

**Evaluation du risque lié à l'utilisation de
l'acide 2-hydroxyéthyl picramique
dans les produits cosmétiques**

SOMMAIRE

1. CONTEXTE.....	2
2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE.....	3
3. CARACTERISATION DU DANGER : SYNTHESE DES AVIS DU CSSC	3
3.1. TOXICITE AIGUE	4
3.1.1. Voie orale.....	4
3.1.2. Voie cutanée.....	4
3.2. IRRITATION CUTANEE ET OCULAIRE	4
3.3. SENSIBILISATION	4
3.4. ABSORPTION CUTANEE.....	4
3.5. TOXICITE A DOSE REPETEE	5
3.5.1. Etude toxicité répétée sur 28 jours.....	5
3.5.2. Etude de toxicité sur 90 jours.....	5
3.6. GENOTOXICITE	6
3.7. REPROTOXICITE.....	7
3.7.1. Développement prénatal	7
3.7.2. Toxicité sur deux générations.....	7
3.8. CONCLUSIONS SUR LE DANGER.....	8
4. EXPOSITION ET EVALUATION DU RISQUE.....	8
5. CONCLUSION.....	9
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	10

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : IDENTIFICATION DE L'HEP.....	3
--	---

1. Contexte

Par lettre du 21 janvier 2009, Madame la Ministre de la Santé, de la Jeunesse et des Sports et de la Vie Associative a saisi l'Afssaps (dont les missions ont été reprises par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (Ansm) depuis le 1^{er} mai 2012) sur la part du risque attribuable aux ingrédients cosmétiques reprotoxiques et/ou perturbateurs endocriniens. Cette saisine s'inscrit dans le cadre du plan d'action « fertilité » du gouvernement. Les autres Agences ont aussi été saisies, chacune dans son domaine de compétence.

Dans ce contexte, l'Ansm a identifié plusieurs substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes, parmi lesquelles figure l'acide 2-hydroxyéthyl picramique (n°CAS 99610-72-7).

L'acide 2-hydroxyéthyl picramique (HEP) est un colorant capillaire inscrit à l'entrée 222 de l'annexe III de la directive cosmétique 76/768/CEE. Il peut être utilisé en tant que colorant d'oxydation ou en tant que colorant non oxydant pour la coloration des cheveux à une concentration de 2 %. Il est précisé à cette même entrée que lorsque l'HEP est utilisé en tant que colorant d'oxydation pour la coloration des cheveux, il peut être utilisé à une concentration de 3 % mais la teneur maximale appliquée à la chevelure ne doit pas dépasser 1,5 % après mélange dans des conditions d'oxydation.

Dans le règlement CLP (CE) n°1272/2008¹ relatif aux substances dangereuses, il est classé :

- en catégorie 1, H228, comme matière solide inflammable ;
- en catégorie 4, H302 pour la toxicité aiguë, nocif en cas d'ingestion ;
- en catégorie 2, H361f, susceptible de nuire à la fertilité.

La dernière classification (H361f) est fondée sur une proposition de l'Institut fédéral allemand pour la protection sanitaire des consommateurs et pour la médecine vétérinaire (*Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin* : BgVV, en 1993), qui repose sur les résultats d'une étude de toxicité à court-terme sur 28 jours chez le rat par voie orale (SCCP/1208/08). Dans cette étude, les rats mâles ayant reçu de l'HEP à la dose de 450 mg/kg pc./j. présentent une atrophie testiculaire.

Le Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs (CSSC) a évalué l'HEP et a rendu un premier avis en 2007 (SCCP/1058/06). Dans cet avis, le CSSC a conclu qu'il n'était pas possible de calculer une marge de sécurité au vu des données incomplètes fournies par l'Industrie cosmétique, notamment concernant le potentiel génotoxique qui ne pouvait pas être exclu. Par ailleurs, il est à noter que dans cet avis, le CSSC a conclu que bien que l'HEP soit classé CMR 2, H361f (susceptible de nuire à la fertilité) les données actuelles de reprotoxicité ne permettent pas de soutenir cette classification.

Suite à cet avis (SCCP/1058/06), l'Industrie cosmétique a fourni des données complémentaires. Ainsi, le CSSC a réévalué l'HEP et a rendu un avis en 2008 (SCCP/1208/08). Le CSSC a pu ainsi calculer des marges de sécurité pour cette substance et a conclu que l'utilisation de l'HEP ne présente pas de risque pour la santé des consommateurs :

- dans les teintures capillaires non oxydantes (temporaires ou semi-permanentes) à une concentration maximale de 2 % et ;
- dans les teintures capillaires oxydantes (ou permanentes) à une concentration maximale de 1,5 % après mélange avec le peroxyde d'hydrogène.

Par ailleurs, dans ce dernier avis, le CSSC réitère sa conclusion relative à la classification CMR 2 de l'HEP : les données actuelles de reprotoxicité ne permettent pas de soutenir cette classification.

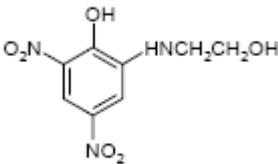
Le présent rapport a été approuvé par les membres de la commission de cosmétologie auprès de l'Ansm lors de la séance du 07 juin 2011.

¹ Règlement (CE) N° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.

2. Caractérisation physico-chimique

Le tableau 1 résume l'identification de l'HEP.

Tableau 1 : Identification de l'HEP

Nom INCI	2-Hydroxyethyl picramic acid
Numéro CAS	99610-72-7
Numéro EINECS/ELINCS	412-520-9
Noms Chemical/IUPAC ou autres	Phenol, 2-[(2-Hydroxyethyl)amino]-4,6-dinitro- (CA INDEX NAME 9CI) 2-[(2-Hydroxyethyl)amino]-4,6-dinitrophenol (IUPAC) 2-(2-hydroxy-3,5-dinitroanilino) ethanol (ECB) 1-Hydroxy-2-(β-hydroxyethyl)amino-4,6-dinitrobenzene N-(2-Hydroxyethyl) picramic acid
Fonctions	Colorant capillaire direct utilisé dans les teintures capillaires semi-permanentes à 2 % et permanentes (oxydantes) à 3 % soit 1,5 % après mélange avec le peroxyde d'hydrogène
Structure chimique	

Propriétés physico-chimiques :

Poids moléculaire : 243,17 g/mol ;

Coefficient de partition (log P_{ow}) : le coefficient de partition de l'acide 2-hydroxyéthyl picramique dépend de sa concentration dans le véhicule utilisé :

Log P_{ow} : 1,28 (pH 3,9 ; 23 ± 1°C), P_{ow} 19,23 à la concentration de 1248 mg/l solution d'octanol ;

Log P_{ow} : 1,16 (pH 3,9 ; 23 ± 1°C), P_{ow} 14,55 à la concentration de 624 mg/l solution d'octanol ;

Log P_{ow} : 1,0 (pH 3,9 ; 23 ± 1°C), P_{ow} 9,95 à la concentration de 312 mg/l solution d'octanol ;

Solubilité : eau : 157 mg/l à 20°C ; acétone/eau : < 10 g/l ; DMSO : > 100 g/l ;

Point de fusion : 134,6 - 137,1°C ;

Température d'ébullition : 141°C ;

Pression de vapeur : $2,4 \times 10^{-8}$ hPa ;

Densité : 1,58 ;

pH : 3,6 (solution aqueuse saturée, 20°C).

3. Caractérisation du danger : synthèse des avis du CSSC

Il n'existe pas, à notre connaissance, de données relatives à l'HEP dans la littérature scientifique. Ainsi, les données présentées dans ce rapport sont issues des avis rendus par le CSSC (SCCP/1058/06 et SCCP/1208/08) et donc des études fournies par l'Industrie cosmétique.

3.1. TOXICITE AIGUE

3.1.1. Voie orale

Des souris CF1 et des rats (15 mâles et 15 femelles) ont été traités par voie orale aux doses de :

- pour les mâles (rats) : 600, 800, 1000 ou 1200 mg/kg pc. ;
- pour les femelles (rats) : 800, 1000, 1200 ou 1400 mg/kg pc. ;
- pour le groupe composé de mâles et femelles (souris) : 250, 500, 750 ou 1000 mg/kg pc.

Pendant les 14 jours d'observation, certains animaux présentaient des signes d'excitation, d'accélération de la respiration et une coloration rouge des urines. La DL₅₀ a été calculée pour les mâles et les femelles à 1134 et 900 mg/kg pc., respectivement. La DL₅₀ calculée est égale à 525 mg/kg pc. pour la souris.

3.1.2. Voie cutanée

Cette étude est conforme à la ligne directrice OCDE 402. Des rats Sprague Dawley (5 mâles et 5 femelles) ont été traités par voie topique à une dose de 2000 mg/kg pc. La substance testée a été dissoute dans de l'eau distillée puis appliquée sur les animaux sous occlusion (patch) pendant 24 heures. Le patch a ensuite été ôté et la zone d'application rincée. Après une période d'observation de 14 jours, aucun signe clinique ni mortalité n'ont été observés. La DL₅₀ est donc supérieure à 2000 mg/kg pc.

3.2. IRRITATION CUTANEE ET Oculaire

L'étude d'irritation cutanée est conforme à la ligne directrice OCDE 404. Trois lapins femelles (Nouvelle-Zélande) ont été rasés sur une zone de 6 cm² (région dorso-latérale) puis exposées dans des conditions semi-occlusives durant 4 heures, à une quantité de 0,5 g de substance dissoute dans 1,5 ml d'eau. Les animaux ont été examinés 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'exposition. Aucun effet irritatif n'a été observé, l'HEP est donc considéré comme non-irritant pour la peau de lapin.

L'étude d'irritation oculaire est conforme à la ligne directrice OCDE 405. L'œil droit de trois lapins femelles (Nouvelle-Zélande) a été exposé à 0,1 ml (contenant 39, 46 ou 50 mg d'HEP), l'œil gauche servant de témoin. Les yeux des animaux ont été observés 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'exposition. Les résultats montrent une légère opacité de la cornée et une légère rougeur chez tous les animaux. Cette légère opacité était persistante 6 jours après l'exposition chez 2 animaux. L'HEP est considéré comme irritant pour l'œil de lapin dans les conditions expérimentales de l'étude.

3.3. SENSIBILISATION

Un test LLNA (*Local lymph node assay*) a été réalisé selon la ligne directrice OCDE 429. Des souris femelles CBA/J (5 animaux/groupe) ont été traitées par de l'HEP dissous dans du DMSO, aux concentrations de 0,5 %, 1,5 %, 5 % et 10 %.

Aucun signe clinique ni mortalité, n'ont été observés durant l'étude. Les résultats sont exprimés en indice de stimulation (IS) qui correspond à la stimulation nécessaire pour induire la prolifération des lymphocytes T. Ainsi, si la valeur de l'IS des animaux traités est supérieure ou égale à 3 (*versus* les animaux témoins pour lesquels l'IS est égal à 1), la substance est considérée comme sensibilisante. Les moyennes des IS obtenus pour les animaux traités par de l'HEP dissous dans du DMSO, sont respectivement de 1,1 ; 1,1 ; 2,6 et 2,8 pour les 4 concentrations testées de 0,5 %, 1,5 %, 5 % et 10 %. Les animaux traités par de la para-phénylènediamine (PPD) à 1 %, utilisés en tant que témoin positif, ont montré une moyenne du SI égale à 7. Ainsi, l'HEP n'a pas été considéré comme sensibilisant par le CSSC, dans les conditions expérimentales de l'étude.

3.4. ABSORPTION CUTANEE

Deux études d'absorption cutanée ont été réalisées : une étude sans peroxyde d'hydrogène, avec une crème contenant 2 % d'HEP et une étude avec une crème à 3 % d'HEP mélangé extemporanément avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 12 % (proportion 1:1).

Etude dans des conditions non-oxydatives :

Cette étude a été menée selon la ligne directrice OCDE 428. Une quantité de 20 µl/cm² est appliquée sur l'oreille de porc. Le fluide récepteur a été fractionné à 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 24 et 72 h après l'application. Le dosage a été effectué par HPLC (*High-performance liquid chromatography*).

Les résultats rapportés montrent un écart-type élevé (écart-type = 3,96) pour l'absorption dans le derme, la valeur la plus forte dans la gamme a donc été retenue soit 13,85 µg/cm².

La moyenne + 2 écart-types peut aussi être utilisée.

Etude dans des conditions oxydantes :

Cette étude a été menée selon la ligne directrice OCDE 428 sur l'oreille de porc. Le même protocole que dans l'étude précédente a été utilisé. Comme précédemment, les résultats rapportés montrent un écart-type élevé (écart-type = 3,18) pour l'absorption dans le derme, la valeur la plus forte dans la gamme a donc été retenue soit 11,38 µg/cm².

La moyenne + 2 écart-types peut aussi être utilisée.

3.5. TOXICITE A DOSE REPETEE

3.5.1. Etude toxicité répétée sur 28 jours

Cette étude a été conduite selon la ligne directrice OCDE 407 mais dans sa version de 1981 (la version actuelle de 2008 inclut l'étude d'autres paramètres, notamment ceux capables de détecter l'activité endocrinienne des substances d'essai). Des rats Wistar (10 animaux par groupe) ont été traités par de l'HEP dissous dans 0,5 % de carboxyméthylcellulose durant 28 jours par gavage à des doses de 50, 150 et 450 mg/kg pc./j. Le groupe contrôle n'a reçu que la solution de carboxyméthylcellulose. Par ailleurs, deux groupes (un traité à la forte dose et un groupe contrôle) ont été constitués et observés durant une période de réversibilité de 15 jours. Les signes cliniques et la mortalité ont été observés, de même les poids corporels et la consommation de nourriture ont été mesurés. Un examen ophtalmologique a été réalisé avant et après l'exposition à la substance d'intérêt. Des échantillons sanguins ont été prélevés afin de mesurer les paramètres hématologiques et biochimiques. Par ailleurs, des prélèvements urinaires ont également été effectués. Enfin, un examen histopathologique a été réalisé sur quatre organes (non précisés) et des échantillons urinaires ont été analysés.

Trois animaux sont morts dont deux animaux pendant la période de réversibilité et 1 animal traité à 150 mg/kg pc./j. ; cette mortalité étant due, selon le directeur de l'étude, aux différents prélèvements. Les taux d'acide urique et de glucose ont nettement diminué pour le groupe traité à la plus forte dose (ces effets ont disparu après la période de réversibilité). Une coloration des urines a été observée pour tous les groupes traités, indiquant une exposition systémique. Lors de l'autopsie, tous les animaux traités ont présenté une coloration rouge brique de la fourrure et de la peau. Une augmentation absolue et relative statistiquement significative du poids des surrénales et des reins a été observée chez les animaux traités à la plus forte dose. Une diminution du poids des testicules a été observée chez 3 animaux sur 5 traités à 450 mg/kg pc./j. et chez 2 animaux sur 5 du groupe réversibilité traités à 450 mg/kg pc./j. Enfin, l'analyse histopathologique a révélé une atrophie testiculaire chez les mâles traités à 450 mg/kg pc./j. et une prolifération du conduit biliaire hépatique pour les groupes traités à 150 mg/kg pc./j. et 450 mg/kg pc./j.

Par conséquent la NOAEL est de 50 mg/kg pc./j.

Remarque : cette étude de l'Institut fédéral allemand pour la protection sanitaire des consommateurs et pour la médecine vétérinaire (BgVV) a fondé la classification européenne de l'HEP (H361 : susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus) en raison de l'atrophie testiculaire observée chez les mâles traités à 450 mg/kg pc./j.

3.5.2. Etude de toxicité sur 90 jours

Cette étude suit la ligne directrice OCDE 408. Des rats Wistar (15 animaux par sexe et groupe) ont été traités par de l'HEP dissous dans de l'eau déionisée durant 90 jours (5 jours par semaine) par voie orale à des doses de 20, 60 et 180 mg/kg pc./j. (puis à une dose de 120 mg/kg pc./j. à partir de la 2^{ème} semaine de traitement du fait de problème d'insolubilité). Pour la réversibilité, un groupe satellite (15 animaux par sexe) traité à la plus forte dose et un groupe satellite contrôle (5 animaux par sexe) ont été observés durant les 4 semaines suivant l'étude. Les signes cliniques et la mortalité ont été

observés, de même les poids corporels et la consommation de nourriture ont été mesurés. Un examen ophtalmologique a été réalisé avant et après l'exposition à la substance d'intérêt. Des échantillons sanguins ont été prélevés afin de mesurer les paramètres hématologiques et biochimiques. Par ailleurs, des prélèvements urinaires ont également été effectués. Enfin, un examen histopathologique a été réalisé sur certains organes (surrénales, cerveau, cœur, reins, foie, rate, testicules et utérus) et des échantillons urinaires ont été analysés.

Aucune mortalité, ni signe clinique n'ont été observés mise à part la coloration des urines pour tous les animaux traités la semaine 3. L'examen ophtalmologique n'a pas révélé de différence entre les groupes traités et le groupe contrôle. La consommation de nourriture et d'eau de même que les gains de poids n'ont pas été affectés. Par ailleurs, aucune variation dans les paramètres urinaires et sanguins n'a été observée. L'examen histopathologique a révélé une prolifération des cellules épithéliales thyroïdiennes chez les mâles et des protéines cylindriques dans les reins ont été observées, chez les animaux des deux sexes traités à la dose de 60 mg/kg pc./j. Ainsi, la NOAEL retenue est de 20 mg/kg pc./j.

Une autre étude de toxicité à dose répétée est présente dans les avis du CSSC (SCCP/1058/06 et SCCP/1208/08). Néanmoins, cette étude n'est pas conforme aux lignes directrices OCDE et seule une dose a été utilisée (15 mg/kg pc./j.). Il est toutefois à noter qu'aucun effet toxique n'a été noté pour les animaux traités à cette dose.

3.6. GENOTOXICITE

Une batterie complète de tests de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* a été réalisée.

- **Test d'Ames (OCDE 471)** : l'HEP induit une augmentation concentration dépendante du nombre de révertants avec et sans activation métabolique dans toutes les souches bactériennes testées, à partir d'une concentration supérieure ou égale à 16 µg/plaque. L'HEP est donc considéré comme mutagène dans le test d'Ames.
- **Test de mutation génique sur lymphome de souris sur le locus tk (OCDE 476)** : en présence et en l'absence d'activation métabolique, l'HEP induit une augmentation significative du nombre de mutants. Par ailleurs, une augmentation statistiquement significative du nombre de petites colonies est observée suggérant ainsi l'induction d'aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères *in vitro*. Par conséquent l'HEP est considéré comme mutagène et/ou clastogène dans les cellules de mammifères *in vitro* en présence et en l'absence d'activation métabolique.
- **Test de micronoyaux *in vivo* chez la souris (OCDE 474)** : aucune augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux n'a été observée pour tous les groupes traités par l'HEP. Ainsi, l'HEP est considéré comme non clastogène/aneugène chez la souris.
- **Test des comètes *in vivo* chez le rat (test non validé par l'OCDE)** : les résultats rapportés pour la longueur de la queue de l'ADN (*DNA tail length*) des groupes traités, dans le foie, l'estomac et la vessie ne sont pas statistiquement différents des résultats rapportés pour le groupe témoin négatif. Ainsi, l'HEP peut être considéré comme non génotoxique dans le foie, l'estomac et la vessie de rat après administration orale. Néanmoins, comme le précise le CSSC, le paramètre à utiliser pour interpréter les résultats d'un test des comètes correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% *tail DNA*), ce paramètre étant reproductible d'une expérience à l'autre. Or si ce paramètre est utilisé pour interpréter les résultats de cette étude, l'HEP est positif dans la vessie de manière dose dépendante.

Le CSSC a donc demandé à l'Industrie cosmétique une explication sur les résultats ambigus rapportés dans le test des comètes. Il est à noter qu'en raison de ces résultats ambigus, le CSSC a rendu un avis défavorable en 2007 (SCCP/1058/06).

Ainsi, dans sa deuxième soumission (SCCP/1208/08), l'Industrie cosmétique a fourni les preuves que les résultats rapportés pour la longueur de la queue de l'ADN étaient dans la limite des valeurs des témoins négatifs historiques du laboratoire. Le CSSC a conclu donc que l'HEP était non génotoxique dans le foie, l'estomac et la vessie des rats.

- **Test de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) *in vivo* chez le rat (OCDE 486) :** l'HEP n'induit pas de synthèse non programmée de l'ADN dans les hépatocytes des rats traités *versus* le groupe témoin négatif.

3.7. REPROTOXICITE

3.7.1. Développement prénatal

Cette étude est conforme à la ligne directrice OCDE 414. Des femelles rats Sprague Dawley gestantes (24 femelles par dose) ont été exposées à de l'HEP dilué dans 0,5 % de carboxyméthylcellulose du jour 6 au jour 19 de la gestation. Trois groupes d'animaux ont été traités par de l'HEP aux doses de 50, 150 et 450 mg/kg pc./j. *versus* un groupe témoin d'animaux. Les signes cliniques ont été observés pendant la totalité de l'exposition, de même le poids corporel et la consommation de nourriture ont été mesurés.

Au jour 20 de la gestation, les animaux ont été sacrifiés et un examen macroscopique a été réalisé. Les ovaires et les utérus ont été prélevés ; la présence de sites de résorption et les fœtus ont été examinés. Chaque fœtus a été pesé et examiné pour les malformations externes visibles. Un examen du squelette et des viscères a également été réalisé sur les fœtus. Le poids des placentas et des utérus ont été notés.

Pour les groupes traités à 150 et 450 mg/kg pc./j., l'HEP provoque une toxicité maternelle caractérisée par une diminution du poids corporel du jour 12 au jour 20 de la gestation. Une diminution de la consommation de la nourriture a également été rapportée. Le poids des utérus gravides était diminué dans le groupe traité à 450 mg/kg pc./j. par rapport au groupe contrôle.

Une augmentation des hémorragies abdominales des fœtus a été notée pour les groupes traités à 150 et 450 mg/kg pc./j. Enfin, un retard de développement des fœtus a été rapporté pour le groupe traité à la plus forte dose.

Par conséquent, la NOAEL de la toxicité maternelle et fœto-embryonnaire est de 50 mg/kg pc./j.

3.7.2. Toxicité sur deux générations

Cette étude est conforme à la ligne directrice OCDE 416.

Une étude préliminaire a été conduite chez des rats Wistar traités par gavage avec des doses de 0, 50, 150 et 450 mg/kg pc./j. Des diminutions de la consommation de nourriture, du nombre d'implantations et du nombre de portées pour les animaux traités à 150 mg/kg pc./j. ont été rapportées. Pour les animaux traités à 450 mg/kg pc./j., des effets toxiques systémiques et reprotoxiques ont été rapportés tels que : un allongement du temps pré-coïtal, une absence d'implantation, une réduction de la consommation de la nourriture et du gain de poids. L'autopsie a mis en évidence des testicules anormaux macroscopiquement et le poids de la prostate et des testicules étaient significativement réduits.

Dans l'étude principale, des rats Wistar (25 par sexe et par dose) ont été traités par gavage quotidiennement par de l'HEP dissous dans une solution de carboxyméthylcellulose à 4 %.

Quatre groupes d'animaux ont été traités par de l'HEP aux doses de 30, 60 et 120 mg/kg pc./j. *versus* un groupe témoin d'animaux. Les parents (P), mâles et femelles, ont été traités durant 70 jours avant l'accouplement et pendant la même durée après l'accouplement. Les femelles ont été traitées durant la gestation et l'allaitement. A la suite du sevrage, au jour 21 post-partum, 25 femelles et 25 mâles de la génération F1 ont été sélectionnés afin d'être les parents de la génération F2. Le reste de la génération F1 a été sacrifié et soumis à des observations macroscopiques. La génération F1 sélectionnée a été exposée du jour 22 et jusqu'à la maturité et l'accouplement (120 jours). Les parents F1 ont été exposés durant la gestation et l'accouplement.

La mortalité et les signes cliniques ont été observés deux fois par jour et le poids corporel a été noté une fois par jour. De même, la variation du gain de poids et de la consommation de la nourriture a été mesurée. Le nombre des sites d'implantation dans l'utérus a été compté pour toutes les femelles.

Les résultats montrent une augmentation relative de la consommation de nourriture chez les mâles traités à 60 et 120 mg/kg pc./j. (génération P) et chez les femelles traitées à 120 mg/kg pc./j. (génération P). Néanmoins, le gain de poids des animaux n'a pas affecté. Aucune différence dans le poids des organes et dans les observations macroscopiques et microscopiques n'a été relevée.

Les paramètres de la reproduction tels que le nombre d'implantations, la durée de la gestation, la fertilité et les indices de gestation, les taux de conception, les naissances, la viabilité et les indices de sevrage n'ont pas été affectés dans la génération P et F1.

Les générations F1 et F2 n'ont pas été affectées par l'exposition à l'HEP, mise à part une décoloration de la fourrure pour tous les petits. Ni le poids à la naissance, ni la moyenne du poids corporel durant l'allaitement n'ont été affectés.

Dans la génération F1, le rapport des naissances mâles sur femelles a été significativement augmenté pour les animaux traités à 20 et 60 mg/kg pc./j. comparé au groupe témoin, mais pas pour les animaux traités à 120 mg/kg pc./j. Enfin, aucun effet macroscopique ou microscopique n'a été observé au niveau des organes des générations F1 et F2.

Par conséquent, la fertilité et les paramètres de reproduction des générations P et F1, de même que leur progéniture, n'ont pas été affectés après exposition à l'HEP quelle que soit la dose testée. Ainsi, la NOAEL pour la reprotoxicité est de 120 mg/kg pc./j.

3.8. CONCLUSIONS SUR LE DANGER

Dans l'étude de toxicité répétée sur 28 jours chez le rat par voie orale, une diminution du poids des testicules a été observée chez 3 animaux sur 5 traités à 450 mg/kg pc./j. Cette diminution du poids des testicules chez les animaux ayant reçu 450 mg/kg pc./j. n'est pas réversible chez 2 animaux sur 5 après 15 jours d'arrêt d'administration. L'analyse histopathologique a révélé une atrophie testiculaire chez les mâles traités à 450 mg/kg pc./j. et une prolifération du conduit hépatique biliaire pour les groupes traités à 150 mg/kg pc./j. et 450 mg/kg pc./j. Par conséquent la NOAEL retenue dans cette étude est de 50 mg/kg pc./j.

L'étude de toxicité à doses répétées durant 90 jours a révélé, lors de l'analyse histopathologique, une prolifération des cellules épithéliales thyroïdiennes chez les mâles et des protéines cylindriques dans les reins pour les deux sexes, chez les rats traités par voie orale à la dose de 60 mg/kg pc./j. Ainsi, la NOAEL retenue dans cette étude est de 20 mg/kg pc./j.

Dans l'étude de toxicité sur deux générations, une étude préliminaire a été réalisée chez des rats Wistar avec des doses de 0, 50, 150 et 450 mg/kg pc./j. Cette étude préliminaire montre une diminution du nombre d'implantations à 150 mg/kg pc./j. et une absence d'implantation à 450 mg/kg pc./j. Ainsi, dans l'étude principale, les doses ont été réduites.

Dans l'étude principale, la fertilité et les paramètres de reproduction des générations P et F1, de même que leur progéniture, n'ont pas été affectés après exposition à l'HEP quelle que soit la dose testée (30, 60 et 120 mg/kg pc./j.). Ainsi, la NOAEL pour la reprotoxicité est de 120 mg/kg pc./j.

Enfin dans l'étude de développement, des effets toxiques ont été observés tels que des hémorragies abdominales chez les fœtus issus des animaux traités à 150 et 450 mg/kg pc./j. et un retard de développement chez les fœtus issus des animaux traités à 450 mg/kg pc./j. De ce fait, la NOAEL de la toxicité maternelle et de la toxicité fœtus/embryon est de 50 mg/kg pc./j.

En conclusion, la NOAEL retenue pour l'évaluation des risques correspond à celle de l'étude de toxicité à doses répétées durant 90 jours par voie orale chez le rat, soit 20 mg/kg pc./j.

4. Exposition et évaluation du risque

L'HEP est un colorant capillaire direct utilisé :

- dans les teintures capillaires non oxydantes (temporaires ou semi-permanentes) à une concentration maximale de 2 % et ;
- dans les teintures capillaires oxydantes (ou permanentes) à une concentration maximale de 1,5 % après mélange avec le peroxyde d'hydrogène.

Ainsi, deux marges de sécurité ont été calculées par le CSSC : l'une dans les conditions non-oxydantes et l'autre dans les conditions oxydantes.

Calcul de la marge de sécurité dans les conditions non-oxydantes :

Maximum absorbé par la peau	= 13,85 µg/cm ²
Surface cutanée	= 700 cm ²
Quantité absorbée par application cutanée	= 9,70 mg
Poids corporel	= 60 kg
Dose d'exposition systémique	= 0,16 mg/kg pc.
NOAEL (90 jours, voie orale, rats)	= 20 mg/kg pc./j.

Marge de sécurité (MoS) = 124

Remarque : dans les avis récents du CSSC relatifs aux colorants capillaires, par exemple les colorants capillaires Basic Orange 31 (SCCS/1334/10) ou Yellow HC n°13 (SCCS/1322/10) mais d'autres également ; la surface cutanée retenue ne correspond plus à 700 cm² mais à 580 cm². Ainsi, la MoS calculée dans ces conditions (580 cm²) est égale à 142.

Calcul de la marge de sécurité dans les conditions oxydantes :

Maximum absorbé par la peau	= 11,38 µg/cm ²
Surface cutanée	= 700 cm ²
Quantité absorbée par application cutanée	= 8,00 mg
Poids corporel	= 60 kg
Dose d'exposition systémique	= 0,13 mg/kg pc.
NOAEL (90 jours, voie orale, rats)	= 20 mg/kg pc./j.

Marge de sécurité (MoS) = 151

5. Conclusion

Des effets sur les organes reproducteurs sont observés dans les études de toxicité à doses répétées et de développement issues des avis du CSSC (SCCP/1058/06 et SCCP/1208/08) à partir de 60 mg/kg pc./j. Ainsi, la NOAEL retenue par le CSSC correspond à 20 mg/kg pc./j. issue de l'étude de toxicité à doses répétées sur 90 jours chez le rat par voie orale, sur la base d'une prolifération des cellules épithéliales thyroïdiennes chez les rats mâles et de l'observation de protéines cylindriques dans les reins chez les rats mâles et femelles. Il est à noter que ces effets ne sont pas rapportés dans l'étude sur deux générations et ne remettent donc pas en cause la NOAEL choisie par le CSSC.

Les marges de sécurité obtenues avec cette NOAEL dans les conditions oxydantes et non oxydantes permettent de conclure à une utilisation sûre de l'HEP pour la santé des consommateurs en tant que colorant capillaire :

- dans les teintures capillaires non oxydantes (temporaires ou semi-permanentes) à une concentration maximale de 2 % et ;
- dans les teintures capillaires oxydantes (ou permanentes) à une concentration maximale de 1,5 % après mélange avec le peroxyde d'hydrogène.

Néanmoins, aucune donnée de stabilité de l'HEP dans les teintures capillaires commercialisées n'a été fournie dans les deux avis du CSSC (SCCP/1058/06 et SCCP/1208/08). Ainsi, il serait utile de connaître la stabilité de ce colorant capillaire, notamment dans les teintures capillaires oxydantes commercialisées afin de confirmer l'absence de produits néoformés en présence de peroxyde d'hydrogène.

6. Références bibliographiques

Scientific Committee on Consumer Products (SCCP/1058/06). (2007). Opinion on 2-Hydroxyethyl picramic acid.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_102.pdf

Scientific Committee on Consumer Products (SCCP/1208/08). (2008). Opinion on 2-Hydroxyethyl picramic acid.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_158.pdf

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS/1334/10). (2010). Opinion on Basic Orange 31.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/index_en.htm

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS/1322/10). (2010). Opinion on Yellow n°13.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/index_en.htm