



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 29 septembre 2020

AVIS

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

relatif à une demande d'avis scientifique portant sur l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant des impuretés, produits de dégradation et oligomères du TMBPF et du TMBPF-DGE

L'Anses a été saisie le 26 avril 2016 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de la demande suivante : demande d'avis scientifique portant sur l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant des impuretés, produits de dégradation et oligomères du TMBPF et du TMBPF-DGE.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

Le TMBPF est un matériau précurseur utilisé dans la fabrication du comonomère TMBPF-DGE, servant lui-même à la polymérisation de résines époxydes utilisées dans les revêtements de matériaux en contact avec les denrées alimentaires. Plus précisément, la résine époxyde sera utilisée dans les revêtements d'emballages métalliques dédiés à tous types de denrées alimentaires (aqueuses, acides, alcoolisées et contenant des aliments gras).

Au niveau européen, l'ensemble des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires est réglementé par le règlement (CE) n°1935/2004¹. Au sein de l'Union européenne, le règlement (CE) n°1895/2005² a harmonisé les exigences applicables à certains dérivés époxydiques dans les matériaux et objets destinés au contact des denrées alimentaires.

Le BADGE (diglycidyl ether de bisphénol A) est autorisé comme monomère pour fabriquer les vernis époxydiques mis au contact des aliments. Des restrictions d'emploi ont été fixées (limites de migration spécifique LMS) pour le BADGE et ses produits de réaction qui se forment au contact des denrées alimentaires (dérivés d'hydrolyse et dérivés chlorés).

Depuis le 01/01/2015, la loi française n°2012-1442 du 24 décembre 2012, en partie abrogée le 17/09/2015 par la décision n°2015-480 QPC du Conseil constitutionnel, suspend l'importation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de tous conditionnements, contenants ou ustensiles comportant du bisphénol A et destinés à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires. Le BADGE est

¹ Règlement (CE) n° 1935/2004 du Parlement européen et du Conseil du 27 octobre 2004 concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE.

² Règlement (CE) n°1895/2005 du 18 novembre 2005 concernant l'utilisation de certains dérivés époxydiques dans les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

produit à partir du Bisphénol A et les vernis époxydiques à base de BADGE peuvent contenir des résidus de bisphénol A. Par conséquent, les vernis fabriqués à base de BADGE sont soumis aux mesures restrictives de la loi française.

La demande du pétitionnaire se situe donc dans un contexte de substitution du BADGE pour produire des résines époxydiques utilisables en France dans l'industrie alimentaire.

L'Anses a tout d'abord été saisie le 02/06/2015 par la DGCCRF pour la réalisation de l'expertise suivante : « demande d'avis portant sur l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant à leurs impuretés, produits de dégradation et oligomères » (saisine n°2015-SA-0117). Conformément aux lignes directrices en vigueur de l'EFSA et à l'avis du CSHPF du 14 octobre 1997, deux dossiers dédiés au TMBPF et TMBPF-DGE avaient été élaborés par le pétitionnaire et fournis à l'Anses pour évaluation.

Le 17/02/2016, l'Anses a rendu un avis relatif à cette saisine dans lequel elle a conclu qu'en l'absence des données expérimentales ci-dessous, elle n'était pas en mesure de se prononcer sur l'innocuité du TMBPF (utilisé comme précurseur), du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires) et de ses produits de dégradation et oligomères :

- il convient de fournir des données précises concernant la stabilité thermique du TMBPF-DGE (par analyse thermogravimétrique par exemple) ;
- afin de s'assurer de la validité des résultats de migration, il convient de fournir des précisions sur la résistance de la cellule de migration utilisée à de tels niveaux de température ;
- concernant le TMBPF-DGE, la réalisation d'un nouveau test des comètes (ligne directrice OCDE 489) sur l'estomac glandulaire et le pré-estomac après administration orale apparaît nécessaire. Afin de valider les résultats négatifs obtenus sur la moelle osseuse et le foie au cours de l'expérimentation *in vivo* décrite, il convient lors de ce nouveau test d'apporter des preuves d'exposition systémique par voie orale de ces organes, par la réalisation d'un dosage plasmatique du TMBPF-DGE et/ou de ses métabolites. Une détermination des impuretés du TMBPF-DGE utilisé lors de ce test doit également être réalisée ;
- au regard des résultats de migration du TMBPF et des dérivés hydrolysés et chlorés prévisibles du TMBPF-DGE, la génotoxicité de ces composés doit être évaluée sur le plan expérimental ;
- au regard des résultats obtenus au cours de l'étude d'identification et quantification des oligomères migrants dans l'acétonitrile et des usages prévus du vernis, il convient de déterminer les niveaux de migration de ces composés dans les simulants alimentaires réglementaires suivants : acide acétique 3%, éthanol 10% et huile alimentaire (ou milieux de substitution).

En réponse aux interrogations de l'Anses, le pétitionnaire a fourni à l'Agence des données complémentaires. Ces compléments ont été examinés par l'Anses et de nouvelles demandes de compléments d'information ont été transmises au pétitionnaire le 8/11/2016.

Ainsi, cet avis compile l'expertise du GT ESPA concernant les documents fournis par le pétitionnaire suite à la première demande de compléments d'information publiée dans l'avis 2015-SA-0117 et la seconde demande de compléments d'information datant du 8/11/2016.

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

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

L'expertise collective a été réalisée par le GT autonome « Évaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine » (GT ESPA). Les travaux ont été présentés au GT

ESPA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques lors des séances du 17 janvier 2019, 17 octobre 2019, 12 décembre 2019 et du 20 février 2020.

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

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS

Pour rappel, cet avis est un complément de l'avis Anses 2015-SA-0117 et ne constitue pas un avis autoporteur. Dans ce contexte, le lecteur pourra se référer à cet avis afin d'obtenir les premières analyses et conclusions en lien avec l'identification des substances, les niveaux de migration et la caractérisation du danger.

L'analyse du GT se focalise, au sein de cet avis, sur les éléments fournis par le pétitionnaire suite aux deux demandes de compléments d'information formulées par l'Anses.

3.1. Données physico-chimiques

3.1.1. Données relatives à la stabilité thermique du TMBPF-DGE

La documentation complémentaire fournie par le pétitionnaire comporte un rapport sur les propriétés physico-chimiques du TMBPF-DGE, notamment les résultats d'une analyse thermogravimétrique (TGA). La courbe d'analyse TGA du TMBPF-DGE montre une perte de masse significative au-delà de 350°C qui atteint 25% à 384°C (voir figure 1).

Conclusions du GT ESPA

Selon les données de TGA communiquées par le pétitionnaire, le TMBPF-DGE est stable jusqu'à 350°C. Dans le dossier initial, les mesures de température maximales effectuées sur le métal lors du durcissement des résines à base de TMBPF-DGE étaient comprises entre 230°C et 250°C. De plus, la température maximale d'utilisation des vernis à base de TMBPF-DGE au contact des aliments est annoncée par le pétitionnaire à 130°C. Par conséquent, le TMBPF-DGE est stable jusqu'à 350°C dans les conditions de l'étude.

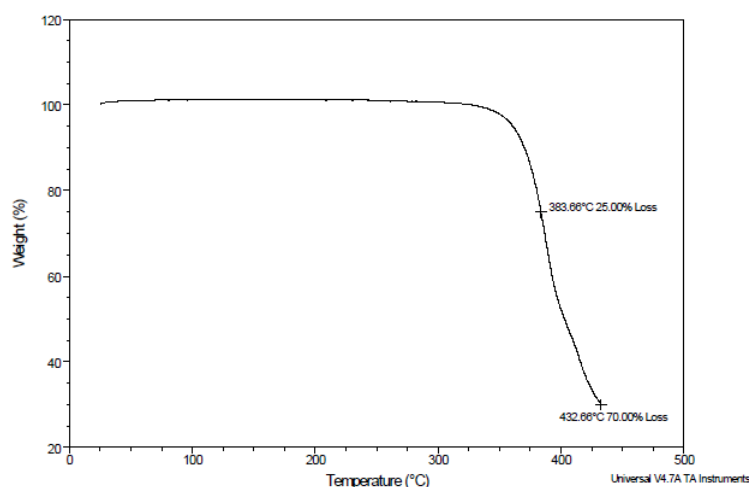


Figure 1 : courbe d'analyse thermogravimétrique du TMBPF-DGE

3.1.2. Précisions sur la résistance de la cellule de migration

Le pétitionnaire a communiqué un courrier d'un laboratoire sous-traitant ainsi que des photographies du modèle de cellule utilisé pour les analyses de migration à hautes températures (130°C).

Les cellules sont en inox V4A (classification allemande équivalente au 316L). Cette nuance d'acier inoxydable contient du molybdène (environ 2%), ce qui rend la cellule très résistante à la corrosion. Le laboratoire sous-traitant déclare que les cellules sont conçues pour résister à des pressions correspondantes à une stérilisation en autoclave à 121°C et à 130°C (pressions comprises entre 210 kPa et 280 kPa). L'étanchéité de la cellule est garantie par un serrage approprié à l'aide d'écrous métalliques de la partie supérieure de la cellule. Cette partie supérieure appuie sur le support métallique revêtu de vernis contre la partie inférieure de la cellule contenant le simulant. Aucun joint de silicone ou autre produit d'étanchéité n'est utilisé. Pour la mise en contact du support métallique revêtu de vernis avec le simulant, les cellules sont retournées dans l'autoclave et durant les phases de contact suivantes à 60°C. Les quantités de simulant récupérées dans les cellules sont périodiquement mesurées avec une solution de formaldéhyde, et l'étanchéité est validée sur la base de données internes au laboratoire qui n'ont pas été communiquées dans le courrier de réponse.

Conclusions du GT ESPA

Les spécifications de la cellule de migration (conception, matériaux, montage des échantillons au contact des simulants) sont adaptées à des mises en contact dans des conditions de stérilisation (température maximale = 130°C et pression maximale = 280 kPa). Le laboratoire contrôle l'étanchéité de ces cellules et indique que celle-ci se situe dans les limites fixées en interne.

3.1.3. Niveaux de migration des oligomères migrant dans les simulants alimentaires réglementaires

Le Tableau 1 synthétise les résultats d'analyse de migration présentés par le pétitionnaire dans le dossier initial et dans les compléments d'information communiqués en réponse aux conclusions de l'avis du 17/02/2016. Conformément à la demande de l'Anses, le pétitionnaire a effectué des analyses supplémentaires visant à identifier et quantifier les oligomères du TMBPF-DGE migrant dans plusieurs simulants prescrits par la réglementation des matières plastiques (acide acétique 3%, éthanol 20% et éthanol 50%). Cependant, le pétitionnaire n'a pas fourni les résultats d'analyse de migration dans les

simulants représentant les aliments gras (huiles végétales ou simulants réglementaires de substitution). En effet, il indique qu'il considère que les résultats obtenus après 24h de contact dans l'acétonitrile à température ambiante constituent un scénario pire cas comparé aux niveaux de migration qui seraient obtenus avec une huile végétale. Dans son avis du 17/02/2016, l'Anses a estimé que l'utilisation de l'acétonitrile comme simulant de substitution à une huile végétale était acceptable en s'appuyant notamment sur une étude de Schaeffer de 2004³. Dans le rapport de cette étude portant sur des vernis époxydiques à base de BADGE et pour les molécules de masse inférieure à 1000 Da, les résultats de migration dans l'acétonitrile à température ambiante sont plus de deux fois supérieurs à ceux obtenus dans l'huile de tournesol portée à 121°C pendant 1h.

³ A Schaefer. Identification and quantification of migrants from can coatings, 2004.

Tableau 1 : résultats d'analyse de migration présentés par le pétitionnaire dans le dossier initial (fond bleu clair) et dans le premier complément d'information (fond orange). Les résultats en gras indiquent les valeurs les plus élevées (pire cas). LC-TOF-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol ; H₂O : hydrolyse ; HCl : hydrochloration ; LOQ : limite de quantification ; Da : Dalton.

| | | Résultats de migration spécifique des NIAS | | | | | | | | | | |
|-------------------|--|--|--|--|--|--|----------------------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------|
| | | Oligomères du TMBPF-DGE | | | | | | Dérivés du TMBPF-DGE (produits de réaction prévisibles H ₂ O et HCl) | | | | |
| | | Substances < 1000 Da détectées par LC-TOF-MS | | Substances détectées et identifiées dans la base de données du pétitionnaire | | Substances identifiées avec fonction oxirane | | TMBPF-DGE.H ₂ O | TMBPF-DGE.2H ₂ O | TMBPF-DGE.2HCl | TMBPF-DGE.H ₂ O.HCl | TMBPF-DGE.HCl |
| Nombre | Quantité > LOQ (µg/6 dm ²) | Nombre | Quantité > LOQ (µg/6 dm ²) | Nombre | Quantité > LOQ (µg/6 dm ²) | Quantité (µg/6 dm ²) | Quantité (µg/6 dm ²) | Quantité (µg/6 dm ²) | Quantité (µg/6 dm ²) | Quantité (µg/6 dm ²) | | |
| Acide acétique 3% | 1h à 121°C | 34 | 399 | 5 | 340 | 1 | 108 | | | | | |
| | 1h à 121°C + 10j à 60°C | 9 | 92 | | | | | | | | | |
| | 0,5h à 130°C | 5 | 261 | 5 | 261 | 1 | 96 | | | | | |
| | 0,5h à 130°C + 10j à 60°C | 4 | 79 | | | | | < 6 | 30 | < 6 | < 6 | |
| Ethanol 10% | 0,5h à 130°C + 10 j à 60°C | | | | | | | < 6 | 60 | 6 | 24 | |
| Ethanol 20% | 1h à 121°C | 300 | 25790 | 12 | 3196 | 5 | 169 | | | | | |
| Ethanol 50% | 1h à 121°C | 300 | 15222 | 12 | 808 | 5 | 273 | | | | | |
| | 0,5h à 130°C + 10j à 60°C | | | | | | | < 6 | 72 | 18 | 42 | |
| Acétonitrile | 24h à T° ambiante | 212 | 9400 | 23 | 1100 | 6 | 471 | 17 | 64 | < 1,5 | | 2,4 |

Le pétitionnaire a testé plusieurs conditions de mise en contact du vernis avec l'acide acétique 3%. Il montre que la majorité des oligomères de moins de 1000 Da a été trouvée après un contact de 1h à 121°C. Il a donc poursuivi son étude dans cette même condition avec l'éthanol à 20% et à 50%. Les résultats d'analyse de migration des substances avec fonction oxirane dans l'acide acétique 3%, l'éthanol 20% et l'éthanol 50% sont inférieurs à ceux précédemment obtenus dans l'acétonitrile après 24h de contact à température ambiante (Tableau 1).

La recherche et la quantification des produits de dégradation et d'hydrolyse n'ont pas été effectuées par le pétitionnaire dans ces simulants, comme requis par l'Anses. A noter que, dans l'éthanol à 20%, des substances, de masse inférieure à 1000 Da et présentes dans la base de données du pétitionnaire, ont été identifiées et détectées à des quantités environ 3 fois supérieures à celles obtenues dans l'acétonitrile. Dans l'éthanol à 50%, les quantités détectées sont moindres mais proches de celles obtenues dans l'acétonitrile. Une partie de ces substances pourrait correspondre à des produits d'hydrolyse mais aucune donnée dans le dossier ne permet d'écarter cette hypothèse. De plus, les analyses de migration réalisées dans l'acide acétique 3%, avec des conditions représentant la stérilisation et le contact de longue durée (1h à 121°C ou 30 min à 130°C + 10j à 60°C), donnent des résultats plus faibles que la stérilisation seule. Ce phénomène n'est pas initialement expliqué par le pétitionnaire mais des hypothèses seront examinées plus loin dans le document.

C'est avec l'acétonitrile comme simulant au contact du vernis, pendant 24h à température ambiante, que sont obtenues les quantités maximales de substances avec fonction oxirane, soit 471 µg/6dm² ou 471 µg/kg d'aliment (pour un rapport de surface de matériau / masse d'aliment égale à 6 dm² / kg).

Conclusions du GT ESPA relatives aux niveaux de migration des oligomères suite à la première demande de compléments d'information

Les éléments fournis par le pétitionnaire n'avaient pas complètement levé le doute quant à la quantité maximale d'oligomères et de produits de dégradation liés au TMBPF-DGE qui pourraient migrer dans les différentes catégories de denrées alimentaires. Dans ce contexte, les éléments listés ci-dessous ont été transmis au pétitionnaire afin qu'il puisse fournir de nouvelles données :

- les quantités de substances avec fonction oxirane, obtenues dans les simulants réglementaires (acide acétique 3%, éthanol 20% et éthanol 50%) après contact avec le vernis, sont plus faibles que celles obtenues dans l'acétonitrile où sont dénombrées 6 substances à hauteur de 471 µg/6dm². Ces résultats indiquent que, dans des conditions acides, une partie des composés à fonction oxirane subit une hydrolyse. Le GT ESPA s'interroge sur l'identité et le devenir des hydrolysats associés à la disparition de certains de ces composés à fonction oxirane. Par conséquent, le GT ESPA réitère sa recommandation d'identifier et de quantifier les produits de dégradation éventuels des composés à fonction oxirane.
- en ce qui concerne le test de migration dans l'acide acétique 3%, le GT ESPA s'étonne du fait que dans des conditions de 1h à 121°C un nombre plus important de composés à fonction oxirane soit généré par rapport aux conditions de 1h à 121°C suivi de 10j à 60°C. Il conviendrait d'expliquer ce phénomène.
- de manière générale, en ce qui concerne les tests de migration, le GT ESPA souhaiterait avoir des informations statistiques plus précises concernant les résultats des niveaux de migration (valeurs minimum et maximum obtenues, écart-types) afin d'avoir une vision de la dispersion des résultats.
- enfin, dans les 4 simulants alimentaires utilisés, 10 substances différentes à fonction oxirane ont été détectées. Il apparaît notamment que l'une de ces substances (oligomère de rapport m/z 478,2355) a été retrouvée dans chacun des simulants alimentaires. Pour cette substance, les niveaux de migration obtenus sont compris entre 108 µg/6dm² dans l'acide acétique à 3% et 216 µg/6dm² dans l'acétonitrile (voir tableau 2). Pour l'ensemble de ces substances à fonction

oxirane, il conviendrait de calculer le niveau d'exposition théorique (NET), et au regard de ce résultat et des lignes directrices existantes de fournir les données permettant d'évaluer la toxicité de chacun de ces composés.

3.1.3.1. Identification et quantification des composés à fonction oxirane

Les composés à fonction oxirane peuvent provenir de différentes sources. Lors de la synthèse du TMBPF-DGE, la réaction entre l'épichlorhydrine et le TMBPF à haute température en présence d'un catalyseur donne un mélange liquide dans lequel le TMBPF-DGE est le composé majoritaire. L'avis de l'Anses du 17/02/2016 fait état de la production de dimères, trimères et tétramères en plus du TMBPF-DGE majoritaire. Lors de la polymérisation servant à obtenir le vernis époxyde, des oligomères du TMBPF-DGE à fonction oxirane peuvent également être formés.

La présence de groupes à fonction oxirane sur les composés formés laisse présager des réactions avec l'eau pour former des diols et des réactions avec l'acide chlorhydrique pour former des dérivés chlorés. Ainsi, à partir des données communiquées lors de la première saisine, le pétitionnaire a fourni des rapports m/z des composés issus de l'analyse par GC/MS qui proviendraient de la réaction des substances à fonction oxirane avec l'eau, l'éthanol ou l'acide acétique 3% (Tableau 2). Il s'agirait d'adduits avec l'eau, l'éthanol et l'acide acétique. Ainsi, considérant leur niveau de migration quantifiable, 6 substances à fonction oxirane (numéro 2, 3, 5, 7, 9, 18 dans le Tableau 2) sont proposées par le pétitionnaire. Les concentrations dans les différents simulants ont été estimées en utilisant le BADGE.H2O comme étalon externe. L'examen comparé des différentes données fournies par le pétitionnaire a mis en évidence 6 autres substances ce qui porte le nombre total de substances à fonction oxirane à 18. Selon le pétitionnaire, l'une des substances n'est pas liée au TMBPF-DGE (substance de rapport m/z 520,3037 référencée n°7 dans le Tableau 2).

Conclusions du GT ESPA relatif à l'identification et la quantification des composés à fonction oxirane

Concernant les produits à fonction oxirane, seules deux molécules sont identifiées (TMBPF-DGE.H2O et TMBPF-DGE + HQ). Pour les autres, les fragments de masse issus d'une analyse par GC/MS ont été exploités par le pétitionnaire pour caractériser chaque substance sans qu'une proposition de structure chimique ne soit présentée. Le GT estime que cette réponse n'est pas suffisante eu égard à la question posée par l'Anses. De plus, le pétitionnaire mentionne 12 substances à fonction oxirane incluant les hydrolysats, au lieu des 18 substances identifiées par les experts du GT sur la base des données fournies. Concernant la quantification, un étalon de BADGE.H2O est utilisé, ce qui est acceptable pour le GT.

Tableau 2 : liste des substances et produits de réaction à fonctions oxirane. AA : acide acétique, EtOH : éthanol, ACN : acétonitrile, NET : niveau d'exposition théorique.

| N° | Rapport m/z | Type Original --> O Adduit --> A | Lié au TMBPF-DGE (Oui ou Non) | Migration dans AA3% en µg/6 dm ² (Vernis A) | Migration dans EtOH en µg/6dm ² (Vernis A) | Migration en milieu gras (ACN) en µg/6dm ² (Vernis A) | Migration en milieu gras (ACN) en µg/6dm ² (Vernis D) | NET en µg/pers/j | Identification |
|----|-------------|----------------------------------|-------------------------------|--|---|--|--|------------------|--|
| 1 | 386,2097 | O | O | 8 | | 51 | | 1,8 | TMBPF-DGE.H2O |
| 2 | 404,2203 | A | O | 48 | | 19 | | 3,7 | ? |
| 3 | 432,2516 | A | O | | 7,4 | | | 0,2 | ? |
| 4 | 478,2358 | O | O | 108 | 169 | 216 | 4,38 | 23,7 | TMBPF-DGE + HQ |
| 5 | 496,2464 | A | O | 20 | 191 | 46 | | 9,0 | ? |
| 6 | 502,2931 | O | O | | | 122 | | 3,1 | ? |
| 7 | 520,3037 | A | N | 145 | 2679 | 107 | | 103,0 | trouvé dans les ingrédients (acide méthacrylique et éther monométhyle de diéthylèneglycol) |
| 8 | 562,3086 | O | O | | | 24 | | 0,6 | ? |
| 9 | 562,3142 | A | O | | | 24 | | 0,6 | ? |
| 10 | 668,3563 | O | O | | | 12 | | 0,3 | ? |
| 11 | 790.4093 | O | O | | | | 1,1 | 1,3 | ? |
| 12 | 830.4016 | O | O | | | | 0,34 | 0,4 | ? |
| 13 | 846.4356 | O | O | | | | 0,15 | 0,2 | ? |
| 14 | 864.4462 | O | O | | | | 0,4 | 0,5 | ? |
| 15 | 956.4720 | O | O | | | | 1,43 | 1,7 | ? |
| 16 | 994.5290 | O | O | | | | 0,13 | 0,2 | ? |
| 17 | 980,5285 | O | O | | | 58 | | 1,5 | ? |
| 18 | 998,5391 | A | O | | 13 | 42 | | 1,5 | ? |

3.1.3.2. Explication relative à la baisse du niveau de migration dans les conditions 1h à 121°C + 10 jours à 60°C comparées à la condition 1h à 121°C

Dans les données communiquées lors de la saisine 2015-SA-0117, les résultats de migration du NIAS de rapport m/z 478,2359 était de 108 µg/6 dm² pour la condition 1h à 121°C et non détectable pour la condition 1h à 121°C + 10j à 60°C.

Le pétitionnaire a répété cette analyse et observe à nouveau une diminution du niveau de migration pour la condition 1h à 121°C + 10j à 60°C, néanmoins cette diminution est moins prononcée qu'au cours de la première expérience au cours de laquelle le NIAS de rapport m/z 478,2359 n'était pas détecté (voir figure 2).

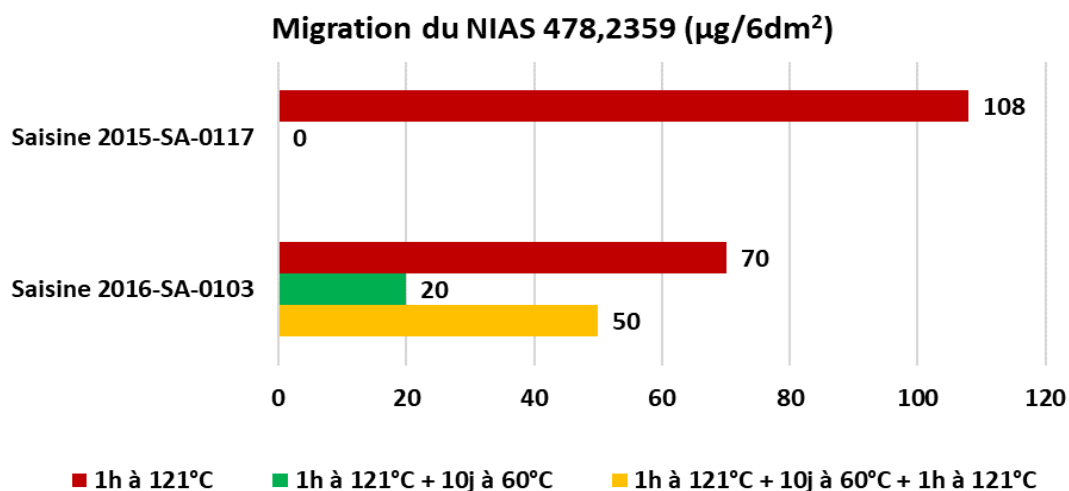


Figure 2 : migration du NIAS de rapport m/z 478,2359 obtenue dans l'acide acétique 3% dans différentes conditions.

Des analyses complémentaires ont été réalisées dans le but de déterminer l'origine de la diminution de la migration pour la condition 1h à 121°C + 10j à 60°C en utilisant des plaques de métal revêtues du vernis A (à base de TMBPF-DGE) dont certaines étaient dopées en BADGE.H2O et en TMBPF-DGE, TMBPF-DGE.H2O et TMBPF-DGE.2H2O. Les plaques vernies ont été exposées à l'acide acétique 3% dans les 6 conditions suivantes :

- 1h à 121°C dans une cocotte-minute
- 1h à 121°C dans une cocotte-minute suivie d'1 jour à 60°C dans une étuve
- 1h à 121°C dans une cocotte-minute suivie de 3 jours à 60°C dans une étuve
- 1h à 121°C dans une cocotte-minute suivie de 5 jours à 60°C dans une étuve
- 1h à 121°C dans une cocotte-minute suivie de 8 jours à 60°C dans une étuve
- 1h à 121°C dans une cocotte-minute suivie de 10 jours à 60°C dans une étuve

La figure 3 représente la stratégie analytique utilisée par le pétitionnaire. Les résultats obtenus par le pétitionnaire (Figure 4) montrent qu'un temps de contact plus long du simulant avec le vernis à 60°C entraîne une réduction du niveau de migration.

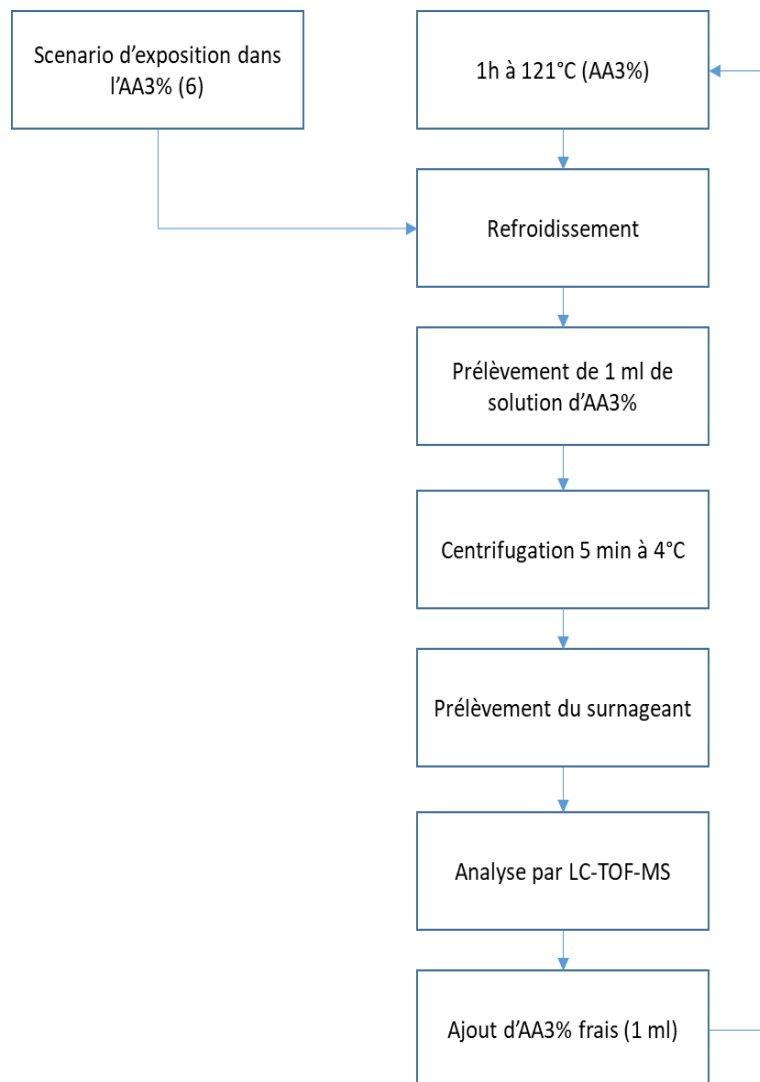


Figure 3 : stratégie analytique utilisée par le pétitionnaire pour expliquer les différences de niveaux de migration obtenus dans les conditions 1h à 121°C et 1h à 121°C + 10 jours à 60°C. AA : acide acétique ; LC-TOF-MS : chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse à temps de vol.

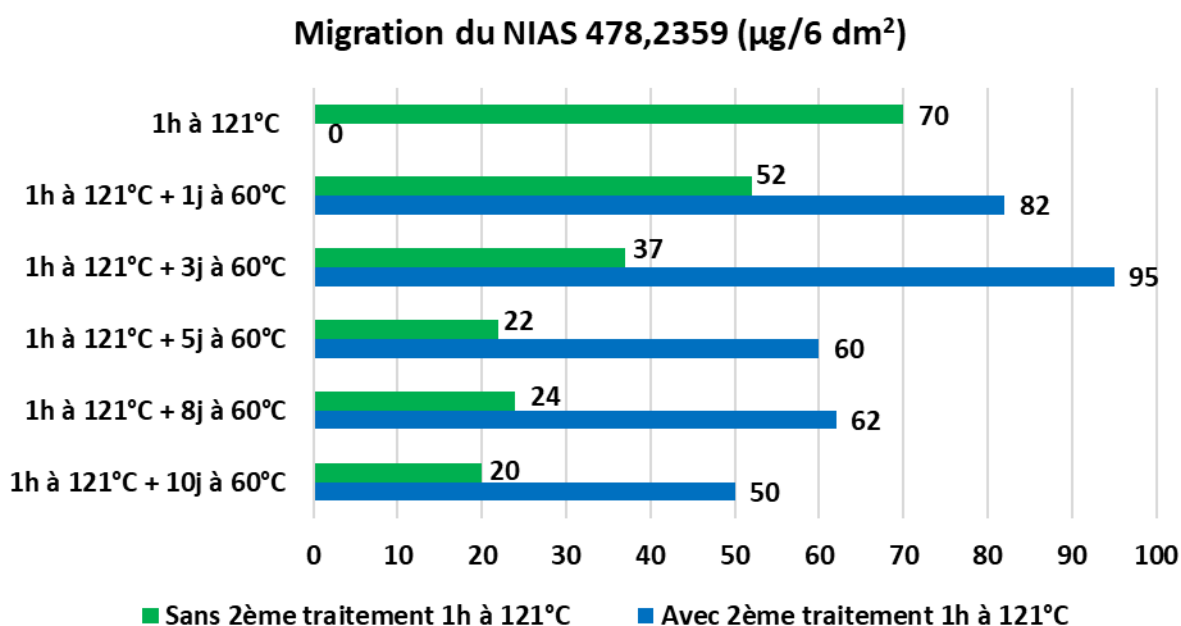


Figure 4 : migration du NIAS de masse 478,2359 en fonction de diverses conditions d'essai, avec et sans second traitement à 121°C pendant 1h.

Afin d'expliquer la diminution de la migration entre 1h à 121°C seul et 1h à 121°C + 10 jours à 60°C, l'hypothèse avancée par le pétitionnaire est que le NIAS de rapport m/z 478,2359 est réabsorbé par le vernis après les 10 jours de contact à 60°C. Le pétitionnaire ajoute que cette hypothèse est confirmée par le fait qu'une ré-augmentation de la migration est constatée lorsque les conditions 1h à 121°C sont appliquées de nouveau après les 10 jours à 60°C.

Conclusions du GT ESPA

L'hypothèse de réabsorption de la substance par le vernis, avancée par le pétitionnaire sur la base des résultats d'analyses complémentaires, n'est pas explicitée (hypothèse possible : changement de l'équilibre en fonction de la température et de la structure du vernis). De plus, aucun des résultats présentés (Figure 4) n'est assorti d'écart-type. Le GT n'est pas convaincu par l'argumentaire du pétitionnaire et souhaite obtenir des éléments sur les phénomènes qui expliqueraient l'hypothèse proposée par le pétitionnaire. Ces éléments permettront de lever l'ambiguïté relative à la robustesse des niveaux de migration mesurés.

3.1.3.3. Informations statistiques sur les analyses de migration

Pour chaque NIAS identifié à partir de la base de données, le pétitionnaire a communiqué pour les données de migration obtenues dans l'acétonitrile, l'éthanol 20 et 50% et l'acide acétique 3% (avec des traitements à 121°C/1h ; 121°C/1h+10j/60°C ; 131°C/30min ; 131°C/30 min+10j/60°C) : les 3 valeurs individuelles, la moyenne, l'écart-type, le coefficient de variation, la valeur minimale et maximale. Le GT a constaté, à l'examen du tableau de données, que certains écarts-types sont très élevés.

Conclusions du GT ESPA

Les données statistiques présentées par le pétitionnaire pour les conditions de migration mentionnées ci-dessus sont recevables.

3.1.3.4. Calcul du NET pour l'ensemble des substances à fonction oxirane

Le TMBPF-DGE étant utilisé dans des vernis appliqués sur des cannettes de boisson, le pétitionnaire propose des calculs de NET à partir des surfaces réelles incluant le corps et le couvercle des cannettes. Le pétitionnaire distingue les deux formulations de vernis à base de TMBPF-DGE selon qu'ils s'appliquent sur le corps ou le couvercle des cannettes : vernis D pour le corps et vernis A pour le couvercle. Les NET ont été calculés à partir de surfaces réelles des cannettes : 0,76 dm² pour le couvercle + 7,1 dm² pour le corps (et non 6 dm² utilisés en théorie). A noter que les résultats de migration pour le vernis D n'étaient pas présents dans le dossier initial et que de nouveaux composés à fonction oxirane ont été pris en compte.

Le pétitionnaire a calculé les NET pour 12 substances mentionnées dans le dossier de départ. L'examen comparé des documents par les experts du GT les a conduits à mettre en évidence 6 autres substances pour lesquelles des NET ont été calculés. Ces substances ont été ajoutées aux 12 substances répertoriées par le pétitionnaire. Le Tableau 2 résume l'ensemble des NET calculés.

Conclusions du GT ESPA

Le pétitionnaire a calculé le NET pour 12 substances à fonction oxirane comparé aux 10 substances présentes dans le dossier initial et pour lesquelles l'Anses avait demandé un complément d'information. Le GT a identifié 6 substances supplémentaires ce qui porte le total de substances à fonction oxirane à 18. Parmi l'ensemble de ces substances, 6 ont un NET inférieur à 0,5 µg/personne/jour, 11 ont un NET compris entre 0,5 et 50 µg/personne/jour. Enfin, une substance présente un NET supérieur à 50 µg/personne/jour (rapport m/z de 520,3037). D'après le pétitionnaire, cette substance n'est pas un produit d'hydrolyse du TMBPF-DGE mais provient de deux ingrédients qui sont le diéthylène glycol monométhyle éther et l'acide méthacrylique. L'acide méthacrylique pourrait correspondre à une substance de départ du copolymère acrylique associé au polymère époxydique. L'usage du diéthylène glycol monométhyle éther n'est pas précisé par le pétitionnaire. Au vu de la valeur du NET, il conviendrait de lever le doute sur la provenance de la substance présentant un rapport m/z de 520,3037 et de fournir les données toxicologiques requises par les lignes directrices.

Au final, le pétitionnaire a bien calculé les NET des substances à fonction oxirane mais 6 substances sont manquantes. Les données toxicologiques requises selon les niveaux de NET ont été évaluées dans les parties relatives à l'expertise toxicologique.

3.2. Données relatives à la toxicologie

3.2.1. Test des comètes *in vivo* sur pré-estomac et estomac glandulaire pour le TMBPF-DGE et preuves d'exposition systémique pour le TMBPF-DGE et ses métabolites

Suite aux recommandations d'effectuer un test des comètes *in vivo* sur pré-estomac et estomac glandulaire pour le TMBPF-DGE, un premier argumentaire a été fourni par le pétitionnaire. En effet, le pétitionnaire a fait savoir que, conformément aux préconisations de l'Anses, le test des comètes sera réalisé sur l'estomac glandulaire. Néanmoins, en raison de l'absence de méthode validée, il ne serait pas possible de mener à bien cette étude sur le pré-estomac.

Le GT estime que la réalisation du test des comètes sur l'estomac glandulaire seul constitue une donnée recevable et suffisante pour mener à bien l'expertise de ce dossier. Ainsi, de nouvelles études de génotoxicité et d'exposition systémique ont été fournies par le pétitionnaire.

L'activité génotoxique *in vivo* du produit TMBPF-DGE (pureté 96,0 %) a été évaluée chez le rat Sprague Dawley mâle traité par voie orale en réalisant le test des comètes (mesure de la fragmentation de l'ADN) vis-à-vis de 4 organes cibles : foie, estomac glandulaire, duodénum et jéjunum. Cette étude a été effectuée conformément à la ligne directrice 489 de l'OCDE et dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire (BPL, telles que révisées en 1997).

➤ Protocole

Le test des comètes a été réalisé par voie orale chez le rat Sprague-Dawley mâle exclusivement (5 animaux/groupe). Le produit a été formulé dans l'huile de maïs et administré sous 10 ml/kg de poids corporel une fois par jour pendant 3 jours consécutifs à 24h d'intervalle, avec un recueil des organes cibles environ 3h après le dernier traitement.

Des essais préalables de toxicité réalisés lors de la précédente étude de génotoxicité avaient permis de déterminer que la dose maximale tolérée (DMT) de TMBPF-DGE par voie orale chez le rat Sprague-Dawley mâle était supérieure à 2000 mg/kg poids corporel/j (N=3).

L'essai principal de génotoxicité a été réalisé à 2000 mg/kg poids corporel/j (N=3) qui correspond à la dose maximale recommandée dans les lignes directrices de l'OCDE, ainsi qu'aux 2 doses inférieures de 500 et 100 mg/kg poids corporel/j (N=3). Les animaux ont été sacrifiés environ 3h après le dernier traitement. Des groupes témoins positifs (Ethyl methanesulfonate à 200 mg/kg poids corporel/j (N=1)) et négatifs ont été inclus dans l'étude principale.

La toxicité a été estimée en déterminant le nombre de "hedgehogs" (cellules très fortement endommagées) sur un total de 150 cellules par animal et l'évaluation de l'activité génotoxique a été réalisée en examinant 150 cellules par animal, soit 750 cellules par groupe.

➤ Résultats du test des comètes

• Formulations

L'analyse de la stabilité et des concentrations des formulations utilisées dans le cadre de cette étude a été effectuée à l'aide d'une méthode analytique validée. La méthode et les résultats sont décrits dans le rapport d'analyse. Celui-ci indique que toutes les formulations de traitement analysées remplissent les critères d'acceptation de 80 – 120% de la concentration nominale avec des résultats variant de 79,9 % à 85,7 %. Le TMBPF-DGE n'a pas été détecté dans l'échantillon témoin analysé.

- Toxicité

Pour rappel, l'essai préliminaire de toxicité avait révélé des signes cliniques jugés compatibles avec le système d'essai à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/j (N=3) qui a été sélectionnée comme dose maximale à tester dans les essais principaux.

- Génotoxicité

Selon le rapport d'étude, le pourcentage de fragmentation spontanée (ADN dans la queue des témoins véhicules) se situe dans l'intervalle des témoins négatifs historiques, et le témoin positif (éthyl méthanesulfonate, 200 mg/kg de poids corporel, N=1) a présenté une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN de la queue par rapport au témoin véhicule, quel que soit l'organe. Ainsi, tous les critères permettant de valider cette étude ont été remplis pour le foie, l'estomac glandulaire, le duodénum et le jéjunum.

Le produit TMBPF-DGE n'a induit aucune augmentation significative du pourcentage d'ADN dans la queue (% Tail DNA) par rapport aux témoins véhicules respectifs, au cours du test des comètes réalisé vis-à-vis du foie, de l'estomac glandulaire, du duodénum et du jéjunum de rats Sprague-Dawley mâles traités.

L'administration de TMBPF-DGE à des doses allant jusqu'à et incluant la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/j n'a pas entraîné d'augmentation significative des dommages primaires à l'ADN dans le foie, l'estomac glandulaire, le duodénum et le jéjunum par rapport aux contrôles véhicules respectifs. Les auteurs ont conclu que le TMBPF-DGE s'est révélé négatif dans le test des comètes *in vivo* réalisé vis-à-vis des 4 organes cibles.

➤ Discussions et interprétations du test des comètes et de l'exposition systémique

- Test des comètes

Le test des comètes vis-à-vis du foie, de l'estomac glandulaire, du duodénum et du jéjunum ainsi réalisé présente de nombreux points forts. Le schéma de traitement/recueil suit les recommandations de la ligne directrice de l'OCDE 489.

Le seul écart par rapport à la ligne directrice de l'OCDE 489 concerne le calcul de la moyenne du pourcentage de Tail DNA pour chaque lame alors que la ligne directrice recommande que la médiane soit déterminée. L'impact de cet écart est considéré comme très faible.

NB : Seuls des rats mâles ont été utilisés étant donné qu'une recherche préalable de toxicité n'a démontré aucune différence entre les 2 sexes. Ceci est réglementairement accepté.

Concernant la toxicité, en se basant sur la fréquence de cellules fortement endommagées (Clouds, hedgehogs), aucune augmentation de leur pourcentage n'a été notée quel que soit l'organe étudié. Il faut néanmoins préciser que le taux spontané de ce type de cellules s'est révélé très élevé pour le duodénum (de 22,3 à 31,8%) ce qui interroge sur la qualité de la méthode d'isolement cellulaire pour cet organe et ce qui diminue la sensibilité de la mesure.

Concernant l'activité génotoxique, les groupes témoins négatifs et positifs se sont situés dans les intervalles des témoins historiques correspondants quel que soit l'organe. Concernant le produit TMBPF-DGE, aucune augmentation statistiquement significative du taux de fragmentation de l'ADN n'a été observée dans les 3 groupes de rats mâles traités aux doses de 2000, 500 et 100 mg/kg de poids corporel/j (N=3) quel que soit l'organe étudié. Les valeurs observées pour les 3 doses et pour les 4 organes étudiés se sont situées dans les gammes des témoins négatifs historiques correspondants.

Néanmoins, certaines gammes de données historiques apparaissent peu acceptables de prime abord :

- pour l'estomac, les témoins négatifs historiques varient de 0,94 à 41,68 % d'ADN dans la queue (95^{ème} percentile de 0 à 21,53 %) ce qui représente une amplitude très importante et surtout une valeur haute qui compromet la sensibilité du test. De plus, les témoins positifs historiques varient de 5,37 à 56,12 % (95^{ème} percentile de 12,73 à 52,23 %) et donc présentent des recouvrements avec les valeurs des témoins négatifs.
- pour le duodénum, le même phénomène est observé dans une moindre mesure avec des témoins négatifs historiques qui varient de 0,11 à 18,40 % et des témoins positifs historiques qui varient de 8,80 à 51,33 %.
- pour le jéjunum, le même phénomène est également observé dans une moindre mesure avec des témoins négatifs historiques qui varient de 0,20 à 19,32 % et des témoins positifs historiques qui varient de 3,79 à 47,0 %.

Or, l'un des critères de positivité est directement lié au positionnement des valeurs obtenues dans les groupes traités par rapport aux valeurs historiques. Avec de telles amplitudes qui se recoupent, la valeur pourrait se situer dans le groupe historique négatif ou dans le groupe historique positif, ce qui peut compromettre l'interprétation.

Néanmoins, dans le cadre de cette étude, la valeur moyenne du groupe témoin négatif estomac est de $3,89 \pm 3,01$ et donc n'appartient qu'au groupe témoin historique négatif (0,94 à 41,68). De la même façon, la valeur moyenne du groupe témoin négatif duodénum est de $4,85 \pm 5,24$ et donc n'appartient qu'au groupe témoin négatif (0,11 à 18,40). Ceci minore donc la problématique du recouvrement des données historiques pour ces 2 organes.

Pour le jéjunum, la valeur moyenne du groupe témoin négatif est de $7,81 \pm 4,23$ et peut donc appartenir au groupe témoin négatif (0,20 à 19,32) ou au groupe témoin positif (3,79 à 47,0). Ceci tronque l'interprétation des données pour cet organe qui ne peut donc pas être validée. Par ailleurs, les auteurs n'évoquent pas qu'un animal du groupe témoin positif estomac et qu'un animal du groupe témoin positif duodénum présentent des valeurs inférieures à leur borne minimale respective des témoins historiques positifs (2,92 vs 5,37-56,12 pour l'estomac et 3,59 vs 8,80-51,33 pour le duodénum).

Enfin, le nombre de cellules fortement endommagées est très élevé pour le groupe témoin négatif duodénum (de 22,3 à 31,8%) ce qui interroge sur la qualité de la méthode d'isolement cellulaire pour cet organe.

- Exposition systémique

Pour répondre à la demande de l'Anses concernant les preuves d'exposition systémique, les résultats d'une étude toxicologique effectuée chez le rat exposé par voie orale pendant 28 jours (lignes directrices de l'OCDE n°422) ont été fournis en première intention. Cette étude démontre les effets toxiques du TMBPF-DGE sur la moelle osseuse dans le groupe à dose élevée (1000 mg/kg poids corporel/j).

Des effets toxiques ont effectivement été notés chez les rats Han Wistar traités à une dose maximale de 1000 mg/kg de poids corporel/j. En effet, lors des analyses histopathologiques, une médullo-toxicité caractérisée par une diminution jusqu'à l'absence des premiers stades de la myélopoïèse et de l'érythropoïèse a été notée. Cependant, comme cela est clairement signifié dans le rapport d'étude correspondant, cet effet a été attribué, avec une forte probabilité, à la déplétion de la moelle osseuse due à une malnutrition et non pas à un effet intrinsèque du TMBPF-DGE. Cet effet n'est donc pas lié à une activité médullo-toxique directe au TMBPF-DGE et n'indique pas une réelle exposition systémique.

Ainsi, en deuxième approche, des échantillons de plasma ont été prélevés 1h après la dernière administration par gavage de 3 rats Sprague-Dawley mâles puis ont été analysés pour détecter la

présence du produit parent (TMBPF-DGE) et de 2 métabolites (le métabolite dihydrolysé, VA-031 et le métabolite dichloré, VA-034).

Le rapport de validation de la méthode et d'analyse est fourni dans le dossier. Ce dernier démontre que le TMBPF-DGE administré oralement est largement métabolisé en l'un de ses principaux métabolites hydrolysés (VA-031) qui a présenté une concentration plasmatique jusqu'à 2800 fois supérieure à celle du TMBPF-DGE. En effet, selon la dose initiale (de 500 à 2000 mg/kg de poids corporel/j), les concentrations du produit parent dans le plasma ont varié entre ~1 et ~31 ppb et les concentrations de VA-031 entre ~2 et ~86 ppm. Ceci démontre la métabolisation du TMBPF-DGE et le passage systémique de son principal métabolite et donc l'exposition du foie (et de la moelle osseuse lors de la précédente étude).

Conclusions du GT ESPA

L'ensemble des résultats obtenus dans le test des comètes *in vivo* (OCDE 489) réalisé chez le rat Sprague-Dawley mâle exposé par voie orale 3 jours consécutifs à des doses allant jusqu'à et incluant la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/j démontre l'absence de potentiel de fragmentation de l'ADN du produit TMBPF-DGE au niveau du foie, de l'estomac glandulaire et du duodénum. Ces résultats sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF-DGE administré par voie orale. Les résultats obtenus pour le jéjunum ne peuvent pas être validés mais cela n'impacte pas la conclusion finale du fait de la présence de résultats valides pour un organe systémique, *i.e.* le foie, et 2 autres organes du tractus gastro-digestif, l'estomac glandulaire et le duodénum. Les analyses plasmatiques démontrent que le TMBPF-DGE administré oralement est largement métabolisé en l'un de ses principaux métabolites hydrolysés (VA-031) qui a présenté des concentrations plasmatiques comprises entre ~2 et ~86 ppm selon la dose initiale (soit jusqu'à 2800 fois supérieure à celle du TMBPF-DGE). Ceci démontre la métabolisation du TMBPF-DGE majoritairement en VA-031, le passage dans la circulation sanguine de ce métabolite principal et l'exposition systémique des animaux. Ces résultats permettent de garantir que les organes systémiques (foie et moelle osseuse) ont été réellement et correctement exposés et donc de valider la pertinence des résultats négatifs obtenus vis-à-vis du foie (et de la moelle osseuse investiguée lors de la précédente étude). En conclusion, ces résultats clairement négatifs sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF-DGE par voie orale.

3.2.2. Données de génotoxicité sur les dérivés hydrolysés et chlorés du TMBPF-DGE

Pour répondre à la demande de l'Anses relative à la génotoxicité des dérivés hydrolysés et chlorés du TMBPF-DGE, le pétitionnaire a fait le choix, dans un premier temps, de s'appuyer sur une approche de type « read across » (lecture croisée) en se basant sur les connaissances disponibles sur le bisphénol A diglycidyl éther (BADGE). Pour ce faire, le pétitionnaire a compilé des données expérimentales ainsi que des données prédictives disponibles sur le BADGE et le TMBPF-DGE. Selon le pétitionnaire, le BADGE et ses sous-produits de réaction constituent les « *pires cas* » par rapport au TMBPF-DGE. Ainsi, le fait qu'aucun potentiel oncogène ne soit présent pour le BADGE et ses chlorhydrines implique qu'il n'y a aucun potentiel oncogène pour le TMBPF-DGE et ses dérivés chlorés et hydrolysés.

Le GT reconnaît que le travail effectué est intéressant en termes de compilation des données existantes et prédictives. Néanmoins, ces données ne permettent pas pour autant d'affirmer que le BADGE et ses chlorhydrines sont les « *pires cas* » par rapport aux molécules analogues dérivées du TMBPF-DGE. Les 2 seuls vrais points de comparaison sur le plan expérimental sont le test d'Ames et le test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse avec la réserve forte de l'absence d'exposition qui relativise la portée et la pertinence d'un résultat négatif. La compilation ne reprend pas non plus tous les résultats potentiellement comparables. Par exemple, si le TMBPF-DGE s'est révélé génotoxique au cours du test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules CHO-WBL aussi bien avec que sans activateur

métabolique, le BADGE a induit une augmentation d'aberrations chromosomiques uniquement en présence d'activation⁴. Cela n'est pas en faveur du classement proposé et dans tous les cas cela démontre des réactivités biologiques qui peuvent être différentes.

En conclusion, compte tenu des niveaux de migration des dérivés hydrolysés et chlorés du TMBPF-DGE obtenus dans les tests de migration (avis 2015-SA-0117), il est nécessaire que la génotoxicité de ces composés soit testée sur le plan expérimental à travers *a minima* deux tests *in vitro* (un test de mutation génique sur bactéries et un test du micronoyau).

Le pétitionnaire a fourni, en seconde approche, les deux tests de génotoxicité *in vitro* mentionnés précédemment.

3.2.2.1. Dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034)

➤ Test d'Ames

- Protocole

L'étude du potentiel mutagène du dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034) (pureté 99,04%) a été conduite avec et sans activation métabolique exogène (S9 de foies de rats traités avec un mélange de phénobarbital/5,6-benzoflavone) sur 4 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537) et sur 1 souche d'*Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101).

Le test a été réalisé conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et en suivant les BPL.

Aucun essai préliminaire de toxicité n'a été réalisé. Le dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034) a été testé en solution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Deux essais indépendants de mutagenèse ont été effectués. Le premier essai a été réalisé en utilisant la méthode standard d'incorporation directe sur boîtes avec 7 doses allant de 5 à 5000 µg/boîte (dose maximale recommandée). Le second essai a été réalisé par la méthode de pré-incubation avec une gamme de 6 doses allant de 15 à 5000 µg/boîte.

Un témoin négatif (DMSO) et des témoins positifs (sans S9 : azide de sodium pour les souches TA100 et TA1535, 9-aminoacridine pour la souche TA1537, 2-nitrofluorène pour la souche TA98, 4-nitroquinoline-1-oxide pour la souche WP2 uvrA/pKM101 ; avec S9 : 2-aminoanthracène pour les souches TA100, TA1535 et WP2 uvrA/pKM101, benzo[a]pyrène pour les souches TA98 et TA1537) ont également été testés.

- Résultats

Aucun signe de toxicité n'a été observé dans les deux essais de mutagenèse. En revanche, des précipités ont été notés pour toutes les souches traitées à la dose de 5000 µg/boîte, dans les deux tests. Dans les 2 essais, aucune augmentation significative du nombre de colonies révertantes comparé à celui du témoin négatif n'a été rapportée, pour aucune des souches testées, avec ou sans activation métabolique.

Conclusions du GT ESPA

Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué selon la ligne directrice de l'OCDE n°471 et en respectant les BPL. Sur le plan méthodologique, 4 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA1535, TA1537, TA98, et TA100) et 1 souche d'*Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101) ont été utilisées.

⁴ Suárez S, Sueiro RA, Garrido J. (2000). Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutat Res.*, 2000, 470, 2: 221-8.

Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'inclure une souche pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN telle que *Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 ou WP2 pKM101.

De plus, la stabilité et l'homogénéité du VA-034 dans le véhicule n'ont pas été déterminées dans le cadre de cette étude, de même que l'analyse de la concentration des solutions de traitement. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation. Toutes les formulations ont été utilisées dans l'heure qui a suivi l'ajout du véhicule à l'élément d'essai. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes. Dans les conditions expérimentales testées, les résultats ne montrent pas de potentiel mutagène du dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034) sur *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, ni sur *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101, avec et sans S9.

➤ Test du micronoyau *in vitro*

- Protocole

Cette étude a été menée afin d'évaluer le potentiel du produit dichloré du TMBPF-DGE (VA-034, pureté 99,04%) à induire la formation de micronoyau dans des lymphocytes du sang périphérique humain (recherche d'effet clastogène/aneugène de la substance).

L'étude est constituée d'une étude préliminaire de toxicité (avec et sans activation métabolique) avec mesure de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) afin de choisir les concentrations pour l'essai principal. L'étude principale porte sur l'analyse de formation de micronoyaux après exposition des lymphocytes au VA-034 à un temps court (3h) avec ou sans système d'activation métabolique exogène (S9 mix) et à un temps long (20h) sans activation métabolique. Le système d'activation métabolique a été préparé à partir de S9 de foies de rats mâles Sprague Dawley traités avec un inducteur enzymatique (mélange de phénobarbital et de 5,6 benzoflavone). Le VA-034 a été testé en solution dans du DMSO, la concentration de ce dernier dans les cultures était de 0,5% v/v. La concentration maximale à laquelle ont été exposées les cellules est de 2000 µg/mL. Cependant, dans toutes les conditions d'exposition, en culture, un précipité a été observé à la concentration de 125 µg et pour les concentrations supérieures. Les témoins positifs utilisés sont la mitomycine C (clastogène sans activation métabolique) à un temps court et long, la cyclophosphamide (clastogène avec activation métabolique) sur un temps court et la colchicine (aneugène) à un temps court sans activation métabolique et à un temps long.

- Résultats

Après 3h de traitement sans S9 mix, les concentrations de VA-034 retenues pour l'analyse des micronoyaux sont 1,97 ; 21,26 et 29,16 µg/mL. Dans ces conditions, le VA-034 n'a pas entraîné d'augmentation statistiquement significative du nombre de cellules binucléées contenant des micronoyaux et le test de tendance montre l'absence d'augmentation liée à la concentration. Les fréquences de micronoyaux observées dans les cellules traitées (à l'exception des cellules traitées avec 29,16 µg/mL) et celles exposées au solvant étaient contenues dans la distribution des données des valeurs témoins historiques du laboratoire.

En ce qui concerne le traitement sur 3h en présence de S9 mix, les concentrations de VA-034 sont de 1,97 ; 21,26 et 36 µg/mL. Il n'a pas été observé avec le VA-034 d'augmentation statistiquement significative du nombre de cellules binucléées contenant des micronoyaux, le test de tendance montre l'absence d'augmentation liée à la concentration et les fréquences de micronoyaux observés dans les

cellules traitées se situent dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire.

Pour le traitement d'une durée de 20h, les concentrations de VA-034 sélectionnées pour analyser les micronoyaux sont de 0,2 ; 3,93 et 7,68 µg/mL. A ce temps, il n'a pas été observé d'augmentation statistiquement significative du nombre de cellules binucléées contenant des micronoyaux avec le VA-034, le test de tendance montre l'absence d'une augmentation liée à la concentration et la fréquence des micronoyaux pour les cellules traitées (à l'exception de celles à 0,2 µg/mL) et celles du témoin solvant sont dans la plage de distribution des données de valeurs des témoins historiques du laboratoire.

Conclusions du GT ESPA

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL. Sur le plan expérimental, il est mentionné que l'échantillon était sous forme d'un solide blanc alors qu'il avait été à l'origine décrit sous forme visqueuse et sans couleur. Un aliquote de l'échantillon a donc été analysé et la pureté a été confirmée montrant que la cristallisation n'impactait pas la pureté. La stabilité et l'homogénéité du VA-034 dans le DMSO n'ont pas été vérifiées mais les solutions ont été préparées extemporanément. Il est aussi précisé que l'analyse de la concentration des solutions de traitement n'a pas été menée dans cette étude. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation. Toutes les formulations ont été utilisées dans les deux heures après l'ajout du DMSO à l'élément d'essai. Ces différents points ne remettent donc pas en cause l'intégrité de l'étude. Par ailleurs, la valeur moyenne de cellules binucléées pour deux conditions de traitements (temps 3h en absence de S9 mix et 20h) est légèrement en dessous (3 au lieu de 3,3 à la plus forte concentration, temps 3h) de l'intervalle de confiance des données de valeurs historiques des témoins solvant et légèrement au-dessus (12 au lieu de 11,5 pour la plus faible concentration, temps 20h) ce qui ne doit pas remettre en cause les critères d'acceptabilité de l'étude. Sur le plan méthodologique, le test du micronoyau a été correctement mené, avec deux temps d'exposition, le DMSO et les témoins positifs des cultures ont été utilisés dans les conditions appropriées. Trois concentrations ont été testées, la concentration maximale testée est cohérente avec les recommandations de la ligne directrice. Les expériences ont été menées sur deux cultures pour les cellules traitées et les témoins positifs et sur quatre cultures pour les témoins solvant.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité du système d'étude (lymphocytes humains) dans ces conditions expérimentales. En conclusion, les résultats ne montrent pas de potentiel clastogène/aneugène du dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034) sur les lymphocytes humains en culture que ce soit avec ou sans activation métabolique.

3.2.2.2. Dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031)

➤ Test d'Ames

- Protocole

Cette étude a été réalisée sur le dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031, pureté 99,5%), avec et sans activation métabolique (S9 de foies de rats traités avec un mélange de phénobarbital/5,6-benzoflavone) sur 4 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537) et sur 1 souche d'*Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101).

Le test a été réalisé conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et dans le respect des principes des BPL.

Aucun essai préliminaire de toxicité n'a été réalisé. Deux essais indépendants de mutagenèse ont été réalisés. Le premier essai a été effectué selon la méthode d'incorporation directe (avec ou sans S9) et le second essai a été réalisé avec la technique de pré-incubation (avec ou sans S9). Le métabolite dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031) a été testé en solution dans du DMSO à la dose maximale de 5000 µg/boîte recommandée dans la ligne directrice de l'OCDE n°471, ainsi qu'aux 6 doses inférieures allant de 5 à 1500 µg/boîte avec ou sans S9 mix.

Un témoin négatif (DMSO) et des témoins positifs (sans S9 : azide de sodium pour les souches TA100 et TA1535, 9-aminoacridine pour la souche TA1537, 2-nitrofluorène pour la souche TA98, 4-nitroquinoline-1-oxide pour la souche WP2 uvrA/pKM101 ; avec S9 : 2-aminoanthracène pour les souches TA100, TA1535 et WP2 uvrA/pKM101, benzo[a]pyrène pour les souches TA98 et TA1537) ont également été inclus dans chaque essai.

- Résultats

Une toxicité (diminution du nombre de colonies révertantes) a été observée pour la souche TA1537 à la dose maximale de 5000 µg/boîte en l'absence de S9, dans le premier essai uniquement. Aucun signe de toxicité pour les autres souches testées n'a été observé dans l'un ou l'autre des tests après exposition au VA-031. Par ailleurs, des précipités ont été observés pour toutes les souches traitées au VA-031 à la dose de 5000 µg/boîte dans les deux essais.

Pour les deux essais, aucune augmentation significative du nombre de colonies révertantes par rapport à celui du témoin négatif n'a été obtenue, pour aucune des souches testées, avec ou sans activation métabolique.

Conclusions du GT ESPA

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et dans le respect des principes des BPL. Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué (2 essais indépendants avec et sans S9, plus de 5 doses testées, triplicat/dose, dose maximale testée recommandée, intervalle entre les doses d'environ une demi-unité logarithmique).

Sur le plan méthodologique, 4 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA1535, TA1537, TA98 et TA100) et 1 souche d'*Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101) ont été utilisées. Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'inclure une souche pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN telle que *Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 ou WP2 pKM101. De plus, la stabilité et l'homogénéité du VA-031 dans le véhicule n'ont pas été déterminées dans le cadre de cette étude, de même que l'analyse de la concentration des solutions de traitement. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation. Toutes les formulations ont été utilisées dans l'heure qui a suivi l'ajout du véhicule à l'élément d'essai. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes.

Les résultats montrent une absence d'activité mutagène du dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031) dans les 2 essais indépendants effectués sur *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, et sur *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101, avec ou sans activation métabolique exogène.

➤ Test du micronoyau *in vitro*

- Protocole

Cette étude a été menée pour évaluer le potentiel du produit dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031, pureté 99,5%) à induire la formation de micronoyaux dans des lymphocytes du sang périphérique humain (recherche d'effet clastogène/aneugène de la substance).

Le test a été réalisé conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 (version révisée en 2016) et dans le respect des principes des BPL.

L'étude est constituée d'une étude préliminaire de toxicité avec et sans activation métabolique (par mesure de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée) pour choisir les concentrations de l'essai principal. L'étude principale porte sur une induction de la formation de micronoyaux dans les lymphocytes. Ces derniers ont été traités avec le VA-031 pendant 3h (temps court) avec ou sans un système d'activation exogène (S9 mix) et 20h (temps long) sans activation métabolique. Le système d'activation métabolique (S9 mix) a été préparé à partir de S9 de foies de rats mâles Sprague Dawley traités avec un inducteur enzymatique (mélange de phénobarbital et de 5,6 benzoflavone). Le VA-031 a été testé en solution dans du DMSO, la concentration finale de DMSO est de 0,5% v/v. La concentration maximale à laquelle ont été exposées les cellules est de 2000 µg/mL mais un précipité a été observé aux concentrations de 1000 µg/mL et aux concentrations supérieures. Les témoins positifs utilisés sont la mitomycine C (clastogène sans activation métabolique) à un temps court et un temps long, la cyclophosphamide (clastogène avec activation métabolique) sur un temps court et la colchicine (aneugène) pour le traitement à un temps court sans activation métabolique et à un temps long.

Pour le temps court, sans activation métabolique, les concentrations de VA-031 sélectionnées pour l'analyse des micronoyaux sont de 30, 240 et 320 µg/mL. Pour le temps court, avec activation métabolique, les concentrations sélectionnées pour l'analyse des micronoyaux sont de 30, 260 et 320 µg/ml. Pour le temps long, les concentrations sélectionnées sont de 0,65; 12,91 et 19,68 µg/mL.

- Résultats

Quels que soient les temps de traitement, avec ou sans activation métabolique, le VA-031 n'a pas modifié de façon statistiquement significative le nombre de cellules binucléées contenant des micronoyaux comparé à celui des cellules n'ayant pas été traitées. De même, le test de tendance montre l'absence d'une augmentation liée à la concentration et les résultats se situent dans la plage de distribution de valeurs des témoins historiques du laboratoire.

Conclusions du GT ESPA

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL.

Sur le plan expérimental, le test du micronoyau a été correctement mené avec deux temps d'exposition dont un temps court avec et sans S9 mix sur des cellules humaines de sang périphérique. Le DMSO et les témoins positifs des cultures ont été utilisés dans les conditions appropriées. Trois concentrations ont été testées avec des cultures dupliquées pour chaque traitement et témoins positifs et quadruplées pour les témoins solvants. La concentration maximale testée est cohérente avec les recommandations de la ligne directrice.

Sur le plan méthodologique, il est précisé que la stabilité et l'homogénéité du VA-031 dans le DMSO n'a pas été vérifiée mais que les solutions ont été préparées extemporanément. Il est aussi précisé que l'analyse de la concentration des solutions de traitement n'a pas été menée dans cette étude. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation, toutes

les formulations ont été utilisées dans les 4h après l'ajout du DMSO à l'élément d'essai. Ces différents points ne remettent donc pas en cause l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux confirmant l'activité du S9 mix et la sensibilité du système d'étude (lymphocytes humains) dans ces conditions expérimentales.

Les résultats ne montrent pas, dans ces conditions expérimentales, de potentiel clastogène/aneugène du dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031) sur les lymphocytes humains en culture que ce soit avec ou sans activation métabolique.

3.2.3. Données de génotoxicité sur le TMBPF

Pour répondre à la demande de l'Anses concernant la génotoxicité du TMBPF, le pétitionnaire a fourni en première intention des données issues de prédictions QSAR. Les données toxicologiques disponibles pour le TMBPF dans le dossier du pétitionnaire étaient incomplètes et majoritairement issues de prédictions basées sur les similarités structure/activité. Il n'était donc pas possible de conclure quant au potentiel mutagène et génotoxique du TMBPF aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Ainsi, il a été demandé au pétitionnaire que le TMBPF soit testé expérimentalement au travers de 2 études *in vitro* de génotoxicité : un test de mutation génique sur bactéries et un test du micronoyau *in vitro*. Le pétitionnaire a fourni les tests de génotoxicité demandé ci-dessus.

➤ Test d'Ames

L'objectif de cette étude est de déterminer le potentiel du TMBPF (pureté 98,16%) et/ou de ses métabolites à induire des mutations reverses au niveau du locus histidine (His) dans les souches de *Salmonella Typhimurium* TA98, TA100, TA1535 et TA1537, et du locus tryptophane (Trp) dans la souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA, en présence ou non d'un système exogène d'activation métabolique (S9 de foies de rats induits par l'arochlor 1254). Le produit a été testé en solution dans du diméthylesulfoxyde (DMSO).

Le test a été réalisé conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et au règlement (CE) n° 440/2008, et en suivant les BPL de l'OCDE.

- Essais préliminaires de toxicité et de solubilité

Un premier essai préliminaire a été réalisé sur les souches TA100 et WP2 uvrA avec une gamme de doses allant de 1,7 à 5000 µg/boîte en utilisant la méthode standard d'incorporation directe sur boîtes, avec et sans S9. Le TMBPF a précipité à des doses ≥ 512 µg/boîte. Une toxicité a été mise en évidence par une diminution du nombre de révertants et une diminution du tapis bactérien aux doses ≥ 512 µg/boîte pour la souche TA100 et aux doses de 1600 et 5000 µg/boîte pour la souche WP2 uvrA.

Comme le TMBPF s'est révélé toxique dans le premier essai, un second essai a été effectué avec les souches TA100 et WP2 uvrA par la méthode de pré-incubation (avec ou sans S9). Le TMBPF a été testé à des concentrations allant jusqu'à 1600 µg/boîte et un précipité a été observé aux doses de 512 et 1600 µg/boîte dans les 2 souches bactériennes. De plus, une bactériostase (diminution du tapis bactérien) a été observée sur la souche TA100 aux doses de 512 et 164 µg/boîte, avec et sans S9 mix, respectivement. Pour la souche WP2 uvrA, aucune toxicité n'a été observée.

- Essais principaux de mutagenèse

L'étude principale de mutagenèse a été réalisée avec 2 essais indépendants. Le TMBPF a d'abord été testé jusqu'à des concentrations de 1600 µg/boîte par la technique d'incorporation directe (avec ou sans S9). Un précipité a été observé aux doses de 512 et 1600 µg/boîte dans les souches TA1535, TA1537 et TA98 avec et sans activation métabolique (et à 164 µg/boîte pour la souche TA1537 avec S9).

Dans le second essai réalisé par la méthode de pré-incubation, le TMBPF a été testé jusqu'à des concentrations de 1600 µg/boîte (avec ou sans S9). Un précipité et une toxicité ont été observés aux doses de 512 et 1600 µg/boîte dans les souches TA1535, TA1537 et TA98 (avec ou sans S9).

Un témoin négatif (DMSO) et des témoins positifs (sans S9 : azide de sodium pour la souche TA1535, ICR-191 pour la souche TA1537, 2-nitrofluorène pour les souches TA1537 et TA98, méthyl méthane sulfonate pour la souche TA100, 4-nitroquinoline N-oxide pour la souche WP2 uvrA ; avec S9 : 2-aminoanthracène pour toutes les souches) ont également été testés.

- Résultats

Dans toutes les conditions testées, le TMBPF n'a pas induit d'augmentation significative du nombre de colonies révertantes (His+) dans chacune des quatre souches de *Salmonella* Typhimurium testées TA1535, TA1537, TA98 et TA100, et du nombre de colonies révertantes (Trp+) dans la souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA, en présence ou en absence d'activation métabolique.

Conclusions du GT ESPA

Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué (2 essais indépendants avec et sans S9, plus de 5 doses testées, triplicat/dose, dose maximale testée, intervalle entre les doses d'environ une demi-unité logarithmique). Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et au règlement (CE) n° 440/2008, et effectuée en suivant les BPL.

Sur le plan méthodologique, les 4 souches de *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98, et TA100 et la souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA ont été utilisées. Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'utiliser une souche proficiente en réparation de l'ADN (*Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 pKM101). De plus, certaines informations sont manquantes (données de stabilité et d'homogénéité de l'élément d'essai dans le véhicule, contrôles des concentrations dans les solutions de traitement). Néanmoins, il est mentionné dans le rapport d'étude que la préparation du TMBPF a été effectuée selon des procédures approuvées et documentées en détail. L'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation et toutes les formulations ont été utilisées dans les 4h suivant l'ajout du véhicule au TMBPF. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Tous les contrôles positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes.

Les résultats ne montrent aucune augmentation significative de la fréquence des révertants après traitement avec le TMBPF, quelle que soit la souche, en absence ou en présence d'activation métabolique, pour les 2 essais indépendants. Sur la base des résultats de cette étude, le TMBPF est considéré comme non mutagène dans le test de mutation reverse sur *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, et sur *Escherichia coli* WP2 uvrA.

➤ Test du micronoyau *in vitro*

Cette étude a été menée pour évaluer le potentiel du TMBPF (pureté 99,7%) à induire des micronoyaux dans des lymphocytes du sang périphérique humain (recherche d'effet clastogène/aneugène de la substance).

Le test a été réalisé conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 (version révisée en 2016) et dans le respect des principes des BPL.

Le TMBPF a été dilué dans du DMSO (DMSO utilisé à une concentration finale de 1% v/v dans les cultures). Une étude de cytotoxicité avec et sans activation métabolique permettant de choisir la gamme de concentrations pour l'étude portant sur une induction de micronoyaux a été menée. Les lymphocytes

ont été exposés au TMBPF pendant 3h (temps court) avec ou sans système d'activation exogène (S9 mix) et 24h (temps long) sans activation métabolique. Le système d'activation métabolique (S9 mix) a été préparé à partir de S9 de foies de rats mâles Sprague Dawley traités avec un inducteur enzymatique (mélange de phénobarbital et de 5,6 benzoflavone). Les témoins positifs utilisés sont la mitomycine C (clastogène sans activation métabolique) pour le traitement à un temps court et long, la cyclophosphamide (clastogène avec activation métabolique) sur le temps court et la colchicine (aneugène) pour le traitement à un temps court et long.

- Résultats

Dans la première expérimentation à un temps court (3h), les concentrations retenues pour l'analyse des micronoyaux des cellules exposées au TMBPF sont de 20, 80 et 100 µg/ml sans S9 mix et de 10, 100 et 110 µg/ml en présence de S9 mix.

Dans ces conditions, le TMBPF augmente de façon significative le nombre de cellules mono et binucléées contenant des micronoyaux en présence et en absence de S9 mix avec un effet dose dans le cas des cellules binucléées.

Pour l'analyse des micronoyaux sur le temps long (24h), les concentrations en TMBPF sélectionnées sont de 0,5 ; 5 et 7,5 µg/ml. Les résultats obtenus montrent un effet dose et une augmentation statistiquement significative de la fréquence de micronoyaux dans les cellules mono et binucléées.

Conclusions du GT ESPA

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL.

Sur le plan méthodologique, certaines informations sont manquantes : les données sur la stabilité du TMBPF dans le DMSO, les données d'homogénéité de l'élément d'essai dans le solvant et le contrôle des concentrations dans les solutions de traitement. Cependant, il est mentionné dans le rapport d'étude que la préparation du TMBPF a été effectuée selon des procédures approuvées et documentées en détail. L'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation et toutes les formulations ont été fraîchement préparées et utilisées dans les 2h après la préparation.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux (dans la plage de distribution des données des valeurs des témoins positifs historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité du système d'essai (lymphocytes humains) dans ces conditions expérimentales. Tous les critères d'acceptabilité sont réunis dans cette étude.

Dans les conditions expérimentales de cette étude, les résultats montrent clairement et de façon statistiquement significative que le TMBPF induit une augmentation, avec un effet dose, des micronoyaux dans les lymphocytes humains en absence et en présence d'activation métabolique et aux deux temps d'exposition. Le nombre de cellules mono et binucléées contenant des micronoyaux dans les cultures traitées entrent dans la plage de distribution des données des valeurs des témoins positifs historiques du laboratoire. Les critères permettent de conclure au potentiel clastogène/aneugène *in vitro* du TMBPF.

➤ **Test des comètes *in vivo***

L'activité génotoxique *in vivo* du produit TMBPF (pureté 99,0 %) a été évaluée chez le rat Sprague Dawley mâle traité par voie orale en réalisant le test des comètes (mesure de la fragmentation de l'ADN) vis-à-vis de 4 organes cibles : foie, estomac glandulaire, duodénum et jéjunum. Cette étude a été effectuée conformément à la ligne directrice 489 de l'OCDE et dans le respect des BPL.

- Protocole

Le test des comètes a été réalisé par voie orale chez le rat Sprague-Dawley mâle exclusivement (5 animaux/groupe). Le produit a été formulé dans l'huile de maïs et administré à 10 ml/kg de poids corporel une fois par jour pendant 3 jours consécutifs à 24h d'intervalle, avec un recueil des organes cibles 3h ± 30 minutes après le dernier traitement.

Les doses testées se sont appuyées sur les résultats d'une étude de 90 jours chez le rat exposé au TMBPF via l'alimentation et avec une période de récupération de 28 jours. Cette étude a permis de déterminer que la dose sans effet nocif observé (DSENO) du TMBPF par voie orale chez le rat était de 750 et 1000 mg/kg de poids corporel/jour, respectivement pour les rats femelles et mâles. Étant donné que le traitement était limité à 3 jours dans l'étude des comètes, aucune mortalité ou signe clinique majeur de toxicité n'était attendue à 2000 mg/kg de poids corporel/jour. L'essai principal de génotoxicité a ainsi été réalisé à 2000 mg/kg de poids corporel/j (N=3), qui correspond à la dose maximale recommandée dans la ligne directrice de l'OCDE 489, ainsi qu'aux 2 doses inférieures de 1000 et 500 mg/kg de poids corporel/j (N=3). Des groupes témoins positifs (Ethyl methanesulfonate à 200 mg/kg de poids corporel/j (N=1)) et négatifs ont été inclus dans l'étude principale.

Les animaux ont été sacrifiés 3h ± 30 minutes après le dernier traitement.

La toxicité a également été estimée en déterminant le nombre de "hedgehogs" (cellules très fortement endommagées) sur un total de 150 cellules/animal et l'évaluation de l'activité génotoxique a été réalisée en examinant 150 cellules/animal, soit 750 cellules / groupe.

- Résultats

L'analyse de la stabilité et des concentrations des formulations utilisées dans le cadre de cette étude a été effectuée à l'aide d'une méthode analytique validée. La méthode et les résultats sont décrits dans le rapport d'analyse. Celui-ci indique que toutes les formulations de traitement analysées remplissent les critères d'acceptation de 80 – 120% de la concentration nominale avec des résultats variant de 98 % à 91,25 % selon la dose initiale. Le TMBPF n'a pas été détecté dans l'échantillon témoin analysé.

Pour rappel, aucun essai préliminaire de toxicité n'a été réalisé mais la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/j (N=3) sélectionnée comme dose maximale à tester dans l'essai principal n'a entraîné aucune mortalité.

Selon le rapport d'étude, les pourcentages d'ADN dans la queue pour les groupes témoins véhicule se situent dans les intervalles de confiance à 95% des témoins négatifs historiques correspondant à chaque organe et le témoin positif (éthylméthanesulfonate, EMS, 200 mg/kg de poids corporel/j) a présenté une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN de la queue par rapport au témoin véhicule, quel que soit l'organe. Ainsi, tous les critères permettant de valider cette étude ont été remplis pour le foie, l'estomac glandulaire, le duodénum et le jéjunum.

Dans les conditions de l'étude, le test des comètes s'est révélé négatif dans le foie, le duodénum et le jéjunum de rats Sprague-Dawley mâles ayant reçu du TMBPF. Concernant l'estomac, une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue par rapport au groupe témoin après l'administration de 1000 mg/kg de poids corporel/jour de TMBPF, accompagné d'un test de tendance positif, a été notée. Le pourcentage de la valeur de l'ADN de la queue pour le groupe 1000 mg/kg de poids corporel/jour ayant reçu la dose positive se situait à l'intérieur, mais à l'extrémité supérieure, des données historiques du laboratoire ($20,09 \pm 0,78$ vs $8,94-20,55$). Ce résultat a été qualifié « d'équivoque ».

D'après les auteurs, l'augmentation relativement faible des dommages à l'ADN uniquement dans le groupe dose moyenne est probablement due à la cytotoxicité et ne reflète pas une réelle génotoxicité.

Globalement, les auteurs ont considéré que l'administration de TMBPF à des doses allant jusqu'à et incluant la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/jour n'a pas entraîné d'augmentation significative des dommages primaires à l'ADN dans le foie, le duodénum et le jéjunum par rapport aux contrôles véhicule respectifs. L'effet cytopathique de l'exposition au TMBPF révélé par l'histopathologie suggère que l'augmentation relativement faible des dommages à l'ADN seulement dans le groupe dose moyenne est probablement liée à la cytotoxicité et ne reflète pas de génotoxicité.

- Discussion et interprétation des résultats

Le test des comètes vis-à-vis du foie, de l'estomac glandulaire, du duodénum et du jéjunum ainsi réalisé présente de nombreux points forts. Le schéma de traitement/recueil suit les recommandations des lignes directrices de l'OCDE 489.

Le seul écart par rapport à cette ligne directrice concerne le jéjunum pour lequel aucune donnée historique positive n'est présentée. Cela constitue une déviation majeure par rapport à la ligne directrice qui indique que le laboratoire doit faire la preuve de sa compétence pour chaque tissu de chaque espèce qu'il prévoit d'étudier. Il doit démontrer qu'une réponse positive acceptable peut être obtenue avec un mutagène connu sur ces tissus et mettre en place une base de données historiques établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour les tissus et espèces étudiés.

NB : Seuls des rats mâles ont été utilisés étant donné qu'une recherche préalable de toxicité n'a démontré aucune différence entre les 2 sexes. Ceci est réglementairement accepté.

Concernant la toxicité, en se basant sur la fréquence de cellules fortement endommagées (« Clouds », « Hedgehogs »), aucune augmentation significative de leur pourcentage n'a été notée quel que soit l'organe étudié.

Concernant l'interprétation de l'activité génotoxique, les groupes témoins négatifs et positifs se sont situés dans les intervalles des témoins historiques correspondants quel que soit l'organe. Il faut noter que pour le duodénum, l'augmentation du « % Tail DNA » dans le groupe témoin positif n'est pas statistiquement significative. Néanmoins, la valeur moyenne ($17,61 \pm 1,83\%$) est bien incluse dans la gamme historique.

Concernant le TMBPF, aucune augmentation statistiquement significative du taux de fragmentation de l'ADN vis-à-vis du foie, du duodénum et du jéjunum n'a été observée dans les 3 groupes de rats mâles traités aux doses de 2000, 1000 et 500 mg/kg de poids corporel/j (N=3). Les valeurs observées pour les 3 doses et pour les 3 organes sont situées dans les gammes des témoins négatifs historiques correspondantes. Il faut noter que les gammes de données historiques apparaissent peu acceptables de prime abord pour le foie, avec des témoins négatifs historiques qui varient de 0,06 à 13,91% (95^{ème} percentile de 0 à 12,28 %) alors que les témoins positifs historiques varient de 6,39 à 41,04% (95^{ème} percentile de 10,20 à 39,57 %) et présentent donc des recouvrements avec les valeurs des témoins négatifs. Néanmoins, dans le cadre de cette étude, la valeur moyenne du groupe témoin négatif pour le foie est de $3,28 \pm 0,47\%$ et n'appartient donc qu'au groupe témoin historique négatif. Ceci minore donc la problématique du recouvrement des données historiques pour ces 2 organes.

Cependant, pour l'estomac, une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue a été notée par rapport au groupe témoin après l'administration de 1000 mg/kg de poids corporel/jour de TMBPF, accompagné d'un test de tendance positif. Le pourcentage de la valeur de l'ADN de la queue pour le groupe 1000 mg/kg de poids corporel/jour se situait à l'intérieur mais à l'extrémité supérieure des données historiques négatives du laboratoire (20,09 vs 8,94 – 20,55).

D'après les auteurs, étant donné son classement comme corrosif/irritant de catégorie 2 pour la peau, il est probable que des concentrations élevées de TMBPF puissent entraîner une toxicité aiguë au niveau d'un site de contact direct. Ainsi, après l'administration orale de TMBPF, une cytotoxicité excessive dans l'estomac pourrait entraîner la desquamation des cellules épithéliales fortement endommagées. Ceci

pourrait même expliquer le pourcentage d'ADN de la queue mesuré inférieur chez les animaux du groupe ayant reçu la dose la plus élevée comparativement au groupe ayant reçu la dose moyenne. Pour évaluer la signification biologique d'un résultat équivoque, des informations sur la cytotoxicité pour le tissu cible sont nécessaires. Dans le cas présent, une évaluation histo-pathologique de l'estomac glandulaire a été effectuée.

L'évaluation histo-pathologique de l'estomac glandulaire montre des signes d'élimination (perte de cellules épithéliales) décelés chez 4 des 5 animaux dans les groupes recevant les doses moyennes et la dose forte et chez 2 des 5 animaux dans le groupe recevant la faible dose contre aucun animal pour le groupe de référence. L'incidence des observations pathologiques chez les rats traités est assez élevée, bien qu'elle n'ait pas montré une relation dose-effet claire. La perte de cellules épithéliales s'est accompagnée d'autres résultats indiquant une nécrose ou des changements dégénératifs.

Ainsi, d'après le rapport d'histopathologie, l'élimination (perte) de cellules épithéliales de la partie fundique et/ou pylorique de l'estomac n'a été observée que chez des animaux traités par le TMBPF. Dans les zones affectées, une augmentation d'agrégats de débris cellulaires caractérisée par un cytoplasme hyper éosinophile avec ou sans noyau intact a été notée. En l'absence d'infiltrat inflammatoire, ces observations suggèrent un effet cytopathique (sub)aigu.

Parallèlement, il n'y a pas réellement d'augmentation du pourcentage de cellules fortement endommagées (« hedgehogs »), avec des valeurs moyennes de $15,9 \pm 3,4$ % (valeurs minimales et maximales de 4,0 et 23,3%) pour le groupe témoin négatif et des valeurs moyennes de $20,3 \pm 6,1$ % (valeurs minimales et maximales de 10,7 et 44,0%) pour le groupe traité à 1000 mg/kg de poids corporel/j (N=3). Néanmoins, le pourcentage de cellules fortement endommagées n'est pas nécessairement un bon reflet de toxicité (en l'occurrence dans cette étude, le pourcentage d'ADN de la queue mesuré chez les animaux du groupe de la dose forte de 2000 mg/kg de poids corporel/j est inférieur à celui observé à 1000 mg/kg de poids corporel/j (N=3) ce qui tend à démontrer une toxicité locale qui n'est pas traduite par une augmentation du nombre de « hedgehogs »).

D'après la ligne directrice de l'OCDE 489, lorsque des résultats positifs ou équivoques sont observés uniquement en présence de signes clairs de cytotoxicité, on conclura à une étude équivoque pour ce qui est de la génotoxicité, à moins de disposer d'informations suffisantes pour permettre une conclusion définitive. Les informations disponibles sont :

- une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue à 1000 mg/kg de poids corporel/jour de TMBPF, accompagné d'un test de tendance positif (avec un pourcentage de la valeur de l'ADN de la queue à la limite de la borne haute des données historiques du laboratoire) ;
- le classement comme corrosif/irritant de catégorie 2 pour la peau ;
- des observations histopathologiques suggérant un effet cytopathique (sub)aigu du TMBPF vis-à-vis de l'estomac glandulaire ;
- pas de réelle augmentation du pourcentage de cellules fortement endommagées (« hedgehogs ») à la dose moyenne de 1000 mg/kg de poids corporel/j qui n'est pas nécessairement un bon reflet de toxicité ;
- un résultat clairement négatif pour l'organe adjacent, le duodénum.

Ainsi, il apparaît probable que des concentrations élevées de TMBPF puissent entraîner une toxicité aiguë au niveau d'un site de contact direct tel que l'estomac glandulaire, ce qui permet de conclure que l'augmentation du pourcentage de fragmentation de l'ADN observée uniquement à la dose intermédiaire est exclusivement dû à l'interférence de la toxicité directe locale du TMBPF. Le TMBPF ne présente donc pas d'activité génotoxique intrinsèque vis-à-vis de l'estomac glandulaire.

Dans le cadre de la présente étude, des échantillons de plasma ont été prélevés 1h et 3h après la dernière administration par gavage de 5 rats Sprague-Dawley mâles puis ont été analysés pour détecter la présence du TMBPF. Les concentrations plasmatiques moyennes chez les animaux exposés 3 jours consécutifs montrent une augmentation substantielle de la concentration plasmatique de TMBPF chez les rats ayant reçu l'article d'essai à des intervalles de 1h et 3h, ce qui confirme l'exposition systémique dans les groupes traités. Les concentrations plasmatiques de TMBPF se sont révélées plus faibles chez les animaux du groupe dose forte de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour comparativement à celles mesurées chez les animaux des groupes 500 et 1 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Conclusions du GT ESPA

L'ensemble des résultats obtenus dans le test des comètes *in vivo* (OCDE 489) réalisé chez le rat Sprague-Dawley mâle exposé par voie orale 3 jours consécutifs à des doses allant jusqu'à et incluant la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/jour démontre l'absence de potentiel de fragmentation de l'ADN du TMBPF au niveau du foie et du duodénum. Ces résultats sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF administré par voie orale pour ces 2 organes.

Concernant l'exposition systémique, l'analyse des échantillons de plasma prélevés à 1 h et 3 h après la dernière administration par gavage de rats Sprague-Dawley mâles montre que le TMBPF administré oralement présente des concentrations plasmatiques modérées, entre ~1 et ~2 µg/mL. Ceci démontre néanmoins son passage dans la circulation sanguine et l'exposition systémique des animaux permettant ainsi de garantir que le foie a été réellement exposé.

Les résultats obtenus pour le jéjunum ne peuvent pas être validés mais cela n'impacte pas la conclusion finale puisque l'on dispose de résultats valides pour un organe systémique, *i.e.* le foie, et 2 autres organes du tractus gastro-digestif, l'estomac glandulaire et le duodénum.

Concernant l'estomac glandulaire, une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue accompagnée d'un test de tendance positif a été notée pour le groupe traité à 1000 mg/kg de poids corporel/jour de TMBPF par rapport au groupe témoin négatif. Le pourcentage de la valeur de l'ADN dans la queue correspondante s'est montré très proche de la borne supérieure des données historiques négatives du laboratoire et ce résultat a été considéré comme équivoque dans un premier temps. L'évaluation histo-pathologique de l'estomac glandulaire montre une élimination (perte) de cellules épithéliales de la partie fundique et/ou pylorique de l'estomac chez des animaux traités par le TMBPF. Dans les zones affectées, une augmentation d'agrégats de débris cellulaires caractérisée par un cytoplasme hyper éosinophile avec ou sans noyau intact a été notée. En absence d'infiltrat inflammatoire, ces observations suggèrent un effet cytopathique (sub)aigu.

D'après la ligne directrice de l'OCDE 489, lorsque des résultats positifs ou équivoques sont observés uniquement en présence de signes clairs de cytotoxicité, on conclura à une étude équivoque pour ce qui est de la génotoxicité, à moins de disposer d'informations suffisantes pour permettre une conclusion définitive. D'après les informations disponibles, il apparaît probable que des concentrations élevées de TMBPF puissent entraîner une toxicité aiguë au niveau d'un site de contact direct tel que l'estomac glandulaire, ce qui permet de conclure que l'augmentation du pourcentage de fragmentation de l'ADN observée uniquement à la dose intermédiaire est exclusivement dû à l'interférence de la toxicité directe locale du TMBPF. Le TMBPF ne présente donc pas d'activité génotoxique intrinsèque vis-à-vis de l'estomac glandulaire.

En conclusion, ces résultats sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF par voie orale vis-à-vis du foie, de l'estomac glandulaire et du duodénum.

3.2.4. Données de génotoxicité sur les composés à fonction oxirane identifiés

D'après l'expertise des données physico-chimiques, 18 composés à fonction oxirane ont été répertoriés par le GT (12 composés seulement ont été répertoriés par le pétitionnaire). Le Niveau d'Exposition Théorique (NET) a été calculé pour chacun d'entre eux.

Conformément à l'avis du CSHPF du 09/12/1997, le NET conditionne le nombre et le type d'études toxicologiques à fournir :

- pour 6 des composés, le NET < 0,5 µg/personne/j : le pétitionnaire doit fournir des données QSAR.
- Pour 11 des composés, le NET est compris entre 0,5 et 50 µg/personne/jour : le pétitionnaire doit fournir un test de mutation génique sur bactéries et un test du micronoyau sur cellules de mammifères.
- Pour 1 composé, le NET est compris entre 50 et 5000 µg/personne/jour : le pétitionnaire doit fournir 2 tests de génotoxicité *in vitro*, une étude de toxicité subchronique de 90 jours par voie orale avec réversibilité et des données de bioaccumulation chez l'Homme.

Le pétitionnaire n'a fourni des données toxicologiques (cf ci-dessous) que pour le TMBPF-DGE-HQ dont le NET est de 23,66 µg/personne/jour.

Des données toxicologiques sont donc manquantes pour les 17 autres composés. D'après le récent document de l'EFSA relatif à l'évaluation de la génotoxicité des mélanges de produits chimiques⁵, le GT préconise de suivre les recommandations issues du panel d'experts de l'EFSA :

« If a mixture contains, besides chemically identified substances, a substantial fraction of chemical substances that have not been chemically identified, the Scientific Committee recommends that, first, the chemically identified substances be assessed individually for their potential genotoxicity, using all available information, including read across and QSAR considerations about their genotoxic potential.

If none of the identified chemical substances in a mixture raises concern for genotoxicity, the genotoxic potential of the unidentified fraction should also be evaluated to complete the assessment of the mixture. Experimental testing of the unidentified fraction should be considered as the first option or, if this is not feasible and a scientific justification is provided, testing of the whole mixture should be undertaken, following the Scientific Committee guidance for individual chemical substances ».

➤ Test d'Ames

- Protocole

L'étude du potentiel mutagène du TMBPF-DGE-HQ (pureté 98,70%) a été conduite avec et sans activation métabolique exogène (S9 de foies de rats induits par l'arochlor 1254) sur 4 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537) et sur 1 souche d'*Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101) par la méthode d'incorporation directe en boîte.

Le test a été réalisé conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et en suivant les BPL.

Aucun essai préliminaire de toxicité n'a été réalisé, seul un essai de mutagenèse a été effectué. Le TMBPF-DGE-HQ a été testé en solution dans du DMSO à la dose maximale recommandée de 5000 µg/boîte ainsi qu'aux 7 doses inférieures allant de 1,6 à 1600 µg/boîte, avec ou sans S9 mix.

⁵ EFSA Journal 2019;17(1):5519, 11pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5519>

Des témoins positifs spécifiques des souches (sans S9 : azide de sodium pour les souches TA1535 et TA100, 9-aminoacridine.HCl pour la souche TA1537, nitrofluorène pour la souche TA98, bichromate de potassium pour la souche WP2 uvrA/pKM101 ; avec S9 : 2-aminoanthracène pour toutes les souches) et un témoin négatif (solvant) ont été inclus lors de l'essai.

- Résultats

Un précipité a été observé aux doses ≥ 500 µg/boîte pour les cinq souches bactériennes, en présence et en absence d'activation métabolique. De même, une activité toxique (diminution du tapis bactérien) a été mise en évidence pour les 4 souches de *Salmonella* Typhimurium à la dose de 1600 µg/boîte avec S9 et à la dose de 500 µg/boîte sans S9. Aucun effet toxique n'a été observé pour la souche *Escherichia coli*. Aucune augmentation significative du nombre de colonies révertantes (His+ ou Trp+) n'a été observée avec l'une des 5 souches bactériennes utilisées, en présence ou en absence d'activation métabolique.

Conclusions du GT ESPA

Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué selon la ligne directrice OCDE n°471 et en suivant les BPL.

Sur le plan méthodologique, 4 souches de *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98, et TA100 et la souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101 ont été utilisées. Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'inclure une souche pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN telle que *Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 ou WP2 pKM101. Par ailleurs, aucune analyse de la stabilité de l'élément d'essai dans les formulations ou dilutions testées n'a été effectuée étant donné que les solutions ont été préparées extemporanément et utilisées dans les 3h. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Tous les contrôles positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes.

Les résultats ne mettent en évidence aucune augmentation significative de la fréquence des révertants quelle que soit la souche, en absence ou en présence d'activation métabolique. Le TMBPF-DGE-HQ montre donc une absence de potentiel mutagène sur système bactérien (*Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, et sur *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101).

➤ Test du micronoyau *in vitro*

- Protocole

Une étude a été menée pour évaluer la capacité du TMBPF-DGE-HQ (pureté 98,7%) à induire la formation de micronoyaux en utilisant des lymphocytes isolés du sang périphérique humain (recherche d'effet clastogène/aneugène de la substance).

Le test a été réalisé conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 (version révisée en 2016) et dans le respect des principes des BPL.

L'étude a été menée à deux temps de traitement : 3h (temps court) avec ou sans activation métabolique et sur un temps long (24h) sans activation métabolique. La concentration maximale de TMBPF-DGE-HQ testée quels que soient les traitements était de 250 µg/ml. La cytostase a été déterminée par mesure de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI). Le système d'activation métabolique (S9 mix) a été préparé à partir de S9 de foies de rats mâles Sprague Dawley

traités avec un inducteur enzymatique (arochlor 1254). Pour tous les traitements, le DMSO a été utilisé comme solvant à la concentration finale de 1%.

Les témoins positifs utilisés sont la mitomycine C (clastogène sans activation métabolique) au temps court et long, la cyclophosphamide (clastogène avec activation métabolique) sur le temps court et la colchicine (aneugène) pour le traitement au temps long.

- Résultats

Concernant les traitements courts, la cytotoxicité observée était inférieure à 30% aux concentrations pour lesquelles un précipité est observé. Après addition de la substance au milieu de culture dans le test initial, un précipité a été observé à la concentration de 166,7 µg/ml et aux concentrations supérieures. A la fin du traitement, un précipité a été observé aux concentrations de 166,7 µg/ml et supérieures (sans activation métabolique) et à 250 µg/ml en présence de S9 mix.

Les doses finales testées pour analyser la présence de micronoyaux variaient, pour le temps court avec activation métabolique, de 111,1 à 250 µg/mL, pour le temps court sans activation métabolique de 74,1 à 166,7 µg/mL et pour le temps long de 1,3 à 14,6 µg/mL.

Conclusions du GT ESPA

Sur le plan expérimental, le test du micronoyau a été correctement mené selon la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL.

Le test a été effectué avec deux temps d'exposition : un temps court avec et sans activation métabolique (S9 mix) et un temps long sur des lymphocytes humains isolés du sang périphérique avec trois concentrations testées. La concentration maximale testée est cohérente avec les recommandations de la ligne directrice 487. Concernant l'analyse de la formulation, Il est précisé que les données sur la stabilité du TMBPF-DGE-HQ en dilutions ou dans les solutions ne sont pas fournies mais que les solutions ont été extemporanément préparées le jour de l'expérimentation et utilisées dans les 2h. Ce point ne remet donc pas en cause l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux (les résultats sont dans la plage de distribution des données des valeurs des témoins positifs historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9 mix et la sensibilité du système d'étude (lymphocytes humains) dans ces conditions expérimentales.

Le TMBPF-DGE-HQ, avec les critères d'acceptabilité de l'essai remplis, n'induit pas, quelles que soient les concentrations testées, une augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux dans les lymphocytes humains en présence ou en absence de S9 mix et dans les conditions utilisées. Les critères permettant de conclure à l'absence de potentiel clastogène/aneugène du TMBPF-DGE-HQ sont remplis.

3.3. Conclusions générales du GT ESPA

Le GT ESPA n'est pas en mesure de conclure sur cette demande pour les raisons explicitées ci-dessous.

3.3.1. Conclusions relatives aux données physico-chimiques

Le pétitionnaire n'a pas apporté toutes les réponses souhaitées aux questions posées par l'Anses concernant les données physico-chimiques de la saisine. Des incertitudes demeurent sur plusieurs points :

- toutes les substances à fonction oxirane caractérisées par leurs rapports charge/masse (m/z) n'ont pas été identifiées ;
- l'hypothèse de la diminution de la migration d'une substance à fonction oxirane par une réabsorption du vernis après une longue durée de contact à 60°C n'est pas convaincante (différence de taux de migration entre les analyses répétées, absence d'écart-types pour les mesures, pas d'explication sur les phénomènes mis en jeu) ;
- les NET ont été calculés pour 12 substances à fonction oxirane alors que 18 substances ont été répertoriées dans les documents fournis par le pétitionnaire.

Pour conclure, le GT n'est pas en mesure d'apporter une conclusion définitive à la partie physico-chimique de cette saisine sans obtenir des données ou explications complémentaires pour les éléments cités ci-dessus.

3.3.2. Conclusions relatives aux données toxicologiques

L'expertise des données concernant la génotoxicité du TMBPF, du TMBPF-DGE, des dérivés dichlorés et dihydrolysés du TMBPF-DGE et du TMBPF-DGE-HQ a été réalisée sur la base des rapports d'étude fournis par le pétitionnaire. Ce dernier a fourni les éléments demandés sauf dans le cas des composés à fonction oxirane. L'ensemble des tests a été effectué conformément aux lignes directrices de l'OCDE en vigueur au moment de leur réalisation et en suivant les bonnes pratiques de laboratoire.

Après examen des données par le GT, il apparaît que :

- le TMBPF :
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames) ;
 - possède un potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau) ;
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vivo* (test des comètes *in vivo* avec preuve d'exposition systémique des animaux).
- le TMBPF-DGE :
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vivo* (test des comètes *in vivo* avec preuve d'exposition systémique des animaux).
- le dérivé dichloré du TMBPF-DGE
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames)
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau)
- le dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames) ;
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau).
- le TMBPF-DGE-HQ
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames) ;

- ne possède pas de potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau).

Concernant les NIAS, 18 composés ont été identifiés. Le NET calculé pour chacun d'entre eux indique que des données *in silico* ou *in vitro* et/ou *in vivo* sont nécessaires. Seules des données pour le TMBPF-DGE-HQ ont été fournies par le pétitionnaire. Des données toxicologiques sont donc manquantes pour les 17 autres substances. D'après le récent document de l'EFSA relatif à l'évaluation de la génotoxicité des mélanges de produits chimiques⁶, il est recommandé de mettre en place l'approche suivante « *If a mixture contains, besides chemically identified substances, a substantial fraction of chemical substances that have not been chemically identified, the Scientific Committee recommends that, first, the chemically identified substances be assessed individually for their potential genotoxicity, using all available information, including read across and QSAR considerations about their genotoxic potential.*

If none of the identified chemical substances in a mixture raises concern for genotoxicity, the genotoxic potential of the unidentified fraction should also be evaluated to complete the assessment of the mixture. Experimental testing of the unidentified fraction should be considered as the first option or, if this is not feasible and a scientific justification is provided, testing of the whole mixture should be undertaken, following the Scientific Committee guidance for individual chemical substances ».

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses a été saisie par la DGCCRF pour évaluer l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF et du TMBPF-DGE utilisés respectivement comme précurseur et monomère de résine de type époxyde au contact de denrées alimentaires. En tant que matériaux au contact des aliments, ils sont soumis au règlement européen CE n°1935/2004 qui énonce les exigences essentielles de sécurité auxquelles ils doivent répondre, parmi lesquelles le respect du principe d'inertie. Ce règlement stipule que la démonstration du respect de ces exigences relève de la responsabilité des metteurs en marché. Aussi, l'agence précise que le travail d'expertise mené dans le cadre du présent avis et de celui associé du 17 février 2016 ne constitue pas un préalable réglementaire à la mise sur le marché de ces produits et ne se substitue pas aux responsabilités confiées par les textes.

Pour mener le travail d'expertise, le collectif d'experts mandaté par l'Anses a examiné les éléments de dossiers successivement transmis par le metteur en marché en s'appuyant principalement sur les requis du référentiel européen « Note for guidance for Food Contact Materials » de l'EFSA du 30 juillet 2008 relative à la constitution des dossiers.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du GT ESPA.

Comme la lecture de ces conclusions le fait apparaître, les éléments fournis par le requérant ont permis de conclure, en matière de toxicologie, pour le TMBPF, le TMBPF-DGE, le dérivé dichloré du TMBPF-DGE, le composé dihydrolysé du TMBPF-DGE et le TMBPF-DGE-HQ. Ces conclusions concernent donc le précurseur et le monomère ainsi que certains dérivés. Ces dérivés font partie des substances appelées NIAS (substances ajoutées non intentionnellement) qui sont à identifier et caractériser suite aux essais de migration en vue de vérifier l'innocuité des substances relarguées par des matériaux au contact des aliments. L'application des lignes directrices relatives à la constitution des dossiers explicite, en fonction des niveaux de migration observés, les requis toxicologiques à fournir pour aboutir à cette démonstration. L'analyse par les experts du GT ESPA des éléments transmis par le metteur en marché

⁶ EFSA Journal 2019;17(1):5519, 11pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5519>

dans le dossier initial puis dans les compléments d'information subséquents à la publication de l'avis de l'Anses en 2016 les a conduits à identifier des NIAS dont la caractérisation du danger n'est pas couverte par les éléments fournis.

Ces données manquantes relatives à la toxicologie et quelques éléments relatifs à la physico-chimie sont précisés dans le présent avis. L'indisponibilité de ces données n'a pas permis au GT de conclure sur l'innocuité globale des substances faisant l'objet de cette demande dans le cadre d'un usage relatif à la formulation de matériaux au contact des denrées alimentaires.

Les éléments manquants aux experts pour formuler une telle conclusion pourront faire l'objet d'un examen dans le cadre d'une saisine ultérieure dès lors que l'Agence aura été saisie à cet effet par la DGCCRF.

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

MCD, TMBPF, TMBPF-DGE, Vernis

FCM, TMBPF, TMBPF-DGE, Varnish

BIBLIOGRAPHIE

Avis Anses 2015-SA-0117 relatif à l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant à leurs impuretés, produits de dégradation et oligomères du TMBPF et du TMBPF-DGE.

EFSA Scientific Committee, More S, Bampidis V, Benford D, Boesten J, Bragard C, Halldorsson T, Hernandez-Jerez A, Hougaard-Bennekou S, Koutsoumanis K, Naegeli H, Nielsen SS, Schrenk D, Silano V, Turck D, Younes M, Aquilina G, Crebelli R, Gürtler R, Hirsch-Ernst KI, Mosesso P, Nielsen E, Solecki R, Carfi M, Martino C, Maurici D, Parra Morte J and Schlatter J, 2019. Statement on the genotoxicity assessment of chemical mixtures. EFSA Journal 2019;17(1):5519,11pp.