

Mémoire de fin d'études : **Master 2 Ingénierie de la Santé**
Parcours **Qualité, Environnement, Santé et Toxicologie**
Option « **Toxicologie** »

2017-2018

NANOPARTICULES DANS LES ADDITIFS ALIMENTAIRES ET LEUR TOXICITÉ

Benjamin LE POLLOZEC

Octobre 2018

Directeur de mémoire : Sébastien Anthérieu
Président du jury : Franck-Olivier Denayer
Membre du jury : Bruno Teste



Table des matières

REMERCIEMENTS	8
AVANT-PROPOS	10
CHAPITRE 1: GENERALITES SUR LES NANOPARTICULES	14
1 Nanotechnologies, nano-objets et nanoparticules	14
1.1 Les sources de nanoparticules	17
1.1.1 Les sources naturelles et accidentelles	17
1.1.2 Les sources intentionnelles	18
2 Les usages des nanomatériaux	18
2.1 Exemples d'application des nanomatériaux par domaine	18
2.2 Application des nanomatériaux dans l'alimentation	19
3 Nanoparticules et société	21
CHAPITRE 2: CARACTERISER ET IDENTIFIER LES NANOPARTICULES DANS L'ALIMENTATION PAR DES MOYENS ANALYTIQUES ET REGLEMENTAIRES	24
1 Introduction	24
2 Caractéristiques physico-chimiques essentielles	24
2.1 Propriétés physico-chimiques pouvant affecter la toxicité des nanoparticules	24
2.2 Propriétés physico-chimiques innées	25
2.3 Propriétés acquises	26
3 Méthodes analytiques adaptées à l'étude des nanoparticules	27
3.1 Déterminer la taille, la forme et la surface spécifique des nanoparticules	27
3.1.1 Taille et distribution en taille des nanoparticules	27
3.1.2 Cas particulier de la XRD (<i>X-ray diffraction</i>).....	27
3.1.3 Cas particulier de la DLS (<i>dynamic light scattering</i>).....	27
3.2 Morphologie des nanoparticules.....	28
3.3 Surface spécifique des nanoparticules	28
3.4 Identifier la chimie élémentaire des nanomatériaux	28
3.5 Choix des méthodes analytiques et des paramètres à étudier	29
4 Premières preuves des effets des nanoparticules sur la santé	31
4.1 Exposition professionnelle aux nanoparticules.....	31
4.2 Exposition alimentaire aux nanoparticules	32

5	Réglementations sur les nanomatériaux manufacturés dans les additifs alimentaires	33
5.1	Réglementation sur les additifs :	33
5.2	Dispositifs de déclarations obligatoires des usages industriels des nanomatériaux	34
5.2.1	Le règlement REACH et l'enregistrement des nanomatériaux	34
5.2.2	R-Nano et les déclarations d'usages des nanomatériaux	35
5.3	Définitions réglementaires et règle d'étiquetage des nanomatériaux dans l'alimentation	36
5.3.1	Etiquetage des nanomatériaux en alimentation	38
5.3.2	Incohérence entre les analyses métrologiques dans l'alimentation et les déclarations R-Nano	39
5.4	Comment ces nanoparticules arrivent-elles dans les additifs alimentaires ?	40
6	Conclusion sur la caractérisation et l'identification des nanomatériaux	41
CHAPITRE 3: EFFETS TOXICOLOGIQUES LIES AUX NANOPARTICULES DANS LES ADDITIFS ALIMENTAIRES: EXEMPLES DU E 170 ET DU E 551		42
1	L'expertise de l'Anses sur la question des nanomatériaux dans l'alimentation	42
1.1	Rôles et missions de l'ANSES	42
1.2	Travaux en cours sur les nanomatériaux dans l'alimentation	43
1.3	La démarche d'évaluation des risques dans l'alimentation	43
1.4	Les besoins du GT "nanomatériaux et alimentation"	45
1.5	Plus-value de la base de données bibliographiques pour le GT et son utilisation dans ce mémoire	45
2	Méthode de recherche bibliographique	46
2.1	Choix des substances	46
2.2	Critères de sélection des articles scientifiques	47
2.3	Méthode d'extraction des données	48
2.4	Méthode de tri des articles	49
3	Etat de l'art des données toxicologiques sur les nanoparticules sélectionnées	50
3.1	Méthode employée pour l'état de l'art	50
3.2	Le carbonate de calcium (E 170)	50
3.2.1	Présentation de l'additif	50
3.2.2	Précisions concernant les connaissances actuelles sur la toxicité du E 170	51
3.2.3	Preuves de la présence de nanoparticules dans le E 170	52
3.2.4	Toxicité des CaCO ₃ NPs	53
3.3	Etat de l'art de la toxicologie des NPs dans le E 551	55
3.3.1	Présentation de l'additif	55
3.3.1	Preuve de SiO ₂ nano dans l'alimentation	56
3.3.1	Comportement du SiO ₂	57
3.3.2	Revue de la littérature existantes sur les SiO ₂ NPs	57
3.3.3	Données toxicologiques <i>in vitro</i>	58

3.3.4	données toxicologiques <i>in vivo</i>	62
4	Discussion.....	64
4.1	Déséquilibre de la quantité d'informations disponibles en fonction de la substance	64
4.2	Critique de la subjectivité dans le choix et l'analyse des articles des revues de la littérature.....	66
4.3	Critique des concentrations de SiO ₂ utilisées dans les études toxicologiques	67
4.4	Autres critiques des protocoles expérimentaux employés dans les études sélectionnées.....	68
4.5	Importance de l'état d'agrégation et des propriétés de surface dans la toxicité des nanoparticules 69	
4.6	Les SiO ₂ NPs, des particules aussi toxiques par ingestion que par inhalation ?	70
4.7	Possible effet synergique des nanomatériaux.....	70
4.8	Effet "cheval de Troie"	71
4.9	Avis de l'EFSA sur l'évaluation des nanomatériaux	71
4.10	Mes recommandations	72
4.11	Vers des modifications ou améliorations des réglementations sur les nanomatériaux ?.....	73
	CONCLUSION.....	76
	ANNEXES:.....	78
	BIBLIOGRAPHIE.....	103

Liste des figures:

Figure 1:	Schéma d'une nanoparticule:	14
Figure 2:	Schéma d'un nanotube	15
Figure 3:	Schéma d'une nanoplaque.....	15
Figure 4:	Nanostructure de la feuille de lotus	18
Figure 5:	Propriétés physico-chimiques d'une nanoparticule	25
Figure 6:	Propriété de la nanoparticule à adsorber des protéines (corona).....	26
Figure 7:	Liste d'ingrédients d'un emballage de complément alimentaire	38
Figure 8:	Démarche d'évaluation des risques sanitaires appliquée à l'alimentation	44

Liste des tableaux:

Tableau 1	Code additif par fonction	34
Tableau 2	Récapitulatif des réglementations concernant les nanomatériaux dans les additifs alimentaires :	36
Tableau 3	Règlements sur la déclaration de nouveaux additifs	38
Tableau 4	Règlement relatif à la déclaration des nanomatériaux dans R-Nano	40
Tableau 5	: Sous-requêtes pour l'extraction des articles scientifiques	48
Tableau 6	Rétention et excrétion des NPs de carbonate de calcium	54
Tableau 7	Tableau récapitulatif des différentes dénominations du E 551:	55
Tableau 8	Etudes de toxicité <i>in vitro</i> des nanoparticules de SiO ₂ food-grade	59
Tableau 9	Etudes de la toxicité <i>in vivo</i> des nanoparticules de SiO ₂ food-grade	62
Tableau 10	Caractérisation de la taille des NPs dans l'étude de Decan et al.	67
Tableau 11	Scénarios d'exposition pour le E 551 dans l'alimentation	67

Liste des abréviations:

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

CES: Comité d'Experts Spécialisés

EFSA: European Food Safety Authority

ERS: Evaluation des Risques Sanitaires

FAO: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FG: Food-grade

GT: Groupe de Travail

MCDA: Matériau au contact des denrées alimentaires

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MP: Microparticule (particule dans la taille est de l'ordre de 1 µm ou plus)

N° CAS: Numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données *Chemical Abstracts Service* (CAS)

NP: Nanoparticule

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONG: Organisation Non Gouvernementale

PUF: particule ultrafine

REACH: Règlement sur l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques

R-Nano: Registre français de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire

ROS: Espèces réactives de l'oxygène

SEM: Microscopie électronique à balayage

TEM: Microscopie électronique à transmission

UERCA – Unité d'Evaluation des Risques Chimiques liés aux substances dans les Aliments

VSSA: surface spécifique (aire surfacique d'une particule en fonction de son volume)

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier toute l'équipe pédagogique de l'ILIS et monsieur le doyen Franck-Olivier Denayer. Plus particulièrement je voudrais remercier monsieur Guillaume Garçon, pour son soutien dans ma recherche de stage, monsieur Sébastien Anthérieu, pour son aide dans la rédaction de ce mémoire, ainsi que madame Sophie Lecuona pour ses conseils et sa gentillesse.

Mes remerciements vont également à mes maîtres de stage de l'Anses, messieurs Gilles Rivière et Bruno Teste, qui m'ont chaleureusement accueilli au sein de l'unité UERALIM, grâce à qui j'ai eu la chance d'entreprendre un stage passionnant et de découvrir les travaux d'expertise menés par l'agence.

J'en profite d'ailleurs pour remercier le président du groupe de travail « nanomatériaux et alimentation », monsieur Fabrice Nessler, et tous les experts du groupe de travail, pour m'avoir impliqué au sein de ce travail, pour tous ces échanges enrichissants et pour l'intérêt porté à mes travaux durant mon stage à l'Anses.

Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes de l'Anses qui m'ont apporté leur soutien, leurs conseils et leur bonne humeur au cours de ce stage, en particulier mes acolytes du bureau 601, Ludovic Pépin, Manon Pruvost-Couvreur et Samuel Sitruk, sans oublier Victoire Lamarca, Hélène Serra, Fernando Aguilar, Frédérique Audiat-Perrin et Géraldine Carne.

Merci à tous !

Avant-propos

Au début des années 2000, l'essor rapide de nouvelles technologies utilisant des nanoparticules, dans de nombreux secteurs industriels, amène de nouveaux enjeux sanitaires. En effet, les risques pour la santé dus à l'usage de ces particules dites « infiniment petites » sont alors inconnus. Pour tenter de comprendre ces risques, des projets internationaux tel que NANOSAFE sont mis en place. Initié par le CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives) et soutenu par la Commission Européenne (CE), ce projet européen avait pour but d'évaluer les risques émergents liés aux nanotechnologies (NANOSAFE 2004). Cet intérêt international a permis de promouvoir la recherche scientifique sur les nanotechnologies, afin de développer ces technologies tout en maîtrisant leurs risques. D'autres projets internationaux sont nés à l'instar de NANOSAFE comme les projets NANOINTERACT, NANOSH et NANOGENOTOX. L'objectif de NANOINTERACT était de développer des outils capables d'étudier les interactions des nanoparticules avec le vivant (NANOINTERACT 2011). Dans le cas de NANOSH, c'est la toxicité des nanoparticules qui a été étudiée, en particulier dans le cas d'expositions professionnelles par inhalation (NANOSH 2006). Quant au projet NANOGENOTOX, celui-ci s'est focalisé sur la caractérisation physico-chimique des nanoparticules et l'évaluation de leur génotoxicité (NANOGENOTOX and Fessard 2009). C'est également à partir de ce moment que le nombre de publications scientifiques sur les risques des nanoparticules a commencé à croître rapidement, avec la publication des premières revues de la littérature sur le sujet (Hoet, Brüske-Hohlfeld, and Salata 2004). Ces avancées ont permis à la communauté scientifique de se rendre compte que la toxicité et les risques liés aux nanoparticules ne peuvent être évalués de la même façon que les substances chimiques conventionnelles. Par conséquent, il est nécessaire d'appliquer une méthodologie adaptée aux nanoparticules afin de générer des données toxicologiques pertinentes pour leur évaluation.

La capacité à explorer le « nano-monde » est au cœur de cette méthodologie, et c'est aussi cette capacité qui a permis aux nanotechnologies de naître dans les années 80. En effet, l'exploration du « nano-monde » est devenue possible grâce au perfectionnement du microscope électronique à transmission inventé 50 ans plus tôt. Il est alors devenu possible d'observer **l'atome** en atteignant des résolutions d'image de l'ordre

de 0,1 nanomètre, soit 10^{-10} mètres. En 1981, le premier microscope à effet tunnel voit le jour et permet d'observer des atomes et même de les manipuler de manière simple. En 1985, le premier microscope à force atomique permet de réaliser la topographie de surface des échantillons à l'échelle atomique. La même année, une nouvelle forme de carbone, qui n'existe pas dans la nature, est inventée par Harold Kroto, James Heath, Sean O'Brien, Robert Curl, and Richard Smalley (Kroto et al. 1985). C'est une sphère de 1 nm de diamètre composé de 60 atomes de carbone que l'on nommera « fullerène », et grâce à laquelle ils obtinrent le prix nobel de chimie en 1996. Grâce à cette découverte, une autre forme de carbone non naturelle est découverte par hasard en 1991 par Iijima : le nanotube de carbone. Ce tube de carbone de 1nm de diamètre s'avèrera d'après Smalley 100 fois plus résistant et 6 fois plus léger que l'acier (Smalley R 1999). Ce matériau sera alors produit en masse et utilisé dans de nombreux domaines (militaire, automobile, électronique, etc.). Ce sont autant d'inventions qui créeront l'engouement vis-à-vis des **nanosciences**, dont l'engouement et l'intérêt technologique deviendra **multidisciplinaire**.

Leurs utilisations vont ainsi s'étendre au domaine de l'agroalimentaire. En effet, la forme nanoparticulaire procure dans certains cas une (ou plusieurs) fonction(s) technologique(s) nouvelle(s) aux substances chimiques, comme c'est le cas pour le dioxyde de silicium qui, sous sa forme nanoparticulaire uniquement, devient anti-agglomérant, une propriété très utile en agroalimentaire.

C'est pourquoi à partir de 2013, en France, un système de déclaration obligatoire, baptisé R-Nano, est mis en place à destination des fabricants et importateurs de substances à l'état particulaire. Celui-ci révèle qu'en 2017 108 entreprises ont déclaré utiliser des nanoparticules dans le secteur d'utilisation « fabrication de produits alimentaires ». L'utilisation des nanoparticules s'est donc bien étendue à l'agroalimentaire, ce qui pose un nouveau problème en termes d'enjeux sanitaires. Depuis, des Organisations Non Gouvernementales (ONGs) ont alerté sur le sujet, en pointant notamment du doigt les additifs alimentaires comme responsables de la présence de ces nanoparticules (Agir pour l'environnement 2016). L'exposition des consommateurs par l'intermédiaire de l'alimentation et la toxicité propre à ces nanoparticules sont pour l'heure mal décrites par manque de données pertinentes, et le risque sanitaire qui en résulte est inconnu. Dans le but d'élucider en partie le risque lié à l'exposition aux nanoparticules dans l'alimentation, ainsi que les obstacles inhérents à cette évaluation du risque, nous essaierons de répondre aux questionnements suivants:

1) Quels sont les moyens analytiques et les dispositions réglementaires permettant, ou ayant pour vocation, l'acquisition de données sur l'exposition et la toxicité des nanoparticules à travers leur présence dans les additifs alimentaires ?

2) Quelle est la toxicité des nanoparticules présentes dans les additifs alimentaires et est-elle significativement différente de la toxicité générée par les mêmes particules à l'échelle non nanométrique ?

Pour se faire, nous définirons ce qu'est une nanoparticule et ses usages. Pour ensuite montrer que, s'il est difficile d'identifier et de caractériser les nanoparticules dans l'alimentation et dans l'organisme, il est nécessaire d'employer des méthodes analytiques adaptées. Puis, après avoir établi la preuve de l'existence de nanoparticules dans les additifs alimentaires, nous étudierons les effets toxicologiques spécifiquement induits par ces nanoparticules à travers deux exemples: Les nanoparticules de carbonate de calcium dans l'additif E 170, et les nanoparticules de dioxyde de silicium dans l'additif E 551. Enfin, nous discuterons des incertitudes et des limites associées à ces données toxicologiques, ainsi que des besoins futurs pour permettre une évaluation du risque sanitaire pertinente de ces substances.

Chapitre 1: Généralités sur les nanoparticules

1 Nanotechnologies, nano-objets et nanoparticules

Les sciences étudiant "l'infiniment petit", ou nanosciences, ont donné naissance à ce que l'on appelle «les nanotechnologies ». Ces nanotechnologies désignent toutes les technologies engendrées par les nanosciences, visant à **fabriquer, manipuler et caractériser** les éléments à l'échelle nanométrique. Le préfixe « nano », qui apparaît souvent dans le domaine des nanosciences, provient du grec "*nânos*" signifiant "nain", et sert à rappeler cette particularité des nanosciences à étudier l'échelle nanométrique.

Définition de l'échelle nanométrique :

Échelle de longueur s'étendant approximativement de 1 à 100 nanomètres.

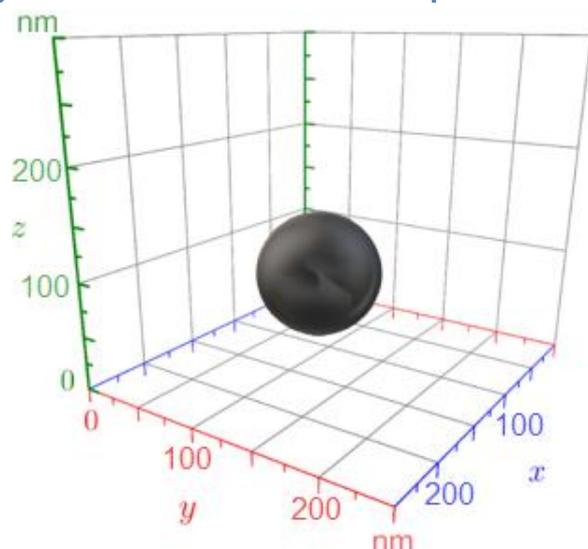
Un nanomètre, abrégé « nm » dans le système international d'unités (SI), représente un milliardième de mètre, soit 10^{-9} m. A titre de comparaison, le virus de la grippe, qui est sphérique, mesure approximativement 100 nm.

Ces éléments à l'échelle nanométrique sont caractérisés par leur taille mais aussi par leur forme. Ils forment ce que l'on nomme les « nano-objets » et constituent les particules primaires des nanotechnologies. On distingue 3 catégories de nano-objets, selon qu'ils possèdent 1, 2 ou 3 dimensions à l'échelle nanométrique (c'est-à-dire inférieure à 100 nm). Cette catégorisation est définie au niveau européen par la norme ISO/TS 80004-2:2015, on y retrouve :

Les nanoparticules (figure 1):

Nano-objet dont toutes les dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et dont les longueurs du plus grand et du plus petit axe ne diffèrent pas de façon significative. Elles sont par conséquent généralement sphériques :

Figure 1: Schéma d'une nanoparticule:



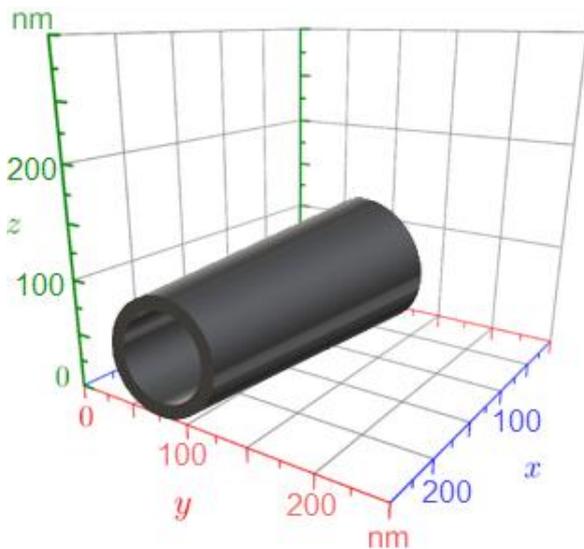


Figure 2: Schéma d'un nanotube

Les nanoplaques (figure 3):

Et les nano-objets dont une seule dimension externe est à l'échelle nanométrique (entre 1 et 100 nm) et les deux autres significativement plus grandes forment des « nanoplaques »:

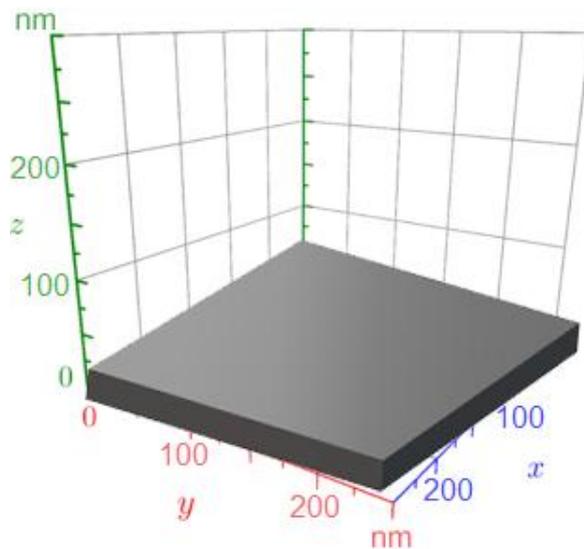


Figure 3: Schéma d'une nanoplaque

Il est important de noter qu'une même substance chimique peut être sous forme nanométrique (constituée de nanoparticules par exemple), ou sous forme conventionnelle (non-nanométrique). Cet état dépend de son origine ou du gradient de taille dans lequel la substance a été fabriquée. De plus, une substance nanométrique peut observer des distributions en taille très variées, du moment que les particules qui la compose restent comprises entre 1 et 100 nm, ou conservent les propriétés de la nano-échelle. Cette diversité dans la distribution en taille des particules peut aussi provenir de conséquences naturelle ou résulter de leur processus de fabrication.

N'importe quelle substance chimique pouvant en théorie être considérée comme un nano-objet selon un critère de taille, ce qui explique l'existence d'une grande diversité de nano-objets, pouvant remplir de nombreuses fonctions. Ceci est d'autant plus vrai que la nano-échelle peut modifier les propriétés physico-chimiques de la substance au point de

lui conférer une fonction technologique qui n'existera qu'à cette échelle. C'est pourquoi il existe une si grande variété d'usages des nanoparticules et autres nano-objets dans différents domaines (cf p.18).

Les formes vues précédemment constituent les formes primaires des matériaux à base de nano-objets (ou nanomatériaux), mais il existe des niveaux supérieurs de structuration de particules nanométriques, notamment sous forme d'agrégats, d'agglomérats ou de polymères. Des propositions de classification de ces "nanostructures" existent mais ne sont à ce jour fixées réglementairement (e.g. classification des nano-objets par Bouwmeester *et al.* (Bouwmeester et al. 2009): Annexe 1)

Au niveau mondial, ce seuil de 100 nm pour décrire la nano-échelle et la nanoparticule est couramment admis. La *Food and Drug Administration* (FDA) américaine utilise également le seuil de 100 nm pour décrire la nano-échelle, et au niveau européen, des définitions comparables à celles de la norme ISO/TS 80004-2:2015 pour décrire les nanoparticules sont utilisées:

Définition d'une nanoparticule par le SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks): « a discrete entity that has three dimensions of the order of 100 nm or less. » (SCENIHR 2007)

Les nanomatériaux:

Le consensus pour ce qui est de définir ce qu'est la nano-échelle, et par la même occasion une nanoparticule, est relativement bien établie. Nous n'avons ici présenté qu'une proposition de catégorisation des nano-objets parmi plusieurs propositions existantes, néanmoins celles-ci se rejoignent sur la description des formes existantes. A contrario, les choses se compliquent lorsqu'il s'agit de définir un nanomatériau (cf page 36). Il est vraisemblablement plus difficile d'avoir un consensus sur une définition lorsque celle-ci engendre de nombreuses conséquences réglementaires, politiques et économiques.

Nous définirons un nanomatériau selon la définition suivante:

Nanomatériaux: particules à l'échelle nanométrique ou ayant des propriétés typiques de la nano-échelle, pouvant se trouver à l'état dispersé, agrégé ou aggloméré.

Un nanomatériau peut être composé de plusieurs substances (composite), il peut également présenter des impuretés.

Lorsqu'un nanomatériau est fabriqué par l'Homme et a pour but de réaliser une fonction bien précise on l'appelle "**nanomatériau manufacturé**".

Autrement dit, un nanomatériau manufacturé est produit **intentionnellement** dans le but d'avoir une **fonctionnalité** bien précise.

Terminologie choisie pour décrire les particules nanométriques:

Nous nous intéresserons ici aux nanoparticules présentes dans les additifs alimentaires.

Par soucis de simplification, nous parlerons uniquement de "nanoparticules" (ou **NPs**) car bien qu'il existe d'autres formes de nano-objets dans l'alimentation, celles qui nous intéresserons plus particulièrement sont sphériques et sont des nanoparticules.

De plus, comme nous parlerons principalement des nanoparticules dans les additifs alimentaires, et que la notion d'additif intègre également les notions "d'intentionnalité" et de "fonctionnalité" des nanomatériaux manufacturés, nous utiliserons **indifféremment** les termes "nanoparticules" et "nanomatériaux" pour parler d'elles.

1.1 Les sources de nanoparticules

1.1.1 Les sources naturelles et accidentelles

Les nanoparticules peuvent être produites accidentellement par des procédés industriels, généralement thermiques (galvanisation, soudage, découpage) ou mécanique (ponçage, perçage, polissage), ou par simple combustion (incinération, émissions des moteurs thermiques). Les procédés qui utilisent ou fabriquent ces nanoparticules peuvent également en émettre accidentellement dans l'air. Pour nommer ces nanoparticules émises dans l'air, dont la voie d'exposition majoritaire est l'inhalation, on utilisera aussi le terme de « particule ultrafine » (abrégé « PUF »).

Les particules ultrafines peuvent également être émises naturellement dans l'environnement, par exemple lors des éruptions volcaniques.

Outre ces particules fines atmosphériques, des nanostructures peuvent être trouvées dans la nature. On peut citer l'exemple de la feuille de lotus (figure 4), dont la nanostructure en picots au niveau de sa cuticule lui confère une super-hydrophobicité par réduction des tensions de surface (Zheng et al. 2008) :



Figure 4: Nanostructure de la feuille de lotus

1.1.2 Les sources intentionnelles

Un nanomatériau peut être produit accidentellement par l'Homme, mais dans la majorité des cas il est manufacturé pour remplir un objectif technologique précis. Parmi eux ces nanomatériaux manufacturés, on distingue :

- Les nanomatériaux inorganiques : solides et généralement constitués de métaux (argent, aluminium, or) ou d'oxydes de métaux (oxyde de fer, dioxyde de titane, dioxyde de silicium, dioxyde de zinc) ou d'autres minéraux (carbonates, phosphates,...).
- Les nanomatériaux organiques : vésicules lipidiques d'origine naturelle (micelles de la caséine du lait) ou manufacturée, qui permettent d'augmenter la disponibilité de molécules hydrophiles (Aguilera 2014).
- Les nanomatériaux composites : Nanocomposites à base de graphène, de nanotubes de carbone (NTCs)(propriétés mécaniques), zéolites (techniques de purification et de séparation), oxydes de métaux mésoporeux (adsorbants, catalyseurs) etc. (Visakh and Martínez Morlanes 2016)

2 Les usages des nanomatériaux

2.1 Exemples d'application des nanomatériaux par domaine

De nos jours les nanomatériaux sont utilisés dans de nombreux domaines : cosmétiques, biomédicale, électronique, science des matériaux :

En science des matériaux :

Certains nanomatériaux comme les NTCs mono-feuillets (*Single-Walled Carbon NanoTubes* ou SWCNTs) et les NTCs multi-feuillets (*Multi-Walled Carbon NanoTubes* ou

MWCNTs), sont très utiles pour leurs propriétés mécaniques. Ils sont plus solides, six fois moins denses et dix fois plus élastiques que l'acier.

Dans le domaine de l'électronique :

Les nanoplaques (de sélénium par exemple) sont utilisées comme semi-conducteurs.

En cosmétique :

Les nanoparticules peuvent être utilisées pour augmenter l'absorption percutanée des substances actives (Khezri, Saeedi, and Maleki Dizaj 2018), par exemple avec des fullerènes (Mousavi, Nafisi, and Maibach 2017). Elles sont aussi utilisées en tant qu'additifs pour stabiliser le produit, augmenter sa conservation ou encore le colorer, avec des nanoparticules de dioxyde de titane utilisées comme colorant blanc (Weir et al. 2012).

Dans le domaine biomédical :

Du fait de leur taille et de leur réactivité les nanomatériaux sont capables de servir de véhicule à d'autres substances pour délivrer des médicaments ou des gènes grâce aux liposomes par exemple (Panahi et al. 2017). Des nanoparticules poreuses comme la silice mésoporeuse (Bitar et al. 2012) sont particulièrement efficace en thérapie ciblée. Les nanoparticules de silice peuvent aussi être utilisées pour faire de la détection d'ADN par fluorescence. La silice peut également servir d'auxiliaire en imagerie médical, tout comme les nanoparticules d'or (Viabitskaya et al. 2011), d'argent (Gong et al. 2007) ou d'oxydes de fer (Lee et al. 2009). De nombreux nanomatériaux peuvent aussi servir d'outils diagnostiques, pour la détection ou la quantification de biomarqueurs (e.g. la nanocellulose (Golmohammadi et al. 2017), les nanoparticules magnétiques (Zhang, Guo, and Cui 2009), les quantum dots (Deng et al. 2007), les nanoparticules de dioxyde de zinc (Lu et al. 2008), les nanoparticules de carbonate de calcium (Shan et al. 2007))

Ces nombreuses applications montrent bien l'intérêt fonctionnel des nanomatériaux, et c'est pourquoi ils ont également trouvé leur place en agroalimentaire.

2.2 Application des nanomatériaux dans l'alimentation

Les nanomatériaux sont utilisés dans l'agroalimentaire selon 3 usages :

- En tant qu'additif alimentaire dans le produit fini
- En tant qu'additif support
- En tant que matériaux au contact des denrées alimentaires (MCDA)

Fonction des nanomatériaux dans les MCDA :

Les MCDA ont pour rôle de prévenir la détérioration des qualités nutritives et organoleptiques des aliments, et d'assurer leur conservation. Pour assurer ces fonctions, on y trouve des matériaux empêchant le passage de l'oxygène et des UV à travers l'emballage, le développement des micro-organismes, régulant l'humidité et le pH, et permettant la stabilité des nutriments. Or certains nanomatériaux permettent de remplir cette fonction mieux que le ferait des substances non nanoparticulaire, c'est pourquoi ils sont utilisés dans les MCDA (Martirosyan and Schneider 2014). Les nanomatériaux peuvent être utilisés pour concevoir des MCDA intelligents, qui permettent par exemple de suivre ces paramètres de pH, d'humidité, etc (Neethirajan and Jayas 2011).

Exemple de nanomatériaux MCDA par fonction :

- Antimicrobienne : nanoparticules d'argent (Ag NPs)(Panea et al. 2014).
- Anti-oxygène : nanocomposites contenant des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂ NPs)(Mills et al. 2006).
- Contrôle de l'humidité :nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO NPs), nanoparticules d'oxyde d'aluminium (Al₂O₃ NPs), TiO₂ NPs (Goudarzi, Shahabi-Ghahfarrokhi, and Babaei-Ghazvini 2017, He et al. 2016).
- Conservation des qualités nutritives: Nanocomposites (polymères à base de silicates, titanate, NTC) et nanocomposites biodégradables (cellulose, amidon, polylactide (PLA), pectine, etc.)(Tang et al. 2012).

Fonction des nanomatériaux dans les additifs :

D'après l'EFSA (European Food Safety Authority) les additifs alimentaires sont des substances ajoutées intentionnellement aux aliments pour exercer certaines fonctions technologiques spécifiques, par exemple pour colorer, sucrer ou contribuer à la conservation des aliments. Ils peuvent aussi servir à améliorer la texture de l'aliment, ou encore sa qualité nutritionnelle. Ces fonctions sont généralement assurées par des particules non-nanométriques, néanmoins certaines fonctions n'existent que grâce aux nanoparticules:

Les nanoparticules peuvent par exemple servir à l'encapsulations des nutriments. En plus de protéger les nutriments, elles leur permettent d'être mieux absorbées par l'intestin grâce à la petite taille et la grande surface spécifique des particules produites, mieux absorbées qu'elles ne le seraient à l'échelle non nanométrique (Dwyer et al. 2015).

Exemples de nanomatériaux dans les additifs alimentaires par fonction:

- Encapsulants : nanoparticules de carbonate de calcium (CaCO_3 NPs)(Kurapati and Raichur 2013) et nanoparticules de dioxyde de silicium (SiO_2 NPs)(Pérez-Esteve et al. 2016)
- Enrichissant alimentaire : Les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3 NPs) utilisées comme supplément en fer en cas d'anémie (Behera et al. 2014), ou les CaCO_3 NPs pour augmenter la biodisponibilité du calcium dans le lait (Erfanian, Rasti, and Manap 2017)
- Colorant : nanoparticules d'oxyde de fer (Aquilina et al. 2016)
- Anti-agglomérant : SiO_2 NPs

Actuellement les nanomatériaux les plus utilisés en termes d'usages dans l'alimentation sont des inorganiques (Ariyaratna, Rajakaruna, and Karunaratne 2017). Ils ne sont pas les plus utilisés en terme de quantité, car il est plus simple et préférable pour les industriels d'utiliser des additifs reconnus sans danger (U.S. Food and Drug Administration 2007). Néanmoins, ils sont fréquents et sont les plus douteux en matière de toxicité. Ces additifs inorganiques emploient un nombre limité d'éléments chimiques (Zn, Al, Ti, Au, Ag, Si, Cu, Co, et Fe) et sont généralement sous forme de métaux ou d'oxydes de métaux (ZnO , Al_2O_3 , TiO_2 , SiO_2 , Fe_2O_3). Parmi eux, les plus fréquents sont le dioxyde de titane (TiO_2), les aluminosilicates, et le dioxyde de silicium (SiO_2)(Lomer et al. 2004).

3 Nanoparticules et société

Le développement de technologies utilisant les nanomatériaux offre une valeur ajoutée à ces technologies, comme on a pu le voir à travers leurs nombreux champs d'application, mais constitue aussi un risque émergent encore mal cerné. Le caractère anxiogène associé à toute exposition, outre le danger qu'elle peut représenter, est très lié aux preuves que cette exposition existe et touche le public. En effet, si nous prenons pour exemple l'usage des nanotubes de carbone (NTC) pour augmenter la résistance mécanique des matériaux (ex : équipements sportifs en fibre de carbone, carrosseries automobiles), cet usage des NTCs n'est pas anxiogène pour le consommateur car il ne semble pas présenter de risque pour la population générale en termes d'exposition. D'autres voies d'exposition sont en revanche plus anxiogènes pour la population, c'est le cas de l'alimentation. A l'instar des OGMs (Organismes génétiquement modifiés), dont le risque perçu a rapidement été considérable du simple fait de leur présence dans notre

alimentation, un phénomène similaire semble gagner les consommateurs vis-à-vis des nanoparticules, ce qui peut être lié au fait que l'exposition aux nanoparticules dans l'alimentation est cachée et non consentie.

A partir du moment où cette exposition est suggérée mais mal expliquée et mal cadrée réglementairement elle n'en devient que plus anxiogène.

Les risques alimentaires sont d'ailleurs particulièrement anxiogènes pour les français car ils concernent inévitablement tout le monde, à tous les âges, y compris les populations sensibles : les femmes enceintes, les enfants et les personnes âgées. Ces risques doivent être maîtrisés en amont par les différents acteurs de la chaîne de fabrication des aliments et évalués par des agences publiques de sécurité sanitaire des aliments, comme l'Anses ou l'EFSA. Mais dans le cas d'un risque encore mal connu et mal circonscrit, le seul recours pour le consommateur est d'être le mieux informé possible de ce que contiennent ses aliments, ce qui passe par l'étiquetage des ingrédients.

Or, la présence de nanoparticules dans les aliments, bien que réelle, n'est à ce jour pas étiquetée en vertu de la réglementation sur l'étiquetage que nous verrons par la suite. La question de la présence de nanoparticules dans l'alimentation est soulevée pour la première fois par l'institut national néerlandais pour la santé publique et l'environnement (RIVM) en 2007 (Bouwmeester et al. 2007), puis par l'Afssa en 2009 sous l'impulsion de la Direction générale de la santé (DGS)(Afssa 2009). En juin 2016, l'ONG Agir pour l'environnement publie un communiqué de presse démontrant cette fois la présence de nanoparticules dans l'alimentation selon des analyses métrologiques.

Ces analyses sont les seuls moyens irréfutables pour identifier et caractériser les nanoparticules directement dans la matrice alimentaire. Il s'agit là d'une étape préliminaire importante pour justifier de la nécessité de mener une évaluation des risques liée à ces nanoparticules dans l'alimentation. En outre, il est essentiel de disposer de méthodes analytiques adaptées aux nanoparticules pour mener à bien les essais toxicologiques. Il faut pouvoir vérifier à tout moment la présence de ces nanoparticules, de l'aliment à l'organisme, ou de la dose administrée à la cellule cible, de manière quantitative et qualitative. Pour une substance classique, connaître la dose administrée peut être suffisante, mais pour une nanoparticule, l'effet est fortement associé à ses propriétés physico-chimiques, par exemple la distribution en taille des particules au sein de l'échantillon : de la poudre de nanoparticules de dioxyde de silicium dont les particules mesurent 10 nm en moyenne n'aurait pas la même toxicité que si ses particules

mesuraient 100 nm. On a donc besoin de méthodes analytiques capables de mesurer cette distribution en taille (caractérisation quantitative). Il faut également être sûr que ce que l'on quantifie correspond à la nanoparticule que l'on recherche (caractérisation qualitative).

C'est pourquoi il est nécessaire d'avoir des méthodes qualitatives et quantitatives adaptées aux nanoparticules pour évaluer leur toxicité.

Chapitre 2: Caractériser et identifier les nanoparticules dans l'alimentation par des moyens analytiques et réglementaires

1 Introduction

Comme toutes particules ou substances, les nanoparticules (NPs) peuvent être définies par un grand nombre de paramètres physico-chimiques, mais les particularités des NPs rendent leur l'identification et leur caractérisation difficile dans l'alimentation.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux paramètres physico-chimiques importants pour caractériser les nanoparticules. Comprendre ces paramètres est essentiel car ce sont eux qui modulent le comportement particulier des nanoparticules dans leurs interactions avec l'organisme, et par la même occasion leur toxicité.

Dans un deuxième temps, nous verrons les méthodes analytiques permettant de caractériser ces paramètres en vue d'être utilisé pour identifier les nanoparticules dans l'alimentation ou dans les protocoles expérimentaux.

Dans un troisième temps, nous discuterons des moyens réglementaires existants pour montrer la présence des nanoparticules dans l'alimentation, et de la nécessité d'avoir recours aux méthodes analytiques pour étudier notre exposition aux nanoparticules par l'alimentation.

2 Caractéristiques physico-chimiques essentielles

2.1 Propriétés physico-chimiques pouvant affecter la toxicité des nanoparticules

Selon l'EFSA, dans son guide sur l'évaluation du risque relatif aux nanotechnologies dans l'alimentation (Hardy et al. 2018), il est difficile de faire une liste courte et exhaustive des paramètres pouvant influencer la toxicité d'une nanoparticule l'EFSA, mais elle retient:

- 1) Sa morphologie, sa taille et sa surface spécifique,
- 2) Sa capacité à changer de propriétés de surface, et à produire des néoformés ou métabolites,

- 3) Son hydrophobicité/hydrophilie,
- 4) Sa stabilité/persistance (dans l'eau, les graisses, les fluides corporels, et son manque de capacité à se dissoudre/se dégrader),
- 5) Sa réactivité chimique et biologique (par exemple sa biodisponibilité)
- 6) Son activité antimicrobienne (sur l'équilibre de la flore intestinale par exemple).
- 7) Sa mobilité (transport à travers les membranes ou via macrophages etc.)
- 8) Sa capacité à potentialiser d'autres substances (par exemple en les adsorbants et en les aidant à franchir les barrières)
- 9) Plus généralement sa capacité à interagir avec d'autres molécules
- 10) Et sa bioaccumulation.

Ces lignes directrices nous permettent de comprendre la diversité d'étudiés de multiples paramètres physico-chimiques. C'est cette étude scrupuleuse, notamment des paramètres les plus importants que sont la morphologie, la taille, la charge de surface et la nature chimique, qui permettra aux articles scientifiques étudiant les nanoparticules (NPs) d'être pertinent.

La physico-chimie d'une NP peut être décomposée en deux catégories: les propriétés innées de la NP, et ses propriétés acquises.

2.2 Propriétés physico-chimiques innées

Les propriétés innées de la NP sont celles qui sont uniquement liées à la nature de la particule en elle-même et qui n'ont pas vocation à changer au cours du temps. C'est le cas de la forme de la nanoparticule, de sa composition chimique, de sa fonction et de sa taille (en tout cas de la taille du coeur de la NP, ici figuré en rouge sur la figure 5)

Source: (Rauch et al. 2013)

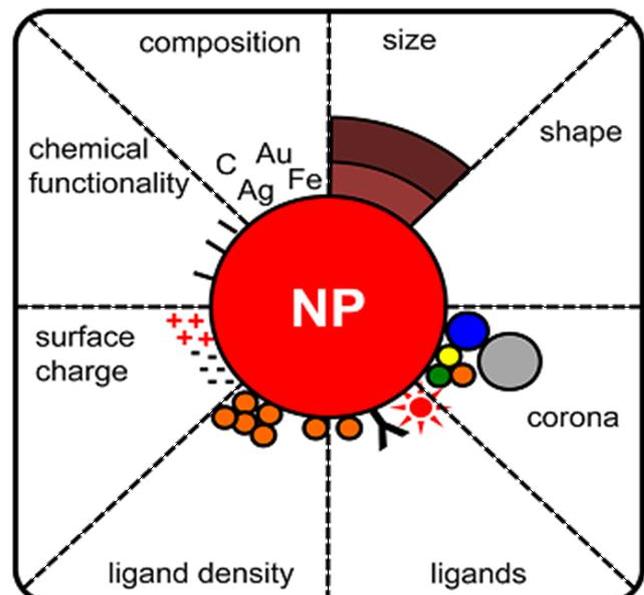


Figure 5: Propriétés physico-chimiques d'une nanoparticule

2.3 Propriétés acquises

Une fois dans l'organisme, les nanoparticules ont la faculté d'adsorber à leur surface les protéines de l'organisme. La force de cette adsorption dépend de l'affinité des protéines avec la particule, elle-même dépendante de la fréquence de contact entre la protéine et la particule, et de la force de la liaison (soit du coefficient de dissociation à l'équilibre (K_d)).

Les protéines ainsi adsorbées forment la « corona » (figure 6) de la NP, et influencent sa toxicocinétique, c'est-à-dire sa capacité à se déplacer dans les tissus. A l'inverse, la corona des NPs peut également permettre à d'autres molécules d'être absorbées sur le passage de la nanoparticule, pendant que celle-ci franchie une barrière épithéliale par exemple, augmentant par conséquent l'absorption cette fois de ces autres molécules

(Saptarshi, Duschl, and Lopata 2013). L'adsorption de ces protéines est un processus très dynamique, avec adsorptions et désorptions fréquentes. Cette corona est très importante car elle influe sur l'ADME de la NP (Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination)

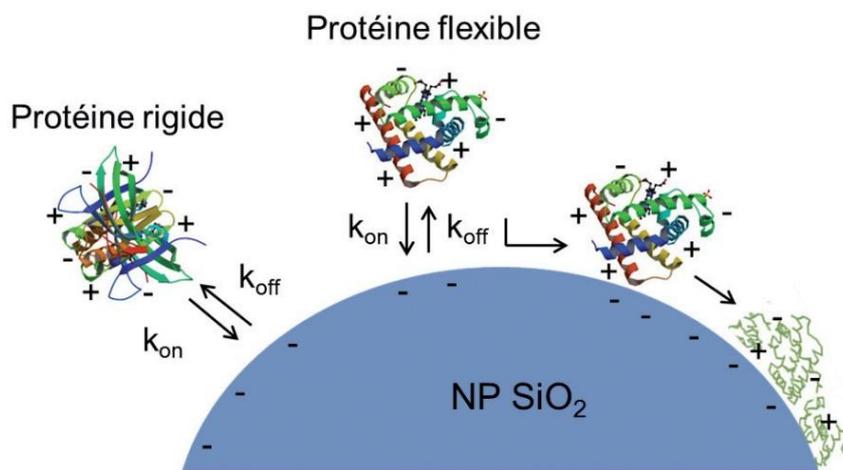


Figure 6: Propriété de la nanoparticule à adsorber des protéines (corona)

Source : (Devineau, Boulard, and Labarre 2013)

Une autre propriété acquise essentielle est la charge de surface, qui peut varier en fonction du milieu dans lequel se trouve de la NP, et est également liée à sa corona. Cette charge peut fortement moduler les interactions de la NP avec son milieu et sa biodisponibilité, un facteur important influençant la toxicité.

La particularité des nanoparticules est que sa petite taille rend certains de ces paramètres particulièrement compliqués à étudier, ce qui nécessite l'emploi de méthodes analytiques bien précises.

3 Méthodes analytiques adaptées à l'étude des nanoparticules

3.1 Déterminer la taille, la forme et la surface spécifique des nanoparticules

3.1.1 Taille et distribution en taille des nanoparticules

TEM (transmission electronic microscopy) et **SEM** (scanning electronic microscopy):

La microscopie électronique permet d'obtenir des images en très haute résolution (jusqu'à 0,1 nm), et de mesurer la taille des particules par observation directe.

SAXS (*Small Angle X-rays Scattering*) et **USAXS** (*Ultra Small Angle X-rays Scattering*):

Technique qui quantifie les changements de densité dans l'échantillon par passage d'un rayon X à faible longueur d'onde (0,1-0,2 nm), et permet de reconstituer une distribution en taille pour des échantillons de 1 à 100 nm pour le SAXS, et inférieurs pour l'USAXS.

La spectrométrie de masse à couplage inductif simple particule (ou **spICP-MS** pour *single particule Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) permet de quantifier la masse des échantillons particule par particule et, grâce à un étalonnage et à des transformations mathématiques, de calculer la taille des particules. Cette méthode jusqu'ici peu utilisée est en train de se démocratiser (Laborda, Bolea, and Jiménez-Lamana 2014).

3.1.2 Cas particulier de la XRD (*X-ray diffraction*)

Cette technique permet d'identifier et de quantifier la phase cristalline, et par le calcul d'obtenir une distribution en taille de cette phase cristalline. Elle peut servir à déterminer un ratio de matériaux cristallins par rapport aux matériaux amorphes, mais elle ne sera pas pertinente pour décrire des nanomatériaux entièrement amorphes (comme c'est le cas pour la silice amorphe synthétique par exemple).

3.1.3 Cas particulier de la DLS (*dynamic light scattering*)

La **DLS** est une technique qui utilise la diffusion de la lumière pour mesurer le mouvement brownien des particules et qui, par une conversion mathématique, permet d'estimer la taille des particules. Cette technique rapide et peu onéreuse est très utilisée pour estimer la taille des particules et leur distribution en taille, néanmoins sa précision est limitée pour analyser des mélanges de particules primaires et d'agrégats de tailles hétérogènes. La DLS a tendance à surestimer la taille des particules primaires en solution si celles-ci ne

sont pas suffisamment dispersées et forment des agrégats ou agglomérats. C'est la raison pour laquelle les résultats scientifiques se basant sur une caractérisation de la taille des nanoparticules réalisée exclusivement par DLS ne pourront être considérés fiables.

3.2 Morphologie des nanoparticules

Pour étudier la morphologie des nanoparticules nous avons besoin d'une méthode donnant des images directes des NPs et donc d'une résolution d'images très élevée, ce qui est possible uniquement par TEM, SEM et AFM.

L'AFM (*Atomic Force Microscopy*) est une technique en champ proche permettant d'obtenir des images de la topologie de surface d'un échantillon jusqu'à une résolution verticale de 0,01 nm.

3.3 Surface spécifique des nanoparticules

On désigne ici par surface spécifique l'aire de surface des particules par rapport à leur volume (en m^2/m^3), que nous abrégons VSSA pour *volume specific surface area*.

La **SAXS** (*Small Angle X-rays Scattering*) et **USAXS** (*Ultra Small Angle X-rays Scattering*) se base sur le principe de la diffraction des rayons-X traversant un échantillon. En mesurant et en analysant l'intensité et l'angle de diffusion de ces rayons-X, la technique parvient à déterminer la distribution en taille et l'aire de surface de l'échantillon.

La méthode de calcul par l'équation dite de Brunauer, Emmett et Teller (BET) permet de calculer la quantité de gaz adsorbée par un échantillon par unité de volume, et par extension la surface spécifique des particules (en m^2/g).

La reconstitution d'images en 3D grâce à la tomographie par TEM peut également être utilisée pour calculer une surface spécifique mais cette méthode n'est pas fréquemment utilisée.

3.4 Identifier la chimie élémentaire des nanomatériaux

La Spectrométrie à Emission Optique couplée à l'ICP (ICP-OES) et la Spectrométrie de Masse couplée à l'ICP (ICP-MS) permettent tous deux de mesurer les concentrations élémentaires dans un échantillon solide mis en solution. La résolution de ces deux techniques est très élevée (de l'ordre du ppb voire ppt)

A noter que d'autres variantes de l'ICP-MS sont utilisables pour détecter la chimie élémentaire des nanomatériaux, par couplage avec d'autres techniques de séparation comme le fractionnement d'écoulement de champs.

Le fractionnement d'écoulement de champ (ou FFF pour *field flow fractionation*) est capable de séparer les nanoparticules en fonction de leur diamètre hydrodynamique (de 1 nm à 1 µm) et permet d'obtenir leur distribution en taille. Une variante de cette technique est la FFF asymétrique (ou AF4) qui, associée à la spectrométrie de masse, bénéficie d'une plus grande sensibilité de détection des NPs et permet l'analyse de la composition élémentaire de l'échantillon (AF4-ICP-MS)(Barahona et al. 2016).

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique d'analyse de la composition des composés organiques. Elle est plus couramment utilisée sur des liquides ou des gaz mais elle peut aussi être utilisée sur des solides préalablement extraits par solvant, dégazage ou pyrolyse.

L'EDS, aussi abrégée EDX (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) est une technique polyvalente, répandue et peu onéreuse, permettant l'analyse compositionnelle rapide des échantillons « au premier coup d'œil » en étant couplée à de la TEM ou SEM. Elle est très efficace mais les échantillons doivent être compatibles avec le vide (problématique pour l'analyse des matériaux organiques humides, mais pas pour les matériaux inorganiques) et a une sensibilité limitée pour les éléments à faible numéro atomique Z.

3.5 Choix des méthodes analytiques et des paramètres à étudier

La caractérisation des paramètres physico-chimiques des nanoparticules est essentielle car leur toxicité est dépendante de ces paramètres (Hardy et al. 2018), mais cela n'est pas la seule raison. Notre objectif est également d'étudier les méthodes analytiques capables de mettre en évidence la présence des NPs dans les additifs alimentaires ajoutés aux denrées alimentaires. Pour rendre cette identification possible, il est nécessaire de recourir à une méthode analytique montrant de façon directe et imagée ces NPs, et permettant de mesurer leurs tailles pour s'assurer qu'elles sont bien à l'échelle nanométrique. Afin de confirmer que les nanoparticules observées correspondent bien à l'additif alimentaire soupçonné de contenir ces nanoparticules, il faut également caractériser la composition chimique des échantillons.

De la même façon, pour étudier la toxicité des NPs dans les études toxicologiques (*in vitro* ou *in vivo*), nous avons besoin d'une caractérisation de la taille, de la morphologie et de la composition chimique précise des NPs testées pour nous assurer que ces dernières correspondent aux NPs utilisées dans les additifs alimentaires. Cette condition est essentielle pour que les données toxicologiques obtenues soient pertinentes pour servir une future évaluation des risques sanitaires (ERS) liée aux NPs dans l'alimentation. L'identification directe et imagée des NPs dans les modèles testés (lignées cellulaires, tissus animaux) après exposition du modèle aux NPs est également importante pour établir un lien de causalité entre exposition aux NPs et effets observés.

Pour obtenir toutes ces informations, la méthode analytique la plus adéquate, permettant de caractériser à la fois la morphologie et la taille des NPs par observation directe, est la microscopie électronique à transmission (TEM). La microscopie électronique à balayage (SEM) et la microscopie à force atomique (AFM) correspondent également à ces critères mais sont moins répandues. Leurs résolutions verticales respectives de 0,1 nm, 1 nm et 0,1 nm les autorisent à étudier finement la nano-échelle (Eaton et al. 2017).

Pour mesurer la taille des particules, le guide de l'EFSA sur l'évaluation du risque lié aux NPs (Hardy et al. 2018) recommande l'utilisation d'au moins deux méthodes analytiques complémentaires, dont l'une d'elle sera de préférence de la microscopie électronique. La DLS peut être une méthode complémentaire pour mesurer la taille des particules, néanmoins celle-ci a des limites. Outre son efficacité pour mesurer la distribution en taille de particules hétérogènes et agrégées (Hoo et al. 2008), elle peut aussi être inadaptée à l'étude de certaines particules diffusant mal ou irrégulièrement la lumière comme c'est respectivement le cas des poudres de silice et des nanofibres (Babick et al. 2016). La caractérisation en taille peut aussi être complétée par la mesure de la surface spécifique (VSSA), qui dépend de la forme et de la taille de la NP.

L'AFM, également performante pour étudier la taille des NPs, a l'inconvénient que pour caractériser des nanoparticules dans une matrice alimentaire l'échantillon devra subir un pré-traitement et on ne pourra pas obtenir la composition élémentaire de cet échantillon alimentaire (Lu et al. 2015). Le TEM n'a pas cet inconvénient car il peut être couplé à l'EDX pour analyser la composition élémentaire, ce qui requiert uniquement une dilution et une dispersion de l'échantillon à analyser.

Nous avons présenté d'autres méthodes analytiques couplées (e.g. AF4-ICP-MS) ou complémentaires (e.g. EDS + DLS + spICP-MS) utilisables pour caractériser la forme, la taille, et la chimie élémentaire des NPs, mais nous estimerons qu'une caractérisation par TEM des NPs est indispensable pour juger de la pertinence des résultats observés.

La construction d'un protocole analytique pertinent est une étape clé de l'évaluation de la toxicité des substances. Les obstacles métrologique concernant les NPs commencent à être élucidés peu à peu, et des lignes directrices à être rédigées. Toutefois, l'étude des NPs et les premières preuves de leur toxicité ne sont plus si récentes, et c'est grâce à ces preuves que l'amélioration des protocoles analytiques a pu se faire et que des cadres réglementaires appliqués aux NPs ont vu le jour.

4 Premières preuves des effets des nanoparticules sur la santé

4.1 Exposition professionnelle aux nanoparticules

Les nanoparticules ont en premier lieu été étudiées pour leur toxicité par inhalation en milieu professionnel. L'inhalation de poussières en milieu professionnel est un problème sanitaire bien connu, mais *quid* de l'inhalation de particules encore plus petites ? Y a-t-il un risque différent lié à l'inhalation de nanoparticules (également appelées "particules ultrafines", ou PUF) ? Il a alors été prouvé que la taille des particules inhalables influence la façon dont celles-ci se déposent dans le système respiratoire (INRS 2005): Les nanoparticules, ou PUF, ont la capacité de se déposer majoritairement au niveau alvéolaire, alors que les particules de plus de 100 nm se déposent presque exclusivement au niveau des voies extra-thoraciques (Annexe 2). Cette différence dans le comportement des particules en aérosol en fonction de leur taille a ainsi témoigné d'un risque nouveau et spécifiquement lié aux propriétés de la nano-échelle.

Outre la taille des particules, la surface spécifique (VSSA) des nanoparticules (en m^2/m^3) est aussi à mettre en cause dans ces résultats. Elle est inversement proportionnelle à la taille de la particule, donc particulièrement élevée chez une nanoparticule (Diedrich et al. 2012). Sa VSSA lui confère une plus grande surface réactive, pour adsorber d'autres molécules à sa surface (cf propriétés de la corona page 26) et pour s'adsorber elle-même aux cellules.

D'après l'INRS, des études suggèrent que cette caractéristique permet aux nanoparticules d'induire un stress oxydant important au niveau des épithéliums pulmonaires. Ceci aurait

un effet délétère sur l'activité des macrophages et donc sur le mécanisme de défense qu'est la phagocytose. De plus, les ROS (espèces réactives de l'oxygène) générées endommageraient les barrières épithéliales. En conséquence, la toxicité potentielle par inhalation des nanoparticules se distingue de celles des particules micrométriques par sa propension à pouvoir provoquer des effets systémiques (INRS 2005). La clairance des NPs est davantage macrophagique que mucociliaire, or les NPs ont également une longue capacité de rétention dans ces macrophages alvéolaires à l'état non dissous (Takenaka et al. 2001) et les NPs, en entrant dans la paroi alvéolaire, ont la possibilité de passer dans les capillaires sanguins et de se distribuer dans tout l'organisme.

L'évaluation du risque associée à l'inhalation de nanoparticules a donné suite à de nombreuses études toxicologiques, notamment sur les nanoparticules les plus ubiquitaires et abondantes telles que les NPs de dioxyde de titane (TiO₂ NPs)(Cattaneo et al. 2010). Dans les années 2000, les études concernant les TiO₂ NPs s'accordent à montrer un effet inflammatoire des TiO₂ NPs et aggravant sur les pathologies d'origines inflammatoires (Brayner 2008, Stone, Johnston, and Clift 2007).

L'ERS des NPs reste complexe du fait du manque de lignes directrices pour évaluer leur toxicité et des multiples formes de nanoparticules existantes par substance (e.g. TiO₂ NPs sous forme rutil de 25 nm, TiO₂ NPs sous forme rutil/anatase de 100 nm, etc.). Néanmoins, ces premières preuves de la toxicité des NPs ont alimenté les inquiétudes quant à l'usage des NPs dans l'alimentation, notamment avec l'usage du TiO₂ en tant qu'additif alimentaire (codifié E 171).

4.2 Exposition alimentaire aux nanoparticules

L'ERS liée aux nanoparticules dans l'alimentation présente une difficulté supplémentaire par rapport à l'ERS en milieu professionnel: réussir à identifier des NPs dans une matrice alimentaire. Si les preuves de la présence de nanoparticules dans la denrée alimentaire n'arrivent que tardivement (2016), des études commencent à suggérer une toxicité par ingestion de nanoparticules supérieure à la toxicité de leur équivalent non nanoparticulaire dès 2000 (Bouwmeester et al. 2009).

On montre par exemple que les NPs ont une plus grande capacité à franchir la barrière gastro-intestinale, ce qui leur permet d'atteindre une multitude d'organes par le système circulatoire sanguin, en particulier le cerveau, la moelle osseuse, la rate et le foie (Hoet, Brüske-Hohlfeld, and Salata 2004, Borm et al. 2006). Ces premières preuves de toxicité des NPs ont suscité la mise en place de réglementations pour cadrer leur utilisation dans

l'alimentation. Il y a deux grandes catégories d'utilisations des NPs en alimentation (cf page 19), en tant qu'additif et en tant que matériau au contact des denrées alimentaires (MCDA). Ce travail ayant pour objectif d'étudier la toxicité des NPs dans les additifs, nous nous intéresserons ici qu'aux réglementations spécifiques aux nanomatériaux dans l'alimentation et aux additifs. Nous essaierons également de comprendre en quoi la réglementation actuelle est aussi un frein à l'évaluation du risque liée à ces nanoparticules dans les additifs alimentaires.

5 Réglementations sur les nanomatériaux manufacturés dans les additifs alimentaires

5.1 Réglementation sur les additifs :

Avant de définir ce qu'est un nanomatériau pour le domaine alimentaire, il nous faut déjà comprendre la réglementation sur les additifs, qui sont les produits contenant ces nanomatériaux ajoutés intentionnellement (rappel: pour simplifier, nous considérerons de la même façon les termes nanomatériaux et nanoparticules).

Selon l'EFSA, les additifs alimentaires sont des substances ajoutées intentionnellement aux aliments pour exercer certaines fonctions technologiques spécifiques, par exemple pour colorer, sucrer ou contribuer à la conservation des aliments. L'usage de ces additifs dans la denrée alimentaire doit être étiqueté sur les emballages, en précisant la fonction de l'additif ainsi que son nom complet ou son numéro E. Les numéros E ont un code numériques à 3 chiffres, appelé numéro SIN (pour Système international de numérotation) qui permet de connaître facilement leur usage grâce au 1^{er} chiffre (Tableau 1).

Le dioxyde de titane par exemple, utilisé comme colorant blanc, est aussi désigné par le code E 171. Cette classification en termes d'usage n'est pas absolue. Une même substance peut par exemple avoir un usage principal en tant que colorant et d'autres usages, mais son numéro E, tout comme son numéro CAS demeure unique.

Il existe un programme issu d'une action conjointe entre la FAO (Food Agriculture and Organization of the United Nations) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), « The Codex Alimentarius Commission », qui liste les additifs autorisés dans l'alimentation, leurs usages et restrictions d'usage dans les denrées et leurs limites maximales d'utilisation (FAO/OMS 2017). Il est important de noter que la plupart d'entre eux sont utilisés en *quantum satis*, c'est-à-dire en quantité suffisante pour obtenir l'effet escompté, ce qui ne

Code E	Fonction
E 100	Colorant
E 200	Conservateur
E 300	Anti-oxygène
E 400	Texturant
E 500	Acidifiant
E 600	Exhausteur de goût
E 900	Edulcorant

fixe pas de réelle limite en terme de quantité. En Europe, tous les additifs sont évalués par l'EFSA avant leur mise sur le marché. Les autorisations d'utilisations des additifs alimentaires et leurs spécificités sont alors édictées par le règlement 1129/2011 de la Commission Européenne (Commission Européenne 2011b).

Tableau 1 Code additif par fonction

Si ces additifs contiennent des NPs, comment la réglementation le prend en compte ? Quelles sont les obligations réglementaires obligeant les industries alimentaires qui utilisent des NPs en tant qu'additif à déclarer cet usage ? Enfin, quels sont les dispositions réglementaires permettant au consommateur d'être informé de cette exposition aux NPs par l'intermédiaire des additifs alimentaires ?

5.2 Dispositifs de déclarations obligatoires des usages industriels des nanomatériaux

5.2.1 Le règlement REACH et l'enregistrement des nanomatériaux

Le règlement européen REACH est une disposition du Parlement Européen et du Conseil, qui oblige fabricants et importateurs à déclarer, enregistrer, soumettre à autorisation et à évaluation toute substance produite ou importée à plus d'une tonne par an. REACH a pour objectif de protéger la santé et l'environnement en proposant des restrictions d'usages des substances chimiques évaluées s'il s'avère que celle-ci présentent un risque inacceptable. Malheureusement, à ce jour aucune exigence spécifique aux nanomatériaux n'existe dans REACH, les conditions pour leur enregistrement en termes de tonnages annuels sont les mêmes que pour les substances chimiques conventionnelles. Or, la nature même des

nanoparticules fait qu'elles sont caractérisées par un nombre de particule par unité de volume très important, et peuvent être utilisées de manière efficace à de faibles quantités. Par conséquent, les conditions d'enregistrement dans REACH (emploi d'une tonne par an minimum) sont difficilement satisfaites pour les nanomatériaux. De plus, REACH ne distingue pas les substances chimiques en fonction de leur état nanoparticulaire ou non, ce qui rend ce puissant outil d'évaluation des risques inadapté (pour le moment) à la problématique des nanomatériaux.

Bien qu'il existe d'autres obligations dans REACH pour des déclarations inférieures à 1 tonne par an, par exemple la communication des informations sur l'utilisation de la substance, de ses restrictions et autorisations d'usage, ou de sa fiche de données de sécurité (FDS), il reste inadéquat pour obtenir des données toxicologiques sur des substances à faible tonnage annuel (<1 t).

5.2.2 R-Nano et les déclarations d'usages des nanomatériaux

Afin de pallier à une absence totale de connaissance sur les emplois des nanomatériaux en termes d'usages et de quantité, le gouvernement français a mis en application depuis le 1^{er} janvier 2013 un système d'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire appelé « R-Nano » et qui est géré par l'Anses. Uniquement dédié aux substances nanoparticulaires, ce dispositif oblige tous fabricants, importateurs ou distributeurs de NPs à déclarer leur usage si la quantité utilisée dépasse les 100 grammes par an. Ainsi, les déclarants devront fournir le nom chimique de la substance, la quantité importée ou fabriquée, et son utilisation.

Les déclarations obligatoires dans R-Nano requièrent une quantité d'information limitée, néanmoins elles permettent d'apporter la preuve de l'utilisation des nanomatériaux dans l'alimentation. En effet, les rapports annuels de R-nano précisent tous les usages déclarés par substance, et catégorisent ces usages par domaine. Dans R-Nano une seule catégorie concerne l'alimentation, nommée « Fabrication de produits alimentaires » et codée « su4 » selon la nomenclature propre à R-Nano. En 2015, on retrouve par exemple le carbonate de calcium déclaré dans la catégorie « su4 : fabrication de produits alimentaires » (Annexe 3), qui existe d'ailleurs sous forme d'additifs alimentaires sous le nom E 170. Parmi les substances reportées dans cette catégorie "alimentaire" on trouve parfois la substance nommée directement par son code additif, par exemple le dioxyde de silicium déclaré sous le nom E 551 (Annexe 3), ce qui apporte la preuve que ces additifs contiennent des NPs.

5.3 Définitions réglementaires et règle d'étiquetage des nanomatériaux dans l'alimentation

Si des substances à l'état nanoparticulaire sont effectivement utilisées en alimentation, comment se fait-il que l'exposition aux nanomatériaux dans l'alimentation reste controversée et que le consommateur n'en soit pas informé ?

Nous l'avons vu, le consensus pour définir ce qu'est un nano-objet, et par la même occasion une nanoparticule, est bien établi (page 14), mais ce n'est pas le cas de la définition des nanomatériaux manufacturés qui n'est décrite dans aucune réglementation transversale à tous les domaines d'application. Au contraire, les nanomatériaux manufacturés sont définis par de nombreux textes rien que pour le domaine de l'alimentation:

Tableau 2 Récapitulatif des réglementations concernant les nanomatériaux dans les additifs alimentaires :

Intitulés des textes relatifs à la définition des nanomatériaux	Apports des textes à la définition des nanomatériaux
Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux	Elle définit un nanomatériau comme étant un agrégat ou agglomérat de particules dont au moins 50% présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm (Commission Européenne 2011a).
Règlement (UE) N°1169/2011 du Parlement Européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires dit « INCO »	Dans ce règlement, un nanomatériau est composé de particules de moins de 100 nm, ou d'agglomérats ou d'agrégats dont beaucoup de leurs particules élémentaires ont une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins. De plus, leur présence doit clairement être indiquée dans la liste des ingrédients, en indiquant « nano » entre crochet après le nom de l'ingrédient (Parlement Européen and Conseil de l'Union Européenne 2011).

<p>Décret n°2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire pris en application de l'article L. 523-4 du code de l'environnement</p>	<p>Dans ce décret, une substance à l'état nanoparticulaire (= nanomatériau) est définie comme une substance dont une proportion minimale des particules présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm (sans préciser ce minimum) (Code de l'Environnement 2012).</p>
<p>Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement Européen et du Conseil du 25 novembre 2015 dit « Novel Food »</p>	<p>Il reprend la définition du règlement « INCO » et l'applique aux nouveaux aliments (Parlement Européen and Conseil de l'Union Européenne 2015).</p>
<p>Arrêté du 5 mai 2017 fixant les conditions d'étiquetage des nanomatériaux manufacturés dans les denrées alimentaires</p>	<p>Cet arrêté reprend la définition du règlement « INCO » en précisant pour information que l'EFSA recommande de réduire le seuil de 50% défini dans la recommandation du 18 octobre 2011 à 10 % (Ministère de l'environnement, de l'économie, and et de la santé 2017).</p>

Globalement, la réglementation n'est pas claire sur la proportion minimale de nanoparticules que doit contenir un nanomatériau pour être considéré en tant que tel. De ce fait, les fabricants, distributeurs et importateurs peuvent se référer à la recommandation de 2008 (Annexe 4), qui fixe cette proportion à 50%. Bien qu'il ne soit pas une obligation juridique, ce seuil de 50% est précis, contrairement à la définition du règlement « INCO » de 2011 (Annexe 5) reprise par les textes plus récents. Et si l'EFSA recommande un seuil de 10% de particules inférieures à 100 nm (dans au moins une des dimensions) pour définir les nanomatériaux, il n'a pas davantage de poids juridique que le seuil de 50% de la recommandation, qui reste une référence préférable pour les industriels.

Ce seuil est effectivement préférable car il permet d'exclure bon nombre d'additifs alimentaires contenant des NPs de la définition "nanomatériaux manufacturés". De plus, considérer un changement dans la distribution en taille des particules d'un additif, par rapport à ce qui est habituellement autorisé, déclenche de nouvelles obligations pour l'industriel, qui devrait déclarer l'additif nanométrique comme un nouvel additif selon les dispositions prévues par les textes suivants:

Tableau 3 Règlements sur la déclaration de nouveaux additifs

Intitulé du texte	Contenu du texte relatif aux nanomatériaux
<p>Règlement (CE) N°1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires</p>	<p>Tout additif déjà autorisé dont on modifierait la distribution en taille des particules (en utilisant des nanotechnologies par exemple) est considéré comme un nouvel additif et doit être réévalué.</p>
<p>Décret n°2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire pris en application de l'article L. 523-4 du code de l'environnement</p>	<p>Dans ce décret, une substance à l'état nanoparticulaire (= nanomatériau) est définie comme une substance dont une proportion minimale des particules présente une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm (sans préciser ce minimum).</p>

Notre problème majeur est que toutes ces dispositions réglementaires ne nous permettent pas de détecter efficacement les additifs qui pourraient contenir des nanoparticules, et par la même occasion d'orienter efficacement les efforts de la recherche sur la toxicité de ces nanoparticules. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de méthodes analytiques adaptées aux nanoparticules (cf page 27) est le seul moyen pour obtenir une **preuve directe** de leur présence dans les denrées alimentaires.

5.3.1 Etiquetage des nanomatériaux en alimentation

La disposition majeure de la réglementation INCO est qu'elle devrait permettre d'informer les consommateurs de la présence des nanoparticules dans l'alimentation par le biais de l'étiquetage de la mention [nano] dans la liste des ingrédients, pour tout ingrédient contenant des nanomatériaux. Or, la mention de la présence de nanoparticules sur les emballages alimentaires est rarissime et n'a été trouvée après une recherche minutieuse que dans un seul produit, qui n'est d'ailleurs pas un aliment mais un complément alimentaire (figure 7):

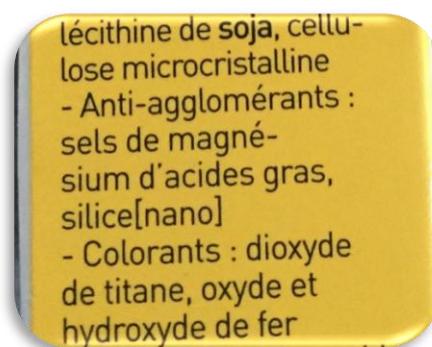


Figure 7: Liste d'ingrédients d'un emballage de complément alimentaire

Pourquoi ces nanomatériaux ne sont pas plus souvent étiquetés en alimentation alors que vraisemblablement ils existent puisque certains additifs sont reportés dans R-Nano ?

Hypothèse n°1 : Les additifs alimentaires ne contiennent réellement pas plus de 50% de nanoparticules.

Cette hypothèse, bien qu'envisageable, a d'ores et déjà été contredite par les contrôles menés par la DGCCRF et des analyses menés par le LNE pour l'association Agir pour l'environnement. Ces analyses ont mis en évidence la présence de nanoparticules dans les aliments en proportions supérieures à 50% pour plusieurs échantillons. Les additifs concernés par ces analyses étaient: le dioxyde de titane (ou E 171), le dioxyde de silicium (ou E 551) et les oxydes de fer (ou E 172)(Agir pour l'environnement 2016).

Hypothèse n°2: Un refus ou une ignorance de la réalité par les industriels de ce que contiennent les additifs qu'ils utilisent.

La crainte pour les industriels que le consommateur perçoive la présence de nanoparticules dans leurs produits de façon négative les découragerait à mentionner la présence de ces dernières sur les emballages. Selon la DGCCRF, ces industriels ne seraient pas conscients de la présence de ces nanoparticules, leurs propres analyses ne révélant pas la présence de NPs, s'expliquant pas l'utilisant de protocoles non adaptés comme la DLS.

Que l'une ou l'autre hypothèse soit la bonne, elles montrent toutes deux encore une fois l'importance d'une caractérisation des NPs par des moyens analytiques adaptés.

5.3.2 Incohérence entre les analyses métrologiques dans l'alimentation et les déclarations R-Nano

Comment expliquer que les additifs alimentaires identifiés comme contenant des nanomatériaux ne soient jamais reportés dans R-Nano ?

Hypothèse n°1:

C'est l'une des deux hypothèses précédentes qui s'applique.

Hypothèse n°2:

La réglementation régissant les déclarations dans R-Nano se basent sur une définition des nanomatériaux aussi imprécise que celles vues dans les règlements précédents ?

Tableau 4 Règlement relatif à la déclaration des nanomatériaux dans R-Nano

Intitulé du texte	Contenu du texte relatif aux nanomatériaux
Arrêté du 6 août 2012 relatif au contenu et aux conditions de présentation de la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire, pris en application des articles R. 523-12 et R. 523-13 du code de l'environnement	Cet arrêté précise le précédent décret en fixant cette « proportion minimale » à 50 % en nombre de particules . Il reprend donc le même seuil que la recommandation de 2011.

En réalité, la définition des nanomatériaux utilisée pour R-Nano fixe également la proportion de nanoparticules minimale dans un nanomatériau à 50%, comme la recommandation de 2011. Ce seuil arrangerait les fabricants, distributeurs et importateurs de nanomatériaux en les exemptant de bon nombre de déclarations. D'autant plus que les omissions de déclaration sur l'hypothèse d'un seuil de 50% non atteint n'est en réalité vérifiable que par des analyses métrologiques fiables.

5.4 Comment ces nanoparticules arrivent-elles dans les additifs alimentaires ?

D'après les fabricants, elles apparaîtraient pendant le processus de fabrication de l'additif alimentaire de manière fortuite, mais peut-on réellement croire à une apparition fortuite de NPs quand certains additifs (non étiquetés [nano]) s'avèrent être composés à 100% de particules nanométriques ? Dans certains cas il y a un problème de mauvaise foi de la part du fabricant.

Si nous prenons l'exemple de l'additif E 171 (dioxyde de titane) utilisé comme colorant blanc et qui s'avère être en partie nanostructuré, sa couleur blanche n'est pas assurée par les nanoparticules de TiO_2 mais par des particules non nanoparticulaires de plus de 200 nm. Il est donc envisageable qu'une proportion de particules inférieures à 100 nm soient produites pendant la fabrication des particules de 200 nm, ces NPs seraient donc fortuites. *A contrario*, dans le cas du E 551 (dioxyde de silicium), sa fonction anti-agglomérante est assurée par les NPs, elles sont donc doivent être produites intentionnellement pour jouer leur rôle technologique. Cela explique également pourquoi les analyses en microscopie électronique du E 551 dans les matrices alimentaires révèle fréquemment des proportions en NPs proches de 100%.

D'autres fonctions technologiques significativement mieux permises par la nanoparticule par rapport à son équivalent non nanométrique peuvent également expliquer ce besoin de recourir aux NPs. En agroalimentaire, la biodisponibilité des nutriments et des arômes est très importante. Le bien-être apporté par une molécule gustative est fonction de sa capacité à délivrer son arôme, depuis la bouche et les intestins jusqu'au cerveau, et la biodisponibilité de la molécule influe sur cette capacité (Aguilera 2014). C'est le cas par exemple des nanoparticules de SiO₂ du E551 utilisées dans des poudres pour préparation de boisson aromatisées (e.g. préparations pour chocolat chaud). En plus des propriétés anti-agglomérantes des NPs de SiO₂, utilisées en enrobage sur les arômes, elles permettent de préserver et mieux délivrer ces derniers. Concernant l'aspect nutritionnel, la biodisponibilité est également recherchée (e.g. biodisponibilité accrue du calcium sous forme nanométrique dans le lait ou les compléments alimentaires). On comprend donc pourquoi l'usage des nanomatériaux s'est développé dans l'agroalimentaire.

6 Conclusion sur la caractérisation et l'identification des nanomatériaux

Il y a encore aujourd'hui trop d'incertitudes autour de l'exposition aux nanoparticules dans les additifs. Quels additifs contiennent réellement des nanoparticules ? Quelle proportion de l'additif est composée de nanoparticules ? Dans quelle quantité est utilisé l'additif dans l'aliment ? Les réglementations relatives aux définitions des nanomatériaux pour le domaine alimentaires ne permettent pas de clarifier cette exposition ou ce qui doit réellement être considéré comme "nanomatériau". Pour considérer cette exposition aux NPs, nous nous en tiendrons à la simple présence de ces nanoparticules dans les additifs alimentaires, **sans considération de proportion minimale** en nanoparticules.

En évaluation des risques, outre l'évaluation de l'exposition, il faut également caractériser les dangers intrinsèquement liés à la substance. On sait que chaque additif est évalué avant sa mise sur le marché, comme une substance chimique conventionnelle mais pas comme une substance pouvant contenir des nanoparticules. Partant de ce postulat, il serait intéressant d'étudier si la présence de nanoparticules dans les additifs alimentaires leur confère une toxicité, et si cette toxicité est significativement plus importante que celle de leurs homologues non-nanométriques. Pour illustrer cette potentielle toxicité des NPs dans les additifs alimentaires, nous prendrons deux exemples:

Le **carbonate de calcium** (E 170) et le **dioxyde de silicium** (E 551)

Chapitre 3:

Effets toxicologiques liés aux nanoparticules dans les additifs alimentaires: Exemples du E 170 et du E 551

1 L'expertise de l'Anses sur la question des nanomatériaux dans l'alimentation

1.1 Rôles et missions de l'ANSES

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été créée le 1^{er} juillet 2010 par la fusion de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) et de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset). L'Anses est un établissement public à caractère administratif et intervient en appui aux ministères chargés de la Santé, de l'Agriculture, de l'Environnement, du Travail et de la Consommation afin de fournir des éléments scientifiques permettant de proposer et/ou d'orienter d'éventuelles mesures de gestion afin de protéger la santé publique (0). Elle est chargée de fournir un appui scientifique (veille, expertise, activités de recherche) aux gestionnaires du risque afin d'éclairer les pouvoirs publics sur leur politique sanitaire.

Au sein de l'Anses, la Direction de l'évaluation des risques est, avec la Direction des produits réglementés, l'un des organes d'évaluation des risques et de coordination de l'expertise scientifique. L'expertise mise en œuvre s'appuie sur une expertise collective par des comités d'experts spécialisés pluridisciplinaires. La Direction de l'évaluation des risques évalue les risques et les bénéfices nutritionnels et sanitaires liés à l'alimentation, les risques sanitaires en santé environnement et en santé au travail, ainsi que les risques pour la santé, l'alimentation et le bien-être des animaux.

Au sein de cette direction, l'Unité d'Evaluation des Risques Chimiques dans l'Alimentation (UERCA) évalue les risques liés à la contamination des aliments par des substances chimiques (PCB, métaux, HAP, dioxines, etc.). L'évaluation des risques est assurée par les agents de l'Anses, par les groupes de travail (GT), constitués d'experts internes et externes à l'agence et pilotés par les coordinateurs de l'Anses, et par les Comités d'Experts Spécialisés (CES).

1.2 Travaux en cours sur les nanomatériaux dans l'alimentation

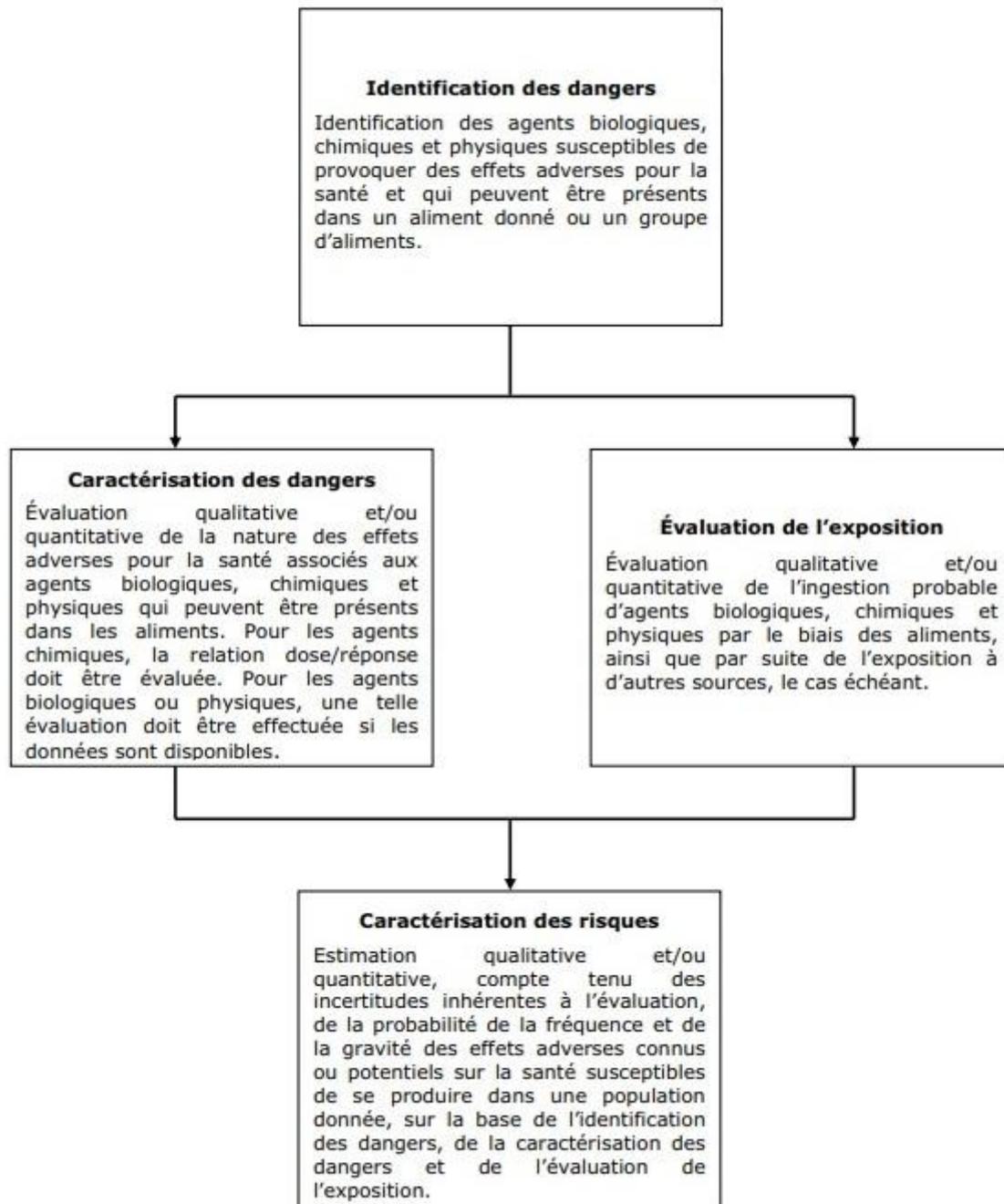
L'agence coordonne actuellement le GT « nanomatériaux et alimentation », travaillant sur la problématique des nanomatériaux dans l'alimentation. Ce GT a pour objectif de détailler l'utilisation des nanomatériaux dans la filière agroalimentaire, et de prioriser les nanomatériaux d'intérêts en vue d'une évaluation des risques sanitaires (ERS). Une partie des données scientifiques utilisées dans la suite de ce travail est tirée des recherches bibliographiques menées durant mon stage à l'UERCA de l'Anses. Ce stage de 6 mois sur la problématique des nanomatériaux dans l'alimentation m'a permis d'étoffer mes connaissances et ma réflexion sur la thématique de ce mémoire.

1.3 La démarche d'évaluation des risques dans l'alimentation

L'évaluation des risques sanitaires (ERS) est un processus scientifique comprenant quatre étapes :

L'identification des dangers, la caractérisation des dangers, l'évaluation de l'exposition et la caractérisation des risques. Dans son analyse des risques relatifs à la sécurité des aliments, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) précisent les étapes d'une ERS adaptée à l'alimentation (Figure 8).

Figure 8: Démarche d'évaluation des risques sanitaires appliquée à l'alimentation



Source : (FAO/OMS 2007)

L'objectif de ce mémoire s'intègre dans cette démarche d'évaluation des risques puisqu'il vise à mieux comprendre le danger lié à la présence de nanoparticules dans les aliments. Ce danger, encore mal connu, est inhérent aux propriétés physico-chimiques particulières des nanoparticules. En effet, une substance à l'état nanoparticulaire peut devenir plus réactive que lorsqu'elle se trouve à l'état non-nanoparticulaire. C'est par exemple le cas de l'or qui, considéré comme inerte, devient réactif sous forme de nanoparticule. Le comportement d'une substance pouvant fortement changer lorsque

celle-ci est produite à l'échelle nanométrique, le risque qui en découle est différent et doit être réévalué. C'est pour cela qu'il était important de connaître les spécificités liées à la nano-échelle en termes de propriétés physico-chimiques, de connaître les paramètres essentiels à l'identification des nanoparticules et influençant leur toxicité, et finalement de connaître les méthodes analytiques appropriées pour les étudier.

1.4 Les besoins du GT "nanomatériaux et alimentation"

Afin de prioriser les nanomatériaux d'intérêts en vue d'une ERS, il était nécessaire au GT de rechercher toutes les preuves de la présence de nanomatériaux dans la filière agro-alimentaire, en tant qu'additifs ou en tant que MCDA. De nombreuses substances ont été étudiées. Mon objectif a été de rassembler un maximum de données de caractérisation métrologique, d'exposition et de danger sur ces nanomatériaux dans une **base de données bibliographiques**.

Nous l'avons vu, identifier la part nanométrique dans les additifs alimentaires, et mesurer ses effets toxicologiques, requièrent l'utilisation de méthodes analytiques adaptées. La difficulté a été de filtrer les données répondant à ces critères de pertinence au niveau analytique.

La mise à disposition de ces données au groupe de travail permettra de cibler les nanomatériaux dont le risque (en termes d'exposition et de danger) est probable, de faire l'état de l'art de la toxicologie de ces nanomatériaux, et de cibler ceux dont on dispose de suffisamment de données de qualité pour envisager une ERS.

1.5 Plus-value de la base de données bibliographiques pour le GT et son utilisation dans ce mémoire

La base de données constituée a l'avantage d'être exhaustive et de faire ressortir les preuves de la présence des NPs dans l'alimentation par métrologie, la réglementation INCO et R-Nano n'étant pas suffisants. Elle met également en exergue les données toxicologiques et d'exposition utilisant les méthodes analytiques adaptées à l'étude des NPs. Grâce à une partie de ces données, nous nous proposerons de répondre aux questionnements suivants:

- 1) Quels sont les obstacles et les biais à considérer pour récolter des données toxicologiques de qualité suffisante sur les NPs contenues dans les additifs alimentaires ?
- 2) Quelle est la toxicité des nanoparticules contenues dans les additifs alimentaires ?

Répondre à ces questions serait une première étape pour étudier la faisabilité puis réaliser une ERS spécifiquement liée à une exposition à ces NPs par l'alimentation.

Pour réaliser ces objectifs, une recherche bibliographique a été menée sur la toxicologie des NPs de deux additifs alimentaires (le E 170 et le E 551) et les résultats ont été synthétisés sous forme d'état de l'art, puis discutés. Dans la partie suivante, nous présenterons le raisonnement qui nous a amené à prendre l'exemple de ces deux additifs, ainsi que la méthode employée pour collecter les données toxicologiques nécessaires.

2 Méthode de recherche bibliographique

2.1 Choix des substances

Parmi la grande diversité d'additifs alimentaires, nous avons vu que les additifs les plus utilisés en termes d'usages et les plus préoccupants en termes de toxicité étaient les aluminosilicates, le TiO_2 (E 171) et le SiO_2 (E 551). Néanmoins, aucune preuve de l'existence de formes nanoparticulaires dans les aluminosilicate n'a été trouvée, à l'exception de l'étude de Loeschner *et al.* Cette étude se base uniquement sur une caractérisation quantitative des nanoparticules par SpICP-MS, et aucune autre méthode n'est utilisée pour confirmer la nature chimique des nanoparticules détectées. Cette étude n'est pas donc pas une preuve suffisante pour montrer l'existence de nanoparticules dans l'aluminium (Loeschner *et al.* 2018). C'est pourquoi les additifs à base d'aluminium n'ont pas été retenus pour illustrer ce travail. Dans le cas du TiO_2 et du SiO_2 la présence de nanoparticules est quant à elle avérée.

On trouve également dans la littérature deux autres additifs inorganiques très documentés: l'argent (E 174) et les oxydes de fer (E 172), dont on a également la preuve qu'ils peuvent être sous forme de nanoparticules. Pour le E 174, la preuve est apportée par Verleysen *et al.* qui détectent des NPs d'argent dans des décorations pour pâtisseries (Verleysen *et al.* 2015). Néanmoins, il s'agit de la seule preuve reportée, et pour une application très restreinte. La donnée scientifique sur l'argent porte en réalité sur son utilisation en tant qu'antibactérien, initialement dans les textiles, puis aujourd'hui en tant qu'additif technologique dans les MCDA. Il existe de rares preuves de la migration des Ag NPs du MCDA vers l'aliment, mais en quantité très faible (de l'ordre du ng/L), cette migration se faisant essentiellement sous forme ionique (Mackevica, Olsson, and Hansen 2016). Sur la base de ces preuves de faibles expositions aux Ag NPs (et l'absence de preuves contraires) cette substance n'a pas été retenue.

Parmi les additifs E 171, E 172 et E 551, seuls les E 171 et E 551 sont à la fois massivement utilisés et avec des proportions en nanoparticules très élevées:

- 69% des particules d'un échantillon de E 171 utilisé dans une étude toxicologique se sont révélées être nanométriques (Gogos et al. 2016)
- Plus de 80% du dioxyde de silicium E 551 analysé dans des produits alimentaires s'est révélé nanométrique (Peters et al. 2012)).

De plus, nous avons vu que la part nanométrique du E 551 était intentionnelle, car essentielle à sa fonction anti-agglomérante, alors que la part nanométrique du E 171 pourrait être fortuite (cf page 40). Concernant le E 171, les ministères ont d'ailleurs entamé une procédure pour suspendre sa mise sur le marché (Ministre des solidarités et de la santé 2018), estimant que sa seule fonction esthétique dans les aliments ne vaut pas le risque encouru. Un état de l'art de la toxicité du E 171 n'a donc pas été jugé prioritaire.

En revanche, l'étude de la toxicité des NPs dans le E 551 est apparue comme prioritaire car il est nanométrique et extrêmement utilisé en alimentation. Par conséquent, il a été choisi de répondre aux objectifs de ce mémoire par une mise à jour des connaissances sur la toxicité des NPs de SiO₂ de type E 551.

D'autres additifs contiendraient potentiellement des nanoparticules mais sont beaucoup moins étudiées, comme le E 170 (carbonate de calcium), le E 341(iii) (phosphate tricalcique), ou le E 554 (Silicate alumino-sodique). Aussi, j'ai pris le parti d'étudier celui qui, *a priori*, est l'un des moins toxiques: le carbonate de calcium (CaCO₃) E 170. L'objectif ici est essentiellement de montrer si des formes nanométriques existent dans le E 170, et si ces nanoparticules se comportent différemment du CaCO₃ non-nanométrique, suggérant une toxicité différente, même si celle-ci est faible.

Nous étudierons donc la toxicité des nanoparticules dans les additifs **E 170 et E 551**.

2.2 Critères de sélection des articles scientifiques

Afin de répondre aux questions posées sur la toxicité de ces NPs, une recherche bibliographique très ciblée a été nécessaire pour récolter les données les plus pertinentes possible. Pour se faire, nous avons cherché à extraire des bases de données bibliographiques les articles scientifiques répondant aux critères suivants:

- Caractérisation physico-chimique de la substance par TEM ou SEM, et par au moins une seconde méthode (EDX, FTIR, Sp-ICP/MS, ICP-OES/MS, FFF).

- La substance administrée au modèle cellulaire ou animal est l'additif en lui-même ou une substance de même nature chimique et fabriquée selon un procédé de fabrication autorisé pour l'additif correspondant.
- Au moins l'un des modèles expérimentaux utilisé est pertinent pour évaluer la toxicité par ingestion (e.g. administration par voie orale *in vivo*, lignée Caco-2 *in vitro*)

2.3 Méthode d'extraction des données

La recherche bibliographique dans la littérature scientifique s'est faite grâce à trois bases de données bibliographiques en ligne: Scopus, PubMed et WebOfScience.

L'extraction des articles scientifiques sur les trois bases de données interrogées s'est faite au moyen de deux requêtes que l'on peut découper en quatre sous-requêtes.

Chaque sous-requête portait sur un sujet précis, et a été conçue en recherchant tous les mots clés relatifs à ce sujet précis:

Numéro de la sous-requête	Sujet des mots-clés de la sous-requête
Sous-requête n°1	Nanoparticules et nanomatériaux
Sous-requête n°2	Toxicité et toxicologie
Sous-requête n°3	Additifs et alimentation
Sous-requête n°4	E 170 (CaCO ₃) et E 551 (SiO ₂)

Tableau 5 : Sous-requêtes pour l'extraction des articles scientifiques

Les mots clés utilisés et les détails de la construction de chaque requête sont présentés en Annexe 7.

Ces sous-requêtes ont ensuite été combinées pour donner 2 requêtes:

Requête A = sous-requête n°1 x sous-requête n°2 x sous-requête n°3

Objectif de la requête A: Trouver toutes les références portant sur la toxicité des nanoparticules/nanomatériaux dans l'alimentation.

Requête B = sous-requête n°1 x sous-requête n°2 x sous-requête n°4

Objectif de la requête B: Trouver toutes les références portant sur la toxicité des nanoparticules de carbonate de calcium et de dioxyde de silicium.

Toutes les références bibliographiques obtenues grâce à ces 2 requêtes (A et B) ont été regroupées dans EndNote, un logiciel de gestion bibliographique. EndNote permet de gérer des références provenant de différentes sources (bases de données, catalogues

de bibliothèques, fichiers en format PDF, documents personnels), de les organiser et de les catégoriser à la convenance de l'utilisateur (cf Annexe 8).

Ces 2 extractions de données ont donné une base de travail de départ de plusieurs milliers de références scientifiques, qui a été triée pour en extraire les références selon les critères de sélection listés précédemment.

2.4 Méthode de tri des articles

Un premier tri des articles a été opéré en utilisant la fonction "Smart Group" dans EndNote. Cette fonction permet de faire une recherche de mots-clés dans les articles scientifiques importés dans le logiciel, à la manière des requêtes présentées auparavant. L'intérêt de cette fonction est qu'elle est capable de rechercher des mots-clés directement dans tout le corps du texte de l'article, ce qui est impossible à réaliser avec les bases de données bibliographiques en ligne. Cette fonction et les mots-clés utilisés sont présentés en Annexe 9.

Ce tri a restreint l'information à **490 articles** pour le E 170 et à **2390 articles** pour le E 551.

Un second tri a été effectué par lecture des titres et des résumés, seuls les articles pertinents au domaine de la toxicologie des NPs et à l'alimentation ont été conservés: Ce second tri a restreint l'information à **109 articles** pour le E 170 et **279** pour le E 551.

La qualité des articles restants a été évaluée par lecture complète des articles. La sélection finale des articles s'est faite par un processus d'exclusion séquentielle selon les étapes suivantes:

- 1) Exclusion des articles ne caractérisant pas leurs échantillons par TEM.
- 2) Exclusion des articles utilisant des échantillons de CaCO₃ ou SiO₂ de formes non conformes à celles autorisées dans l'additif alimentaire correspondant.
- 3) Exclusion des articles dont les plus petites nanoparticules mesurées dépassent 100 nm.

Résultat final du tri concernant le E 170

Nous avons retenu **14 articles** sur les CaCO₃ NPs, incluant des articles qui ne sont pas des études toxicologiques mais qui suggèrent l'existence de NPs.

Résultat final du tri des articles concernant le E 551

25 articles portant sur la toxicologie des NPs de SiO₂ et leur présence dans l'alimentation ont été retenus.

3 Etat de l'art des données toxicologiques sur les nanoparticules sélectionnées

3.1 Méthode employée pour l'état de l'art

L'objectif du présent état de l'art est d'étudier si une toxicité strictement liée à l'ingestion de nanoparticules par le biais de l'alimentation, et donc par la consommation d'additifs, existe. Pour se faire, pour chaque additif, nous présenterons précisément l'additif, puis nous chercherons à montrer par des critères métrologiques s'il est probable qu'il contienne des nanoparticules et/ou des preuves directes de la présence de nanoparticules dans la denrée alimentaire, liée à l'utilisation de l'additif. Pour finir, nous ferons la synthèse des données scientifiques sur la toxicité de ces nanoparticules en fonction des données disponibles et d'autres critères de sélection et de pertinence des données dans le cas du E 551.

3.2 Le carbonate de calcium (E 170)

3.2.1 Présentation de l'additif

Le carbonate de calcium, désigné en tant qu'additif sous le code E 170, est listé au *Codex alimentarius* pour ses fonctions de régulateur de l'acidité, d'antiagglomérant, de colorant, d'affermissant, d'agent de traitement des farines et de stabilisant.

De formule chimique CaCO_3 (Numéro CAS : 471-34-1) le carbonate de calcium porte aussi d'autres noms: calcite, craie, sel de calcium d'acide carbonique, CI Pigment White 18 (dans les cosmétiques).

Le carbonate de calcium existe sous plusieurs formes cristallines: vaterite, calcite, aragonite, de 1 à 10 μm de diamètre; et sous forme amorphe de 40 à 120 nm de diamètre (Annexe 10). Sa forme amorphe est la plus instable et tend à se cristalliser avec le temps (Posavec et al. 2016). Plus spécifiquement, le carbonate de calcium du E 170 est généralement sous forme calcite (Lauth, Maas, and Rezwan 2017).

Selon la Directive 2008/128/EC le carbonate de calcium peut être fabriqué selon deux procédés: à partir de matériaux calcaires (roches calcaires, coquillages) par calcination, ou par précipitation d'ions calcium et d'ions carbonate (EFSA 2011).

[Fabrication du \$\text{CaCO}_3\$ par calcination:](#)

D'après l'EFSA ce procédé est le plus répandu. Il consiste à calciner le calcaire pour obtenir de la chaux vive, qui va être mise en suspension pour être refroidie. La chaux

éteinte subie alors un processus de carbonatation par un barbotage avec du gaz CO_2 , pour devenir du carbonate de calcium CaCO_3 (Domingo et al. 2004).

Fabrication du CaCO_3 par précipitation:

Cette seconde méthode fait partie des méthodes "biomimétiques" selon Boyjoo et al., c'est-à-dire qui essaie de mimer la formation naturelle du CaCO_3 (cf 0).

Utilisation du E 170 dans l'alimentation:

L'additif E 170 est autorisé dans le lait, le lactosérum, les pâtes, la viande, le poisson, le sel, le café, le thé, et les compléments alimentaires pour nourrissons.

Sous forme nanoparticulaire il peut servir à la fois de source de calcium et de stabilisant, car il est stable dans le temps (pendant plus de 500 jours) et la forme nanoparticulaire améliore la biodisponibilité du calcium (Posavec et al. 2016).

A noter que les CaCO_3 NPs peuvent également être utilisées dans les MCDA. Avella et al. proposent par exemple l'utilisation d'un film nanocomposite de propylène isostatique (iPP) empli en CaCO_3 NPs pour l'emballage des fruits (Avella et al. 2007). Ce film semble être efficace et la migration des NPs est négligeable, ce qui confirme que l'exposition aux NPs par les MCDA reste minoritaire par rapport à l'exposition par les additifs alimentaires.

3.2.2 Précisions concernant les connaissances actuelles sur la toxicité du E 170

C'est un additif très utilisé car on lui attribue une très faible toxicité. Dans la réévaluation du E 170 en tant qu'additif, les experts de l'EFSA considèrent que la NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) de 1000 mg/kg/j proposée dans plusieurs études est pertinente (EFSA 2011). Certains des articles revus par le panel disent utiliser des nanoparticules de carbonate de calcium (CaCO_3 NPs), mais l'EFSA précise qu'ils n'utilisent pas de méthode pour caractériser la taille de leurs échantillons. Or, cette étape est essentielle pour connaître la toxicité spécifiquement liée aux nanoparticules.

Dans cette mise à jour des connaissances toxicologiques sur les CaCO_3 NPs en tant qu'additif, nous allons dans un premier temps essayer de rassembler, à partir de la littérature scientifique, tous les éléments qui tendent à prouver l'existence de NPs dans le E 170. Dans un second temps, nous ferons l'état de l'art de la toxicité de ces NPs grâce aux articles sélectionnés selon les critères présentés précédemment (cf page 47).

3.2.3 Preuves de la présence de nanoparticules dans le E 170

Selon l'Efsa, la présence de nanoparticules ne peut être écartée du fait du procédé de fabrication du CaCO_3 qui engendrait une part non contrôlée de nanoparticules. Dans deux échantillons de carbonate de calcium food-grade *the Calcium Carbonate Association* relèvent des proportions en NPs de 0,3% et 0,65% (EFSA 2011).

On appelle « food-grade » un matériau dont les particules sont de même nature (et même forme) que celles utilisées dans l'additif alimentaire correspondant. Il est de qualité suffisante pour servir en agro-alimentaire.

En étudiant la synthèse du CaCO_3 Boyjoo *et al.* montrent que la méthode par calcination (la plus courante) crée majoritairement des nanoparticules. Les méthodes biomimétiques quant à elles peuvent produire nanoparticules (Boyjoo, Pareek, and Liu 2014).

La synthèse de CaCO_3 amorphe opérée par Meiron *et al.* a également mené à l'apparition de nanoparticules dans leurs échantillons (Meiron et al. 2011).

D'après Sekhon *et al.* les CaCO_3 NPs sont très utilisées en alimentaire. Une demande de brevet pour utiliser des nano-sels de calcium dans un enrobage de chewing-gum est d'ailleurs citée (Sekhon 2010).

Dans leur étude, Huang *et al.* administrent par gavage du carbonate de calcium sous forme nanométrique ou micrométrique à deux groupes de rats ICR ayant subi une ovariectomie. Les résultats indiquent que le groupe ayant reçu les NPs réussit à conserver une densité osseuse et une concentration en calcium sérique supérieure au groupe ayant reçu les microparticules, ce qui témoigne d'une plus grande biodisponibilité du calcium sous forme nanoparticulaire (Huang et al. 2009). Ce résultat est corroboré par l'équipe de Park (Park, Ahn, and Kwak 2008), ce qui suggère que les CaCO_3 auraient un intérêt technologique en tant que complément alimentaire, ou comme simple additif pour les aliments nécessitant des teneurs en calcium constantes comme le lait.

3.2.4 Toxicité des CaCO₃ NPs

Même si le CaCO₃ est davantage absorbé à l'échelle nanométrique que micrométrique chez la souris après 28 jours d'exposition par gavage, Huang *et al.* ne décèlent pas d'effet toxicologique du CaCO₃ (NOAEL à 1,3 g/kg/j). Notons que le diamètre moyen des CaCO₃ NPs est de 151 ±19 nm, mesuré par DLS, mais la caractérisation par TEM confirme la présence de formes nanoparticulaires. Le diamètre hydrodynamique moyen mesuré par DLS soulève deux hypothèses: la distribution en taille mesurée serait faussée (due aux agrégats) ou l'hétérogénéité de taille des particules augmente le diamètre hydrodynamique moyen calculé. Cette incertitude liée à la DLS est la raison pour laquelle un calcul de la distribution par mesure en TEM est préférable. En effet, l'agrégation impacte le mouvement brownien des nanoparticules ce qui perturbe la caractérisation par DLS. Par conséquent, cette seule référence ne peut être jugée suffisante pour confirmer ou contredire l'absence d'effets toxicologiques liés spécifiquement aux NPs.

D'après Meiron *et al.*, la quantité de calcium dans le fémur des rats 33h après administration de 5 mg de CaCO₃ est 30% après administration de la forme amorphe du CaCO₃ au lieu de sa forme cristalline. Caractérisé par TEM et présentant des nanoparticules de 40 nm à 120 nm, la forme amorphe du CaCO₃ a montré une biodisponibilité du calcium supérieure à celle des particules de 1 à 10 µm de la forme cristalline. L'absorption et la rétention du calcium dans le sérum étaient respectivement plus élevées de 40% et 26,5% chez les rats ayant reçu la forme amorphe.

En plus d'accroître la biodisponibilité du calcium, les NPs de CaCO₃ ont une cinétique d'absorption significativement plus rapide que leurs homologues cristallins/micrométriques (Posavec *et al.* 2017, Lee *et al.* 2015). Dans une étude *in vivo* sur des rats Sprague-Dawley l'équipe de chercheur montrent une augmentation d'environ 10% de l'absorption du calcium sur 5 jours entre la forme nanométrique et micrométrique, et une augmentation de la rétention du calcium également de 10% (Tableau 6). Ces résultats sont aussi à mettre en relation avec la cinétique d'excrétion fécale et urinaire du calcium, qui dépend du niveau d'absorption du calcium (Tableau 6), une excrétion fécale élevée du calcium est contrebalancée par une excrétion urinaire plus faible.

Tableau 6 Rétention et excrétion des NPs de carbonate de calcium

TABLE 2 Calcium concentrations of diets, metabolic balance data, BW, bone variables, and serum PTH in 8-wk-old rats fed 5 different calcium sources for 4 wk¹

	Calcium compound				
	CaCO ₃ _3	CaCO ₃ _36	CaCO ₃ _64	CaCO ₃ :HAp_94	Hydroxyapatite_100
Calcium content in diet, g/kg	4.73 ± 0.06	4.74 ± 0.11	4.80 ± 0.05	4.86 ± 0.04	4.71 ± 0.11
5-d metabolic balance					
Calcium intake, ² mg/5 d	371 ± 16	385 ± 8	410 ± 10	405 ± 10	398 ± 10
Calcium fecal excretion, ³ mg/5 d	170.7 ± 11.1	185.5 ± 8.2	204.3 ± 6.1 ^A	186.3 ± 8.5 ^{A,B}	175.5 ± 5.6 ^B
Calcium absorption, ² mg/5 d	199.8 ± 10.1	199.5 ± 4.4	206.1 ± 7.5	218.3 ± 9.3	222.4 ± 6.8
Calcium urinary excretion, ³ mg/5 d	4.1 ± 0.8	3.8 ± 0.5	2.1 ± 0.2 ^A	4.5 ± 0.4 ^B	4.1 ± 0.4 ^B
Calcium retention, ² mg/5 d	195.7 ± 9.8	195.6 ± 4.5	204.0 ± 7.4	213.8 ± 9.3	218.3 ± 6.8
Calcium fractional retention, ² %/5 d	53.08 ± 1.91	50.98 ± 1.32	49.66 ± 1.15 ^A	52.83 ± 1.77 ^{A,B}	54.86 ± 0.95 ^B
End of study					
BW at study day 36, g	230 ± 5	231 ± 6	237 ± 5	232 ± 5	234 ± 4
Calcium intake, ² mg/26 d	1758 ± 34 ^{a,b}	1726 ± 27 ^b	1840 ± 35 ^{a,A}	1777 ± 31 ^{A,B}	1757 ± 17 ^B
BMD femur, ⁴ g/cm ²	0.161 ± 0.003	0.161 ± 0.002	0.160 ± 0.003	0.162 ± 0.002	0.159 ± 0.002
BMD L1–4 vertebrae, ⁴ g/cm ²	0.152 ± 0.004	0.153 ± 0.003	0.152 ± 0.003	0.150 ± 0.003	0.148 ± 0.003
PTH, ⁴ pg/mL	161.8 ± 30.2	134.2 ± 25.4	174.0 ± 36.2	147.5 ± 18.7	178.5 ± 26.1
Femur, ⁴ mg Ca/g dw	148.2 ± 6.8	156.7 ± 4.8	151.9 ± 4.7	145.2 ± 4.2	148.7 ± 4.5

¹ Values are means ± SEMs, *n* = 12/group. Mean values were statistically compared by using ANCOVA with post hoc Bonferroni's correction. The compounds are named after their chemical composition followed by an underscore and the SSA expressed as m²/g (chemical composition_SSA). Groups were compared by SSA (lowercase letters) and by chemical composition (uppercase letters). Labeled means in a column without a common superscript letter differ, *P* < 0.05. BMD, bone mineral density; BW, body weight; CaCO₃, calcium carbonate; CaCO₃:HAp, 50:50 wt:wt percent solution mixture of calcium carbonate and hydroxyapatite; dw, dry weight; PTH, parathyroid hormone; SSA, specific surface area.

² Statistical analysis adjusted for BW at study day 36.

³ Statistical analysis adjusted for calcium intake over the 5-d metabolic balance and BW at study day 36.

⁴ Statistical analysis adjusted for milligrams of calcium intake per 26 d of test feeding (including the balance period) and BW at study day 36.

Diamètres et surface spécifique des échantillons caractérisés par TEM et BET:

- CaCO₃_3: d = 783 nm, SSA = 3 m²/g
- CaCO₃_36: d = 62 nm, SSA = 36 m²/g
- CaCO₃_64: d = 35 nm, SSA = 64 m²/g

L'absorption de ces NPs ne se fait pas sans causer de dommages selon Kim et son équipe. Les chercheurs révèlent une hausse significative de la génération d'un stress oxydant dans les cellules humaines de la lignée INT-407 par les CaCO₃ NPs, par rapport au CaCO₃ micrométrique. Ce stress oxydant a aussi causé des dommages significatifs au niveau membranaire (évalué par le test de la LDH). Néanmoins, cette substance reste très faiblement cytotoxique pour toutes les formes de CaCO₃ testées et à toutes les concentrations (de 0 à 1000 mg/L)(Kim, Lee, et al. 2015).

En conclusion, il est difficile de parler de biodisponibilité dépendante de la taille des particules comme l'indiquent plusieurs auteurs pour le CaCO₃, les particules de CaCO₃ comparées sont généralement différentes, d'autres paramètres que la taille peuvent donc

influencer cette biodisponibilité, comme la surface spécifique ou son polymorphisme (calcite, vaterite, amorphe). Au vu du peu de données toxicologiques disponibles, il est difficile de statuer sur la toxicité du carbonate de calcium, qui semble, comme attendu, très peu cytotoxique, néanmoins les preuves montrant une différence significative des effets entre les formes nanométriques et micrométriques encouragent à plus d'investigations.

3.3 Etat de l'art de la toxicologie des NPs dans le E 551

3.3.1 Présentation de l'additif

Le E 551 est un additif alimentaire autorisé en Europe dans toutes les denrées alimentaires. Il fait parti de la minorité d'additifs dont la quantité maximale autorisée n'est pas en *quantum satis*, elle est limitée à 10.000 mg/kg (Commission Européenne 2011b). Il est composé de dioxyde de silicium (SiO_2). Ce dioxyde de silicium peut être d'origine naturelle ou synthétique, et existe sous forme amorphe ou cristalline: Dans le cas du E 551, il s'agit de dioxyde de silicium synthétique sous sa forme amorphe, appelé aussi SAS (synthetic amorphous silica).

Ce SiO_2 amorphe, ou SAS, peut être fabriqué par hydrolyse en phase gazeuse ou par hydratation de la silice:

Tableau 7 Tableau récapitulatif des différentes dénominations du E 551:

Product	Route of production	Name in the EU specifications for E 551	EINECS no	CAS no, generic	CAS no, specific	Chemical abstract Index name
Pyrogenic silica	Thermal process	Fumed silica	231-545-4	7631-86-9	112945-52-5	Silica, amorphous, fumed; crystalline-free
Hydrated silica	Wet process	Precipitated silica	231-545-4	7631-86-9	112926-00-8	Synthetic amorphous silica, precipitated; crystalline-free
		Silica gel, hydrous silica	231-545-4	7631-86-9	112926-00-8	Synthetic amorphous silica, precipitated; crystalline-free

EINECS: European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances; CAS: Chemical Abstracts Service.

EFSA Journal 2018;16(1):5088

Il est important de connaître ces différentes formes du SiO_2 car ce sont les seules autorisées dans l'additif E 551. Ainsi, des résultats toxicologiques portant sur d'autres formes de SiO_2 ne pourraient être considérés pertinents pour évaluer la toxicité du E 551. Il existe une 4ème forme de SAS: la silice colloïdale ou sol de silice, structurée très différemment (Lee, Yun, and Kim 2011)(image TEM: Annexe 13) et qui n'est pas autorisée en tant que E 551. Elle est néanmoins régulièrement utilisée dans les études toxicologiques, ces études ont donc été exclues. La méthode de Stöber, qui permet de

synthétiser des nanoparticules de silice en contrôlant précisément la forme et la taille des particules, est aussi couramment utilisée (Tang and Cheng 2013), et les particules produites de cette façon sont également colloïdales (Annexe 13).

Les 3 formes de SAS décrites par l'EFSA (Tableau 7)(fumed silica, precipitated silica, silica gel) ont été caractérisés par TEM (Annexe 13) et chacune d'entre-elle semble contenir des nanoparticules (Albers et al. 2015).

Il existe également des SAS de référence respectant les spécificités du E 551:

- NM-200, NM-201 et NM-204 (precipitated silica, n°CAS: 7631-86-9)
- NM-202 et NM-203 (pyrogenic silica, n°CAS: 112945-52-5)

Toutes les dioxydes de silicium respectant les spécificités du E 551 seront appelés SiO₂ food-grade ou abrégés SiO₂-FG.

3.3.1 Preuve de SiO₂ nano dans l'alimentation

De la Calle *et al.* ont identifié la présence de nanoparticules de silice dans du café et du chocolat en poudre par DLS, SpICP-MS et AF4-MALLS-ICP-MS (une autre variante de l'ICP-MS couplée à la FFF et à la MALS, *Multiple Angle Light Scattering*, permettant la séparation et la caractérisation de la composition chimique de l'échantillon)(de la Calle et al. 2018). Les particules de silice sont vraisemblablement issues du E 551, une contamination extérieure est toujours possible mais impossible à vérifier. Des NPs de silice sont également retrouvées dans des échantillons de café étiquetés E 551 par Contado *et al.*, cette fois par FFF (field-flow fractionation) et TEM (Contado, Ravani, and Passarella 2013). Le café en poudre n'est pas le seul aliment concerné puisque des quantités importantes de SiO₂ NPs ont été trouvées dans des préparations pour soupes instantanées et pancakes étiquetés E 551 (Peters et al. 2012). Ces résultats ne sont pas surprenants du fait des propriétés anti-agglomérantes de ces particules, propriétés essentielles aux produits en poudre ou déshydratés, dont beaucoup d'autres doivent contenir de telles NPs.

3.3.1 Comportement du SiO₂

La courbure de la NP de SiO₂ (Vertegel, Siegel, and Dordick 2004) lui permet d'adsorber à sa surface plus de protéines que ne le feraient d'autres particules de SiO₂ plus grandes (corona).

L'équipe de Lee a d'ailleurs étudié la biocinétique des NPs de SiO₂ et a découvert que leur distribution dans l'organisme est avant tout liée à leur interaction avec les molécules de l'organisme plutôt qu'à leur taille (Lee et al. 2017). Leur internalisation serait *a priori* dépendante de la taille des particules puisque l'internalisation des NPs est bien supérieure à celle des particules micrométriques au niveau de la barrière intestinale et notamment des cellules M (*microfold cells*). Ceci s'explique par le fait que les NPs sont internalisées par des transports actifs au niveau des cellules M, et peuvent également faire appel à tous les mécanismes d'endocytose tels que l'endocytose clathrine-dépendante, cavéole-dépendante dans une moindre mesure, la phagocytose actine-dépendante et la macropinocytose. Ces mécanismes sont décrits par Saptarshi *et al.* et repris en Annexe 21 (Saptarshi, Duschl, and Lopata 2013))

3.3.2 Revues de la littérature existantes sur les SiO₂ NPs

La toxicité des SiO₂ NPs a récemment été revue dans quatre revues de la littérature:

- ❖ "*The safety of nanostructured synthetic amorphous silica (SAS) as a food additive (E 551)*" par Claudia Fruijtner-Pölloth, soumis le 25 juillet 2016 à *Archives of Toxicology* (H index: 90, SJR 2017: 1,54) et accepté le 08 septembre 2016.
- ❖ "*Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food*" par Hans Christian Winkler, Mark Suter et Hanspeter Naegeli, soumis le 01 décembre 2015 à *Journal of Nanobiotechnology* (H index: 51, SJR 2017: 1,38) et accepté le 03 mai 2016.
- ❖ "*Toxicology of silica nanoparticles: an update*" par Sivakumar Murugadoss, Lison, Godderis, Van Den Brule, Mast, Brassinne, Sebaihi et Peter Hoet, soumis le 08 mai 2017 à *Archives of Toxicology* (H index: 90, SJR 2017: 1,54) et accepté le 18 mai 2017.
- ❖ "*Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive*" par Maged Younes et les autres experts du "*Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*" de l'EFSA, publié le 23 novembre 2017 au journal de l'EFSA.

Ces revues ont été analysées, et les références obtenues par notre tri d'articles et celles citées dans ces quatre revues de la littérature ont été croisées. Il est apparu que **147** des 257 articles sélectionnés lors du second tri d'articles avaient déjà été repris au moins une fois dans ces revues de la littérature. J'ai donc pris le parti d'opérer le tri final sur les **110** références n'ayant été citées par aucune de ces revues, afin que l'on puisse ajouter aux états de l'art existants les articles pertinents jusqu'ici omis.

Comme annoncé précédemment, **12** articles de toxicologie ont finalement été sélectionnés, dont 8 de toxicité *in vitro*, 4 de toxicité *in vivo*. Ce choix restreint des données présentées est délibéré, il permet de montrer des données de toxicité portant spécifiquement sur le dioxyde de silicium food-grade caractérisé par TEM !

Rappel des étapes de tri séquentielle pour la sélection finale des articles:

- 1) Exclusion des articles ne caractérisant pas leurs échantillons par TEM.
- 2) Exclusion des articles utilisant des échantillons de CaCO₃ ou SiO₂ de formes non conformes à celles autorisées dans l'additif alimentaire correspondant.
- 3) Exclusion des articles dont les plus petites nanoparticules mesurées dépassent 100 nm.

Parmi les 110 articles lus, 31 ont été exclus lors de l'étape 1), 39 articles lors de l'étape 2), et 4 lors de l'étape 3) et 24 pour d'autres raisons (toxicité par inhalation ou cutanée, article inaccessible). Finalement, 12 articles ont pu être sélectionnés.

3.3.3 Données toxicologiques *in vitro*

Nous présenterons les résultats des données toxicologiques obtenues dans les tableaux récapitulatifs ci-après:

Tableau 8 Etudes de toxicité *in vitro* des nanoparticules de SiO₂ food-grade

Source	Modèle expérimental	Taille des NPs de SiO ₂ -FG	Doses et paramètres étudiés	Résultats
Guerrero-Beltran, C. E. et al. (2017)	Cardiomyocytes de rats Wistar	SiO ₂ -FG de 91 nm et micro-SiO ₂ SAS de 670 nm	100 mg/L pour le SiO ₂ -FG, 1500 mg/L pour le SAS Tests d'apoptose, nécrose (activité caspase), LDH, raccourcissement cellulaire et signalisation du Ca ²⁺	Internalisation des NPs dans les cardiomyocytes. Niveau de LDH significativement supérieur pour les NPs VS micro-SiO ₂ (foldchange de +2). Réduction de l'activité du réticulum sarcoplasmique à Ca ²⁺ -ATPase par les NPs
Guo, Z. et al. (2018)	Co-culture <i>in vitro</i> de HT29-MTX et Caco-2	SiO ₂ -FG de 34.3 ± 4.4nm	2x10 ⁻⁴ , 2x10 ⁻² , 2 mg/L expo: 4h ou répétée 5j Stress oxydant après transport de nutriments, résistance épithéliale, IAP, expression génique	Pas d'effet sur la résistance épithéliale Stress oxydant significativement plus élevé par rapport au contrôle. Idem pour l'activité de l'alkaline phosphatase intestinale. Surexpression de TNF-α (FC: 9.61± 2.26) et IL-8 (FC: 3.28±0.41)(en chronique à faible dose)(Annexe 16)
Katsumiti, A. et al. (2016)	Hémocytes et cellules branchiales de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	15, 30 et 70 nm produites par hydratation	0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50 and 100 mg/L pendant 24h. Tests de viabilité (rouge neutre et MTT)	Pas de différence significative de cytotoxicité par rapport au contrôle mis à part pour les plus hautes doses (25, 50 et 100 mg/L)

Kusaczuk, M. et al. (2018)	Lignée cellulaire de glioblastome humain (LN229)	De 5 à 15 nm (caractérisation TEM sans taille moyenne)	50 et 100 mg/L pendant 24h et 48h. MTT test, activité caspase 3/7 et 9, ROS, expression génique	Apoptose, activité caspase 3/7, génération de ROS et expression de l'IL1B et COX2 dépendantes de la dose et de la durée. Activité caspase 9 augmentée après 48h (cf Annexe 17)
Spyrogianni, A. et al. (2017)	macrophages murins RAW 264.7	SiO ₂ -FG de 14, 18 et 30 nm	1000 mg/L Etude de la cytotoxicité en fonction de la vitesse de sédimentation dans le milieu de culture	La cytotoxicité <i>in vitro</i> des NPs mises en suspension apparaît supérieure pour les grosses NPs après 24h, car elles se déposent plus rapidement. En réalité, à dépôt égal, les plus petites NPs sont les plus cytotoxiques (cf Annexe 19)
Wu, Y. et al. (2015)	Cellules cancéreuses humaines gastriques (MGC80-3) et HeLa.	SiO ₂ -FG de 20 ± 5 nm (précisé amorphe et non poreux)	Doses de 0 à 640 mg/L Apoptose (fluorescence de l'annexine V-FITC/PI) Test MTT, ROS, distribution et mécanismes d'absorption	Augmentation de l'apoptose, de la cytotoxicité, et des ROS dépendante de la dose et durée, mais pas de signes statistiques de toxicité pour les doses de 0 à 80 mg/L. Diminution de la viabilité de 24% (MGC80-3) et 93% (HeLa) à 320 mg/L. 10 ⁻³ M de méthyl β-cyclodextrine inhibe 62% de l'internalisation des NPs dans les cellules HeLa contre 22% avec 10 ⁻⁶ M de dynasore: endocytose clathrine-dépendante supérieure à cavéole-dépendante

Xue, Y. et al. (2014)	Hépatocytes de rat buffalo	SiO ₂ NPs de 20 nm et SiO ₂ micrométrique (0,5 à 6 µm)	0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 mg/L Mesure des cytokines (TNF-α), des ROS, dommages membranaires (LDH), activité mitochondriale	Diminution de l'activité mitochondriale au-delà de 10 mg/L et significativement plus élevée pour les NPs Augmentation significative de LDH à 1000 mg/L Internalisation rapide dans les hépatocytes Perturbation du cycle de Krebs dû aux réponses inflammatoires à partir de 1000 mg/L
Yang, H. et al. (2016)	Lignée cellulaire RAW264.7	SiO ₂ NPs de 20 nm et SiO ₂ micrométrique (1 à 5 µm)	11 doses de 0 à 24000 mg/L pour les NPs et 10 doses de 62 à 32000 mg/L pour le SiO ₂ micro Test MTT, comètes, apoptose, cycle cellulaire	CI50: 5080 mg/L pour les SiO ₂ NPs, 16690 pour le SiO ₂ micrométrique. Cytotoxicité supérieure causée par les NPs mais génotoxicité supérieure du SiO ₂ micrométrique

En résumé, les NPs de dioxyde de silicium food-grade montrent une cytotoxicité, une augmentation de l'apoptose, une augmentation de la génération de stress oxydant et de dommage à la membrane significativement supérieure au contrôle à partir de 25 mg/L, et à son équivalent non nanométrique à partir de 100 mg/L. Néanmoins, les SiO₂ NPs ne semblent pas être plus génotoxiques que les particules de SiO₂ micrométriques, dans des conditions expérimentales *in vitro*.

3.3.4 Données toxicologiques *in vivo*

Tableau 9 Etudes de la toxicité *in vivo* des nanoparticules de SiO₂ food-grade

Source	Modèle expérimental	Taille des NPs de SiO ₂ -FG	Doses et paramètres étudiés	Résultats
Clement, L. et al. (2013)	Daphnies, algues, diatomées	SiO ₂ Stöber fonctionnalisée de 292 nm et 448 nm. SiO ₂ -FG de 14 nm et 22 nm	0.005 à 1000 mg/L Tests OCDE n°201 et 202: et concentration efficace médiane (CE50)	La CE50 est dépendante de la taille des particules, les NPs de 14 nm sont les plus toxiques, leur CE50 est inférieure à toutes les autres CE50 pour les trois autres NPs testées et pour les trois modèles expérimentaux (Annexe 14)
Li, J. et al. (2018)	Souris Kunming mâles normales et atteintes d'un syndrome métabolique	SiO ₂ -FG de 15.4±1.8 nm	10 mg/kg /j pendant 30 jours dans la nourriture (avec et sans fructose) Stress oxydant, test des comètes et histopathologie du foie	Pas d'influence des NPs sur le poids, les niveaux d'insuline et de glucose. Synergie des NPs de SiO ₂ et du fructose dans leur score inflammatoire et les dommages à l'ADN. Accumulation des NPs dans le foie (moins importante chez les souris "saines") (cf Annexe 18)
Liang, C. L. et al. (2018)	Rats sprague-dawley	SiO ₂ -FG de 25.9 ± 3.4 nm et micro-SiO ₂ de 1087.8 ± 389.6 nm	Gavage de 166.7, 500, et 1,500 mg/ (kg pdc j) pendant 90 jours. Examen histopathologique	Malgré ces doses extrêmement élevées les auteurs ne reportent la présence d'aucune particule internalisée dans les tissus ni d'aucune lésion. Aucun autre test n'a été effectué.

Waegeneers , N. et al. (2018)	Rats Sprague-Dawley femelles de 9 semaines	SiO ₂ -FG de type NM-200 de 7 à 778 nm et 53 nm de médiane	Instillation intraveineuse unique de 20 mg/kg /pdc Examen histopathologique et immunohistochimie 6h et 24h après exposition	Pas de changement histopathologique dû spécifiquement à la silice. Nette augmentation des macrophages hépatiques 6h et 24h après exposition. Répartition du Si par concentration: Foie > rate > vessie = ovaies 64 ± 22% et 54 ± 14% de Si hépatique 6h et 24h après exposition respectivement.
--	--	---	--	---

Les études *in vivo* nous permettent d'évaluer la toxicocinétique des nanoparticules de SiO₂, et nous apprennent que ces NPs se distribuent rapidement et s'accumulent dans le foie préférentiellement (plus de 50% de nanoparticules hépatiques 1h après exposition). La rétention de la silice dans l'organisme est de plusieurs semaines, et elles perdurent à l'état de nanoparticules. Des signes de diminution de la viabilité cellulaire et de l'augmentation de la réponse inflammatoire se manifestent à partir de 10 mg/kg pdc. Les preuves de génotoxicité significative de la NP par rapport à la MP (microparticule) sont uniquement indirects, et aucune lésions histopathologiques n'ont été vues.

4 Discussion

4.1 Déséquilibre de la quantité d'informations disponibles en fonction de la substance

Il y a une grande disparité dans la quantité d'information disponible d'une substance à une autre. Pour certaines substances, il est difficile de caractériser les enjeux sanitaires qu'elles représentent car, même si elles sont utilisées à l'état nanoparticulaire, les données prouvant leur présence dans l'alimentation par des méthodes de caractérisation fiables sont inexistantes. En attendant des données obtenues directement des industriels, ou par analyse directe des denrées alimentaires (comme l'a fait la DGCCRF) ou de l'additif, il est possible de supposer la présence des NPs dans l'alimentation par des moyens alternatifs comme R-Nano, ou la revue des applications des nanomatériaux en question dans la littérature: Exemples:

- La synthèse de nouveaux nanomatériaux efficaces pour l'agroalimentaire comme des composites MCDA, contenant des NPs de CaCO_3 (cf page 51)
- L'amélioration de technologies existantes grâce aux nanomatériaux (cf les nombreuses applications dans le biomédical des NPs courantes, y compris de celles qui sont utilisées en alimentaire mais dont la présence de particules nanométriques n'est pas avérée).

Par exemple les NPs de CaCO_3 peuvent être utilisées pour le transport de substances actives médicamenteuses dans l'organisme et en thérapie ciblée pour le traitement du cancer (Griffin et al. 2018), ce qui montre à la fois leur capacité à potentialiser d'autres substances et à les rendre plus biodisponibles, deux facteurs qui, selon l'EFSA, peuvent affecter la toxicité des NPs (cf page **Erreur ! Signet non défini.**). Une dernière alternative est d'étudier les procédés de fabrication des additifs alimentaires, afin de voir s'ils produisent naturellement des nanoparticules, comme cela semble être le cas pour le E 170.

Manque d'information dans le cas du carbonate de calcium:

Aucun des articles extraits des bases de données bibliographiques en ligne ne mentionnait le "E 170" ni dans son titre, ni dans son résumé, ni dans ses mots-clés.

Malgré cela, nous avons pu montrer que la méthode de synthèse du E 170 produit de faibles proportions de nanoparticules. La toxicité du E 170 ou des CaCO_3 NPs food-grade

devrait donc être réévaluée en tenant compte de ces nanoparticules. La réévaluation du E 170 faite par l'EFSA en 2011 signalait déjà un manque de données toxicologiques sur ces NPs, en 2018 ce manque n'a pas été pallié.

Autre exemple pour une substance citée mais dont la toxicité n'a pas été investiguée: le cas de l'aluminium:

L'aluminium n'a pas pu être étudié par manque de données, pourtant plusieurs additifs couramment utilisés et contenant de l'aluminium sont autorisés:

- L'aluminium E 173, autorisé en quantité satisfaisante dans les décorations pour pâtisseries
- Les sulfates d'aluminium E 520, E 521, E 522 et E 523: autorisés dans les fruits et légumes confits, cristallisés ou glacés à 200 mg/kg maximum.
- Le phosphate d'aluminium sodique acide E 541: autorisé dans les viennoiseries jusqu'à 1000 mg/kg.
- Les aluminosilicates E 554 et E 555: autorisés dans les produits comme les laits en poudre et le lactosérum.

Ces substances seraient notamment utilisées sous forme nanométrique dans les MCDA et les compléments alimentaires (Sieg et al. 2017). En 2008, l'EFSA décide de passer la dose hebdomadaire tolérable pour l'aluminium de 7 mg/kg à 1 mg/kg du fait de sa capacité à s'accumuler dans les tissus. De nombreuses études ont d'ores et déjà démontré la toxicité de l'aluminium. De plus, plusieurs études ont démontré la présence d'aluminium dans de nombreux aliments, dont certains en contenaient en quantité supérieure à la dose tolérable hebdomadaire (Ogimoto et al. 2016, Zhang et al. 2016).

Néanmoins, l'exposition aux nanoparticules d'aluminium dans l'alimentation et leur impact sur la santé a pour le moment été très peu étudiée. Dans leur revue systématique sur le risque lié à l'aluminium Willhite *et al.* recensent un nombre significatif d'articles sur les NPs d'alumine, et d'autres formes d'aluminium, mais très peu d'articles sur des formes d'aluminium autorisées comme additif alimentaire, et sur de la toxicité par ingestion (Willhite et al. 2014). De rares études sont citées sur le sulfate d'aluminium $Al_2(SO_4)_3$ (E 520), mais elles ne s'intéressent pas spécifiquement aux nanoparticules. D'autres études seraient nécessaires pour confirmer ou réfuter l'hypothèse de Loeschner *et al.* selon laquelle certains plats préparés contiendraient des nanoparticules d'aluminium (Loeschner et al. 2018).

4.2 Critique de la subjectivité dans le choix et l'analyse des articles des revues de la littérature

Les articles que j'ai choisi pour montrer un effet se basent sur des méthodes précises, et certaines revues par exemple omettent des articles qui sont pourtant dignes d'intérêt, c'est d'ailleurs pour cette raison qu'il a été décidé de s'attarder sur ces articles. Néanmoins, les critiques de sélection des articles de chaque auteur de revue de la littérature peuvent être discutées. Dans sa revue de la littérature, Fruijtier-Pölloth Claudia s'est intéressée à la toxicologie des NPs de SiO₂-FG. Elle conclut sur l'absence de données systémiques ou locales pertinentes par exposition orale pour les NPs de SiO₂-FG, considérant que le E 551 existe uniquement sous la forme d'agrégats micrométriques qui ne se décomposent pas au pH gastrique. Elle mentionne tout de même qu'il serait possible que ces agrégats se dissolvent à un pH plus élevé, dans les intestins par exemple. Considérant cela, l'étude de l'effet des nanoparticules dans le E 551 serait impertinente.

Mme Fruijtier-Pölloth reporte l'étude de Gerloff *et al.* sur l'effet des SiO₂ NPs (SAS) sur la cytotoxicité et la régulation de l'interleukin-8 dans les cellules intestinales Caco-2 différenciées et indifférenciées. L'étude est revue comme ne montrant aucun effet toxicologique des SiO₂ NPs car les effets sur la viabilité sont significatifs uniquement pour les cellules indifférenciées (Gerloff *et al.* 2013), mais d'autres effets significatifs ont en réalité été montrés sur la sécrétion des Interleukin-8 (IL-8) (cf résultats en Annexe 15). Enfin, cette même revue, cherchant à évaluer la toxicité de la silice SAS, cite toutes les études utilisant de la silice colloïdale comme non pertinentes, ce qui est vrai, la SAS n'est pas colloïdale, mais encore faut-il que les échantillons employés dans les études soient réellement colloïdaux.

L'équipe de Decan *et al.* a par exemple étudié la cytotoxicité et la génotoxicité des nanoparticules de silice amorphe synthétique de quatre tailles différentes sur des cellules d'épithélium alvéolaire de souris (lignée FE1) à une concentration de 12,5 mg/L. Les échantillons de silice amorphe employés ont été caractérisés par DLS et TEM:

Tableau 10 Caractérisation de la taille des NPs dans l'étude de Decan et al.

Nom de l'échantillon	Taille moyenne des particules
SiNP12	22,5 nm
SiNP5-15	56,9 nm
SiNP10-20	237,5 nm
SiP2	2045,4 nm

La dose employée, comparativement aux études vues dans notre état de l'art, est relativement faible. Selon Mme Fruijtier-Polloth, les résultats de cette étude sont négatifs, et la silice employée est de la SAS colloïdale. Pourtant, les résultats montrent bien de la toxicité et même une augmentation de l'expression des gènes pour les plus petites particules. De plus, la caractérisation TEM révèle bien qu'il ne s'agit pas de silice colloïdale (Decan et al. 2016). Notons que cette revue de la littérature a été financée par "the Association of Amorphous Silica Producers".

4.3 Critique des concentrations de SiO₂ utilisées dans les études toxicologiques

Même si des effets aigus comme chroniques peuvent apparaître lors des essais toxicologiques, les concentrations testées sont parfois trop élevées pour être comparables à une exposition réelle de la population générale (Shi et al. 2013). On peut se poser la question de la pertinence d'un effet toxicologique observé *in vitro* sur 24h à 1000 mg/L lorsque l'on ignore le niveau d'exposition réelle aux NPs de SiO₂-FG dans l'alimentation.

L'EFSA a proposé plusieurs scénarios d'expositions au E 551 dans l'alimentation

Scénario 1: exposition chronique à une quantité de E 551 calculée sur la moyenne de E 551 contenue dans tous les aliments (compléments alimentaires exclus)

Scénario 2: association des données de consommation avec les niveaux maximum autorisés ou utilisés de l'additif

Tableau 11 Scénarios d'exposition pour le E 551 dans l'alimentation

Exposition moyenne	Pour les enfants de 3 à 9 ans	Pour les adultes de 18 à 64 ans	Equivalent journalier pour un homme de 70kg
Scénario 1	De 5,9 à 24,5 mg/kg pdc	De 2,8 à 8,0 mg/kg pdc	De 196 à 560 mg/j
Scénario 2	2,7 à 18,4 mg/kg pdc	De 0,9 à 2,7 mg/kg pdc	De 63 à 189 mg/j

Les études que nous avons sélectionné rapportaient généralement des doses de 100 à 1000 mg/L pour la toxicité aigüe *in vitro*, ce qui correspond relativement bien à l'exposition journalière pour un adulte, et des doses de 10 à 20 mg/kg pdc pour les études *in vivo*, plus proche de l'exposition estimée pour les enfants.

De ce point de vue, les doses utilisées paraissent pertinentes, hormis pour l'étude menée par Liang et al. utilisant des doses extrêmement élevées. Néanmoins, deux biais essentiels sont aussi à prendre en considération:

- la pertinence de l'extrapolation des données toxicologiques de la cellule ou de l'animal à l'Homme
- l'exposition réelle en NPs par l'intermédiaire du E 551: Un scénario d'exposition faisant l'hypothèse que 100% du SiO₂ dans l'additif est sous forme de NPs est-il pertinent ?

Une autre estimation de l'exposition a été proposée par Dekkers *et al.*, plus ancienne. Celle-ci fixe l'exposition quotidienne aux NPs de SiO₂ à 1,8 mg/kg pdc/j (Dekkers et al. 2011), soit bien inférieure à la limite considérée sans danger par l'EFSA de 21 mg/kg/j /pdc (pour un homme de 70kg)(soit 1500 mg/j)(EFSA 2009). Il y a un facteur 5 entre ce niveau d'exposition et le seuil d'exposition bas couramment proposé dans les études *in vivo*, toutefois il faut aussi prendre en compte l'exposition chronique et la bioaccumulation de la silice. Il n'est pas exclu que l'exposition réelle atteigne ces doses, elles sont donc tout de même jugées pertinentes.

4.4 Autres critiques des protocoles expérimentaux employés dans les études sélectionnées

L'équipe de Guo s'est intéressée à l'effet des NPs sur les fonctions intestinales. Sous les conditions physico-chimiques du TGI (tractus gastro-intestinal)(estomac: pH 3, intestin grêle: pH 6) les agrégats de NPs peuvent se désagréger, les particules primaires peuvent également être dégradées, or leur protocole *in vitro* utilise un pH 7,0, ce qui ne permet donc pas de mimer les conditions physico-chimiques du TGI. Cela explique le fait que la caractérisation des NPs dans les tissus étudiés n'a montré que des NPs sphériques et agrégées, correspondant effectivement à la forme basique du E 551 dispersée dans de l'eau ultra pure.(Guo et al. 2018).

Cependant, les effets toxicologiques montrés par Guo *et al.* sur la perturbation de l'homéostasie intracellulaire et l'augmentation de la réponse inflammatoire causée par la

surexpression des gènes médiateurs de cette réponse inflammatoire sont tout de même corroborer par ceux de Kusaczuk *et al.* (Kusaczuk et al. 2018)

4.5 Importance de l'état d'agrégation et des propriétés de surface dans la toxicité des nanoparticules

La silice amorphe (SAS) existe sous diverses formes, dont la silice colloïdale, qui n'est pas une forme autorisée dans le E 551, ce qui est admis par tous. Sa structure totalement non agrégée, même en milieu aqueux, confère à ses NPs une biodisponibilité et une cytotoxicité **supérieure à la SAS agrégée**. Les NPs fabriquées par la méthode dite de Stöber sont extrêmement proches, en termes de forme et de charge de surface, des SiO₂ NPs colloïdales, et s'agrègent également très faiblement. A taille égale, la toxicité des NPs de SiO₂ Stöber et des NPs de SiO₂ colloïdales est similaire, sinon supérieure, à celle de la SAS (Battal et al. 2015, Choi et al. 2010, Guichard et al. 2016, Kim, Joachim, et al. 2015, Sun et al. 2011). Néanmoins la légère rugosité des NPs Stöber (Napierska et al. 2010) pourrait leur conférer une toxicité sensiblement supérieure à celles des NPs colloïdales, qui sont lisses. Quoi qu'il en soit, même si aucun effet systémique des NPs colloïdales n'est montré par les études *in vivo* à des concentrations 2000 mg/kg (Kim et al. 2014, Ryu et al. 2014), leurs effets sur les niveaux inflammatoires, sur la viabilité cellulaire et sur la cytotoxicité sont avérés mais ces données toxicologiques ne peuvent être utilisées pour évaluer les risques liés spécifiquement aux NPs de E 551 (ou même à la SAS).

Pourtant, peut-être dans un souci d'exhaustivité, et du fait de la quantité limitée de données, les quatre revues de la littérature sur la SAS étudiées (Fruijtier-Pöllöth 2016, Murugadoss et al. 2017, Winkler, Suter, and Naegeli 2016, Younes et al. 2018) incluent des articles scientifiques utilisant la silice colloïdale ou de Ströber.

Il est intéressant de remarquer comment certaines formes de silice non définies comme SAS ou E 551 peuvent apparaître dans les revues de la littérature, et comment d'autres autorisées peuvent être considérées comme colloïdales.

Plus intéressant encore, la silice colloïdale, qui n'est pas du E 551 nous le rappelons, et est plus toxique que lui, est considérée comme SAS dès lors qu'elle est fonctionnalisée par un traitement de surface au silane ou au silanol (Fruijtier-Pöllöth 2016). Or, cette fonctionnalisation des NPs modifie complètement leurs interactions avec les cellules. Kwon *et al.* ont proposé une méthode de fabrication de NPs de silice colloïdales avec un traitement de surface à la L-arginine. Les résultats de leurs essais toxicologiques

indiquent que ces NPs une fois fonctionnalisés n'ont plus du tout de toxicité à 2000 mg/kg *in vitro* comme *in vivo* (pour des NPs de 20 et 100 nm)(Kwon et al. 2014). Cette observation pourrait peut-être être rapprochée de l'inemployabilité du test d'AMES pour étudier la génotoxicité des NPs, la couche de lipopolysaccharides des bactéries faisant barrière aux NPs.

4.6 Les SiO₂ NPs, des particules aussi toxiques par ingestion que par inhalation ?

La toxicité des NPs de SiO₂ a été très étudiée par inhalation, et les preuves de leur toxicité par cette voie d'exposition sont nombreuses. Pourtant, les NPs de SiO₂ pourraient être tout aussi toxique. Une preuve en ce sens est l'étude de toxicité *in vitro* de Mu *et al.* par test MTT et test des comètes:

Trois lignées cellulaires, cellules épithéliales tumorales de colon, kératinocytes, et épithélium alvéolaire, modélisant respectivement la voie orale, cutanée et par inhalation, exposées à 10 mg/L de SiO₂-FG révèlent une toxicité égale, sinon supérieure, des NPs sur les cellules de colon comparativement aux deux autres (Mu et al. 2012).

Il pourrait être intéressant de reproduire davantage ce type d'études car les données sur les mécanismes d'action toxique par inhalation des SiO₂ NPs sont plus nombreuses que par ingestion, et une lecture croisée de ces deux types de données est peut-être envisageable.

4.7 Possible effet synergique des nanomatériaux

Selon Croissant et al. les NPs de silice mésoporeuse sont utilisées depuis longtemps dans le domaine pharmaceutique, en association avec d'autres substances comme le calcium. Si une synergie est possible entre ces 2 substances, notamment en terme de transport et d'absorption, on peut se demander si le même type de synergie pourrait exister entre E 170 et E 551 dans la matrice alimentaire: par exemple. Ariano *et al.* montrent que les nanoparticules de SiO₂ de 50 nm (fabriquées par procédé sol-gel) perturbent l'homéostasie du calcium dans les cellules neurales de souris (GT1-7). Elles provoquent l'augmentation significative du calcium intracellulaire, alors que cette augmentation est faible avec des particules de 200 nm (doses testées 15, 73*, 146**, 292** mg/L)(Ariano et al. 2011).

Précisions à propos de la silice mésoporeuse:

Pour autant, il ne faut surtout pas confondre évaluation de la toxicité de la silice mésoporeuse et de la silice food-grade.

De nombreux articles portent sur la silice mésoporeuse utilisée dans le biomédical pour améliorer le transport des substances actives. Elle est particulièrement efficace dans ce rôle car elle est spécialement synthétisée pour avoir une très grande porosité. Les revues sur la silice (ou même la SAS) incluent parfois cette forme de silice, mais elle ne peut servir au read-across pour le E 551. Outre sa structure très différente du E 551, elle a également un temps de dégradation beaucoup plus long: 90% des SiO₂ NPs mésoporeuses de 20nm sont dégradées en une semaine, contre 42% pour des SiO₂ NPs de 10 nm non mésoporeuses (Croissant, Fatieiev, and Khashab 2017). Cho *et al.* montrent que les SiO₂ NPs non poreuses sont capturés par les macrophages de la rate et du foie avant excréation et y restent jusqu'à quatre semaines chez la souris (Cho et al. 2009). En comparaison, 23% des NPs mésoporeuses sont excrétées dès les 30 premières minutes chez la souris.

4.8 Effet "cheval de Troie"

Outre les possibles effets "cocktails" des NPs, il serait intéressant d'étudier leur capacité à potentialiser la toxicité de substances connues pour être toxiques, comme le montrent Zhang *et al.* avec l'exemple de l'interaction des NPs de SiO₂ avec un PCB perturbant la barrière hémato-encéphallique et engendrant une toxicité cérébrovasculaire (Zhang et al. 2012).

4.9 Avis de l'EFSA sur l'évaluation des nanomatériaux

Les substances présentant des nanoparticules ne peuvent pas être évaluées comme des substances chimiques conventionnelles, il serait nécessaire de mettre en place des lignes directrices pour l'évaluation du risque appliqué aux nanomatériaux (Hardy et al. 2018)

Méthode d'évaluation du risque lié aux nanomatériaux dans l'alimentation par l'EFSA :

- L'évaluation du risque combinera danger, exposition, informations issues de lectures croisées, et une méthode d'évaluation du poids de la preuve sur les informations disponibles. Elle devra également inclure la contamination aux NPs due à l'exposition aux

MCDA s'il est prouvé que des formes nanoparticulaires se maintiennent après migration dans l'aliment.

- Facteurs d'incertitudes : Si les données proviennent de méthodes validées avec des tests spécifiques aux nanoparticules, on utilisera les mêmes facteurs d'incertitudes que pour l'évaluation du risque conventionnelle. En revanche si les données sont restreintes et que l'on utilise des données qui ne remplissent pas ces conditions on devra appliquer des facteurs d'incertitudes additionnels.

- L'évaluation du risque doit être faite sur des informations dites "nanospécifiques", c'est-à-dire qui montrent un danger spécifiquement lié à la taille nano. Des informations sur la taille, et toutes les propriétés physico-chimiques du nanomatériau influençant son absorption, sa persistance, sa mobilité et sa biodisponibilité (y compris si le nanomatériau est utilisé pour l'enrobage ou l'encapsulation) sont essentielles.

4.10 Mes recommandations

Faisabilité d'une ERS

Les SiO₂ NPs ont été très étudiées pour toutes les voies d'exposition, et il existe aussi bien des données de cytotoxicité, de génotoxicité, que de mécanistique ou d'exposition. Il serait donc possible de mener une ERS sur ces nanoparticules. En revanche, les données sur les CaCO₃ NPs sont très limitées, elles sont insuffisantes pour une ERS ou pour tirer une conclusion sur le danger de ces nanoparticules. Pour ces dernières il est déjà difficile de prouver leur présence dans l'alimentation, nous aurions besoin d'une preuve formelle et directe de la présence de NPs dans un échantillon de E 170. En ce qu'il concerne leur toxicité, il faudrait de nouvelles données comparant les CaCO₃ NPs les particules de CaCO₃ micrométrique, pour étudier la pertinence de mener une ERS sur cette substance, des données de génotoxicité manquent également.

Les méthodes analytiques adaptées aux nanoparticules

Nous l'avons vu à de nombreuses reprises, la caractérisation par TEM est très importante, elle est bien plus précise que la DLS qui calcule un diamètre hydrodynamique. Les diamètres calculés par DLS peuvent varier de manière importante uniquement en fonction du milieu dans lequel se trouve les NPs. C'est ce que remarquent Wu *et al.* en détectant des diamètres hydrodynamiques de 238 ± 2 nm pour des particules de $20\text{nm} \pm 5\text{nm}$ lorsqu'elles sont dispersées en milieu aqueux, et de 330 ± 6 nm lorsqu'elles sont dispersées en milieu de culture (+10% de sérum)(Wu et al. 2015). Néanmoins, ce

phénomène peut également être lié à la corona de la NP en milieu de culture (Sikora, Shard, and Minelli 2016).

Nous remarquons également qu'il semble y avoir un nouveau paradigme selon lequel la toxicité des nanoparticules est gouvernée par leur taille, et que seule l'étude de ce paramètre est essentiel. D'autres paramètres sont toutefois tout aussi importants, tels que la charge de surface et la porosité, et ne sont fréquemment pas étudiés. Pour Yu et al. ces deux paramètres ont plus d'influence sur la toxicité des NPs que la taille (Yu, Malugin, and Ghandehari 2011).

Génération de données manquantes

Au-delà des données toxicologiques, qui sont inégales, les données faisant actuellement le plus défaut pour permettre une ERS liée aux NPs dans les additifs alimentaires sont celles d'exposition.

Les effets précoces engendrés par la toxicité des NPs étant peu spécifique, il serait également intéressant de tester dans une même étude toxicologique diverses NPs, de composition chimique différente. En effet, cela pourrait permettre de mettre en balance les effets inflammatoires et oxydants de chaque substances les unes par rapport aux autres, pour un même protocole, et ainsi de voir si des regroupements de substances par catégorie de toxicité pourraient être faits, ce qui éviterait d'avoir à traiter la toxicité de tous les NPs au cas par cas.

Enfin, l'efficacité des essais toxicologiques vis-à-vis des nanoparticules devrait être davantage étudiée et validée. Pour le moment, de nombreux auteurs considèrent que du point de vue de ces essais les NPs peuvent être considérées comme des substances chimiques conventionnelles.

4.11 Vers des modifications ou améliorations des réglementations sur les nanomatériaux ?

En 2017, une équipe de l'INRA montre des effets initiateurs et promoteurs des stades précoces de la cancérogenèse colorectale des TiO₂ NPs, par exposition orale chronique (Bettini et al. 2017). Cette étude de 100 jours sur des rats est la première à montrer des effets aussi sévères par ingestion (cancérogènes et immunotoxiques), qui plus

est en utilisant comme source de TiO₂ NPs l'additif E 171, couramment utilisé dans les denrées alimentaires en tant que colorant.

Les études *in vivo*, représentant des conditions expérimentales bien plus proches de la réalité que les conditions *in vitro*, elles sont considérées comme plus fiables. Cela et le fait que les effets montrés soient précancéreux explique que ces résultats aient particulièrement inquiété les associations de consommateurs et les ministères en charge de la santé et de l'alimentation. En conséquence, dès Mai 2018, la secrétaire d'Etat à l'Ecologie a annoncé le retrait du E 171 de nos aliments avant la fin de l'année. Cette annonce a été réitérée au sénat, et le gouvernement s'est engagé à suspendre l'utilisation du E 171, et à remettre un rapport au Parlement sur les mesures prises le concernant au plus tard le 1er Janvier 2019 (Ministre des solidarités et de la santé 2018). Ceci prouve le réel impact des découvertes scientifiques sur les décisions réglementaires. C'est la raison pour laquelle il conviendrait d'engager davantage de moyens dans la réalisation d'études toxicologiques avec un protocole comparable (ou en tout cas avec une exposition longue et chronique *in vivo* directement par ingestion de l'additif).

La réglementation REACH pourrait également être une source très abondante de données si elle incluait des conditions spécifiques et adaptées à l'enregistrement des substances sous forme nanoparticulaire. C'est finalement ce qu'ont décidé de mettre en place les Etats membres de l'Union européenne lors du comité Reach réuni le 26 avril 2018. Une proposition de la Commission européenne visant à adapter les annexes de Reach afin que puissent être explicitement pris en compte les nanomatériaux a été validée. Cet amendement sera applicable à partir du 1^{er} janvier 2021, et donnera notamment à l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) le pouvoir d'obtenir des informations supplémentaires sur les nanomatériaux produits au-delà de 10 tonnes par an. Il permettra également de séparer les déclarations sur les substances chimiques conventionnelles de celles sur les nanomatériaux, en incluant des informations physico-chimiques mieux adaptées à la nano-échelle (Parlement Européen et du Conseil 2018).

Conclusion

L'évaluation de la toxicité des nanoparticules présentes dans les additifs alimentaires réclame une caractérisation exhaustive des propriétés-chimiques de la substance avant d'en étudier la toxicité. C'est *a minima* la caractérisation de la taille des particules, de leur morphologie et de leur composition chimique qui permet d'établir le lien de causalité entre présence de nanoparticules dans un additif alimentaire ingéré et présence de nanoparticules provenant de cet additif dans l'organisme. Concernant l'exposition de la population générale à ces nanoparticules dans les additifs, les méthodes analytiques sont actuellement les seules à donner une information fiable, à condition d'avoir recours à plusieurs méthodes analytiques complémentaires, dont l'une d'elle devra être de la microscopie électronique. Les dispositions réglementaires pouvant aider à obtenir de nouvelles données pertinentes sur ces nanoparticules nécessitent encore des améliorations, ce qui est d'ailleurs en cours avec la proposition du Comité REACH validée le 26 mai 2018 qui, à partir du 1er janvier 2019, permettra une prise en compte spécifique des nanomatériaux dans REACH.

Les enjeux sanitaires liés à l'exposition à ces nanoparticules sont encore à élucider. Ils requièrent une évaluation des risques sanitaires spécifique aux nanoparticules, ce qui passe par la génération de données toxicologiques les plus pertinentes de cette exposition aux nanoparticules par les additifs alimentaires. La méthode de collecte de données toxicologiques présentée dans ce travail nous a permis d'obtenir ces informations pertinentes sur des nanoparticules bien caractérisées. Les substances dont la toxicologie a été investiguée ici, le E 170 et le E 551, témoignent bien d'une toxicité spécifique à la nano-échelle, notamment par la capacité qu'ont les nanoparticules à traverser les barrières épithéliales, les endommageant, à générer du stress oxydant, à adsorber d'autres molécules à leur surface et à être internalisées tout en étant moins rapidement excrétées qu'elles ne sont absorbées.

Afin de mieux comprendre leur toxicité, il faudrait étudier plus en détail l'influence de certains paramètres physico-chimiques sur la toxicité des nanoparticules, en particulier leur charge de surface, leur porosité et leur corona, qui modulent de façon importante les interactions de ces nanoparticules avec l'organisme.

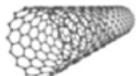
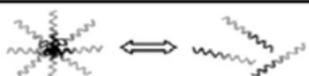
Enfin, les additifs alimentaires ne sont pas les seules sources potentielles de nanoparticules dans l'alimentation, un futur travail consisterait à étudier les expositions liées à ces sources potentielles, comme les MCDA, les contaminations fortuites dans les matières premières, ou encore les résidus de traitement de l'eau de consommation.

Annexes:

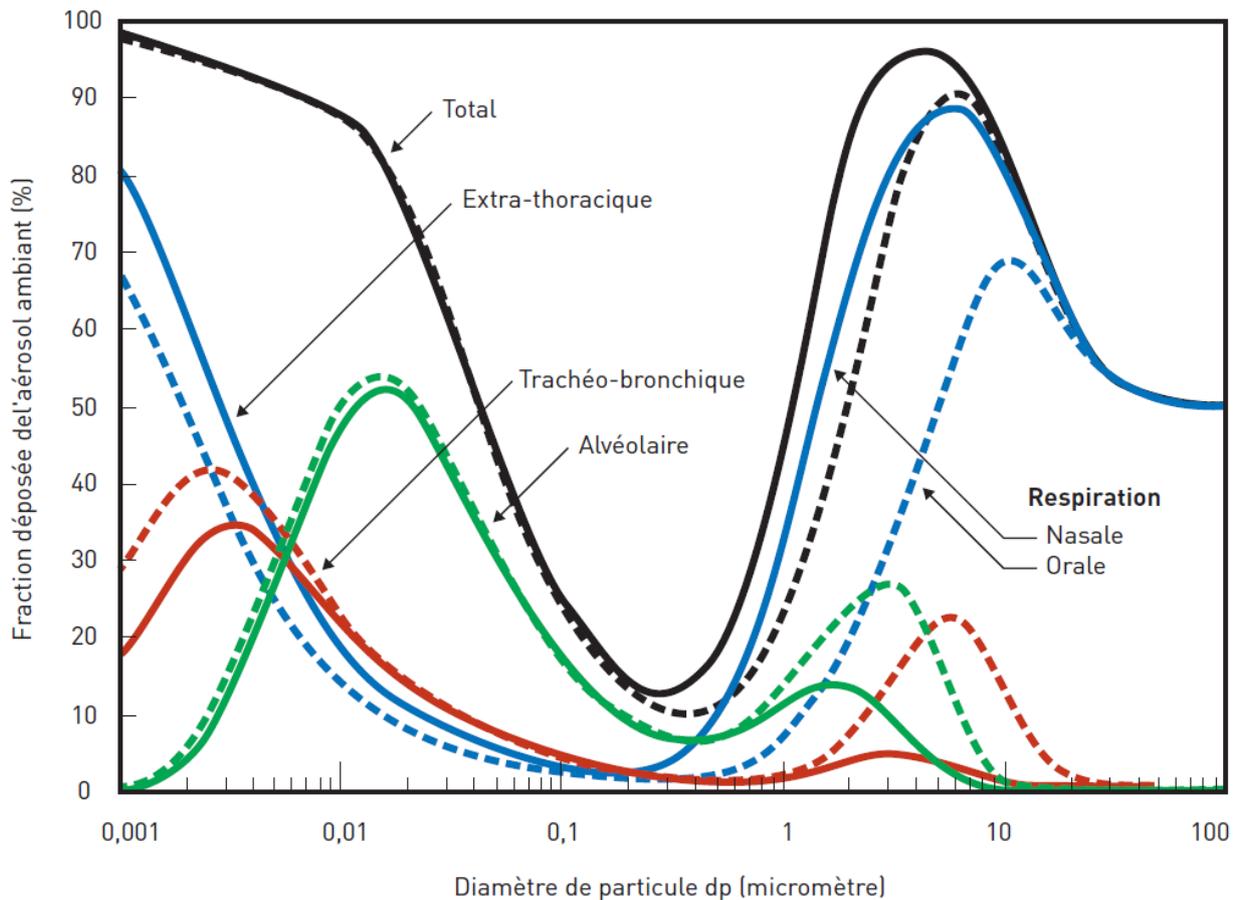
Liste des annexes:

Annexe 1	Classification des différents types et formes de nano-objets par Bouwmeester et al. (2009).....	79
Annexe 2	Mesure du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires chez l'Homme en fonction de la taille des particules.....	80
Annexe 3	: Extraits du rapport R-Nano de 2015.....	81
Annexe 4	: Extrait de la recommandation n°2011/696/UE relative à la définition des nanomatériaux.....	82
Annexe 5	: Règlement « INCO ».....	83
Annexe 6	: Extrait du règlement (CE) N°1333/2008.....	84
Annexe 7	: Mots clés et requêtes pour interroger les bases de données bibliographiques.....	85
Annexe 8	: Présentation de l'interface du logiciel EndNote.....	88
Annexe 9	: Les Smart Groups dans EndNote.....	89
Annexe 10	Images TEM des formes cristallines et colloïdales du carbonate de calcium 90	
Annexe 11	: Organigramme de l'Anses.....	91
Annexe 12	: Méthodes de synthèse du CaCO ₃ et images TEM de ses différentes formes 92	
Annexe 13	: Caractérisation par TEM des différentes formes de SiO ₂ NPs.....	93
Annexe 14	: Résultats toxicologiques publiés par Clement et al.....	94
Annexe 15	: Résultats publiés par Gerloff et al. (2013).....	95
Annexe 16	: Résultats publiés par Guo et al. (2018).....	96
Annexe 17	: Résultats publiés par Kusaczuk et al.(2018).....	97
Annexe 18	: Résultats publiés par Li et al. (2018).....	98
Annexe 19	: Résultats publiés par Spyrogianni et al. (2017).....	99
Annexe 20	: Résultats publiés par Waegeneers et al. (2018).....	99
Annexe 21	: Interaction des nanoparticules avec la cellule.....	101

Annexe 1 Classification des différents types et formes de nano-objets par Bouwmeester et al. (2009)

Particle type and shape	Description
'Solid' nanoparticles	
	<i>Spherical or compact particles</i> compositionally homogeneous
	<i>Nanofiber</i> compositionally homogeneous
	<i>Nanotube</i> compositionally homogeneous
	<i>Nanoplate</i> compositionally homogeneous
	<i>Complex non-spherical particles</i> compositionally homogeneous
	<i>Compositionally heterogeneous particles</i> compositional variation core vs. surface
	<i>Compositionally heterogeneous particles.</i> distributed compositional variation
	<i>Homogeneous aggregates/agglomerates</i> consisting of a single particle class
	<i>Heterogeneous aggregates/agglomerates</i> consisting of diverse particle types
Nano delivery systems: lipid based	
	<i>Nanoliposomes /archaeosomes</i> bilayer lipid vesicles
	<i>Micelle</i> single layer lipid vesicles
	<i>Nanocochleates</i> lipid layer sheet rolled up in spiral fashion
Nano delivery systems: polymer based	
	<i>Micelle</i> aggregated copolymers
	<i>Nanosphere</i> aggregated copolymers generating a solid central core
	<i>Nanocapsule /Polymersome</i> polymer membrane surrounding a central cavity: - Nanocapsule: oily liquid cavity, single layer membrane - Polymersome: aqueous cavity, bilayer membrane (similar to nanoliposome)

Annexe 2 Mesure du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires chez l'Homme en fonction de la taille des particules



Source (INRS 2005)

Dans cette figure, les lignes continues représentent une respiration majoritairement nasale, alors que les lignes pointillées représentent une respiration majoritairement orale. Enfin, les lignes bleues, rouges et vertes montrent la fraction de particules déposée dans différents étages du système respiratoire, par rapport au total de particules s'étant déposé (ligne noire).

On observe un faible pourcentage de dépôt des particules entre 100 nm et 1 μm , ces particules sont plus facilement expirées. En revanche, le pourcentage de dépôt est très élevé pour des particules de 1 nm et 100 nm, et pour celles de 1 μm à 100 μm . La différence significative est que celles inférieures à 100 nm (les nanoparticules) se déposent fortement au niveau alvéolaire (jusqu'à plus de 50% des particules), alors que les particules micrométriques restent à l'étage extra-thoracique. A noter également que les nanoparticules de 1 nm de diamètre ne sont pas expirées, elles se déposent à 100%. Cette différence de comportement de l'aérosol en fonction de la taille de ses particules dénote un risque spécifique lié à l'inhalation de nanoparticules.

Annexe 3 : Extraits du rapport R-Nano de 2015

Carbonate de calcium déclaré en usage alimentaire :

Calcium carbonate	Calcium carbonate	> 1000 t	ac1	Véhicules
Carbonate de Calcium			ac13	Articles en plastique
Carbonate de Calcium Précipité			ac2	Machines, appareils mécaniques, articles électriques/électroniques
precipitated calcium carbonate			ac8	Articles en papier
			pc1	Adhésifs, produits d'étanchéité
			pc18	Encres et toners
			pc19	Intermédiaire
			pc32	Préparations et composés à base de polymères
			pc9a	Revêtements et peintures, solvants, diluants
			pc9b	Charges, mastics, enduits, pâte à modeler
			proc1	Utilisation dans des processus fermés, exposition improbable
			proc10	Application au rouleau ou au pinceau
			proc2	Utilisation dans des processus fermés continus avec exposition momentanée maîtrisée
			proc3	Utilisation dans des processus fermés par lots (synthèse ou formulation)
			proc4	Utilisation dans des processus par lots et d'autres processus (synthèse) pouvant présenter des possibilités d'exposition.
			proc5	Mélange dans des processus par lots pour la formulation de préparations et d'articles (contacts multiples et/ou importants)
			proc6	Opérations de calandrage.
			proc7	Pulvérisation dans des installations industrielles
			su0	Autres
			su10	Formulation [mélange] de préparations et/ou reconditionnement (sauf alliages)
			su12	Fabrication de produits en matières plastiques, y compris formulation et conversion
			su17	Fabrication générale, p. ex. machines, équipements, véhicules, autres matériels de transport
			su19	Bâtiment et travaux de construction
			su24	Recherche scientifique et développement
			su4	Fabrication de produits alimentaires
			su6b	Fabrication de pâte, papier et produits papetiers
			su7	Imprimerie et reproduction de supports enregistrés
			su9	Fabrication de substances chimiques fines

Déclaration de l'additif alimentaire E 551 (dioxyde de silicium) comme substance à l'état nanoparticulaire :

Aérosil A200, Ox50, R812, R7200	Silicon dioxide	> 1000 t	ac10	Articles en caoutchouc
---------------------------------	-----------------	----------	------	------------------------

page 62 / 184

Décembre 2015

Rapport d'étude

Aérosil R972 - Aérosil Mox 80 - Aérosil 200 - Aérosil 300; Silicon dioxide (synthetic amorphous silica)		ac13	Articles en plastique
amorphous colloidal silica		ac2	Machines, appareils mécaniques, articles électriques/électroniques
amorphous silica fume		ac3	Piles et accumulateurs électriques
Amorphous Silicon dioxide		ac30	Autres articles avec rejet intentionnel de substances, veuillez spécifier
Colloidal Silica		ac32	Gommes parfumées
Dioxyde de silicium		ac4	Articles en pierre, plâtre, ciment, verre et céramique
dioxyde de silice		ac7	Articles métalliques
Dioxyde de silicium		ac8	Articles en papier
Dioxyde de silicium, amorphe		pc0	Autres (utilisation des codes UCN: voir la dernière ligne)
Dioxyde de silicium (E551)		pc1	Adhésifs, produits d'étanchéité
Dyoxide de Silice		pc14	Produits de traitement de surface des métaux, y compris produits pour galvanisation et galvanoplastie

Annexe 4 : Extrait de la recommandation n°2011/696/UE relative à la définition des nanomatériaux

Recommandation n° 2011/696/UE du 18/10/11
relative à la définition des nanomatériaux

(JOUE n° L 275 du 20 octobre 2011)

Vus

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

Vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne, et notamment son article 292,

A ADOPTÉ LA PRÉSENTE RECOMMANDATION :

1. Les États membres, les agences de l'Union et les opérateurs économiques sont invités à utiliser la définition indiquée ci-après du terme «nanomatériau» lorsqu'ils adoptent et mettent en oeuvre des actes législatifs, des politiques et des programmes relatifs aux produits issus des nanotechnologies.

2. On entend par « nanomatériau » un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, **dont au moins 50 % des particules**, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.

Dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, **le seuil de 50 %** fixé pour la répartition numérique par taille **peut être remplacé par un seuil compris entre 1 % et 50 %**.

3. Par dérogation au point 2, les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi simple présentant une ou plusieurs dimensions externes inférieures à 1 nm sont à considérer comme des nanomatériaux.

4. Aux fins du point 2, les termes « particule », « agglomérat » et « agrégat » sont définis comme suit :

- a) on entend par « particule » un minuscule fragment de matière possédant des contours physiques bien définis ;
- b) on entend par « agglomérat » un amas friable de particules ou d'agrégats dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels ;
- c) on entend par « agrégat » une particule constituée de particules soudées ou fusionnées.

5. Lorsque cela est techniquement faisable et requis en vertu d'une réglementation spécifique, la conformité avec la définition établie au point 2 peut être déterminée sur la base de la surface spécifique en volume. Tout matériau est à considérer comme relevant de la définition établie au point 2 dès lors qu'il présente une surface spécifique en volume supérieure à $60 \text{ m}^2 / \text{cm}^3$. Cependant, tout matériau qui, sur la base de sa répartition numérique par taille, constitue un nanomatériau est à considérer comme correspondant à la définition établie au point 2 même s'il présente une surface spécifique en volume inférieure à $60 \text{ m}^2 / \text{cm}^3$.

6. La définition établie aux points 1 à 5 sera réexaminée, pour décembre 2014, à la lumière de l'expérience et des évolutions scientifiques et techniques. **Ce réexamen devra particulièrement se focaliser sur la question de savoir s'il y a lieu de relever ou d'abaisser le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille.**

7. La présente recommandation est adressée aux États membres, aux agences de l'Union et aux opérateurs économiques.

RÈGLEMENT (UE) N°1169/2011 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

25 octobre 2011

CHAPITRE I DISPOSITIONS GÉNÉRALES

Article 2

Définitions

2. Les définitions suivantes s'appliquent également:

t) «nanomatériau manufacturé»: tout matériau produit intentionnellement présentant une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, ou composé de parties fonctionnelles distinctes, soit internes, soit à la surface, dont beaucoup ont une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, y compris des structures, des agglomérats ou des agrégats qui peuvent avoir une taille supérieure à 100 nm mais qui conservent des propriétés typiques de la nanoéchelle.

Les propriétés typiques de la nanoéchelle comprennent:

- i) les propriétés liées à la grande surface spécifique des matériaux considérés; et/ou
- ii) des propriétés physico-chimiques spécifiques qui sont différentes de celles de la forme non nanotechnologique du même matériau;

Article 18

Liste des ingrédients

3. Tous les ingrédients qui se présentent sous forme de nanomatériaux manufacturés sont indiqués clairement dans la liste des ingrédients. Le nom des ingrédients est suivi du mot «nano» entre crochets.

**RÈGLEMENT (CE) N ° 1333/2008 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU
CONSEIL**

du 16 décembre 2008

sur les additifs alimentaires

Considérant ce qui suit :

(13) Un additif alimentaire déjà autorisé en vertu du présent règlement et préparé au moyen de méthodes de fabrication ou de matières premières sensiblement différentes de celles visées dans l'évaluation de risques de l'Autorité ou différentes de celles prévues par les spécifications doit être soumis par l'Autorité à une évaluation. Par «sensiblement différentes», on pourrait entendre entre autres une modification de fabrication par l'abandon d'un procédé d'extraction à partir de plantes au profit d'un procédé de fermentation à l'aide d'un micro-organisme ou une modification génétique du micro-organisme d'origine, une modification des matières premières ou une modification de la taille des particules, y compris l'utilisation des nanotechnologies.

Article 12

Modification du processus de production ou des matières premières d'un additif alimentaire déjà inclus dans une liste communautaire

Lorsque, s'agissant d'un additif alimentaire déjà inclus dans une liste communautaire, les méthodes de production ou les matières premières utilisées font l'objet d'une modification notable, ou lorsqu'intervient une modification dans la taille des particules, par exemple par l'emploi des nanotechnologies, l'additif produit avec ces nouvelles méthodes ou matières premières est considéré comme un additif différent et une nouvelle entrée ou une modification des spécifications dans les listes communautaires est nécessaire avant qu'il puisse être mis sur le marché.

Annexe 7 : Mots clés et requêtes pour interroger les bases de données bibliographiques

Les exemples de requêtes ci-dessous sont adaptés à la base de données Scopus. Les requêtes utilisées pour PubMed et WebOfScience ont été réadaptées selon le langage de requête propre à PubMed et à WebOfScience.

Sous-requête n°1:

```
((TITLE-ABS-KEY(nanoparticle) OR TITLE-ABS-KEY(nanoparticles) OR TITLE-ABS-KEY(nano-particle) OR TITLE-ABS-KEY(nano-particles) OR TITLE-ABS-KEY(nanomaterial) OR TITLE-ABS-KEY(nanomaterials) OR TITLE-ABS-KEY(nano-material) OR TITLE-ABS-KEY(nano-materials) OR TITLE-ABS-KEY(nanocrystal) OR TITLE-ABS-KEY(nanocrystals) OR TITLE-ABS-KEY(nanowire) OR TITLE-ABS-KEY(nanowires) OR TITLE-ABS-KEY(nanorod) OR TITLE-ABS-KEY(nanorods) OR TITLE-ABS-KEY(nanocomposite) OR TITLE-ABS-KEY(nanoscale) OR TITLE-ABS-KEY(nanosized) OR TITLE-ABS-KEY(nano-sized) OR TITLE-ABS-KEY(corona) OR TITLE-ABS-KEY(microparticles) OR TITLE-ABS-KEY(micro-particles) OR TITLE-ABS-KEY(microparticulates) OR TITLE-ABS-KEY(nano-object) OR TITLE-ABS-KEY(nano-objects))) AND ABS(nano*)) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE,"English "))
```

Résumé des mots-clés:

Nanoparticle, nanomaterial, nanocrystal, nanowire, nanorod, nanocomposite, quantum dot, nano-object, nano-sized, nanoscale, microparticle, micro-sized, microparticulate, corona.

Sous-requête n°2:

```
(TITLE-ABS-KEY(toxicology) OR TITLE-ABS-KEY(toxicity) OR TITLE-ABS(effect) OR TITLE-ABS(effects) OR TITLE-ABS-KEY(toxicokinetic) OR TITLE-ABS-KEY(toxicokinetics) OR TITLE-ABS-KEY(pharmacokinetic) OR TITLE-ABS-KEY(pharmacokinetics) OR TITLE-ABS-KEY(genotoxic) OR TITLE-ABS-KEY(genotoxicity) OR TITLE-ABS-KEY(reprotoxic) OR TITLE-ABS-KEY(reprotoxicity) OR TITLE-ABS-KEY(mutagenic) OR TITLE-ABS-KEY(mutagenicity) OR TITLE-ABS-KEY(carcinogenic) OR TITLE-ABS-KEY(carcinogenicity) OR TITLE-ABS-KEY(neurotoxic) OR TITLE-ABS-KEY(neurotoxicity) OR TITLE-ABS-KEY(cytotoxic) OR TITLE-ABS-KEY(cytotoxicity)) OR TITLE-ABS-KEY(immunotoxic) OR TITLE-ABS-
```

KEY(immunotoxicity) OR TITLE-ABS-KEY(ADME) OR TITLE-ABS-KEY(allergenicity) OR TITLE(characterization) OR TITLE(characterisation) OR TITLE(quantification) OR TITLE(degradation) OR TITLE(stability) OR TITLE(solubility) OR TITLE(dissolution) OR TITLE(dispersibility) OR TITLE(short-term) OR TITLE(long-term) OR TITLE(subacute) OR TITLE(acute) OR TITLE(subchronic) OR TITLE(chronic) OR TITLE(ingested) OR TITLE(oral) OR TITLE(orally-exposed) OR TITLE(oxidative stress) OR TITLE(oxidative damage) OR TITLE(absorption) OR TITLE(distribution) OR TITLE(metabolisation) OR TITLE(elimination) OR TITLE(clastogenic) OR TITLE(aneugenic) OR TITLE(epigenetic) OR TITLE(DNA damage) OR TITLE(exposure) OR TITLE(assessment) OR TITLE(impact size) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE,"English "))

Résumé des mots-clés:

Toxicology, toxicity / effect, toxikokinetic, pharmacokinetic, genotoxic, genotoxicity, reprotoxic, reprotoxicity, mutagenic, mutagenicity, DNA damage, aneugenic, clastogenic, epigenetic, carcinogenic, carcinogenicity, neurotoxic, neurotoxicity, cytotoxic, cytotoxicity, oxidative stress, immunotoxic, immunotoxicity, allergenicity, characterization, quantification, impact size, degradation, stability, dissolution, dispersibility, solubility, ADME, absorption, distribution, metabolism, excretion, ingested, oral, orally-exposed, exposure, assessment, short-term, long-term, subacute, acute, subchronic, chronic

Sous-requête n°3:

(TITLE-ABS-KEY(food) OR TITLE-ABS-KEY(food AND additive) OR TITLE-ABS-KEY(feed AND additive) OR TITLE-ABS-KEY(food AND matrix) OR TITLE-ABS-KEY(food-matrix) OR TITLE-ABS-KEY(food AND grade) OR TITLE-ABS-KEY(food-grade) OR TITLE-ABS-KEY(nutrition) OR TITLE-ABS-KEY(ingestion) OR TITLE-ABS-KEY(gastric) OR TITLE-ABS-KEY(intestinal) OR TITLE-ABS-KEY(human AND diet) OR TITLE-ABS-KEY(microbiome)) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE , "English "))

Résumé des mots-clés:

Food, food additive, feed additive, food matrix, food grade, nutrition, ingestion, gastric, intestinal, human diet, microbiota.

Sous-requête n°4:

(TITLE-ABS-KEY("E170") OR TITLE-ABS-KEY("E171") OR TITLE-ABS-KEY("E172") OR TITLE-ABS-KEY("E173") OR TITLE-ABS-KEY("E341") OR TITLE-ABS-KEY("E551") OR

TITLE-ABS-KEY("E541") OR TITLE-ABS-KEY("E554") OR TITLE-ABS-KEY("E555") OR TITLE-ABS-KEY("E174") OR TITLE-ABS-KEY("E175") TITLE-ABS-KEY("E 170") OR TITLE-ABS-KEY("E 171") OR TITLE-ABS-KEY("E 172") OR TITLE-ABS-KEY("E 173") OR TITLE-ABS-KEY("E 341") OR TITLE-ABS-KEY("E 551") OR TITLE-ABS-KEY("E 541") OR TITLE-ABS-KEY("E 554") OR TITLE-ABS-KEY("E 555") OR TITLE-ABS-KEY("E 174") OR TITLE-ABS-KEY("E 175") OR TITLE-ABS-KEY(calcium AND carbonate) OR TITLE-ABS-KEY(chalk) OR TITLE-ABS-KEY(titanium) OR TITLE-ABS-KEY(iron) OR TITLE-ABS-KEY(aluminum) OR TITLE-ABS-KEY(aluminium) OR TITLE-ABS-KEY(silver) OR TITLE-ABS-KEY(gold) OR TITLE-ABS-KEY(calcium AND phosphates) OR TITLE-ABS-KEY(monocalcium AND phosphate) OR TITLE-ABS-KEY(dicalcium AND phosphate) OR TITLE-ABS-KEY(tricalcium AND phosphate) OR TITLE-ABS-KEY(aluminosilicate) OR TITLE-ABS-KEY(silicon) OR TITLE-ABS-KEY(silica))

Résumé des mots-clés:

E170, E171, E172, E341, E551, calcium carbonate, chalk, iron, titanium, calcium phosphate, monocalcium phosphate, dicalcium phosphate, tricalcium phosphate, silicon, silica, E541, E554, E555, E174, E175, E173, aluminum, aluminium, aluminosilicate, silver, gold.

Annexe 8 : Présentation de l'interface du logiciel EndNote

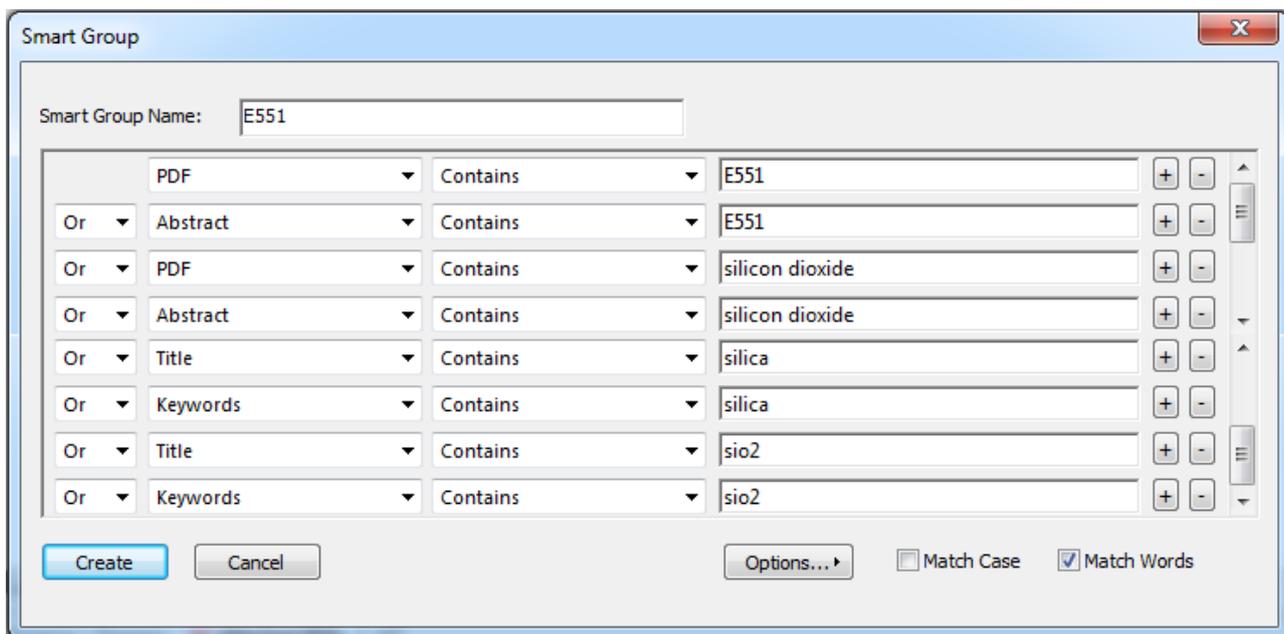
The screenshot displays the EndNote X9 interface with the following components:

- My Library:** A list of folders on the left side, including 'Immuno and allergenic effects', 'Législations nanos/additifs', 'Mécanismes d'action', 'Métrologie des nanos', 'Nanos et société', 'Occupational health', 'Paramètres influençant la tox', 'Propriétés des nanos', 'Risk assessment', 'Stabilité et solubilité', 'Tests toxicologiques', 'Toxicologie générale', 'E551 SiO2', 'Articles contenant E551', 'Articles contenant E551 que je garde', 'Articles revués par Fruijtjer 2016', 'Articles revués par Murugados 2017', 'Articles revués par Winkler 2016', 'Articles revués par Younes 2018', 'Daily intake', 'MCDA', 'Preuve Nano', 'Références intéressantes à trier', 'Somme revués + toxicologie', 'Toxicologie', 'Toxicologie - les revués', 'Toxicologie - les revués: pb forme SiO2', 'Toxicologie - les revués: pb méthodes', 'Toxicologie - les revués: réf non tox', 'Toxicologie - les revués: réf OK partout', 'Toxicologie - les revués: SiO2>100nm', 'E170(i) CaCO3', 'Preuve Nano', and 'Références à garder'.
- Reference List:** A table of references with columns for Author, Year, and Title. The selected reference is:

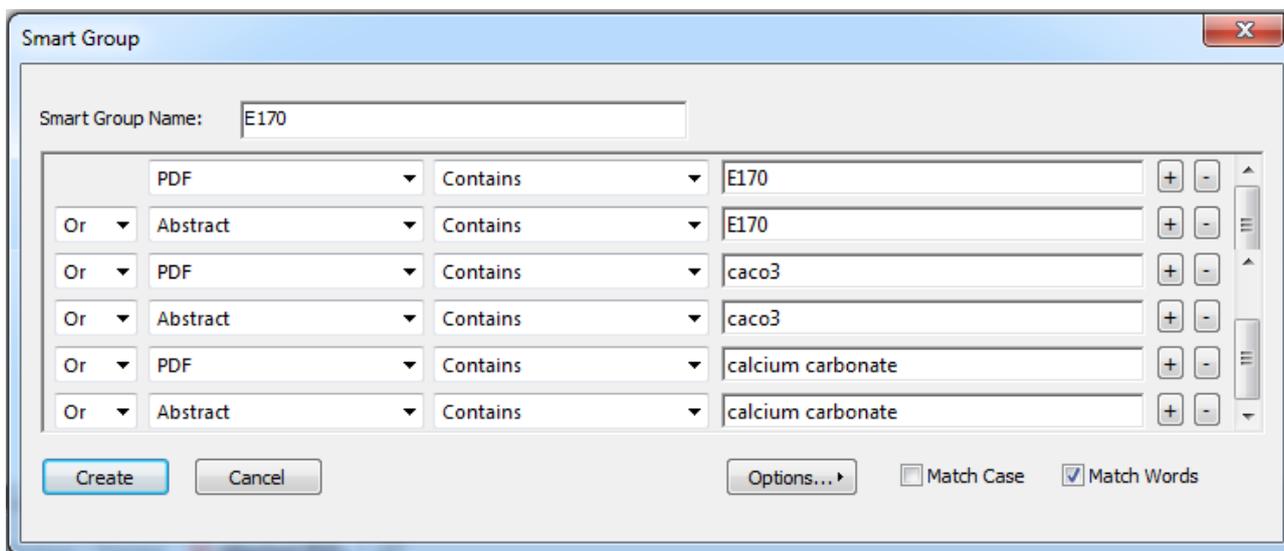
Author	Year	Title
Bouwmeester, H.; van der Zande, M.; Jepson, M. A.	2018	Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota
- Reference Preview:** A preview window showing the title 'Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota' and a 'Advanced Review' label. It includes a logo with three overlapping circles.
- Status Bar:** Shows 'Showing 1230 of 1230 references in Group. (All References: 6205)' and a 'Layout' button.

Annexe 9 : Les Smart Groups dans EndNote

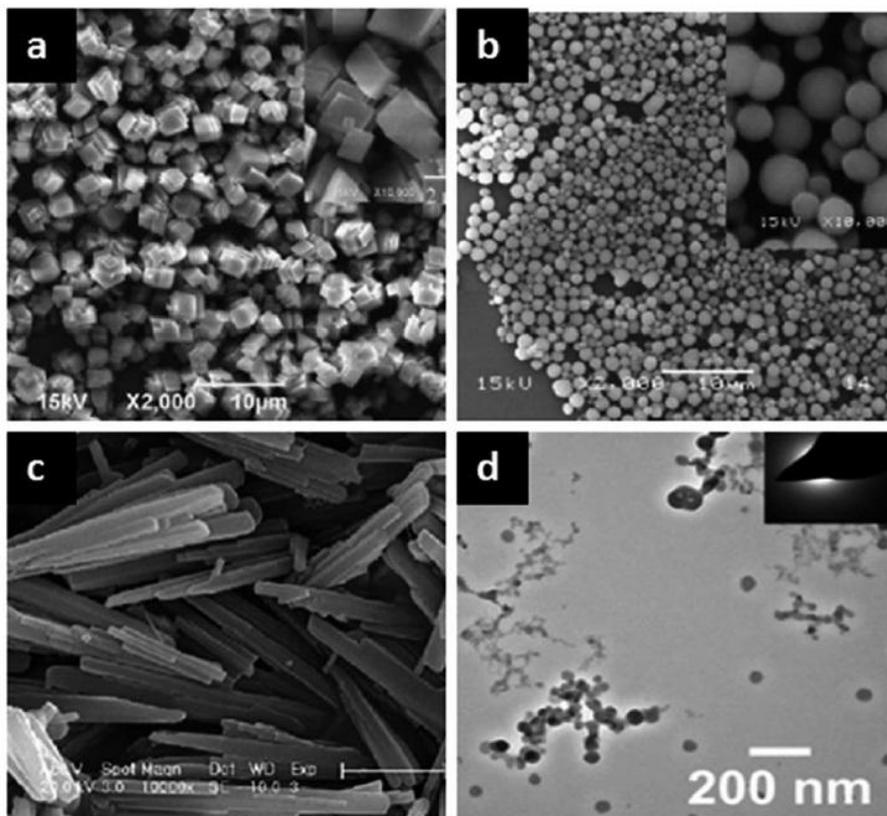
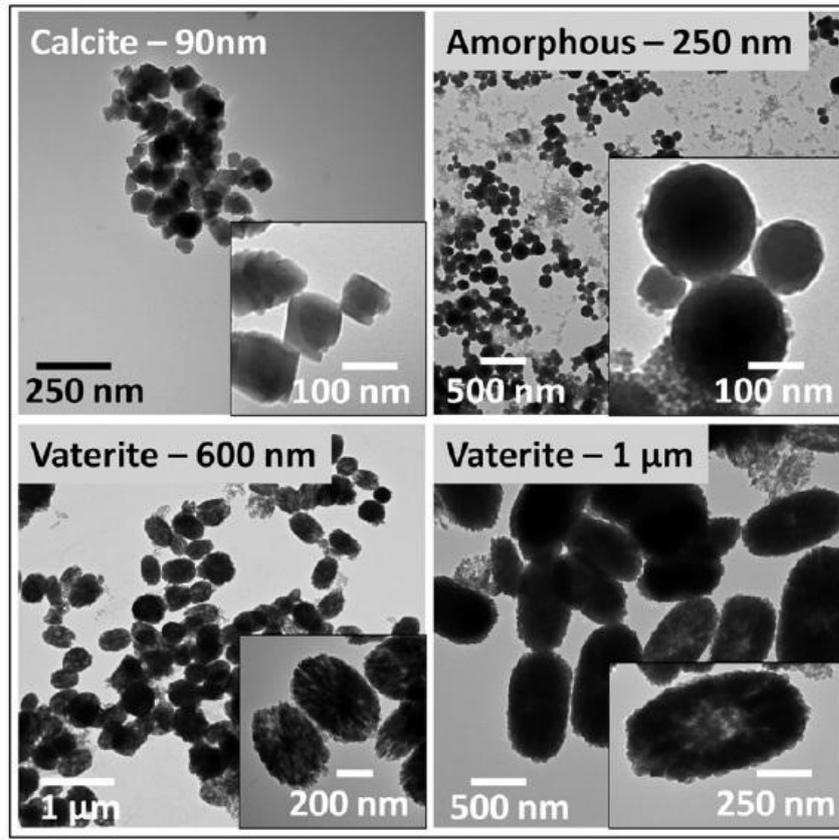
Smart Group pour le E 551/dioxyde de silicium:



Smart Group pour le E 170/carbonate de calcium:

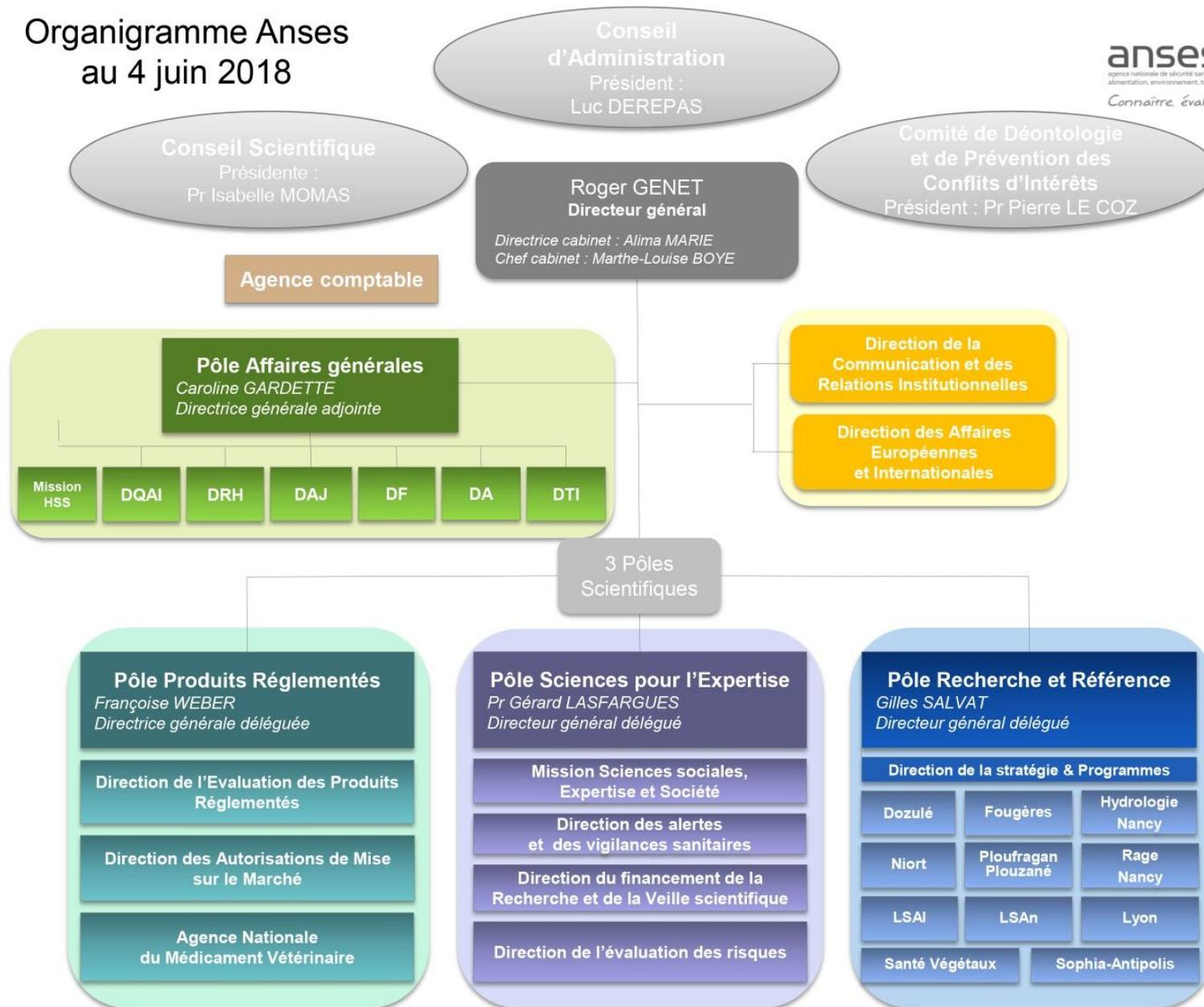


Annexe 10 Images TEM des formes cristallines et colloïdales du carbonate de calcium



Annexe 11 : Organigramme de l'Anses

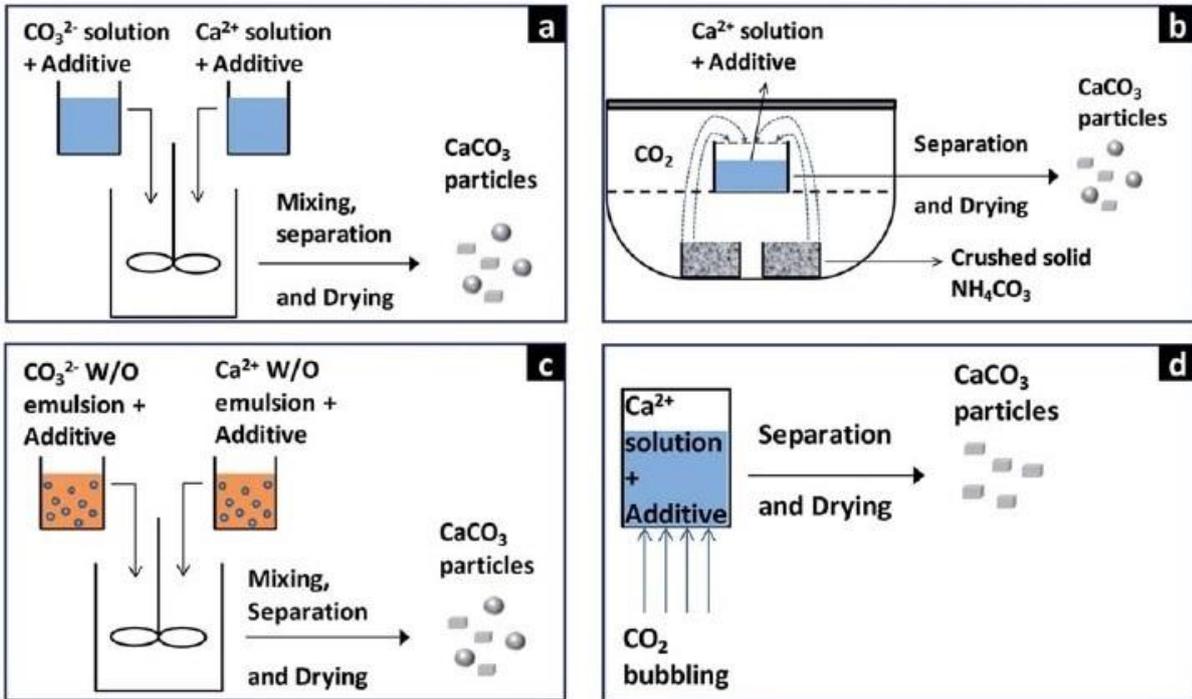
Organigramme Anses
au 4 juin 2018



Annexe 12 : Méthodes de synthèse du CaCO₃ et images TEM de ses différentes formes

Source (Boyjoo, Pareek, and Liu 2014)

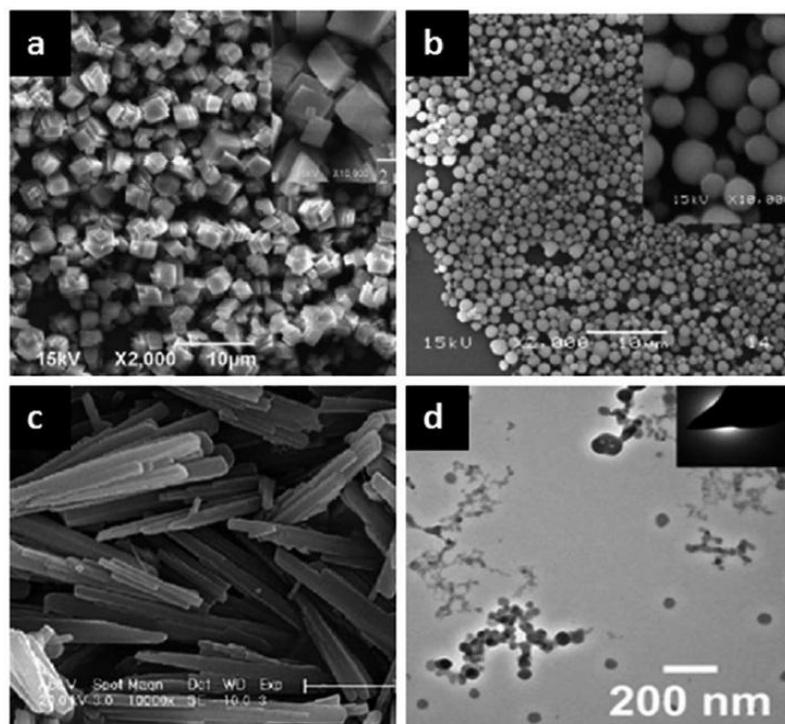
Méthodes de synthèse du CaCO₃:



a) méthode par précipitation spontanée b) méthode de la carbonatation lente c) méthode de l'émulsion inverse d) méthode par barbotage au CO₂. Les méthodes a) b) et c) sont des méthodes dites "biomimétiques"

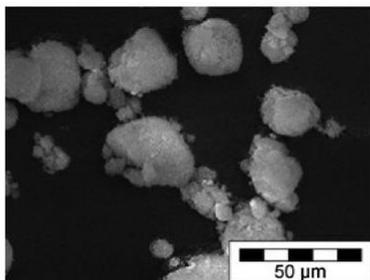
Images TEM des différentes formes de CaCO₃:

- a) Calcite
- b) Vatérite
- c) Aragonite
- d) Amorphe

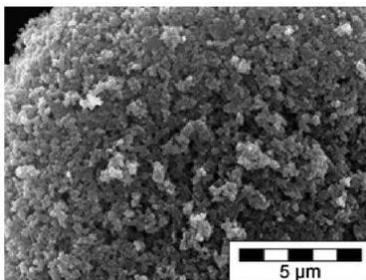


Annexe 13 : Caractérisation par TEM des différentes formes de SiO₂ NPs

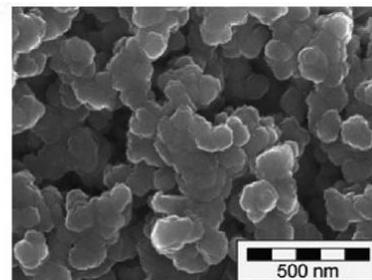
Fumed silica:



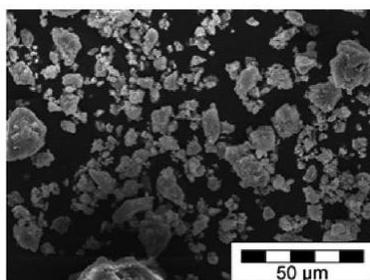
Fumed silica:



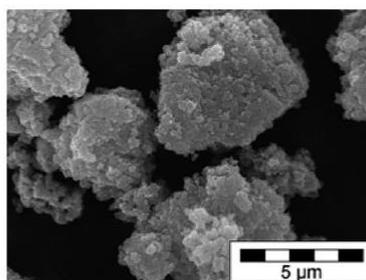
Fumed silica:



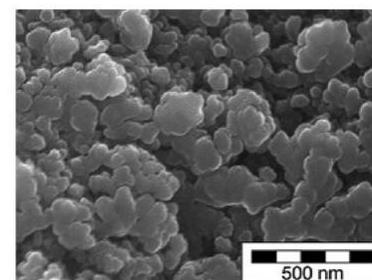
Precipitated silica:



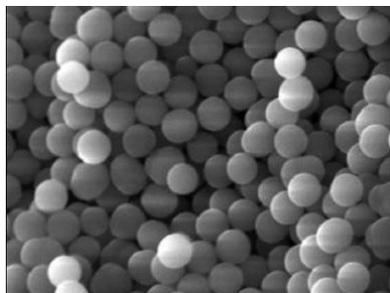
Precipitated silica:



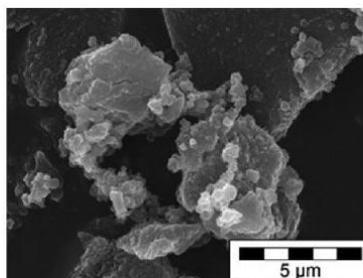
Precipitated silica:



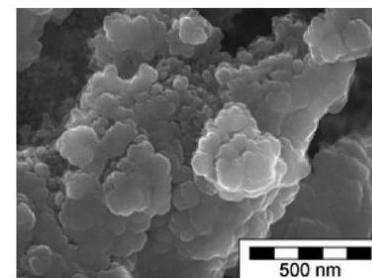
Silica sol-gel (colloidal):



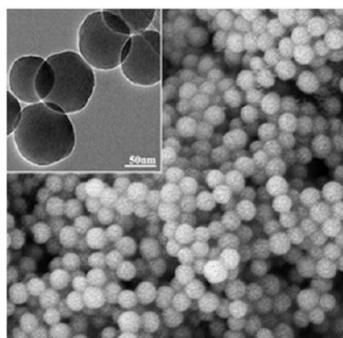
Silica gel (hydrated):



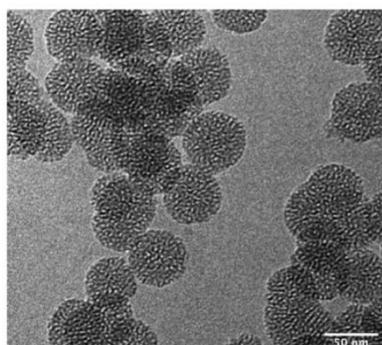
Silica gel (hydrated):



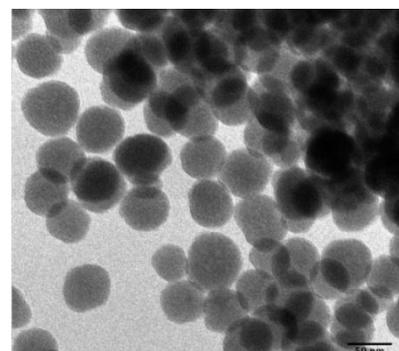
Silice colloïdale:



Silice mésoporeuse:



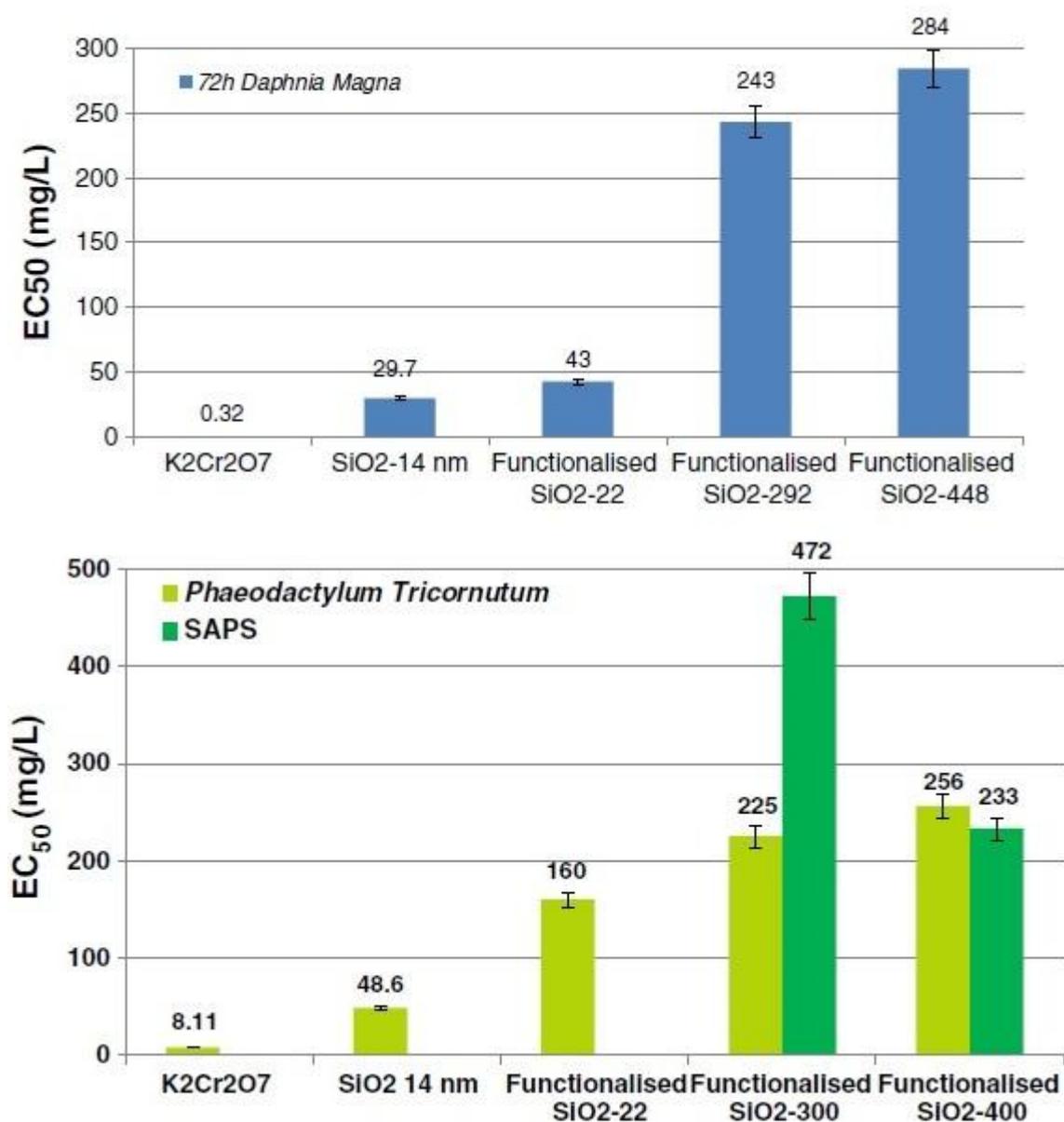
Silice Stroeber (colloïdale):



Annexe 14 : Résultats toxicologiques publiés par Clement et al.

Source: (Clement et al. 2013)

EC50 sur daphnies *daphnia magna*, algues *Chlorella vulgaris* et diatomées *Phaeodactylum tricornutum*:



Annexe 15: Résultats publiés par Gerloff et al. (2013)

Test de viabilité cellulaire: DS-particles = SiO₂-DS = Digestion Simulated particles = particules dans les conditions de digestion

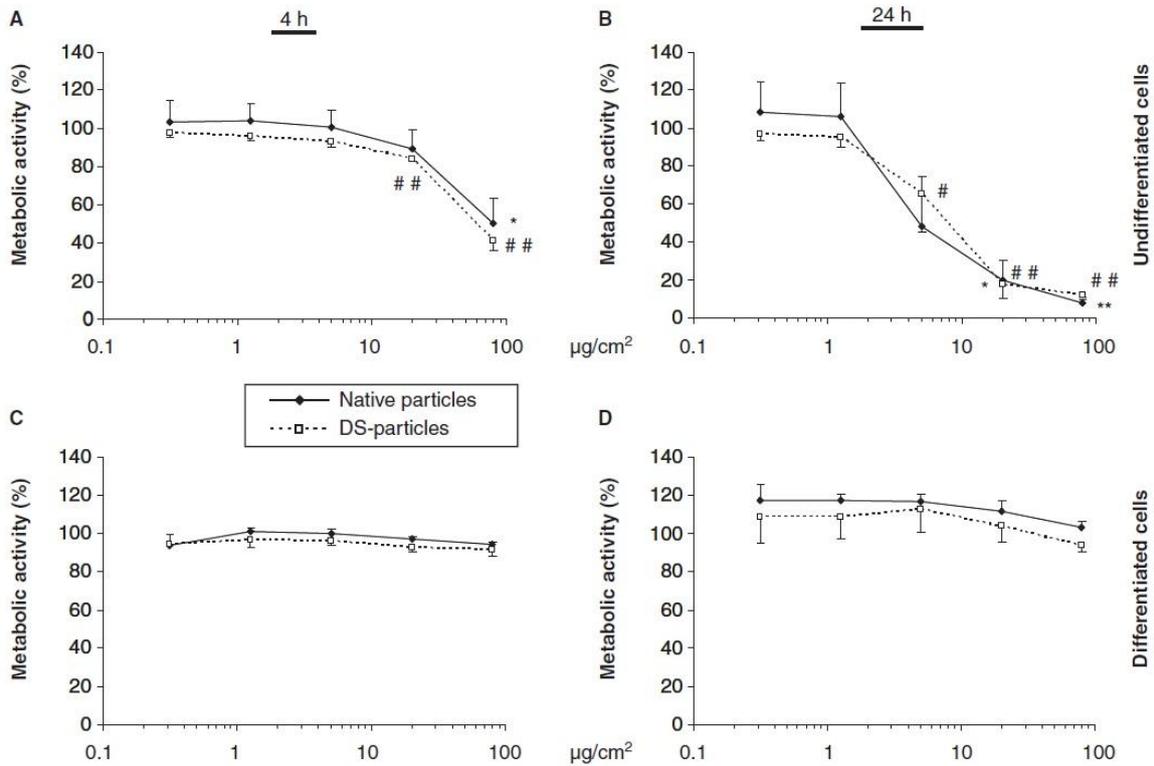


Figure 7. Effects of SiO₂ on the viability of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells. Undifferentiated (A, B) and differentiated (C, D) Caco-2 cells were incubated with 0.3125, 1.25, 5, 20 and 80 µg/cm² native or digestion-simulated SiO₂ particles for 4 (A, C) and 24 h (B, D). Metabolic competence of the cells was determined via conversion of WST-1 as a marker of cell viability. Values are expressed as mean and standard deviation, *n* = 3. **p* < 0.01 and ***p* < 0.001 versus control for native particles. #*p* < 0.01 and ##*p* < 0.001 versus control for digestion-simulated particles.

Test d'immunotoxicité: SiO₂-DS = Digestion Simulated particles

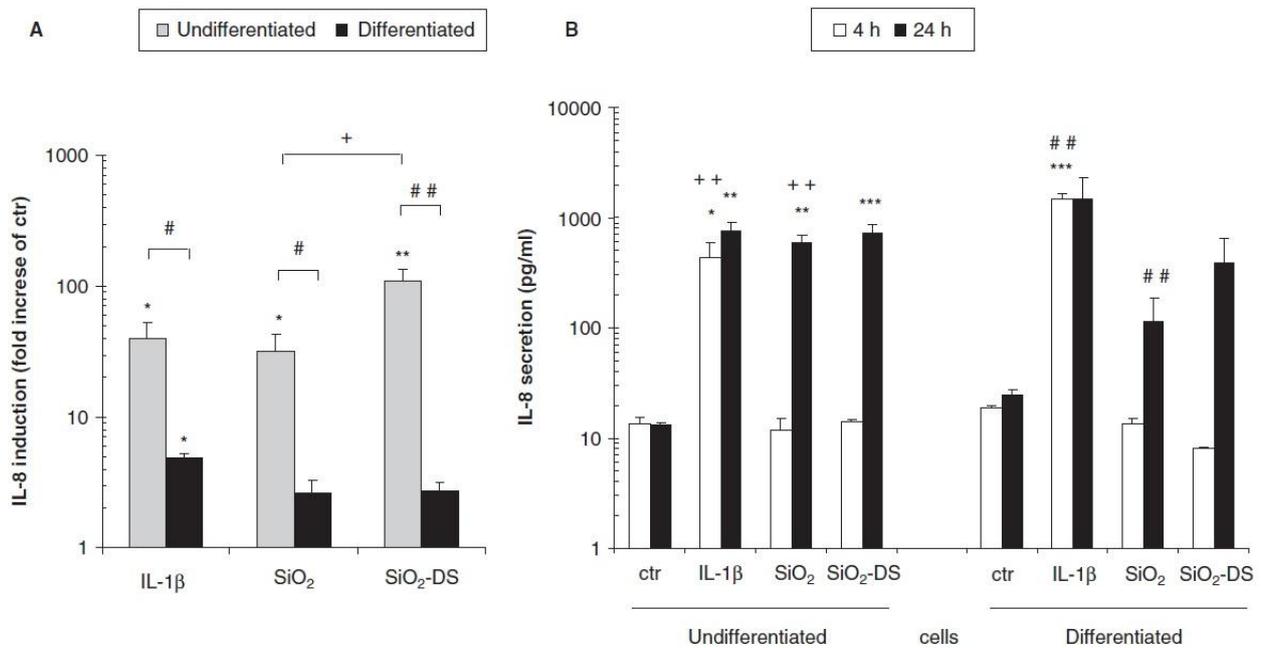
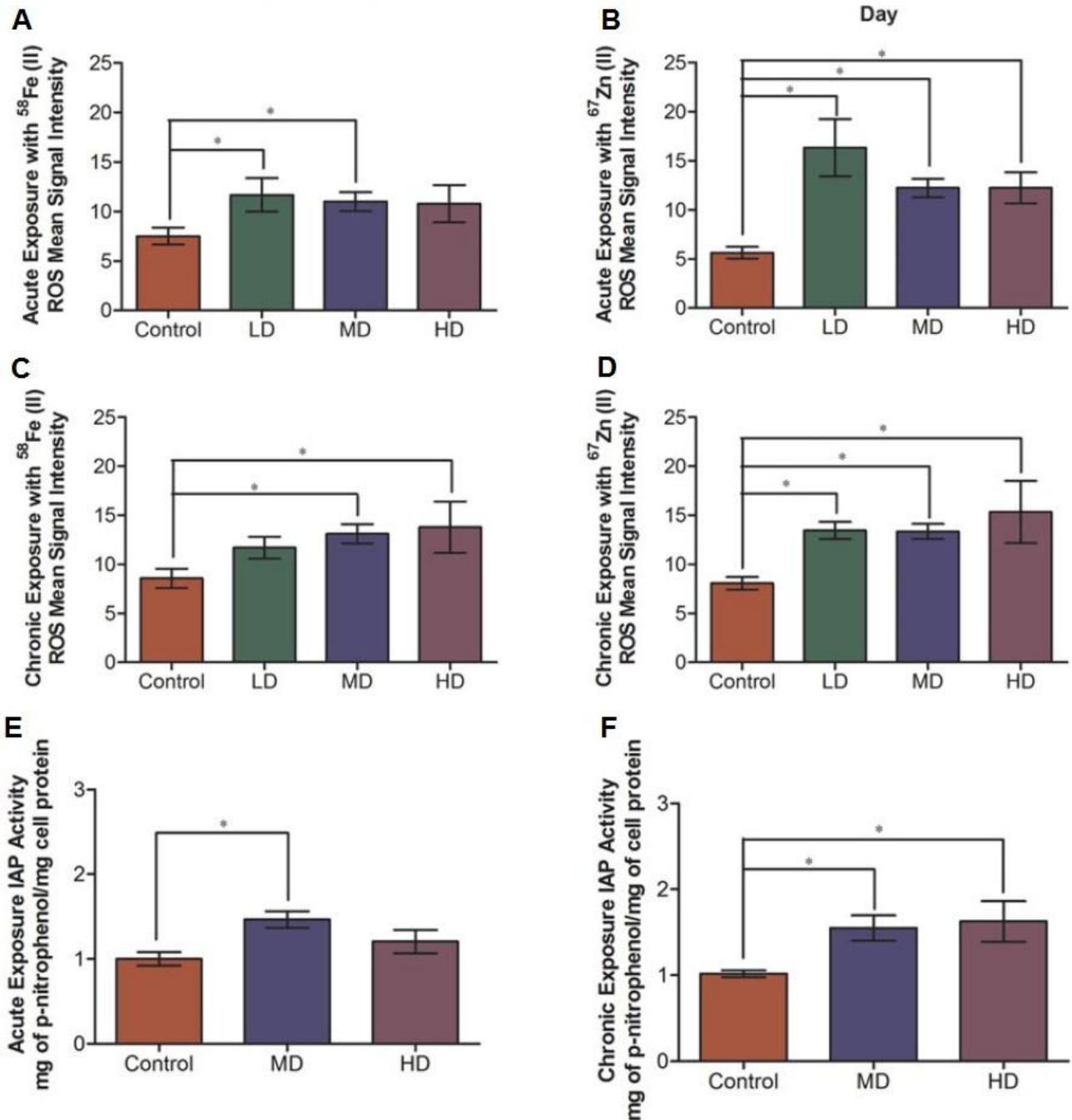


Figure 9. Effects of SiO₂ particles on IL-8 mRNA expression and protein secretion after treatment of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells. Induction of IL-8 mRNA after 4 h incubation with 20 µg/cm² native or digestion-simulated SiO₂ was determined in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells via qRT-PCR (A). The secretion of IL-8 after 4 h and 24 h incubation with 20 µg/cm² native or digestion-simulated SiO₂ was determined in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by ELISA (B). IL-1β (10 ng/ml) was used as a positive control. Values are expressed as mean and standard deviation, *n* = 3. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 versus control. +*p* < 0.05 and ++*p* < 0.01 native versus digestion-simulated particles. #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01 differentiated versus undifferentiated cells.

Source: (Guo et al. 2018)



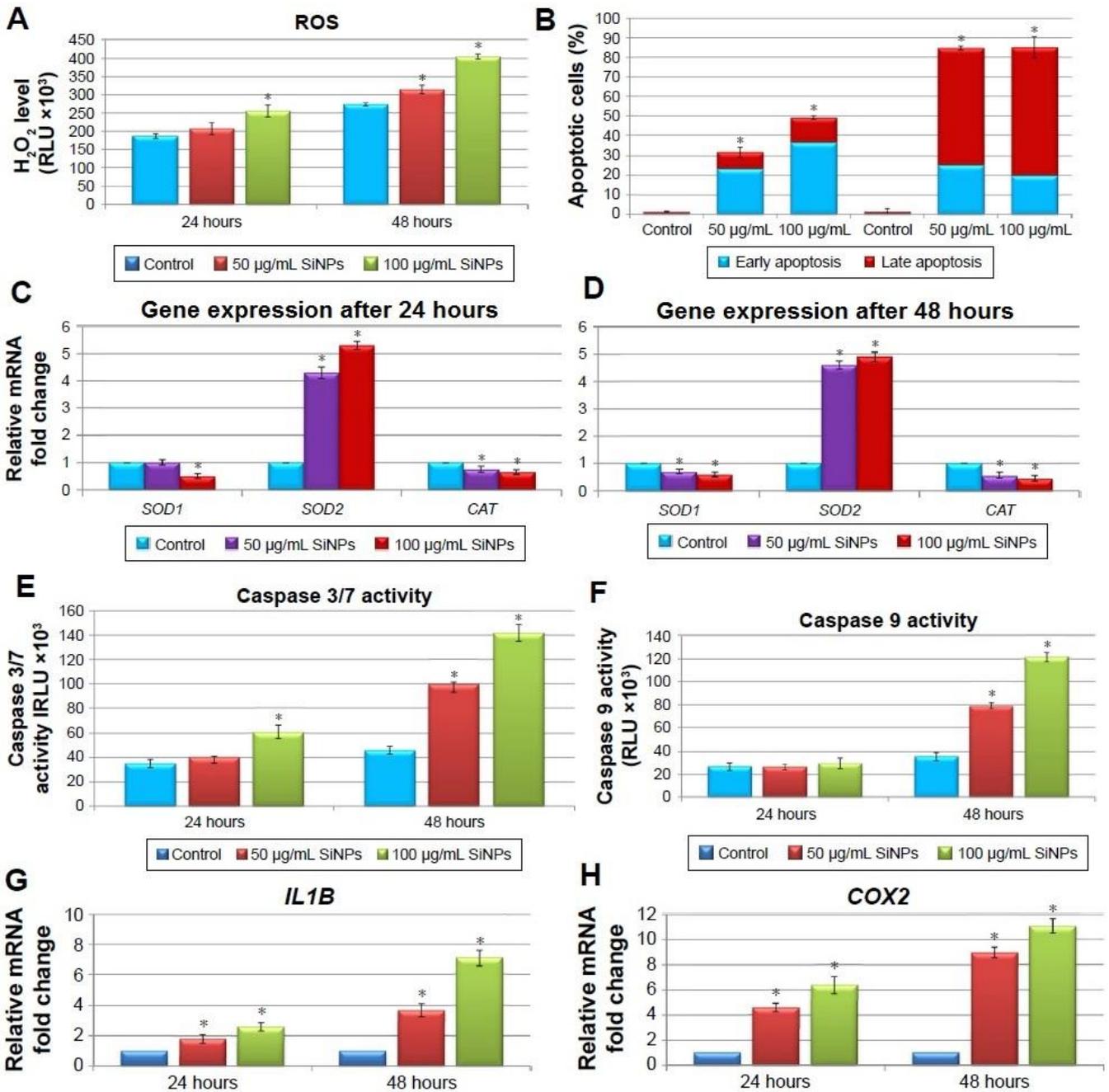
A) C) E) exposition aigüe pendant 4h, B) D) E) exposition subaigüe sur 5 jours.

A) B) C) D) génération de stress oxydant

E) F) activité alcaline phosphate

LD: faible dose, MD: moyenne dose, HD: haute dose

Source (Kusaczuk et al. 2018)



A) Stress oxydant B) Pourcentage d'apoptose C)D) Niveau d'expression des gènes médiateurs de l'inflammation après 24 et 48h d'exposition E) Activité caspase 3/7 F) Activité caspase 9 G)H) Niveau d'expression des gènes responsables de l'immunité

Annexe 18 : Résultats publiés par Li et al. (2018)

Source (Li et al. 2018)

Con = contrôle

Fru = souris ayant été

nourries avec du fructose

SiNP= souris ayant été

nourries avec des NPs

de SiO₂

Fru+SiNP= souris ayant

été nourries avec du

fructose et des NPs de

SiO₂

A) score d'inflammation
hépatique

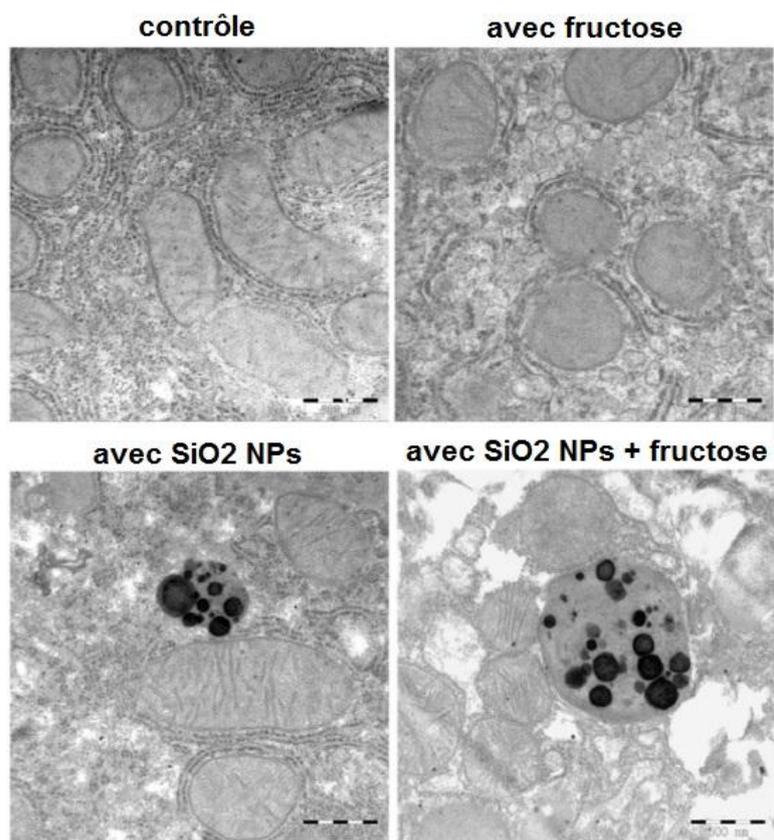
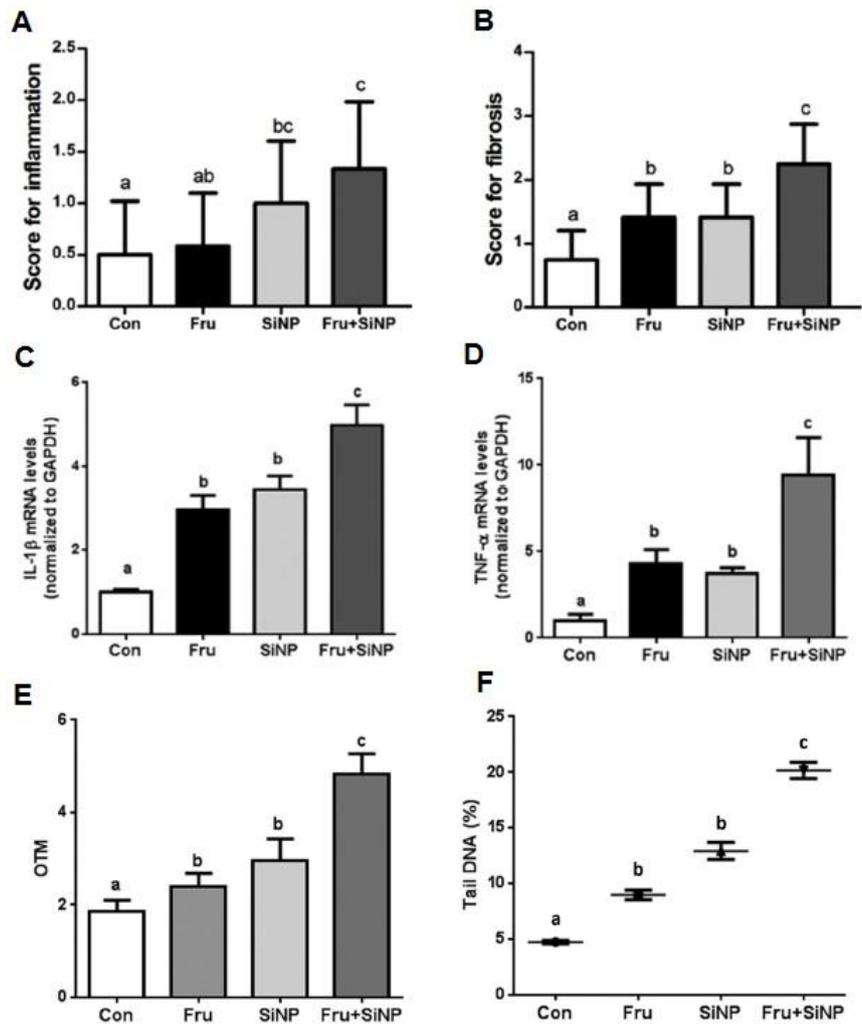
B) score de fibrose
hépatique

C) niveau d'expression
des IL-1B par les ARNm

D) niveau d'expression
des TNF-α par les ARNm

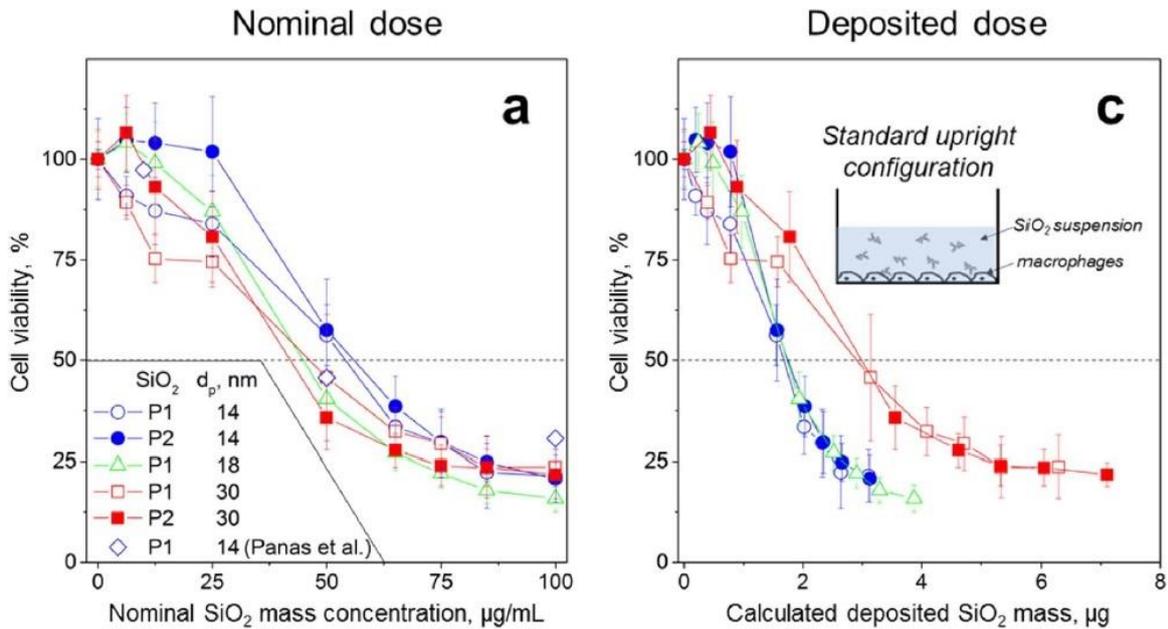
E) % d'ADN dans la
queue de comète

F) % d'ADN dans la
queue de comète par
rapport au total d'ADN



Images TEM du niveau
de NPs de SiO₂ dans le
tissu hépatique:

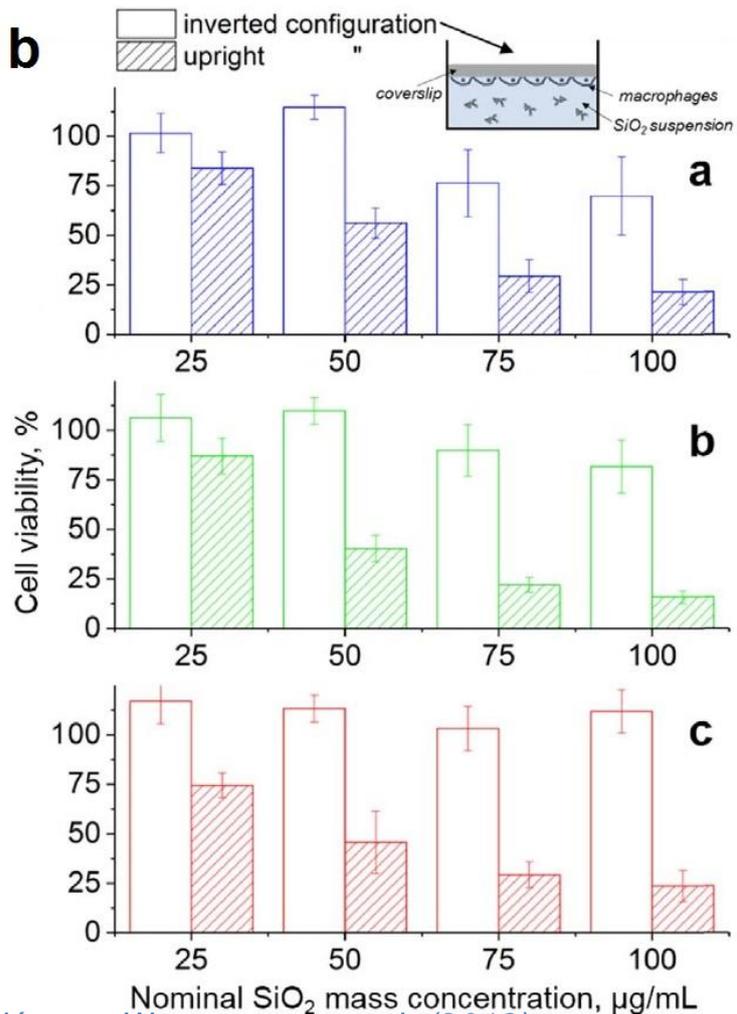
Source (Spyrogianni et al. 2017)



a) Viabilité cellulaire en fonction de la concentration en NPs déposée au départ à la surface du milieu

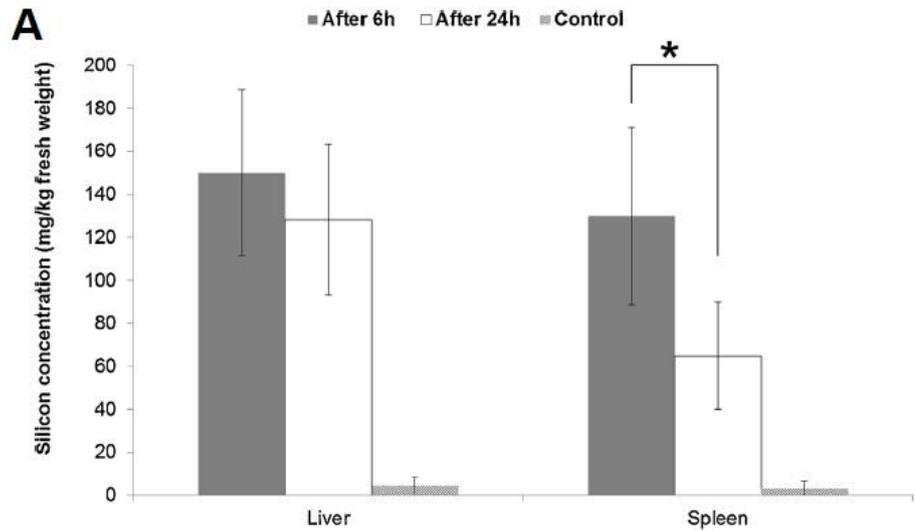
c) Viabilité cellulaire en fonction de la quantité de NPs déposée sur les macrophages

b) Viabilité cellulaire en fonction de la configuration du système. En configuration standard les grosses particules qui se déposent plus rapidement apparaissent plus toxiques qu'elles ne le sont (à niveau de dépôt égal). A l'inverse en configuration inversée les petites particules, restant plus en suspension, sont plus toxiques.

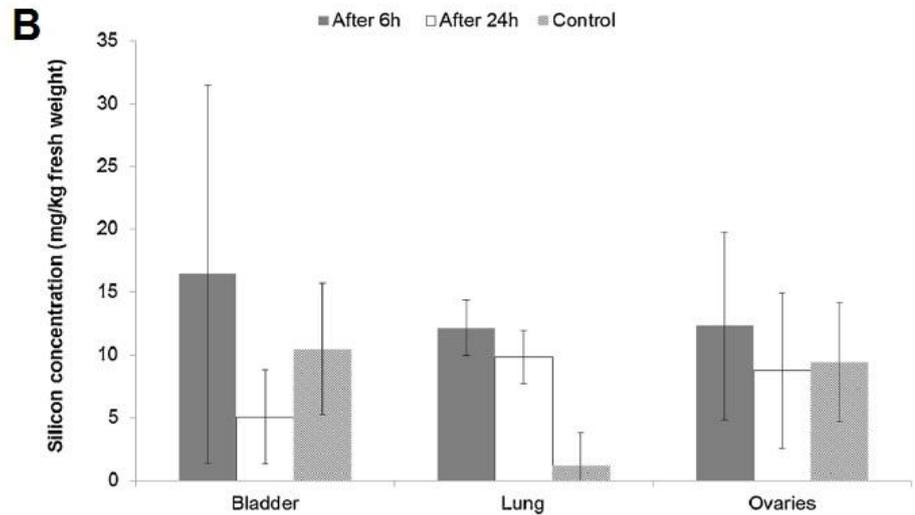


Source: (Waegeneers et al. 2018)

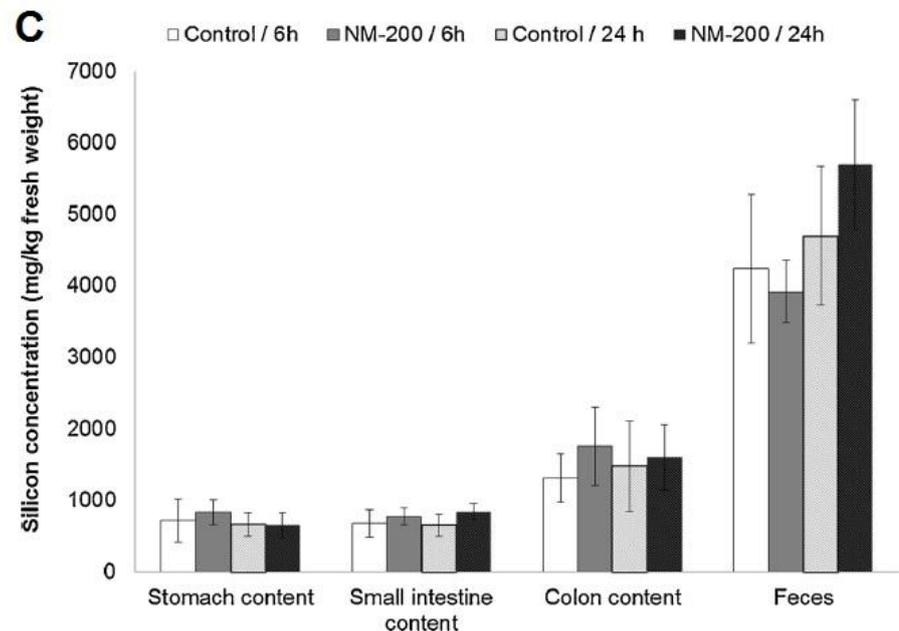
A) Concentration en SiO₂ 6h et 24h après exposition dans le foie et la rate.



B) Concentration en SiO₂ 6h et 24h après exposition dans la vessie, les poumons et les ovaires.



C) Répartition du SiO₂ dans le TGI 6h et 24h après exposition.



Annexe 21 : Interaction des nanoparticules avec la cellule

Source : (Saptarshi, Duschl, and Lopata 2013)

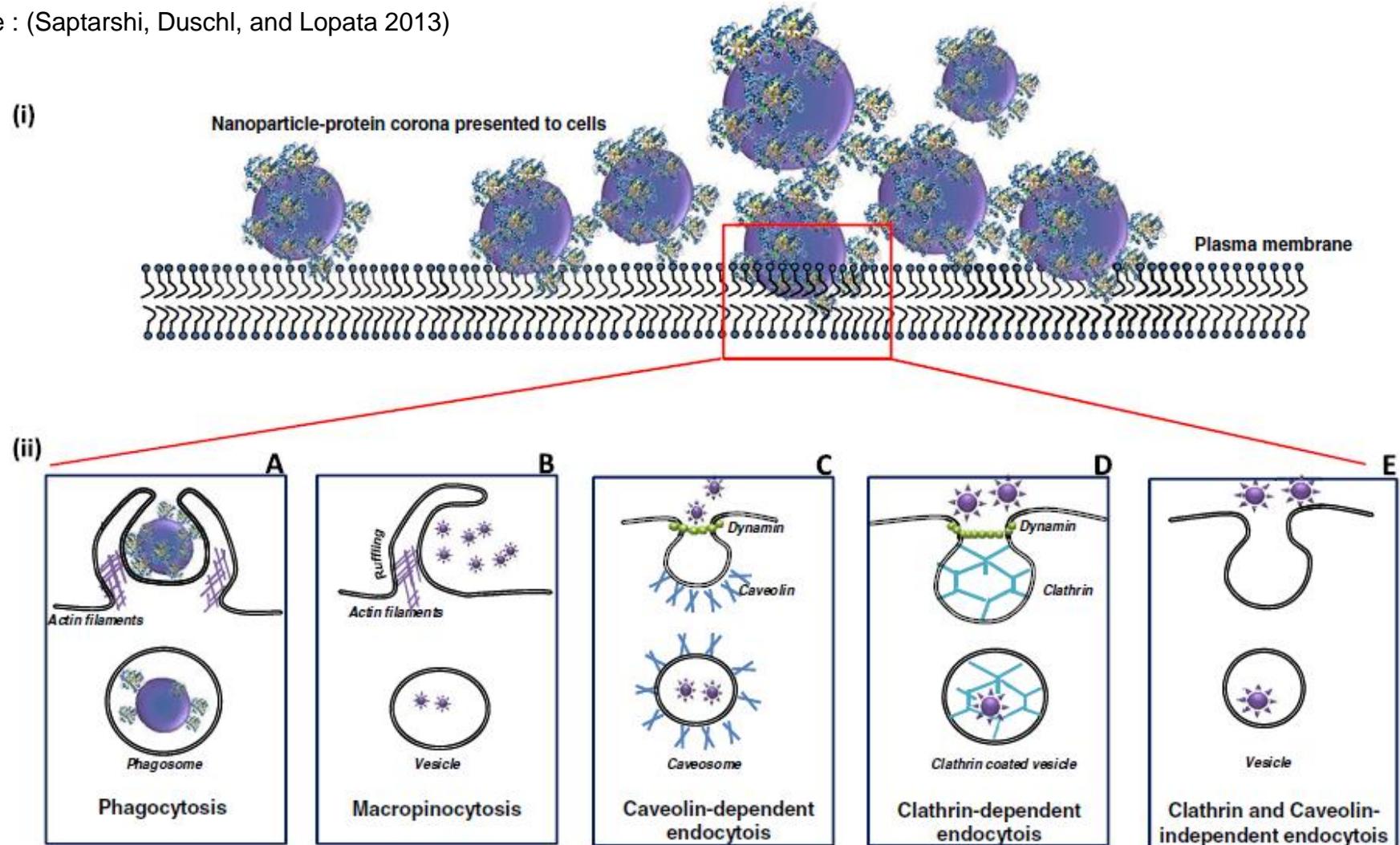


Figure 2 Interaction of nanoparticles with the cellular interface. NPs interact with cells via the protein corona. (A) Uptake of large sized NP-protein complexes, agglomerates of NP may be ingested by specialized cells such as macrophages and neutrophils via phagocytosis. It involves folding of the plasma membrane over the NP complex to form the phagosome. (B) Non-specific uptake of extracellular fluid containing aggregates of NP may also be taken up by cells via macropinocytosis which involves ruffling of the plasma membrane to form vesicles which ultimately fuse to form lysosomes. Endocytosis of NP complexes may also be directed by specific receptors involving formation of (C) caveolae that are plasma membrane indentations consisting of cholesterol binding proteins called caveolins or (D) clathrin-coated vesicles. (E) Apart from these other endocytic mechanisms, independent of clathrin or caveolae may also facilitate uptake of NP.

Bibliographie

- Afssa. 2009. "Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale." Mars 2009.
- Agir pour l'environnement. 2016. Enquête inédite révélant la présence de nanoparticules cachées dans l'alimentation.
- Aguilera, J. M. 2014. "Where is the nano in our foods?" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (41):9953-9956. doi: 10.1021/jf5016939.
- Albers, P., M. Maier, M. Reisinger, B. Hannebauer, and R. Weinand. 2015. "Physical boundaries within aggregates - Differences between amorphous, para-crystalline, and crystalline Structures." *Crystal Research and Technology* 50 (11):846-865. doi: 10.1002/crat.201500040.
- Aquilina, G., G. Azimonti, V. Bampidis, M. D. Bastos, G. Bories, A. Chesson, P. S. Cocconcelli, G. Flachowsky, J. Gropp, B. Kolar, M. Kouba, S. L. Puente, M. Lopez-Alonso, A. Mantovani, B. Mayo, F. Ramos, G. Rychen, M. Saarela, R. E. Villa, R. J. Wallace, P. Wester, and Efsa Panel Additives Prod Subst. 2016. "Safety and efficacy of iron oxide black, red and yellow for all animal species." *Efsa Journal* 14 (6):16. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4482.
- Ariano, P., P. Zamburlin, A. Gilardino, R. Mortera, B. Onida, M. Tomatis, M. Ghiazza, B. Fubini, and D. Lovisolo. 2011. "Interaction of spherical silica nanoparticles with neuronal cells: Size-dependent toxicity and perturbation of calcium homeostasis." *Small* 7 (6):766-774. doi: 10.1002/smll.201002287.
- Ariyaratna, I. R., Rmpi Rajakaruna, and D. N. Karunaratne. 2017. "The rise of inorganic nanomaterial implementation in food applications." *Food Control* 77:251-259. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.016.
- Avella, M., G. Bruno, M. E. Errico, G. Gentile, N. Piciocchi, A. Sorrentino, and M. G. Volpe. 2007. "Innovative packaging for minimally processed fruits." *Packaging Technology and Science* 20 (5):325-335. doi: 10.1002/pts.761.
- Babick, Frank, Johannes Mielke, Wendel Wohlleben, Stefan Weigel, and Vasile-Dan Hodoroaba. 2016. "How reliably can a material be classified as a nanomaterial? Available particle-sizing techniques at work." *Journal of Nanoparticle Research* 18 (6):158. doi: 10.1007/s11051-016-3461-7.
- Barahona, F., I. Ojea-Jimenez, O. Geiss, D. Gilliland, and J. Barrero-Moreno. 2016. "Multimethod approach for the detection and characterisation of food-grade synthetic amorphous silica nanoparticles." *Journal of Chromatography A* 1432:92-100. doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.058.
- Battal, D., A. Çelik, G. Güler, A. Aktaş, S. Yildirimcan, K. Ocakoglu, and Ü Çömelekoğlu. 2015. "SiO₂ Nanoparticle-induced size-dependent genotoxicity-an in vitro study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet assay." *Drug and Chemical Toxicology* 38 (2):196-204. doi: 10.3109/01480545.2014.928721.
- Behera, T., P. Swain, P. V. Rangacharulu, and M. Samanta. 2014. "Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish, *Labeo rohita* H." *Applied Nanoscience* 4 (6):687-694. doi: 10.1007/s13204-013-0251-8.
- Bettini, S., E. Boutet-Robinet, C. Cartier, C. Comera, E. Gaultier, J. Dupuy, N. Naud, S. Tache, P. Grysan, S. Reguer, N. Thieriet, M. Refregiers, D. Thiaudiere, J. P. Cravedi, M. Carriere, J. N. Audinot, F. H. Pierre, L. Guzylack-Piriou, and E. Houdeau. 2017. "Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon." *Scientific Reports* 7:13. doi: 10.1038/srep40373.

- Bitar, A., N. M. Ahmad, H. Fessi, and A. Elaissari. 2012. "Silica-based nanoparticles for biomedical applications." *Drug Discov Today* 17 (19-20):1147-54. doi: 10.1016/j.drudis.2012.06.014.
- Borm, P. J. A., D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. B. Warheit, and E. Oberdorster. 2006. "The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC." *Particle and Fibre Toxicology* 3. doi: 10.1186/1743-8977-3-11.
- Bouwmeester, Hans, S C A M Dekkers, Michelle Noordam, Werner I. Hagens, Astrid S Bulder, Cees De Heer, Sandra ten Voorde, Susan W. P. Wijnhoven, and Adriënne Sips. 2007. "Health impact of nanotechnologies in food production." RIKILT/RIVM Report 2007.014.
- Bouwmeester, Hans, Susan Dekkers, Maryvon Y. Noordam, Werner I. Hagens, Astrid S. Bulder, Cees de Heer, Sandra E. C. G. ten Voorde, Susan W. P. Wijnhoven, Hans J. P. Marvin, and Adriënne J. A. M. Sips. 2009. "Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53 (1):52-62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.10.008>.
- Boyjoo, Y., V. K. Pareek, and J. Liu. 2014. "Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications." *Journal of Materials Chemistry A* 2 (35):14270-14288. doi: 10.1039/c4ta02070g.
- Brayner, R. 2008. "The toxicological impact of nanoparticles." *Nano Today* 3 (1-2):48-55. doi: 10.1016/S1748-0132(08)70015-X.
- Cattaneo, A. G., R. Gornati, E. Sabbioni, M. Chiriva-Internati, E. Cobos, M. R. Jenkins, and G. Bernardini. 2010. "Nanotechnology and human health: Risks and benefits." *Journal of Applied Toxicology* 30 (8):730-744. doi: 10.1002/jat.1609.
- Cho, M., W. S. Cho, M. Choi, S. J. Kim, B. S. Han, S. H. Kim, H. O. Kim, Y. Y. Sheen, and J. Jeong. 2009. "The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles." *Toxicol Lett* 189 (3):177-83. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.04.017.
- Choi, J., Q. Zheng, H. E. Katz, and T. R. Guilarte. 2010. "Silica-based nanoparticle uptake and cellular response by primary microglia." *Environmental Health Perspectives* 118 (5):589-595. doi: 10.1289/ehp.0901534.
- Clement, L., A. Zenerino, C. Hurel, S. Amigoni, E. Taffin de Givenchy, F. Guittard, and N. Marmier. 2013. "Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles." *Sci Total Environ* 450-451:120-8. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.042.
- Code de l'Environnement. 2012. "Décret n°2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire pris en application de l'article L. 523-4 du code de l'environnement."
- Commission Européenne. 2011a. "Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux."
- Commission Européenne. 2011b. Règlement (UE) N°1129/2011 de la Commission du 11 novembre 2011 modifiant l'annexe II du règlement (CE) N°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en vue d'y inclure une liste de l'Union des additifs alimentaires.
- Contado, C., L. Ravani, and M. Passarella. 2013. "Size characterization by Sedimentation Field Flow Fractionation of silica particles used as food additives." *Analytica Chimica Acta* 788:183-192. doi: 10.1016/j.aca.2013.05.056.
- Croissant, Jonas G., Yevhen Fatieiev, and Niveen M. Khashab. 2017. "Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles." *Advanced Materials* 29 (9):1604634. doi: 10.1002/adma.201604634.

- de la Calle, I., M. Menta, M. Klein, and F. Seby. 2018. "Study of the presence of micro-and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques." *Food Chemistry* 266:133-145. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.107.
- Decan, N., D. Wu, A. Williams, S. Bernatchez, M. Johnston, M. Hill, and S. Halappanavar. 2016. "Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 796:8-22. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.11.011.
- Dekkers, S., P. Krystek, R. J. B. Peters, D. P. K. Lankveld, B. G. H. Bokkers, P. H. Van Hoeven-Arentzen, H. Bouwmeester, and A. G. Oomen. 2011. "Presence and risks of nanosilica in food products." *Nanotoxicology* 5 (3):393-405. doi: 10.3109/17435390.2010.519836.
- Deng, Z., Y. Zhang, J. Yue, F. Tang, and Q. Wei. 2007. "Green and orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses." *Journal of Physical Chemistry B* 111 (41):12024-12031. doi: 10.1021/jp074609z.
- Devineau, Stéphanie., Yves. Boulard, and Jean Labarre. 2013. "Protéines et nanoparticules, ça colle... ou pas." *Biofutur*, octobre 2013, 34-38.
- Diedrich, T., A. Dybowska, J. Schott, E. Valsami-Jones, and E. H. Oelkers. 2012. "The dissolution rates of SiO₂ nanoparticles as a function of particle size." *Environmental Science and Technology* 46 (9):4909-4915. doi: 10.1021/es2045053.
- Domingo, C., J. García-Carmona, E. Loste, A. Fanovich, J. Fraile, and J. Gómez-Morales. 2004. "Control of calcium carbonate morphology by precipitation in compressed and supercritical carbon dioxide media." *Journal of Crystal Growth* 271 (1-2):268-273. doi: 10.1016/j.jcrysgr.2004.07.060.
- Dwyer, J. T., K. L. Wiemer, O. Dary, C. L. Keen, J. C. King, K. B. Miller, M. A. Philbert, V. Tarasuk, C. L. Taylor, P. C. Gaine, A. B. Jarvis, and R. L. Bailey. 2015. "Fortification and health: challenges and opportunities." *Adv Nutr* 6 (1):124-31. doi: 10.3945/an.114.007443.
- Eaton, P., P. Quaresma, C. Soares, C. Neves, M. P. de Almeida, E. Pereira, and P. West. 2017. "A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles." *Ultramicroscopy* 182:179-190. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.07.001>.
- EFSA. 2009. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food on calcium silicate, silicon dioxide and silicic acid gel added for nutritional purposes to food supplements following a request from the European Commission.
- EFSA. 2011. "Scientific Opinion on re-evaluation of calcium carbonate (E 170) as a food additive." *EFSA Journal* 9 (7):2318. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2318.
- Erfanian, A., B. Rasti, and Y. Manap. 2017. "Comparing the calcium bioavailability from two types of nano-sized enriched milk using in-vivo assay." *Food Chem* 214:606-613. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.116.
- FAO/OMS. 2007. *Analyse des risques relatifs a la securite sanitaire des aliments: guide a l'usage des autorites nationales responsables de la securite sanitaire des aliments*. Rome: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- FAO/OMS. 2017. Codex Alimentarius - Norme générale pour les additifs alimentaires.
- Fruijtjer-Pölloth, C. 2016. "The safety of nanostructured synthetic amorphous silica (SAS) as a food additive (E 551)." *Archives of Toxicology* 90 (12):2885-2916. doi: 10.1007/s00204-016-1850-4.
- Gerloff, K., D. I. A. Pereira, N. Faria, A. W. Boots, J. Kolling, I. Förster, C. Albrecht, J. J. Powell, and R. P. F. Schins. 2013. "Influence of simulated gastrointestinal conditions on particle-induced cytotoxicity and interleukin-8 regulation in

- differentiated and undifferentiated Caco-2 cells." *Nanotoxicology* 7 (4):353-366. doi: 10.3109/17435390.2012.662249.
- Gogos, Alexander, Janine Moll, Florian Klingenfuss, Marcel van der Heijden, Fahmida Irin, Micah J. Green, Renato Zenobi, and Thomas D. Bucheli. 2016. "Vertical transport and plant uptake of nanoparticles in a soil mesocosm experiment." *Journal of Nanobiotechnology* 14 (1):40. doi: 10.1186/s12951-016-0191-z.
- Golmohammadi, H., E. Morales-Narváez, T. Naghdi, and A. Merkoçi. 2017. "Nanocellulose in Sensing and Biosensing." *Chemistry of Materials* 29 (13):5426-5446. doi: 10.1021/acs.chemmater.7b01170.
- Gong, J. L., Y. Liang, Y. Huang, J. W. Chen, J. H. Jiang, G. L. Shen, and R. Q. Yu. 2007. "Ag/SiO₂ core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools." *Biosensors and Bioelectronics* 22 (7):1501-1507. doi: 10.1016/j.bios.2006.07.004.
- Goudarzi, V., I. Shahabi-Ghahfarrokhi, and A. Babaei-Ghazvini. 2017. "Preparation of ecofriendly UV-protective food packaging material by starch/TiO₂ bio-nanocomposite: Characterization." *International Journal of Biological Macromolecules* 95:306-313. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.065.
- Griffin, S., M. I. Masood, M. J. Nasim, M. Sarfraz, A. P. Ebokaiwe, K. H. Schäfer, C. M. Keck, and C. Jacob. 2018. "Natural nanoparticles: A particular matter inspired by nature." *Antioxidants* 7 (1). doi: 10.3390/antiox7010003.
- Guichard, Y., C. Fontana, E. Chavinier, F. Terzetti, L. Gaté, S. Binet, and C. Darne. 2016. "Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line." *Toxicology and Industrial Health* 32 (9):1639-1650. doi: 10.1177/0748233715572562.
- Guo, Z., N. J. Martucci, Y. Liu, E. Yoo, E. Tako, and G. J. Mahler. 2018. "Silicon dioxide nanoparticle exposure affects small intestine function in an in vitro model." *Nanotoxicology*:1-24. doi: 10.1080/17435390.2018.1463407.
- Hardy, Anthony, Diane Benford, Thorhallur Halldorsson, Michael John Jeger, Helle Katrine Knutsen, Simon More, Hanspeter Naegeli, Hubert Noteborn, Colin Ockleford, Antonia Ricci, Guido Rychen, Josef R. Schlatter, Vittorio Silano, Roland Solecki, Dominique Turck, Maged Younes, Qasim Chaudhry, Francesco Cubadda, David Gott, Agnes Oomen, Stefan Weigel, Melpo Karamitrou, Reinhilde Schoonjans, and Alicja Mortensen. 2018. "Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health." *EFSA Journal* 16 (7):e05327. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5327.
- He, Q., Y. Zhang, X. Cai, and S. Wang. 2016. "Fabrication of gelatin-TiO₂ nanocomposite film and its structural, antibacterial and physical properties." *International Journal of Biological Macromolecules* 84:153-160. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.012.
- Hoet, P. H. M., I. Brüske-Hohlfeld, and O. V. Salata. 2004. "Nanoparticles - Known and unknown health risks." *Journal of Nanobiotechnology* 2. doi: 10.1186/1477-3155-2-12.
- Hoo, Christopher M., Natasha Starostin, Paul West, and Martha L. Mecartney. 2008. "A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions." *Journal of Nanoparticle Research* 10 (1):89-96. doi: 10.1007/s11051-008-9435-7.
- Huang, S., J. C. Chen, C. W. Hsu, and W. H. Chang. 2009. "Effects of nano calcium carbonate and nano calcium citrate on toxicity in ICR mice and on bone mineral density in an ovariectomized mice model." *Nanotechnology* 20 (37):375102. doi: 10.1088/0957-4484/20/37/375102.
- INRS. 2005. Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiel sur la santé.

- Khezri, K., M. Saeedi, and S. Maleki Dizaj. 2018. "Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 106:1499-1505. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.084.
- Kim, I. Y., E. Joachim, H. Choi, and K. Kim. 2015. "Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 11 (6):1407-1416. doi: 10.1016/j.nano.2015.03.004.
- Kim, M. K., J. A. Lee, M. R. Jo, M. K. Kim, H. M. Kim, J. M. Oh, N. W. Song, and S. J. Choi. 2015. "Cytotoxicity, uptake behaviors, and oral absorption of food grade calcium carbonate nanomaterials." *Nanomaterials* 5 (4):1938-1954. doi: 10.3390/nano5041938.
- Kim, Y. R., S. Y. Lee, E. J. Lee, S. H. Park, N. W. Seong, H. S. Seo, S. S. Shin, S. J. Kim, E. H. Meang, M. K. Park, M. S. Kim, C. S. Kim, S. K. Kim, S. W. Son, Y. R. Seo, B. H. Kang, B. S. Han, S. S. An, B. J. Lee, and M. K. Kim. 2014. "Toxicity of colloidal silica nanoparticles administered orally for 90 days in rats." *Int J Nanomedicine* 9 Suppl 2:67-78. doi: 10.2147/ijn.S57925.
- Kroto, H. W., J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, and R. E. Smalley. 1985. "C60: Buckminsterfullerene." *Nature* 318 (6042):162-163. doi: 10.1038/318162a0.
- Kurapati, R., and A. M. Raichur. 2013. "Composite cyclodextrin-calcium carbonate porous microparticles and modified multilayer capsules: Novel carriers for encapsulation of hydrophobic drugs." *Journal of Materials Chemistry B* 1 (25):3175-3184. doi: 10.1039/c3tb20192a.
- Kusaczuk, M., R. Krętowski, M. Naumowicz, A. Stypułkowska, and M. Cechowska-Pasko. 2018. "Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in glioblastoma cells." *International Journal of Nanomedicine* 13:2279-2294. doi: 10.2147/IJN.S158393.
- Kwon, J. Y., H. L. Kim, J. Y. Lee, Y. H. Ju, J. S. Kim, S. H. Kang, Y. R. Kim, J. K. Lee, J. Jeong, M. K. Kim, E. H. Maeng, and Y. R. Seo. 2014. "Undetectable levels of genotoxicity of SiO₂ nanoparticles in in vitro and in vivo tests." *Int J Nanomedicine* 9 Suppl 2:173-81. doi: 10.2147/ijn.S57933.
- Laborda, Francisco, Eduardo Bolea, and Javier Jiménez-Lamana. 2014. "Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis." *Analytical Chemistry* 86 (5):2270-2278. doi: 10.1021/ac402980q.
- Lauth, V., M. Maas, and K. Rezwani. 2017. "An evaluation of colloidal and crystalline properties of CaCO₃ nanoparticles for biological applications." *Materials Science and Engineering C* 78:305-314. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.037.
- Lee, J. A., M. K. Kim, H. M. Kim, J. K. Lee, J. Jeong, Y. R. Kim, J. M. Oh, and S. J. Choi. 2015. "The fate of calcium carbonate nanoparticles administered by oral route: Absorption and their interaction with biological matrices." *International Journal of Nanomedicine* 10:2273-2293. doi: 10.2147/IJN.S79403.
- Lee, J. A., M. K. Kim, J. H. Song, M. R. Jo, J. Yu, K. M. Kim, Y. R. Kim, J. M. Oh, and S. J. Choi. 2017. "Biokinetics of food additive silica nanoparticles and their interactions with food components." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 150:384-392. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.001.
- Lee, K., H. Y. Moon, C. Park, O. R. Kim, E. Ahn, S. Y. Lee, H. E. Park, S. H. Ihm, K. B. Seung, K. Chang, T. J. Yoon, C. Lee, C. Cheong, and K. S. Hong. 2009. "Magnetic resonance imaging of macrophage activity in atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice by using polyethylene glycolated magnetic fluorescent silica-coated nanoparticles." *Current Applied Physics* 9 (1 SUPPL.):S15-S18. doi: 10.1016/j.cap.2008.08.040.
- Lee, Soyoung, Hui-Suk Yun, and Sang-Hyun Kim. 2011. "The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis." *Biomaterials* 32 (35):9434-9443. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.042.

- Li, J., X. He, Y. Yang, M. Li, C. Xu, and R. Yu. 2018. "Risk assessment of silica nanoparticles on liver injury in metabolic syndrome mice induced by fructose." *Science of the Total Environment* 628-629:366-374. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.047.
- Loeschner, K., M. Correia, C. L. Chaves, I. Røkkjaer, and J. J. Sloth. 2018. "Detection and characterisation of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS." *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 35 (1):86-93. doi: 10.1080/19440049.2017.1382728.
- Lomer, M. C., C. Hutchinson, S. Volkert, S. M. Greenfield, A. Catterall, R. P. Thompson, and J. J. Powell. 2004. "Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease." *Br J Nutr* 92 (6):947-55.
- Lu, Pei-Jia, Shou-Chieh Huang, Yu-Pen Chen, Lih-Ching Chiueh, and Daniel Yang-Chih Shih. 2015. "Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics." *Journal of Food and Drug Analysis* 23 (3):587-594. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.009>.
- Lu, X., H. Zhang, Y. Ni, Q. Zhang, and J. Chen. 2008. "Porous nanosheet-based ZnO microspheres for the construction of direct electrochemical biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* 24 (1):93-98. doi: 10.1016/j.bios.2008.03.025.
- Mackevica, A., M. E. Olsson, and S. F. Hansen. 2016. "Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants." *Journal of Nanoparticle Research* 18 (1):1-11. doi: 10.1007/s11051-015-3313-x.
- Martirosyan, A., and Y. J. Schneider. 2014. "Engineered nanomaterials in food: Implications for food safety and consumer health." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (6):5720-5750. doi: 10.3390/ijerph110605720.
- Meiron, O. E., E. Bar-David, E. D. Aflalo, A. Shechter, D. Stepensky, A. Berman, and A. Sagi. 2011. "Solubility and bioavailability of stabilized amorphous calcium carbonate." *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (2):364-372. doi: 10.1002/jbmr.196.
- Mills, Andrew, Gerry Doyle, Ana M. Peiro, and James Durrant. 2006. "Demonstration of a novel, flexible, photocatalytic oxygen-scavenging polymer film." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 177 (2):328-331. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.06.001>.
- Ministère de l'environnement, de l'économie, and et de la santé. 2017. "Arrêté du 5 mai 2017 fixant les conditions d'étiquetage des nanomatériaux manufacturés dans les denrées alimentaires."
- Ministre des solidarités et de la santé. 2018. "Risques liés à la présence de nanoparticules de dioxyde de titane dans les médicaments." publiée dans le JO Sénat du 12/07/2018 - page 3493, Last Modified 12/07/2018. <https://www.senat.fr/questions/base/2018/qSEQ180404359.html>.
- Mousavi, S. Z., S. Nafisi, and H. I. Maibach. 2017. "Fullerene nanoparticle in dermatological and cosmetic applications." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 13 (3):1071-1087. doi: 10.1016/j.nano.2016.10.002.
- Mu, Qingshan, Nicole S. Hondow, Łukasz Krzemiński, Andy P. Brown, Lars J. C. Jeuken, and Michael N. Routledge. 2012. "Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles." *Particle and Fibre Toxicology* 9 (1):29. doi: 10.1186/1743-8977-9-29.
- Murugadoss, S., D. Lison, L. Godderis, S. Van Den Brule, J. Mast, F. Brassinne, N. Sebaihi, and P. H. Hoet. 2017. "Toxicology of silica nanoparticles: an update." *Archives of Toxicology* 91 (9):2967-3010. doi: 10.1007/s00204-017-1993-y.

- NANOGENOTOX, and V. Fessard. 2009. "In vivo genotoxicity of manufactured nanomaterials."
- NANOINTERACT. 2011. "Development of a platform and toolkit for understanding interactions between nanoparticles and the living world."
- NANOSAFE. 2004. "Industrial applications of nanomaterials - chances and risks."
- NANOSH. 2006. "Inflammatory and genotoxic effects of engineered nanomaterials."
- Napierska, Dorota, Leen C. J. Thomassen, Dominique Lison, Johan A. Martens, and Peter H. Hoet. 2010. "The nanosilica hazard: another variable entity." *Particle and Fibre Toxicology* 7 (1):39. doi: 10.1186/1743-8977-7-39.
- Neethirajan, Suresh, and Digvir S. Jayas. 2011. "Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries." *Food and Bioprocess Technology* 4 (1):39-47. doi: 10.1007/s11947-010-0328-2.
- Ogimoto, M., K. Suzuki, N. Haneishi, Y. Kikuchi, M. Takanashi, N. Tomioka, Y. Uematsu, and K. Monma. 2016. "Aluminium content of foods originating from aluminium-containing food additives." *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 9 (3):185-190. doi: 10.1080/19393210.2016.1158210.
- Panahi, Y., M. Farshbaf, M. Mohammadhosseini, M. Mirahadi, R. Khalilov, S. Saghfi, and A. Akbarzadeh. 2017. "Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 45 (4):788-799. doi: 10.1080/21691401.2017.1282496.
- Panea, Begoña, Guillermo Ripoll, Jaime González, Ángel Fernández-Cuello, and Pere Albertí. 2014. "Effect of nanocomposite packaging containing different proportions of ZnO and Ag on chicken breast meat quality." *Journal of Food Engineering* 123:104-112. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.029>.
- Park, H. S., J. Ahn, and H. S. Kwak. 2008. "Effect of nano-calcium-enriched milk on calcium metabolism in ovariectomized rats." *Journal of Medicinal Food* 11 (3):454-459. doi: 10.1089/jmf.2007.0086.
- Parlement Européen, and Conseil de l'Union Européenne. 2011. Règlement (UE) N°1169/2011 du Parlement Européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires.
- Parlement Européen, and Conseil de l'Union Européenne. 2015. "Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement Européen et du Conseil du 25 novembre 2015."
- Parlement Européen et du Conseil. 2018. Règlement concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), aux fins de couvrir les nanoformes des substances.
- Pérez-Esteve, É, M. Ruiz-Rico, C. De La Torre, L. A. Villaescusa, F. Sancenón, M. D. Marcos, P. Amorós, R. Martínez-Mañez, and J. M. Barat. 2016. "Encapsulation of folic acid in different silica porous supports: A comparative study." *Food Chemistry* 196:66-75. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.017.
- Peters, R., E. Kramer, A. G. Oomen, Z. E. H. Rivera, G. Oegema, P. C. Tromp, R. Fokkink, A. Rietveld, H. J. P. Marvin, S. Weigel, Aacm Peijnenburg, and H. Bouwmeester. 2012. "Presence of Nano-Sized Silica during In Vitro Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive." *Acs Nano* 6 (3):2441-2451. doi: 10.1021/nn204728k.
- Posavec, L., F. M. Hilty, J. Baumgartner, H. Buntting, M. Hilbe, M. Kruger, F. Krumeich, A. F. Grobler, and M. B. Zimmermann. 2017. "Chemical Composition, but Not Specific Surface Area, Affects Calcium Retention of Nanostructured Calcium Compounds in Growing Rats." *J Nutr* 147 (3):353-360. doi: 10.3945/jn.116.241927.
- Posavec, L., J. T. N. Knijnenburg, F. M. Hilty, F. Krumeich, S. E. Pratsinis, and M. B. Zimmermann. 2016. "Dissolution and storage stability of nanostructured calcium

- carbonates and phosphates for nutrition." *Journal of Nanoparticle Research* 18 (10). doi: 10.1007/s11051-016-3608-6.
- Rauch, J., W. Kolch, S. Laurent, and M. Mahmoudi. 2013. "Big signals from small particles: Regulation of cell signaling pathways by nanoparticles." *Chemical Reviews* 113 (5):3391-3406. doi: 10.1021/cr3002627.
- Ryu, H. J., N. W. Seong, B. J. So, H. S. Seo, J. H. Kim, J. S. Hong, M. K. Park, M. S. Kim, Y. R. Kim, K. B. Cho, M. Y. Seo, M. K. Kim, E. H. Maeng, and S. W. Son. 2014. "Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days." *Int J Nanomedicine* 9 Suppl 2:127-36. doi: 10.2147/ijn.S57929.
- Saptarshi, Shruti R., Albert Duschl, and Andreas L. Lopata. 2013. "Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle." *Journal of Nanobiotechnology* 11:26-26. doi: 10.1186/1477-3155-11-26.
- SCENIHR. 2007. "Opinion on the scientific aspects of the existing and proposed definitions relating to products of nanoscience and nanotechnologies."
- Sekhon, B. S. 2010. Food nanotechnology - an overview. In *Nanotechnology, Science and Applications*.
- Shan, D., M. Zhu, E. Han, H. Xue, and S. Cosnier. 2007. "Calcium carbonate nanoparticles: A host matrix for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor." *Biosensors and Bioelectronics* 23 (5):648-654. doi: 10.1016/j.bios.2007.07.012.
- Shi, H., R. Magaye, V. Castranova, and J. Zhao. 2013. "Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data." *Particle and Fibre Toxicology* 10 (1). doi: 10.1186/1743-8977-10-15.
- Sieg, H., C. Kastner, B. Krause, T. Meyer, A. Burel, L. Bohmert, D. Lichtenstein, H. Jungnickel, J. Tentschert, P. Laux, A. Braeuning, I. Estrela-Lopis, F. Gauffre, V. Fessard, J. Meijer, A. Luch, A. F. Thunemann, and A. Lampen. 2017. "Impact of an Artificial Digestion Procedure on Aluminum-Containing Nanomaterials." *Langmuir* 33 (40):10726-10735. doi: 10.1021/acs.langmuir.7b02729.
- Sikora, A., A. G. Shard, and C. Minelli. 2016. "Size and zeta-Potential Measurement of Silica Nanoparticles in Serum Using Tunable Resistive Pulse Sensing." *Langmuir* 32 (9):2216-24. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b04160.
- Smalley R, E. 1999. "Prepared written statement and supplemental material of R. E. Smalley." *Nanotechnology*.
- Spyrogianni, A., G. A. Sotiriou, D. Brambilla, J. C. Leroux, and S. E. Pratsinis. 2017. "The effect of settling on cytotoxicity evaluation of SiO₂ nanoparticles." *Journal of Aerosol Science* 108:56-66. doi: 10.1016/j.jaerosci.2017.02.011.
- Stone, V., H. Johnston, and M. J. D. Clift. 2007. "Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: Cellular and molecular interactions." *IEEE Transactions on Nanobioscience* 6 (4):331-340. doi: 10.1109/TNB.2007.909005.
- Sun, L., Y. Li, X. Liu, M. Jin, L. Zhang, Z. Du, C. Guo, P. Huang, and Z. Sun. 2011. "Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles." *Toxicology in Vitro* 25 (8):1619-1629. doi: 10.1016/j.tiv.2011.06.012.
- Takenaka, S., E. Karg, C. Roth, H. Schulz, A. Ziesenis, U. Heinzmann, P. Schramel, and J. Heyder. 2001. "Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats." *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4:547-51. doi: 10.1289/ehp.01109s4547.
- Tang, Li, and Jianjun Cheng. 2013. "Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application." *Nano Today* 8 (3):290-312. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.04.007>.
- Tang, X. Z., P. Kumar, S. Alavi, and K. P. Sandeep. 2012. "Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging

- Materials." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52 (5):426-442. doi: 10.1080/10408398.2010.500508.
- U.S. Food and Drug Administration. 2007. Nanotechnology Task Force.
- Verleysen, E., E. Van Doren, N. Waegeneers, P. J. De Temmerman, M. Abi Daoud Francisco, and J. Mast. 2015. "TEM and SP-ICP-MS Analysis of the Release of Silver Nanoparticles from Decoration of Pastry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (13):3570-3578. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00578.
- Vertegel, A. A., R. W. Siegel, and J. S. Dordick. 2004. "Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme." *Langmuir* 20 (16):6800-7. doi: 10.1021/la0497200.
- Viarbitskaya, S., L. Ryderfors, T. Mikaelsson, E. Mukhtar, and L. B. Å Johansson. 2011. "Luminescence enhancement from silica-coated gold nanoparticle agglomerates following multi-photon excitation." *Journal of Fluorescence* 21 (1):257-264. doi: 10.1007/s10895-010-0713-2.
- Visakh, P. M. , and M. J Martínez Morlanes. 2016. "Introduction for Nanomaterials and Nanocomposites: State of Art, New Challenges, and Opportunities." In *Nanomaterials and Nanocomposites*, 1-20.
- Waegeneers, N., A. Brasseur, E. Van Doren, S. Van der Heyden, P. J. Serreyn, L. Pussemier, J. Mast, Y. J. Schneider, A. Ruttens, and S. Roels. 2018. "Short-term biodistribution and clearance of intravenously administered silica nanoparticles." *Toxicology Reports* 5:632-638. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.05.004.
- Weir, A., P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, and N. Von Goetz. 2012. "Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products." *Environmental Science and Technology* 46 (4):2242-2250. doi: 10.1021/es204168d.
- Willhite, C. C., N. A. Karyakina, R. A. Yokel, N. Yenugadhati, T. M. Wisniewski, I. M. F. Arnold, F. Momoli, and D. Krewski. 2014. "Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts." *Critical Reviews in Toxicology* 44:1-80. doi: 10.3109/10408444.2014.934439.
- Winkler, H. C., M. Suter, and H. Naegeli. 2016. "Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food." *Journal of Nanobiotechnology* 14 (1). doi: 10.1186/s12951-016-0189-6.
- Wu, Y. Q., W. Tang, P. Wang, C. S. Liu, Y. Yuan, and J. C. Qian. 2015. "Cytotoxicity and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles in Human Cancer Cells." *Particle & Particle Systems Characterization* 32 (7):779-787. doi: 10.1002/ppsc.201400167.
- Younes, M., P. Aggett, F. Aguilar, R. Crebelli, B. Dusemund, M. Filipic, M. J. Frutos, P. Galtier, D. Gott, U. Gundert-Remy, G. G. Kuhnle, J. C. Leblanc, I. T. Lillegaard, P. Moldeus, A. Mortensen, A. Oskarsson, I. Stankovic, I. Waalkens-Berendsen, R. A. Woutersen, M. Wright, P. Boon, D. Chrysafidis, R. Gurtler, P. Mosesso, D. Parent-Massin, P. Tobback, N. Kovalkovicova, A. M. Rincon, A. Tard, C. Lambre, and Efsa Panel Food Additives Nutrien. 2018. "Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive." *Efsa Journal* 16 (1):70. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5088.
- Yu, Tian, Alexander Malugin, and Hamidreza Ghandehari. 2011. "Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity." *ACS Nano* 5 (7):5717-5728. doi: 10.1021/nn2013904.
- Zhang, B., L. Chen, J. J. Choi, B. Hennig, and M. Toborek. 2012. "Cerebrovascular toxicity of PCB153 is enhanced by binding to silica nanoparticles." *J Neuroimmune Pharmacol* 7 (4):991-1001. doi: 10.1007/s11481-012-9403-y.

- Zhang, H., J. Y. Zhang, H. L. Wang, P. J. Luo, and J. B. Zhang. 2016. "The Revision of Aluminum-containing Food Additive Provisions in China." *Biomedical and Environmental Sciences* 29 (6):461-466. doi: 10.3967/bes2016.061.
- Zhang, X., Q. Guo, and D. Cui. 2009. "Recent advances in nanotechnology applied to biosensors." *Sensors* 9 (2):1033-1053. doi: 10.3390/s90201033.
- Zheng, Y., D. Han, J. Zhai, and L. Jiang. 2008. "In situ investigation on dynamic suspending of microdroplet on lotus leaf and gradient of wetttable micro- and nanostructure from water condensation." *Applied Physics Letters* 92 (8). doi: 10.1063/1.2887899.

Résumé - Abstract

BENJAMIN LE POLLOZEC

NANOPARTICULES DANS LES ADDITIFS ALIMENTAIRES ET LEUR TOXICITÉ

La découverte de la présence de **nanoparticules** dans les aliments, par l'intermédiaire des **additifs alimentaire**, est devenu un enjeu en **sécurité sanitaire alimentaire**. Les dispositifs réglementaires, encadrant l'usage des **nanoparticules**, ne rendent pas compte de manière exhaustive de l'exposition de la population générale aux **nanoparticules**. Aussi, il est indispensable d'utiliser des méthodes analytiques adaptées pour identifier et quantifier les **nanoparticules**. De plus, une même substance chimique peut présenter diverses formes microparticulaires ou nanoparticulaires, qui ne sont pas toutes représentatives de l'**additif alimentaire** correspondant. On a donc besoin de données toxicologiques comportant une **caractérisation** précise de la substance testée. En outre, ces données révèlent une **toxicité** supérieure des **nanoparticules** (même faiblement toxiques) comparée à leurs équivalents non nanoparticulaire, ainsi qu'une toxicocinétique différente. Ces résultats renforcent le besoin de produire davantage de données toxicologiques les plus pertinentes possibles, prenant en compte les spécificités de la nano-échelle.

Mots clés: nanoparticules - additifs alimentaires - toxicité - sécurité sanitaire alimentaire - caractérisation

NANOPARTICLES IN FOOD ADDITIVES AND THEIR TOXICITY

The discovery of the presence of **nanoparticles** in food, through **food additives**, has become an issue in **food safety**. Regulations that frame the use of **nanoparticles** in food do not comprehensively report the exposure of the general population to **nanoparticles**. Also, it is essential to use suitable analytical methods to identify and quantify **nanoparticles**. In addition, the same chemical substance may have various microparticulate or nanoparticulate forms, which are not all representatives of the corresponding **food additive**. Thus, toxicological data that accurately **characterize** the substance being tested are needed. In addition, these data reveal a higher **toxicity** of **nanoparticles** (even slightly toxic) compared to their non-nanoparticulate equivalents, as well as a different toxicokinetics. These results reinforced the need for more toxicological data of high relevance, which take into account the specificities of the nanoscale.

Keywords: nanoparticles - food additives - toxicity - food safety - characterization