

Apport des biotests en complément de l'analytique pour l'évaluation du risque des substances non intentionnelles des emballages.

Isabelle SEVERIN, Ruzanna HAYRAPETYAN, Laurence DAHBI et Marie Christine CHAGNON,
Derttech "Packtox", NUTOX, INSERM U1231, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France.

L'évaluation des risques des substances non intentionnelles, imprévisibles, présentes dans les emballages représente un défi pour les industriels de l'agroalimentaire et de la cosmétologie, du fait d'une interaction contenant/contenu. Une stratégie, proposée dans cet article, consistant à combiner des outils analytiques, *in silico* et *in vitro* afin d'identifier un danger présent dans un mélange complexe comme un extrait/migrat d'emballage, apparaît comme pertinente et prometteuse, afin d'éviter et de gérer les substances indésirables. Cette approche semble d'autant plus utile dans un contexte d'économie circulaire, où la part des matériaux biosourcés, réutilisables et recyclés va augmenter dans les années qui viennent, avec une perte de traçabilité dans le cycle de vie d'un emballage.

Mots clés : emballages au contact des denrées alimentaires, biotests, substances non intentionnelles, techniques analytiques, mélanges

ABSTRACT

The risk assessment of non-intentionally added and unpredictable substances present in packaging is a challenge for the food and cosmetics industry, due to the phenomenon of migration from the container to the content. A strategy, proposed in this article, consisting in combining analytical, *in silico* and *in vitro* tools in order to identify a hazard present in a complex mixture such as a packaging extract/migrate, appears to be relevant and promising to avoid and monitor undesirable substances. This approach appears to be even more pertinent in the context of the circular economy, where the share of biobased and recycled materials will increase in the coming years, with a loss of traceability in the life cycle of a packaging.

Les matériaux au contact des denrées alimentaires (MCDA) doivent répondre à l'article 3 du règlement 1935/2004, à savoir que « 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** ». Or, des interactions contenu/contenant ont lieu quel que soit le matériau et, en particulier, des substances peuvent être cédées par l'emballage au contact des aliments ; c'est le phénomène de migration.

Lors de la fabrication d'un emballage, des substances de départ (monomères, additifs...) connues et caractérisées, peuvent être utilisées dès lors qu'une évaluation du risque a été menée, ce sont les **Substances Intentionnelles** (SI). Elles sont alors autorisées avec des conditions d'utilisation et pour certaines avec des restrictions d'emploi, elles devront donc être contrôlées afin de protéger la santé du consommateur.

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 (Grob, 2006), elles peuvent aussi entraîner un risque potentiel pour la santé du consommateur au même titre que les SI. Il convient alors d'identifier le risque lié à ces SNI susceptibles de migrer conformément aux principes scientifiques d'évaluation des risques reconnus à l'échelle internationale. Le règlement 10/2011 sur les matériaux plastiques exige que les SNI soient prises en compte au même titre que les SI.

Tous les emballages sont concernés par les SNI, y compris les matériaux biosourcés, réutilisables et recyclés, qui seront de plus en plus utilisés dans le contexte de l'économie circulaire (directive 2019/904, loi AGECE). D'après une publication du Bureau Européen des Unions de Consommateurs (BEUC), ils seraient même davantage contaminés que les matériaux vierges (BEUC, 2019 ; Geueke et al., 2018).

Le rapport 2015/2259/ (INI) du Parlement européen, publié en octobre 2016, concernant les MCDA mentionnait des lacunes dans la réglementation des MCDA, notamment en terme de sécurité, 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 prémonitoire facultative visant à garantir la sécurité des MCDA chimiquement complexes, et qu'il convient d'encourager 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 rapport de la Commission Européenne souligne aussi le besoin d'utiliser des biotests pour l'évaluation des substances non identifiées des MCDA susceptibles de migrer (Commission Européenne, 2020).

Cependant, contrairement aux SI, il n'y a pas de ligne directrice harmonisée pour une évaluation du risque, et l'approche classique basée sur l'identification et la quantification des substances retrouvées dans un migrat associées à leur évaluation toxicologique n'est pas envisageable, elle n'est pas faisable d'un point de vue du temps, du coût et sur le plan technique, l'analyse chimique d'un extrait/migrat étant rarement exhaustive (ILSI, 2016, Séverin et al., 2017).

UNE PROBLÉMATIQUE COMPLEXE

Pour étudier 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, de nombreuses techniques analytiques (HPLC-MS ou GC-MS) ciblées ou non, peuvent être utilisées. Cependant, ces analyses permettent de détecter un maximum de substances présentes (chromatogramme avec « forêt de pics ») mais elles ne permettent pas toujours de les identifier, de les quantifier, ces substances se retrouvant parfois à l'état de trace (Grob, 2002 ; Koster *et al.*, 2016 ; Nerin *et al.*, 2013 ; Skjevraak *et al.*, 2005). Les techniques analytiques ne permettent pas non plus de savoir si ces substances présentent un danger. Utiliser des méthodes alternatives comme le QSAR (toxicologie prédictive) ou appliquer un seuil de préoccupation toxicologique (Threshold of Toxicological Concern ou TTC) pour prédire le risque ne sera pas possible car ces SNI doivent être précisément caractérisées d'un point de vue chimique et quantifiées. Une synthèse sera alors nécessaire pour pouvoir les tester. Cette approche longue et coûteuse n'est pas non plus forcément utile car la majeure partie de ces substances ne présenteront pas d'effet néfaste.

De plus, les SI et les SNI se retrouvent en mélange dans un extrait ou un migrat et il est pertinent de se poser la question d'un éventuel effet « cocktail » du mélange, identifié fréquemment avec les perturbateurs endocriniens (PE) (Kortenkamp, 2007, SCHER, 2011) ou avec des substances génotoxiques (Kopp *et al.*, 2018), qui sont les nouveaux défis pour une évaluation du risque pertinente.

VERS UNE APPROCHE PROMETTEUSE

C'est pourquoi, l'utilisation de tests réalisés sur des modèles biologiques *in vitro* (bactéries, cellules humaines en culture...) dits « biotests » est une stratégie complémentaire aux analyses chimiques pour contrôler l'absence de danger lié à la présence de SNI non prévisibles/non identifiées indésirables d'un extrait/migrat. Ces biotests permettent d'identifier une réponse biologique (toxicité) « globale », un mode d'action de l'ensemble des substances du mélange testé. Ainsi, l'avantage de cette approche globale est de tenir compte des substances non identifiées et d'un effet mélange. L'EFSA (2019) reconnaît la pertinence d'utiliser des biotests pour évaluer la génotoxicité des mélanges complexes quand la totalité des composés ne peut pas être identifiée.

En 2016, ILSI Europe a publié un rapport concernant les recommandations sur l'évaluation du risque lié aux SNI, proposant une stratégie d'évaluation du risque des MCDA notamment de coupler les méthodes de chimie analytique ciblées et/ou non-ciblées et les biotests *in vitro* dans le cas des SNI non identifiées (ILSI, 2016, Koster *et al.*, 2016). Les cibles toxicologiques (cytotoxicité/génotoxicité et perturbation endocrinienne) étudiées répondent à la notion de faible exposition comme c'est le cas pour les substances liées aux MCDA. La combinaison de ces méthodes a pour but, à terme de pouvoir orienter et effectuer une évaluation du risque MCDA à l'état fini et de permettre de lever une incertitude et de prendre des décisions si nécessaires. Cette approche fait l'objet depuis plusieurs années de travaux de recherche et de discussions lors de sessions particulières dans des congrès ou des forums (ILSI, Food Packaging Forum).

Ainsi, l'utilisation de biotests présente aussi 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 l'emballage fini et de définir les priorités pour les investigations ultérieures en matière de sécurité des aliments

mais aussi d'innovation. Appliqués tôt dans le développement de nouveaux emballages, les biotests peuvent jouer un rôle important pour une conception efficace de nouveaux matériaux d'emballage sûrs (Safe By Design). Cette approche peut aussi s'appliquer à d'autres domaines, utilisant des matériaux pouvant générer une interaction contenant/contenu (cosmétique, dispositifs médicaux).

DES AMÉLIORATIONS ENCORE NÉCESSAIRES

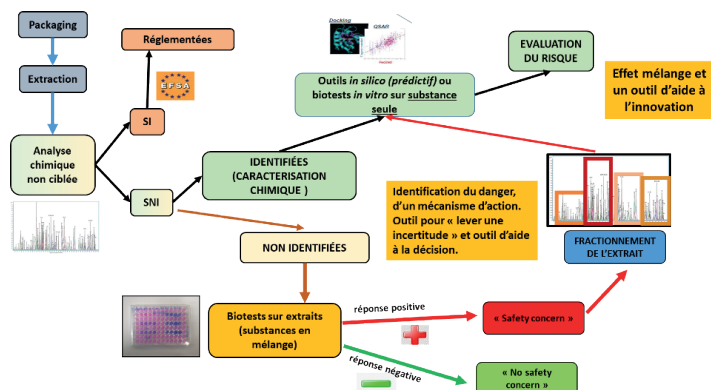
Les biotests sont déjà largement utilisés par les instances réglementaires en particulier en matière de génotoxicité, ils ont été développés et standardisés pour évaluer des substances pures. Dans le cas de mélanges complexes comme les extraits de MCDA, ils présentent encore, pour le moment, des limites (Séverin *et al.*, 2017, Groh *et al.*, 2017). Ainsi la préparation des échantillons avant de les utiliser dans les biotests est une étape particulièrement importante et peut s'avérer délicate (solvant biocompatible, procédures de concentration, contrôle de ce qui est réellement testé...). Actuellement, les solvants utilisés sont souvent limités à l'eau pour le contact aqueux et l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour le contact gras. De plus, la concentration finale de ces deux derniers solvants dans le milieu de culture ne doit pas dépasser 1% (concentration non cytotoxique pour la plupart des lignées cellulaires), une concentration préalable de l'extrait avant de mener le biotest étant alors requise afin de tester une quantité représentative de l'extrait/ migrat.

Cette préparation de l'échantillon doit donc être normalisée pour que cette approche globale devienne un outil adapté, fiable et de routine pour une évaluation globale d'extrait d'emballage.

De plus, le **modèle cellulaire** choisi doit répondre aussi à un certain nombre de critères (lignée humaine préférable) mais ces modèles doivent aussi être maîtrisés, caractérisés (origine, capacités de métabolisation, nombre de passages à respecter, présence de protéines fonctionnelles, expressions des récepteurs nucléaires...). Le biotest retenu doit aussi avoir un **seuil de réponse biologique spécifique**, déterminé, précis et suffisamment bas afin d'éviter des résultats faussement négatifs (toxicité non détectée). Ces seuils sont déjà atteints avec les tests d'activation transcriptionnelle sur des gènes d'intérêt en matière de perturbation endocrinienne mais des évolutions sont encore nécessaires pour améliorer la sensibilité des tests de génotoxicité (Schilter *et al.*, 2019).

CONCLUSION

L'approche telle que décrite dans cet article peut se résumer selon la figure ci-dessous.



A partir de l'emballage fini, une extraction va être réalisée et l'extrait analysé d'un point de vue chimique (analyses en CPG/MS, HPLC/MS non ciblée). Certaines substances notamment des SI seront identifiées, elles seront donc déjà réglementées. D'autres pics chromatographiques peuvent correspondre à des SNI. Certaines pouvant être identifiées (utilisation de bases de données), dans ce cas, le danger pourra être recherché *in silico* (logiciels de type QSAR) ou à l'aide de biotests avec la substance pure (si la substance est disponible).

Concernant les SNI ne pouvant être identifiées, l'extrait total va être testé à l'aide de biotests. Si une réponse négative est observée dans le biotest d'intérêt, le mélange, dans ces conditions expérimentales, n'entraîne pas de préoccupation en matière de toxicité. Si une réponse positive est observée, l'étape suivante consistera à fractionner l'extrait et à tester les différentes fractions pour rechercher (dans les différentes fractions) et identifier la/les substance(s) responsable(s) de cette toxicité. Une fois identifiée, elle pourra faire l'objet d'une évaluation des risques ultérieure. A noter, que l'effet observé peut aussi résulter de la combinaison de plusieurs substances présentes dans l'extrait.

Développer une approche harmonisée utilisant les biotests comme outils d'alerte et de priorisation en complément de l'analytique pour l'évaluation des substances non intentionnelles **présentes** dans les MCDA et acceptée par toutes les parties prenantes (scientifiques, évaluateurs des risques et gestionnaires du risque) est donc une étape prometteuse incontournable et représente un besoin urgent pour les industriels afin de leur permettre d'être conformes à la réglementation avec leur matériaux finis.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bureau Européen des Unions de Consommateurs (BEUC), (2019) Reform EU Food Packaging Rules To Better Protect Consumers. *BEUC comments to the Food Contact Materials REFIT evaluation*, BEUC-X-2019-029.
- EFSA. More, S., Bampidis, V., Benford, D. *et al.* (2019) Genotoxicity assessment of chemical mixtures. *EFSA J.* 17, 5519-5530.
- European Commission (2020) Study supporting the Evaluation of Food Contact Materials (FCM) legislation (Regulation (EC) No 1935/2004) pp 161.
- Guecke, B., Groh, K., Muncke, J. (2018) Food packaging in the circular economy: Overview of chemical safety aspects for commonly used materials. *Journal of Cleaner Production*, 193, 491-505.
- Groh, K. (2002) Comprehensive analysis of migrates from food-packaging materials: a challenge. *Food Addit. Contam.* 19, 185-191.
- Groh, K., Biedermann, M., Scherbaum, E. *et al.* (2006) 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.* 46, 529-35.
- Groh, K. and Muncke, J. (2017) In vitro toxicity testing of food contact materials; state of the art and future challenges. *Comp. Rev. Food Science Food Safety.* 16, 1123-1150.
- ILSI report (2016) "Guidance on best practices on the risk assessment of NIAS in FCM". pp 72.
- Kopp, B., Vignard, J., Fessard, V. *et al.* (2018) Genotoxicity and Mutagenicity Assessment of Food Contaminant Mixtures Present in the French Diet. *Env. Mol. Mutagenesis* 59, 742-754.
- Kortenkamp (2007) Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine Disrupting Chemicals *Environ. Health Perspect.* 115, 98-105.
- Koster S., Bani-Estivals M.H., Bonuomo M., Bradley E., Chagnon M-C., Garcia M. L., Godts F., Gude T., Helling R., Paseiro-Losada, Pieper G., Rennen M., Simat T., L. Spack. (2016) "Guidance on best practices on the risk assessment of NIAS in FCM" ILSI Europe Report series, 1-68.
- Nerin, C., Alfaro, P., Aznar, M., Domeno, C., (2013) The challenge of identifying non-intentionally added substances from food packaging materials: A review. *Analytica Chimica Acta.* 775,14-24.
- Report P8 TA (2016)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)). Pp 10.
- Schilter, B., Burnett, K., Eskes, C. *et al.* (2019) 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.* 36, 1903-1936.
- Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER) (2011) Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. 50 pp.
- Severin, I., Souton, E., Dahbi, L., Chagnon, MC. (2017) Use of bioassays to assess hazard of food contact material extracts: State of the art. *Food Chem. Tox.* 105, 429-447.
- Skjevrak, I., Brede, C., Steffensen, I.L. *et al.* (2005) Non-targeted multi-component analytical surveillance of non-targeted food contact materials: Identification of substances not included in EU positive lists and their risk assessment. *Food Addit. Contam.* 22, 1012-1022.