

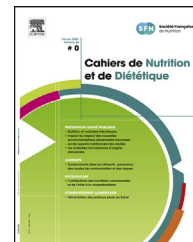


Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



TOXICOLOGIE

Stratégie pour une sécurité chimique intégrée des matériaux d'emballage au contact des denrées alimentaires



Integrated chemical safety assessment of food contact articles

Isabelle Severin^{a,*}, Laurence Dahbi^a,
Sandra Domenek^{b,c}, Phuong-Mai Nguyen^d,
Anne Platel^e, Olivier Vitrac^{b,c},
Marie Christine Chagnon^a

^a Inserm U1231, Derttech "Packtox", NUTOX, université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

^b AgroParisTech, INRAE, UMR Sayfood, université Paris-Saclay, 91120 Palaiseau, France

^c Paris-Saclay Food and Bioproduct Engineering Research Unit, 91744 Massy, France

^d Laboratoire national d'essais, 78190 Trappes, France

^e CHU de Lille, University Lille, ULR 4483–IMPECS–IMPact de l'environnement chimique sur la santé, institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France

Reçu le 8 septembre 2022 ; accepté le 8 décembre 2022

Disponible sur Internet le 5 janvier 2023

MOTS CLÉS

Emballages au contact des denrées alimentaires ;
Biotests ;
Substances non intentionnelles ;
Techniques analytiques ;
Mélanges

Résumé L'évaluation des risques des Substances Non Intentionnelles (SNI), présentes dans les emballages au contact des denrées alimentaires et susceptibles de migrer dans les aliments, représente un défi majeur pour les conditionneurs, les industriels de l'agroalimentaire, les évaluateurs et les gestionnaires du risque. Une stratégie, consistant à combiner des outils analytiques à des études *in silico* et *in vitro*, permettant l'identification du danger dans un mélange complexe (extrait/migrat d'emballage), est présentée dans cet article. L'objectif est d'éviter la présence dans l'aliment de substances indésirables, non caractérisées d'un point de vue chimique, voire inconnues. Cette approche semble d'autant plus indispensable et pertinente dans un contexte d'économie circulaire où la part des matériaux biosourcés, réutilisables et recyclés va considérablement augmenter dans les prochaines années, la traçabilité de ces nouveaux matériaux étant, pour la plupart, à ce jour, difficile.

© 2022 Société française de nutrition. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : isabelle.severin@agrosupdijon.fr (I. Severin).

KEYWORDS

Food contact materials;
Bioassays;
Non-intentionally added substances;
Analytical techniques;
Mixture

Summary Risk assessment of Non-Intentionally Added Substances (NIAS) present in food contact packaging that may migrate into food is a major challenge for food packagers and manufacturers and for risk assessors and managers. A strategy, consisting of combining analytical tools, *in silico* and *in vitro* studies, allowing the identification of the hazard in a complex mixture (packaging extract/migrate), is presented in this article. The aim is to avoid the presence of undesirable, chemically uncharacterised or unknown substances in food. This approach appears all the more essential and relevant in a circular economy context, where the share of bio-based, reusable and recycled materials will increase considerably in the coming years. To date, traceability of these new materials is, for the most part, difficult.

© 2022 Société française de nutrition. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Les emballages des produits alimentaires sont fabriqués à partir de quatre matériaux principaux, à savoir le plastique (37 %), le carton (34 %), le verre (11 %) et les métaux (aluminium et acier) (6 %), ainsi que 10 % d'autres matériaux (bois, cires, lièges...), respectivement, selon leur répartition en volume de production. Ces matériaux ont pour but d'assurer la protection et la conservation du produit, le stockage, la vente et le transport des denrées alimentaires, ainsi que la communication et le marketing liés à la marque et à la réglementation concernant l'étiquetage et la traçabilité. À côté de ces fonctions « bénéfiques », l'emballage peut, néanmoins, présenter un danger pour le consommateur du fait de l'existence d'interactions contenu/contenant qui ont lieu, quel que soit le matériau utilisé, et en particulier du fait que des substances chimiques peuvent être « cédées » par l'emballage au contact des aliments ; c'est le phénomène de migration [1].

Plus de 12 000 substances individuelles ont été répertoriées comme pouvant être utilisées pour la fabrication des Matériaux au Contact des Denrées Alimentaires (MCDA) [2]. Or, les MCDA doivent répondre à l'article 3 (principe d'inertie) du règlement cadre européen (CE) n° 1935/2004 [3], qui souligne que, entre autres, « les matériaux et objets doivent être fabriqués conformément aux bonnes pratiques de fabrication afin que, dans les conditions normales ou prévisibles de leur emploi, ils ne puissent pas céder des constituants dans une quantité dangereuse pour la santé humaine ». À titre d'exemple, lors de la fabrication d'un emballage plastique, des substances de départ (monomères, additifs...) peuvent être utilisées dès lors qu'une évaluation du risque a été menée préalablement à leur autorisation ; ce sont les Substances Intentionnelles (SI). Ces substances autorisées sont alors listées avec des conditions d'utilisation, et avec des restrictions d'emploi pour certaines, afin de protéger la santé du consommateur (annexe 1 du Règlement (UE) n° 10/2011 [4]).

Cependant, lors du procédé de fabrication de l'emballage ou lors de post-traitements (conditionnement, micro-onde...), des réactions chimiques ou de dégradation peuvent se produire, entraînant l'apparition de nouvelles substances non prévisibles, souvent difficiles à identifier et pour lesquelles aucune donnée toxicologique n'est disponible. Ce sont les Substances Non Intentionnelles (SNI). Les SNI peuvent représenter une large part de l'ensemble des substances qui migrent dans l'aliment [5–7] et Mc Combie et al. (2020) en ont identifié entre 30 000 et 100 000 [8]. La contamination de l'aliment et le risque sanitaire associé peuvent être alors sous-évalués du fait de la présence de ces SNI.

Bien que le règlement 10/2011 sur les matières plastiques soit le seul à exiger de s'assurer du risque sanitaire des SNI, tous les emballages sont concernés par leur présence, y compris les matériaux biosourcés, réutilisables et recyclés, et qui seront de plus en plus présents sur le marché dans le contexte de l'économie circulaire. D'après plusieurs publications, ces matériaux réutilisés et recyclables seraient même davantage contaminés que les matériaux vierges [9,10].

Les réglementations sur l'économie circulaire (directive européenne (UE) 2019/904, loi AGECE n° 2020-105) [11,12], incitant les États à réduire la quantité d'emballages ainsi qu'à augmenter le recyclage et la réutilisation, obligent les industriels à s'interroger sur la conformité de ces nouveaux emballages qui doivent être de même qualité sanitaire que les matériaux vierges.

Le rapport 2015/2259/(INI) du Parlement européen concernant les MCDA [13] souligne des lacunes dans la réglementation, notamment en termes de sécurité sanitaire, mentionnant que les effets combinés et le produit fini n'étaient pas assez pris en compte : « il convient d'encourager l'utilisation des biotests comme mesure prédictive facultative visant à garantir la sécurité des MCDA chimiquement complexes, et aussi les recherches sur le développement des deux systèmes de tests, analytiques et toxicologiques, afin de garantir des évaluations de la sécurité des MCDA robustes et économiques, dans l'intérêt des consommateurs, de l'environnement et des fabricants ». Le récent rapport de la Commission européenne souligne aussi le besoin d'utiliser des biotests pour l'évaluation des substances non identifiées dans les MCDA susceptibles de migrer dans les aliments [14].

Cependant, contrairement aux SI, et même si le règlement (UE) n° 10/2011 impose une évaluation du risque des SNI au même titre que les SI uniquement pour les matériaux plastiques, celle-ci reste difficile. Il n'y a pas de ligne directrice harmonisée pour une évaluation du risque appropriée, et l'approche classique basée sur l'identification et la quantification des substances présentes dans un migrat, et leur évaluation toxicologique n'est pas concevable à cause des contraintes de temps et de coûts. De plus, sur le plan technique, l'analyse chimique d'un extrait/migrat est rarement exhaustive [15–17].

Les SNI : une problématique complexe

Pour identifier les substances présentes dans les MCDA, une étape de migration (mimant les conditions de contact avec l'aliment) ou d'extraction (maximisant le phénomène de migration) est réalisée, puis différentes techniques analytiques (HPLC-MS ou GC-MS), ciblées ou non, peuvent être

utilisées. Ces analyses permettent de détecter un maximum de substances présentes (chromatogramme avec une « forêt de pics »), mais elles ne permettent pas toujours, ni de les identifier, ni de les quantifier ; ces substances se retrouvant parfois à l'état de trace [18–20]. De plus, les techniques analytiques ne permettent pas de savoir si ces substances présentent un danger. L'utilisation de méthodes alternatives, notamment les outils *in silico* QSAR (relation quantitative structure/activité), ou l'application d'un seuil de préoccupation toxicologique (*Threshold of Toxicological Concern* ou TTC) pour prédire le risque, est impossible si ces SNI ne sont pas précisément caractérisées chimiquement et quantifiées. L'application du seuil de détection analytique de 10 ppb est discutable pour les SNI dans la mesure où ce n'est pas un seuil de sécurité, à moins de démontrer que ces SNI ne sont pas des substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR) [17,21]. De même, pour pouvoir étudier une SNI avec la batterie de tests réglementaires *in vitro*, souvent une synthèse est nécessaire et donc une caractérisation chimique précise doit être réalisée en amont.

De plus, les SI et les SNI se retrouvent en mélange dans un extrait ou un migrat et la question d'un éventuel effet « cocktail » se pose, comme cela a fréquemment été identifié avec les perturbateurs endocriniens [22,23] ou avec des substances génotoxiques [24]. Cet effet mélange est une problématique à laquelle les toxicologues doivent faire face afin de mener une évaluation du risque sanitaire pertinente des substances chimiques, comme c'est déjà le cas avec les pesticides [25].

Les biotests : des outils incontournables

L'utilisation de tests réalisés sur des modèles biologiques *in vitro* (bactéries, cellules en culture...), dits « biotests », est une stratégie complémentaire aux analyses chimiques pour étudier le danger lié à la présence de SNI non identifiées et indésirables dans un extrait/migrat. Ces biotests permettent d'identifier un potentiel effet toxique du mélange. L'autorité européenne de sécurité des aliments [26] reconnaît l'utilité d'évaluer la génotoxicité des mélanges complexes quand la totalité des composés ne peuvent pas être identifiés individuellement.

Pour lever les incertitudes liées à la présence de SNI indésirables dans les aliments, ILSI Europe a publié un rapport concernant des recommandations pour leur évaluation du risque en proposant notamment une stratégie couplant les méthodes de chimie analytique ciblées et/ou non ciblées et l'utilisation de biotests *in vitro* [17,19]. Les cibles toxicologiques (cytotoxicité/génotoxicité et perturbation endocrinienne) retenues répondent à la notion de faible exposition, comme c'est le cas pour les substances relarguées par les MCDA.

Ainsi, l'utilisation de biotests présente l'avantage, en complément de l'analyse chimique, d'être une approche pragmatique à faible coût, rapide et robuste pour identifier les substances préoccupantes dans les emballages finis (incluant les différents matériaux, les colles et adhésifs, les encres...) et donc de définir les priorités pour des investigations ultérieures en matière de sécurité sanitaire, mais aussi d'innovation. Cette approche fait l'objet de travaux de recherche depuis plusieurs années et de discussions dans des groupes de travail, lors de sessions particulières dans des congrès ou des forums (ILSI, *Food Packaging Forum*). Appliqués tôt dans le développement de nouveaux emballages, les biotests peuvent jouer un rôle important pour

une conception efficace et sûre de nouveaux matériaux d'emballage (mise en œuvre de l'approche *Safe By Design*).

Des améliorations encore nécessaires

Dans le cas particulier de mélanges complexes comme les extraits de MCDA, l'utilisation des biotests présente encore des limites [16,21] (Fig. 1).

Extraction/migration

Pour pouvoir étudier au mieux, avec des biotests, la toxicité de l'ensemble des substances capables de migrer des MCDA, l'extraction est une étape importante, car elle conditionne la nature, le nombre et la quantité de substances qui seront testées ; cette étape doit être représentative d'un « worst case » (pire cas, équivalent à une migration totale). Pour cela, les solvants utilisés ont pour but de maximiser le nombre de substances extraites (iso-octane, acétonitrile...).

Pour une exposition plus réaliste, des essais de migration peuvent aussi être réalisées, comme demandées par le règlement plastique (UE) n° 10/2011, en utilisant des simulants alimentaires comme l'éthanol à 10 % pour les denrées alimentaires aqueuses, l'acide acétique à 3 % pour celles acides, l'éthanol à 20 % pour celles en milieu alcoolique, l'éthanol à 50 % pour les produits laitiers, l'huile végétale de composition spécifique en acides gras pour les aliments gras et l'oxyde de poly(2,6-diphényl-p-phénylène) (Tenax®) pour les aliments secs. Ces solvants peuvent être substitués par d'autres solvants s'il a été démontré scientifiquement que le substitut surestime la migration par rapport aux simulants réglementés.

Les conditions d'extraction varient aussi en termes de durée, de température de contact et de ratio surface/volume selon le matériau analysé. Par exemple, la migration des papiers-cartons est un processus bien plus rapide que celle des plastiques, une des conditions préconisées dans le règlement (UE) n° 10/2011 (10 jours à 40 °C) ne serait pas optimale et il serait préférable de se baser sur les recommandations de la FDA (2007) de 24 h à 40 °C [27]. D'autre part, le rapport « surface d'emballage sur volume de solvant » doit aussi être déterminé afin d'obtenir, par la suite, le facteur de concentration le plus élevé. En général, un rapport correspondant à au moins 20 dm² par litre de solvant doit être choisi [21].

Préparation de l'échantillon

Le solvant de l'échantillon doit être compatible avec le milieu de culture utilisé pour les biotests. Une étape d'évaporation à sec du solvant d'extraction est parfois nécessaire pour reprendre l'extrait dans un solvant biocompatible. En effet, la plupart des solvants organiques utilisés pour l'extraction ne sont pas biocompatibles, car cytotoxiques. Les solvants candidats sont donc le plus souvent l'eau pour le contact aqueux et l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde (DMSO), généralement utilisés à 1 % (concentration finale dans le milieu de culture non cytotoxique la plus élevée pour la plupart des lignées cellulaires) pour le contact gras. Ainsi, une étape de concentration des extraits, d'un facteur de 100 à 1000, est nécessaire pour tenir compte de la dilution ultérieure du solvant dans le milieu de culture.

Wagner et Oehlman (2011) [28] ont démontré que des techniques de préparation d'échantillons inappropriées

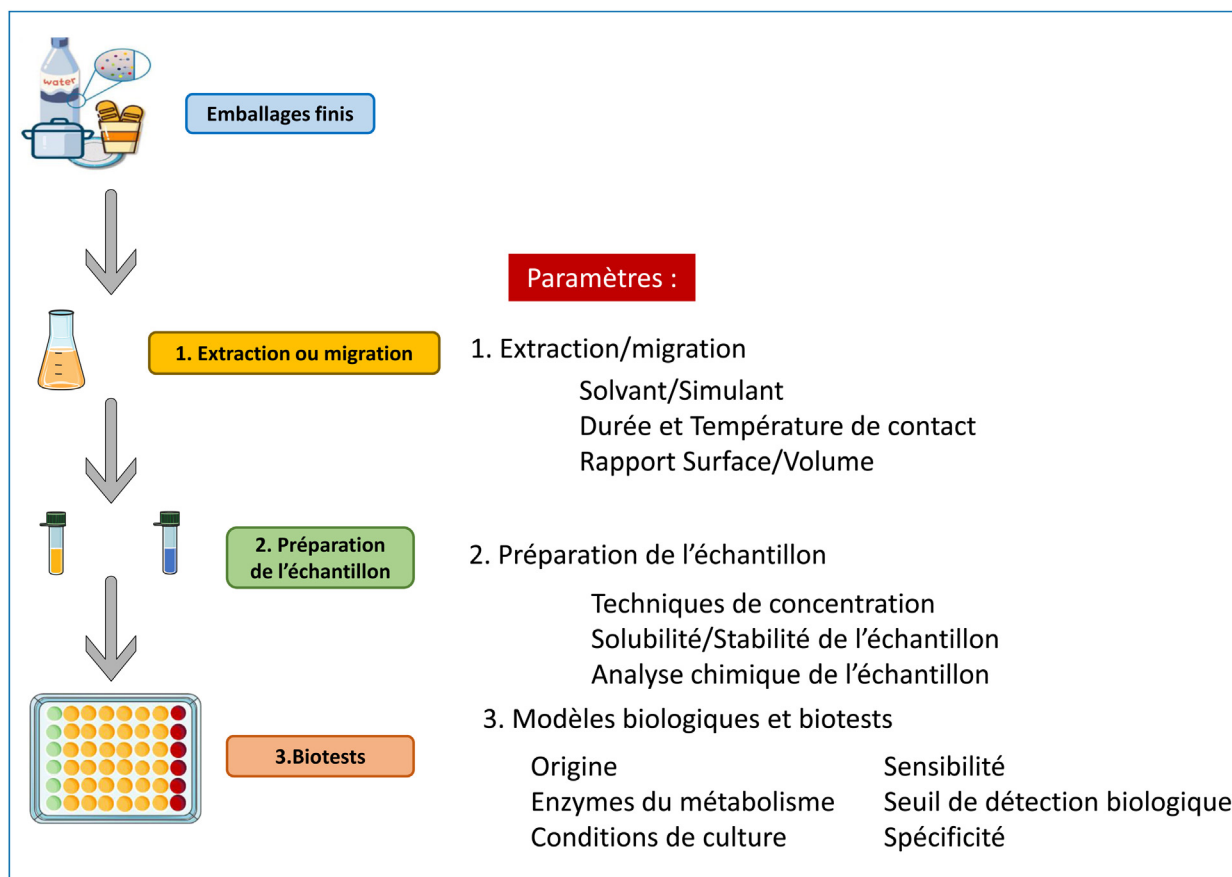


Figure 1. Représentation des étapes critiques pour tester un emballage fini (extraction/migration/préparation et biotests).

pouvaient conduire à des résultats « faux négatifs » avec des biotests en raison d'une perte de composés volatils au cours du traitement de l'échantillon. Les auteurs concluent que la méthode SPE (*Solid Phase Extraction*), qui utilise un adsorbant traditionnel à base de silice (C18) et une préparation d'échantillons minimisant les étapes d'évaporation, semble être la méthode la plus efficace pour extraire les composés de type œstrogénique à partir d'eaux embouteillées. Une méthode alternative pour éviter l'évaporation à sec et réduire la perte des volatils est de rajouter du DMSO, utilisé comme « piègeur » avant l'évaporation complète du solvant d'extraction. En raison de son point d'ébullition élevé, le DMSO est capable de retenir des substances volatiles pendant la phase d'évaporation [29] du solvant d'extraction. Cependant, contrairement à l'éthanol, le DMSO ne peut pas être évaporé, s'il y avait un besoin de concentration ultérieur.

Néanmoins, il a été démontré que ces deux solvants induisent certaines enzymes du métabolisme [30] et que l'éthanol est clastogène *in vitro* [31]. Il est donc primordial de prendre en compte l'effet toxique du solvant utilisé à forte concentration. De plus, une méthode d'extraction liquide/liquide ou SPE en une seule étape ne permet pas d'extraire toutes les substances génotoxiques de polarités variées [21].

Toutes les expériences doivent être réalisées exclusivement avec des matériaux dits « inertes » (ex. du verre, du téflon ou de l'acier inoxydable) afin d'éviter la contamination croisée des échantillons [32].

Enfin, la composition de l'extrait, sa stabilité et sa reproductibilité pendant le stockage doivent être vérifiées pour

s'assurer que l'extrait testé *in vitro* est représentatif de celui obtenu après l'extraction.

Les échantillons doivent être testés jusqu'à leur limite de solubilité (tant qu'ils ne sont pas cytotoxiques), mais pas au-delà, car cela pourrait générer des données non reproductibles du fait d'une dissolution hétérogène ou d'une précipitation.

Une fois les conditions d'extraction définies, il faut valider le protocole de concentration en « spikant » (enrichissant) les extraits avec une substance génotoxique de référence de façon à vérifier que la réponse obtenue est bien celle attendue. La même démarche peut aussi être réalisée avec une substance non génotoxique pour vérifier la spécificité du biotest. Ainsi, il est possible de s'affranchir de l'effet matrice de l'échantillon.

Modèles biologiques et biotests

Le choix du modèle biologique est également important, car il détermine la qualité et la fiabilité des résultats. Les biotests doivent être effectués sur des modèles *in vitro* pertinents, car l'environnement cellulaire a un impact crucial sur les résultats. Les modèles sont très variés, comme des bactéries ou des levures, des cellules de mammifères (rongeurs ou humains) d'origine tissulaire diverses, ainsi que le mode de culture (2 ou 3 dimensions...). Concernant les tests de génotoxicité, il est convenu que les lignées cellulaires utilisées doivent avoir certaines caractéristiques : être de préférence d'origine humaine, avoir une protéine p53 fonctionnelle et être capable de réparer les lésions de l'ADN pour

obtenir une réponse fidèle dans les tests de génotoxicité [33,34]. De plus, des informations sur les activités enzymatiques des modèles cellulaires doivent être précisées. Les cellules de mammifères avec un métabolisme défini de phase 1 (fonctionnalisation) et de phase 2 (conjugaison) sont considérées comme plus adaptées dans les tests de génotoxicité pour réduire les faux positifs [34]. Lorsque le modèle biologique ne possède pas ou peu d'activités métaboliques endogènes (comme les bactéries par exemple), l'utilisation d'un système d'activation métabolique exogène est alors utilisé pour améliorer la sensibilité des tests et éviter les résultats faux négatifs. Le système le plus couramment utilisé, appelé S9, est une fraction microsomale de foie de rat dont les enzymes ont été induites par l'arochlor 1254 ou un mélange de phénobarbital/ β -naphtoflavone. Cependant, le S9 mix (enrichi en co-facteurs) est toxique au-delà d'un certain % et doit être utilisé sur un temps court (≤ 4 h).

Concernant les modèles biologiques, les conditions de culture doivent être optimisées, notamment l'utilisation du sérum de veau fœtal (SVF). Le SVF est utilisé généralement à 10 % dans le milieu. Cependant, de par sa quantité importante en protéines, il peut avoir un effet protecteur vis-à-vis des cellules. C'est pourquoi, il est recommandé de diminuer la quantité de sérum (0,5 à 1 %) pendant la période de traitement.

La sensibilité (capacité à détecter correctement les substances positives) et la spécificité (capacité à détecter correctement les substances négatives) des biotests doivent être caractérisées en testant des substances de référence (substances connues pour être toxiques ou non toxiques) afin d'éviter des données faussement négatives ou positives pour l'identification du danger. En effet, le seuil de détection biologique doit être suffisamment bas pour détecter des effets à une faible concentration (ce qui est le cas dans les extraits de MCDA). Ces seuils sont déjà atteints avec les tests d'activation transcriptionnelle sur des gènes d'intérêt en matière de perturbation endocrinienne (activités de l'ordre du pg ou fg équivalent E2/L), mais des évolutions sont encore nécessaires pour améliorer la sensibilité des tests de génotoxicité [21].

Projet de recherche « Packsafe »

Le projet de recherche « Packsafe », financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE21-004) et débuté en janvier 2022 pour une durée de 48 mois, a pour objectif de répondre aux différents points évoqués ci-dessus. Le consortium regroupe 4 laboratoires publics, deux spécialisés en chimie analytique, le Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE) et l'UMR Sayfood 0782, et deux, spécialisés dans la réalisation de tests de toxicité *in vitro*, le Laboratoire de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille et le Dertech Packtox de l'UMR 1231 qui coordonne le projet. La première étape du projet consiste à optimiser la préparation des échantillons pour les biotests, à identifier un éventuel effet « matrice », puis à sélectionner des biotests sensibles et spécifiques pour la détection des effets génotoxiques et perturbateurs endocriniens dans les différents extraits. Cette première étape sera validée sur des emballages finis du commerce. La deuxième étape consiste à utiliser ces biotests avec des extraits d'emballages (recyclés ou non) soumis à des procédés particulièrement générateurs de SNI. En parallèle de ces deux étapes, des analyses chimiques seront réalisées pour caractériser les extraits et obtenir des signatures chimiques par chimométrie. La dernière étape a pour but d'intégrer tous les résultats obtenus dans un système

expert d'aide à la décision, basé sur l'outil informatique FMECA engine (<https://github.com/ovitrac/FMECAengine>), initialement développé dans le projet « SafeFoodPack Design » (ANR-10-ALIA-009) par l'UMR SayFood. Résultant d'une approche scientifique multidisciplinaire, ce projet permettra aux fabricants d'emballages et à leurs clients (transformateurs, industries agro-alimentaires) : (1) de mieux garantir la sécurité et la conformité de leurs matériaux ; et (2) d'encourager leur innovation et/ou leur compétitivité en leur proposant des outils scientifiques d'aide à la décision, pertinents et fiables, pour un développement par une approche « safe-by-design » des MCDA.

En génotoxicité, plusieurs biotests ont été retenus. Les deux tests réglementaires requis pour les MCDA (test d'Ames et test du micronoyau) seront utilisés sous forme miniaturisée.

Le test d'Ames est un test de mutations reverses, à court terme, qui détecte les mutations géniques de type substitution, addition ou suppression d'une ou plusieurs paires de bases de l'ADN sur des modèles bactériens, *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* [35]. Dans le projet « Packsafe », la méthode en plaques 6 puits a été retenue.

Le test du micronoyau (OCDE 487) permet de mettre en évidence des effets clastogènes (cassures de chromosomes) et/ou aneugènes (perte d'un ou plusieurs chromosomes entiers) provoqués par des substances chimiques. Ces anomalies sont identifiées sous forme de micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en interphase, ayant réalisé un cycle cellulaire complet après exposition [36–38].

En plus, le test DDR (*DNA Damage Response*) a été retenu comme test de *screening*. Ce test consiste à utiliser un kit, le *Multiflow DNA damage assay* (Litron Rochester, NY, USA), sur la lignée cellulaire humaine lymphoblastoïde TK6. Il est basé sur la combinaison de plusieurs marqueurs impliqués dans les événements mutagènes, clastogènes et aneugènes [39]. Ce test permet, par une lecture en cytométrie en flux après 4 h ou 24 h d'exposition, de classer correctement à plus de 90 % les composés selon leur mode d'action supposé [40]. Il a été validé en 2017 par une étude inter-laboratoires [41] qui a montré une sensibilité d'environ 92 % et une spécificité d'environ 96 %.

En perturbation endocrinienne, les biotests permettant de mettre en évidence le mode d'action d'un perturbateur endocrinien (PE) comme préconisé dans le niveau 2 du cadre conceptuel d'évaluation des PE (OCDE, 2018) seront utilisés pour la mesure des activités (anti)œstrogéniques, (anti)androgéniques, (anti)thyroïdiennes et de la synthèse des stéroïdes.

Le test AR (OCDE 458) [42] est un test d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur aux androgènes réalisé sur la lignée cellulaire AR-EcoScreen. Il met en évidence des effets (anti)androgéniques liés à une interaction avec le récepteur aux androgènes, grâce au gène rapporteur de la luciférase.

Sur le même principe, le test ER (OCDE 455) [43] permet de mettre en évidence une activité (anti)œstrogénique liée à une interaction avec le récepteur des œstrogènes, grâce au gène rapporteur de la luciférase sur la lignée cellulaire hER α Hela-9903.

L'essai de stéroïdogénèse (OCDE 456) [44] sur la lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain a pour but de détecter les substances qui impactent la production d'œstrogènes et de testostérone (inhibition ou induction). Cette lignée exprime les gènes qui codent les enzymes clés pour la stéroïdogénèse. Les résultats de l'essai s'expriment par des changements dans les taux en œstradiol ou en testostérone.

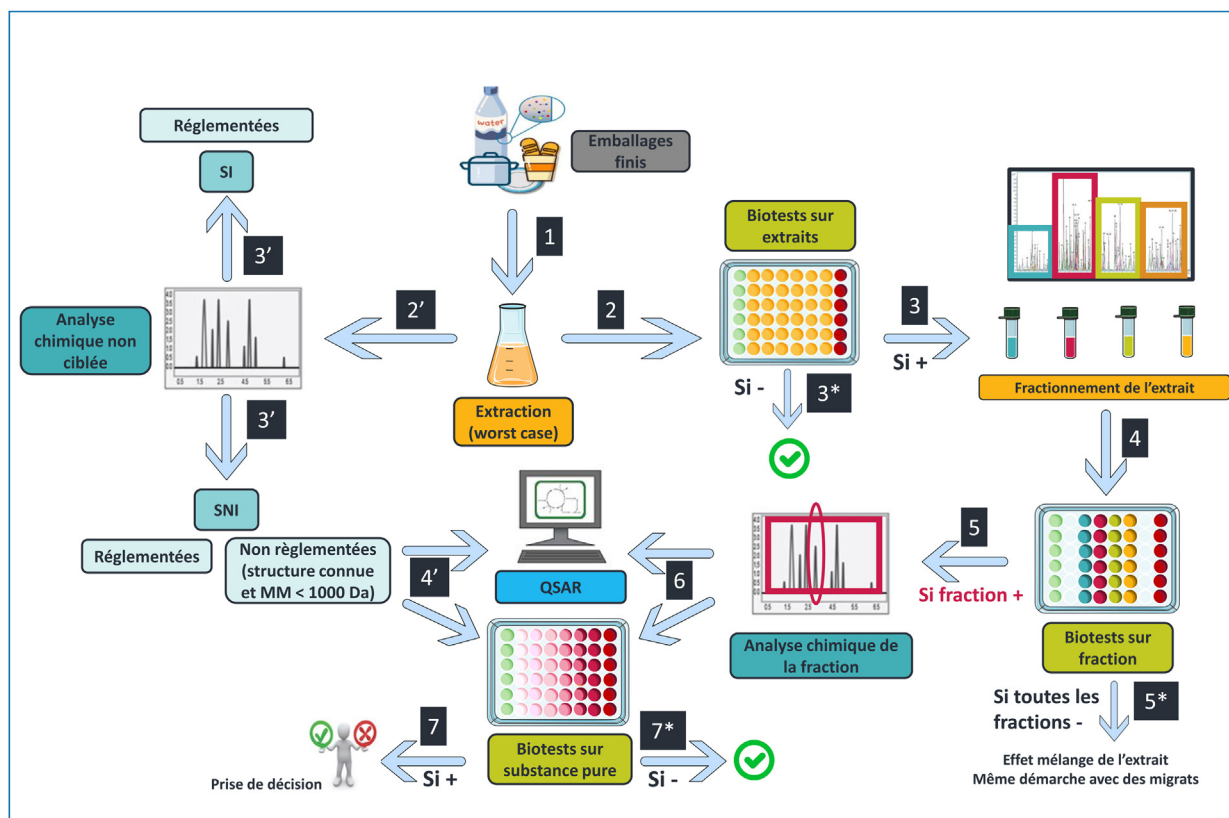


Figure 2. Approche globale d'évaluation du danger des extraits d'emballages au contact des denrées alimentaires. Chiffre' : partie chimie ; chiffre simple : partie biotests et chiffre * : risque écarté.

Le test T-Screen est, quant à lui, un test de prolifération cellulaire utilisant la lignée cellulaire pituitaire de rat GH3 qui exprime les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et dont la prolifération est dépendante de la présence de l'hormone T3. Les effets agonistes sont confirmés par l'incubation simultanée avec une substance de référence antagoniste.

Stratégie finale proposée

Une fois les verrous techniques (Fig. 1) résolus, l'approche sera développée comme le montre la Fig. 2.

À partir d'emballages finis, une première étape d'extraction par solvant (pire des cas) sera réalisée [1]. L'extrait sera alors testé en parallèle en analyse chimique non ciblée pour obtenir une signature chimique sous forme de chromatogrammes en utilisant la spectrométrie de masse en détection (2') et sur des biotests sensibles et spécifiques [5]. L'analyse chimique va permettre d'identifier les substances intentionnelles et non intentionnelles (3'), qui seront réglementées ou non et pour lesquelles des analyses QSAR pourront être menées (4'). Si la substance est disponible commercialement, elle pourra aussi être testée *in vitro* pour déterminer sa toxicité (4'). En ce qui concerne l'extrait analysé *in vitro* [5], si le biotest donne une réponse négative, le mélange testé sera considéré comme ne posant pas de problème en termes de sécurité sanitaire dans ces conditions expérimentales (3*). Si le biotest donne un résultat positif, l'extrait sera alors fractionné [6] et chaque fraction sera testée séparément *in vitro* [9]. Si aucune des fractions n'entraîne de réponse positive, il pourra être conclu que l'effet observé sur l'extrait de départ est dû

à un effet mélange (5*). Dans ce cas, la même approche devra être menée sur un migrant (obtenu en réalisant un essai de migration suivant les conditions réglementaires) pour être dans des conditions plus réalistes. Si par contre, l'une des fractions donne une réponse toxicologique positive, elle sera analysée d'un point de vue chimique [18] pour essayer d'identifier la substance responsable. Une fois identifiée, la substance sera alors analysée en QSAR et/ou *in vitro* si elle est commercialement disponible [10]. En fonction des résultats, une décision pourra alors être prise (7 et 7*).

En conclusion, développer une approche harmonisée utilisant des biotests comme outils d'alerte et de priorisation en complément de l'analyse chimique pour l'évaluation des substances non intentionnelles présentes dans les MCDA, est une étape nécessaire et prometteuse pour améliorer la sécurité chimique des MCDA finis, quelles que soient leurs origines.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Pocas F. Migration from packaging and food contact materials into foods. Reference module in food science. Elsevier; 2018 [ISBN 9780081005965].

- [2] Groh KJ, Geueke B, Martin O, Maffini M, Muncke J. Overview of intentionally used food contact chemicals and their hazards. *Environ Intern* 2021;150:106225.
- [3] 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. *OJL* 2004;338:4–17.
- [4] Règlement (CE) n° 10/2011 de la commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. *OJL* 2011;12:1–89.
- [5] Grob K. The role of the European food safety authority (EFSA) in a better European regulation of food contact materials – some proposals. *Food Addit Contam* 2019;36:1895–902.
- [6] Biedermann M, Grob K. Assurance of safety of recycled paperboard for food packaging through comprehensive analysis of potential migrants is unrealistic. *J Chromat* 2013;1293:107–19.
- [7] Grob K, Biedermann M, Scherbaum E, et al. Food contamination with organic materials in perspective: packaging materials as the largest and least controlled source? A view focusing on the European situation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;46:529–35.
- [8] McCombie G. Enforcement's perspective. In: European commission, directorate general health and food safety; 2018 [Disponible : https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs.fcm.eval-workshop_20180924_pres07.pdf].
- [9] Geueke B, Groh K, Muncke J. Food packaging in the circular economy: overview of chemical safety aspects for commonly used materials. *J Clean Prod* 2018;193:491–505.
- [10] BEUC (Bureau Européen des Unions de Consommateurs). Reform EU Food Packaging Rules To Better Protect Consumers. BEUC comments to the Food Contact Materials REFIT evaluation, BEUC-X-2019-029; 2019.
- [11] Directive 2019/904; 2019 [<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019L0904>].
- [12] Loi Anti-gaspillage pour une économie circulaire (AGEC) 2020-105; 2020 [<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000041553759>].
- [13] Report P8 TA 0384 implementation of the food contact materials regulation European parliament resolution of 6 October 2016 on the implementation of the food contact materials regulation (EC) No. 1935/2004 (2015/2259(INI)).; 2016. p. 10.
- [14] European Commission. Study supporting the Evaluation of Food Contact Materials (FCM) legislation (Regulation (EC) No 1935/2004); 2020. p. 161.
- [15] Muncke J, Andersson A-M, Backhaus T, Boucher JM, Almroth BC, Castillo AC, et al. Impacts of food contact chemicals on human health: a consensus statement. *Environ Health* 2020;19:25–37.
- [16] Severin I, Souton E, Dahbi L, Chagnon MC. Use of bioassays to assess hazard of food contact material extracts: state of the art. *Food Chem Tox* 2017;105:429–47.
- [17] ILSI report. Guidance on best practices on the risk assessment of NIAS in FCM; 2016. p. 72.
- [18] Grob K. The european system for the control of the safety of food contact materials needs restructuring: a review and outlook for discussion. *Food Addit Contam* 2017;34:1643–59.
- [19] Koster S, Bani-Estivals MH, Bonuomo M, Bradley E, Chagnon M-C, Garcia ML, et al. Guidance on best practices on the risk assessment of NIAS in FCM. ILSI Europe Report series; 2016. p. 1–68.
- [20] Nerin C, Bourdoux S, Faust B, Gude T, Lesueur C, Simat T, et al. Guidance in selecting analytical techniques for identification and quantification of non-intentionally added substances (NIAS) in food contact materials (FCMS). *Food Addit Contam* 2022;39:620–43.
- [21] Schilter B, Burnett K, Eskes C, et al. Value and limitation of in vitro bioassays to support the application of the threshold of toxicological concern to prioritise unidentified chemicals in food contact materials. *Food Addit Contam* 2019;36:1903–36.
- [22] Kortenkamp. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 2007;115:98–105.
- [23] SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks). Toxicity and assessment of chemical mixtures; 2011. p. 50.
- [24] Kopp B, Vignard J, Fessard V, et al. Genotoxicity and mutagenicity assessment of food contaminant mixtures present in the French diet. *Env Mol Mutagenesis* 2018;59:742–54.
- [25] Fabrega EFSA, Dujardin J, Heppner B, Hugas C, Kleiner M. Theme (concept) paper – risk assessments of combined exposure to multiple chemicals (RACEMiC) EFSA supporting publication; 2022 [2022:e200504 8pp].
- [26] EFSA Scientific committee. Genotoxicity assessment of chemical mixtures. *EFSA J* 2019;17:5519–30.
- [27] Pieke E, Granby K, Teste B, Smedsgaard J, Rivière G. Prioritization before risk assessment: the viability of uncertain data on food contact materials. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018;97:134–43.
- [28] Wagner M, Oehlmann J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-screen. *J Ster Biochem Mol Biol* 2011;127:128–35.
- [29] Korner W, Hanf V, Schuller W, Kempter C, Metzger J, Hagenmaier H. Development of a sensitive E-Screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci Total Environ* 1999;225:33–48.
- [30] Nishimura M, Ueda N, Naito S. Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms, UGT-dependent glucuronosyl transferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1052–6.
- [31] Kayani MA, Parry JM. The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Tox In Vitro* 2010;24:56–60.
- [32] Chevolleau S, Debrauwer L, Stroheker T, Viglino L, Mourahib I, Meireles M-H, et al. Consolidated method for screening the endocrine activity of drinking water. *Food Chem* 2016;213:274–83.
- [33] Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Env Health Perspect* 1999;107:5–24.
- [34] Kirkland D, Pfuhrer S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, et al. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res* 2007;628:31–55.
- [35] Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2281–5.
- [36] Fenech M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods Mol Biol* 2008;410:185–216.
- [37] Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000;455:81–95.
- [38] Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:167–72.
- [39] Bryce SM, Bemis JC, Mereness JA, Spellman RA, Moss J, Dickinson D, et al. Interpreting in vitro micronucleus positive results: simple biomarker discriminates clastogens, aneugens, and misleadinf positive agents. *Environ Mol Mutagen* 2014;55:542–55.
- [40] Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, Dertinger SD. Genotoxic mode of action predictions from a multiplexed flow cytometric assay and a machine learning approach. *Environ Mol Mutagen* 2016;57:171–89.
- [41] Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, Spellman RA, Engel ME, Schuler M, et al. Interlaboratory evaluation of a multiplexed

- high information content in vitro genotoxicity assay: multiplexed high information content assay. *Environ Mol Mutagen* 2017;58:146–61.
- [42] OECD 458. OECD guideline for the testing of chemicals: stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals; 2020.
- [43] OECD 455. OECD guideline for the testing of chemicals: performance-based test guideline for stably transfected transactivation in vitro assays to detect estrogen receptor agonists and antagonists; 2021.
- [44] OECD 456. OECD guideline for the testing of chemicals: H295R steroidogenesis assay; 2022.