

**Evaluation du risque lié à l'utilisation
de l'octyl methoxycinnamate dans les
produits cosmétiques**

SOMMAIRE

1. CONTEXTE.....	2
2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE.....	3
3. CARACTERISATION DU DANGER.....	3
3.1. SYNTHÈSE DE L'AVIS DU COMITÉ SCIENTIFIQUE POUR LA SÉCURITÉ DES CONSOMMATEURS DE 1996...	4
3.1.1. Toxicité aiguë orale.....	4
3.1.2. Toxicité à dose répétée.....	4
3.1.3. Irritation cutanée	4
3.1.4. Irritation oculaire.....	5
3.1.5. Sensibilisation	5
3.1.6. Développement et Tératogenèse.....	5
3.1.7. Toxicocinétique	6
3.1.8. Génotoxicité	7
3.1.9. Photogénotoxicité.....	8
3.1.10. Phototoxicité.....	8
3.1.11. Test d'inhibition des tumeurs induites par le rayonnement UV.....	8
3.2. SYNTHÈSE DE L'AVIS DU COMITÉ SCIENTIFIQUE POUR LA SÉCURITÉ DES CONSOMMATEURS DE 2001...	8
3.3. DONNÉES ISSUES DE LA LITTÉRATURE SCIENTIFIQUE ET DU RAPPORT FOURNI PAR INGREGOS	9
3.3.1. Toxicocinétique	9
3.3.2. Données de sensibilisation	10
3.3.3. Reprotoxicité	11
3.3.4. Etudes explorant le potentiel perturbateur endocrinien.....	13
3.4. CONCLUSIONS SUR LE DANGER	21
4. EXPOSITION ET ÉVALUATION DU RISQUE.....	23
5. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	24
6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	25

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : RÉSUMÉ DES ÉTUDES EXPLORANT LE POTENTIEL GÉNOTOXIQUE DE L'OMC (SCC, 1996)	7
TABLEAU 2 : EFFETS DE L'OMC EN COMPARAISON AVEC DE L'OESTRADIOL, D'APRÈS KLAMMER <i>ET AL.</i> (2005)	16
TABLEAU 3 : VALEURS DES NOAEL, LOAEL ET BMD, D'APRÈS KLAMMER <i>ET AL.</i> (2005).....	16
TABLEAU 4 : RÉSUMÉ DES EFFETS DE L'OMC RAPPORTÉS DANS L'ÉTUDE D'AXELSTAD <i>ET AL.</i> (2011).....	20
TABLEAU 5 : RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DES ÉTUDES <i>IN VITRO</i> ÉVALUANT LE POTENTIEL PE DE L'OMC	22
TABLEAU 6 : EXPOSITION À L'OMC EN FONCTION DES CATÉGORIES DE PRODUITS COSMÉTIQUES APPLIQUÉS	23

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 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'Afssaps a identifié plusieurs substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes, parmi lesquelles figure l'octyl methoxycinnamate (OMC).

L'OMC est un filtre ultra-violet (UV), absorbant uniquement les rayonnements UVB (Wong *et al.*, 2011). Il est inscrit à l'annexe VII, partie 1, entrée 12, de la directive cosmétique 76/768/CEE fixant la liste des filtres UV que peuvent contenir les produits cosmétiques. La concentration maximale d'utilisation de cette substance en tant que filtre UV dans les produits cosmétiques est fixée à 10 %.

Un avis relatif à la sécurité d'utilisation dans les produits cosmétiques de l'OMC a été émis par le Comité scientifique pour la santé des consommateurs (CSSC anciennement appelé « Scientific committee on cosmetology » ou SCC) en 1996. Ce dernier sera synthétisé dans le paragraphe 3.1 du présent rapport. Le CSSC a calculé, dans cet avis, une marge de sécurité (MoS) égale à 750 pour cette substance considérant ainsi son utilisation dans les produits cosmétiques comme sûre pour la santé des consommateurs (SCC, 1996).

Par ailleurs, en 2001, la publication de Schlumpf *et al.* a mis en exergue des effets oestrogéniques de certains filtres UV utilisés dans les produits cosmétiques, dont l'OMC. Ainsi, le CSSC a émis un avis sur les potentiels effets oestrogéniques des filtres UV (« Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers » ou SCCNFP, 2001), repris dans le présent rapport (paragraphe 3.2). Une nouvelle MoS a été calculée pour l'OMC, fondée sur une NOAEL retenue à partir de l'étude de Schlumpf *et al.* (2001), cette dernière étant égale à 870, le CSSC a de nouveau considéré comme sûre son utilisation dans les produits cosmétiques.

Toutefois, l'OMC est classé perturbateur endocrinien de catégorie 1 dans le rapport DHI¹ en raison des études suivantes :

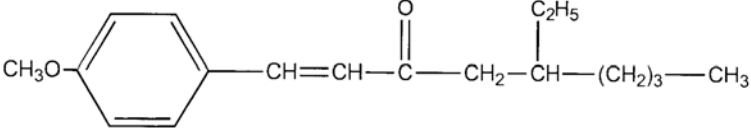
- chez le rat, mettant en évidence une augmentation du poids de l'utérus des femelles, de manière dose-dépendante (Schlumpf *et al.*, 2001) et ;
- chez le poisson, montrant une augmentation de la vitellogénine² plasmatique et une augmentation de l'expression de l'ARNm des récepteurs oestrogéniques alpha du foie (Inui *et al.*, 2003).

Le présent rapport a été approuvé par la commission de cosmétologie du 7 novembre 2011.

¹ Danish Hydrologic Institute (DHI) water and environment. (2007). Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. En ligne : http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/final_report_2007.pdf

² La vitellogénine est une protéine synthétisée dans le foie des poissons, des crustacées, etc. et dont la synthèse est contrôlée par les œstrogènes. Une fois synthétisée, elle circule dans le plasma pour atteindre les ovaires où elle est stockée dans le cytoplasme des ovocytes. La vitellogénine est actuellement utilisée comme biomarqueur d'exposition et d'effet aux perturbateurs endocriniens.

2. Caractérisation physico-chimique

Nom INCI	Ethylhexyl Methoxycinnamate
Numéro CAS	5466-77-3
Numéro EINECS/ELINCS	226-775-7
Nom Chemical/IUPAC ou autre	3-(4-methoxy-phenyl)-propionic acid 2-ethyl-hexyl ester 2-ethylhexyl 3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoate 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate Octyl methoxycinnamate
Autres noms	Octinoxate, Parsol® MCX; Uvinul MC 80; OMC, EHMC, Ro 05-8640/000
Fonctions	Filtre UV autorisé à un maximum de 10 %, annexe VII de la directive cosmétique 76/768/CEE, partie 1, entrée 12
Structure chimique	

Propriétés physico-chimiques :

Forme : huileuse ;
 Poids moléculaire : 290,4 g/mol ;
 Solubilité : < 0,75 mg/l dans l'eau, miscible dans l'éthanol et dans certains lipides ;
 Densité : 1,0 g/cm³ (à 25°C) ;
 Coefficient de partage (Log Pow) > 6,0 (à 23°C) ;
 Point de fusion : 99,87°C ;
 Température d'ébullition : 360,54°C.

3. Caractérisation du danger

Les données suivantes sont présentées dans le présent rapport :

- une synthèse des avis du CSSC de 1996 et 2001 ;
- une mise à jour de la revue des études disponibles dans la littérature scientifique.

Par ailleurs, par courrier en date du 9 septembre 2010, l'Afssaps a demandé au représentant des fournisseurs de matières premières à usage cosmétique (Ingrecos) et aux représentants de l'Industrie cosmétiques en France (FEBEA et COSMED) concernant un certain nombre de substances sélectionnées dans le cadre de la saisine portant sur la part du risque attribuable aux ingrédients cosmétiques reprotoxiques et/ou PE, des données relatives :

- à l'exposition de ces substances dans les produits cosmétiques ;
- aux propriétés toxicologiques de ces substances, notamment concernant le potentiel reprotoxique.

En réponse à ce courrier, Ingrecos a fourni à l'Afssaps un rapport présentant un ensemble de données relatives au potentiel reprotoxique et PE de l'OMC. Parmi ces données, est présente une synthèse de l'avis du CSSC (SCC, 1996), exposée dans le présent rapport mais également des données issues de la littérature scientifique et des études réalisées par des industriels dont seuls les résumés sont disponibles.

3.1. SYNTHÈSE DE L'AVIS DU COMITÉ SCIENTIFIQUE POUR LA SÉCURITÉ DES CONSOMMATEURS DE 1996

Il est à noter qu'il n'est pas précisé dans l'avis du CSSC (SCC, 1996) si les études présentées suivent les lignes directrices OCDE et/ou les bonnes pratiques de laboratoire.

3.1.1. Toxicité aiguë orale

Une étude a été réalisée chez la souris et la DL₅₀ orale calculée dans cette étude est égale à 8000 mg/kg pc. Ni les doses administrées, ni la souche des souris utilisée ne sont spécifiées dans l'avis du CSSC.

3.1.2. Toxicité à dose répétée

Durant 13 semaines, 4 groupes composés de 12 rats mâles et 12 rats femelles SPF ont été traités par voie orale (dans l'aliment) par de l'OMC aux doses de 0, 200, 450 et 1000 mg/kg pc./j. Les signes cliniques, les paramètres biologiques et hématologiques ont été étudiés. L'observation macroscopique a été réalisée chez tous les animaux. L'investigation histopathologique du cœur, des poumons, du foie, de l'estomac, des reins, de la rate, de la thyroïde et de la rétine n'a été effectuée que sur la moitié des animaux du groupe contrôle et du groupe traité à la plus forte dose. Seule l'analyse histopathologique du foie a été réalisée pour tous les groupes d'animaux quelle que soit la dose.

Six animaux du groupe contrôle et du groupe traité à la plus forte dose ont été sacrifiés et examinés 5 semaines après la fin du traitement pour l'étude de la réversibilité des effets.

Les résultats n'ont pas montré de mortalité dose-dépendante, aucune précision n'est donnée sur le nombre d'animaux morts pendant l'étude. Une augmentation du poids des reins des animaux traités à la plus forte dose a été notée, cette augmentation était réversible 5 semaines après l'arrêt du traitement. Cette augmentation serait due, d'après les auteurs, à une réponse physiologique en raison d'une augmentation du taux d'élimination. Une diminution du glycogène du foie a été notée ainsi qu'une augmentation du taux de fer dans les cellules de Kupffer pour les animaux traités à la plus forte dose. Deux de ces animaux ont montré une nécrose centrilobulaire minime du foie associée à une infiltration. Par ailleurs, ces observations ont également été constatées pour 2 des animaux du groupe contrôle. De ce fait, ces observations ont été attribuées à la présence d'une infection, sans pour autant justifier ni l'identification, ni la présence du microorganisme potentiellement responsable. Enfin, une augmentation du taux en glutamate déshydrogénase, réversible après 5 semaines, a été observée. La NOAEL retenue dans cette étude est de 450 mg/kg pc./j.

Durant 13 semaines, 4 groupes de 10 rats mâles et 10 rats femelles SD ont été traités par voie cutanée par une application d'OMC dans une huile minérale. Les doses testées étaient de 0 ; 55,5 ; 277 et 555 mg/kg pc./j. appliquées sur la peau rasée, 5 jours par semaine. Les auteurs précisent que la plus forte dose correspond à une dose 135 fois plus élevée que la quantité moyenne à laquelle pourrait être exposée le consommateur par jour. Divers paramètres biochimiques et cliniques ont été évalués durant l'étude, sans précision sur leur nature.

Aucune mortalité n'a été constatée durant l'étude. Tous les animaux ont présenté une desquamation au site d'application qui a été attribuée au véhicule par les auteurs. Une augmentation du poids des animaux du groupe traité à la plus faible dose par rapport aux autres groupes, a été constatée. Aucun changement dans les paramètres hématologiques n'a été observé. Une augmentation du taux de phosphatases alcalines a été notée pour le groupe traité à la plus forte dose mais de manière non significative. Enfin, une augmentation du poids relatif du foie du groupe traité à la plus forte dose a été notée mais aucune anomalie microscopique du foie n'a été observée.

La NOAEL retenue dans cette étude est de 555 mg/kg pc./j.

3.1.3. Irritation cutanée

Chez 20 cochons d'Inde sur lesquels de l'OMC non dilué a été appliqué, 2 fois par jour pendant 16 jours, aucun signe d'irritation n'a été constaté.

Les autres tests d'irritation ont été réalisés chez l'homme. Ainsi, l'OMC non dilué a été appliqué sous occlusion durant 24 heures sur la peau de 60 individus dont 20 présentaient une peau qualifiée de « sensible ». Les observations, 24 et 48 heures après retrait du patch d'occlusion, n'ont pas mis en évidence quelque réaction cutanée qu'elle soit. Par ailleurs, la même étude a été réalisée sur 51

hommes et femmes et aucune irritation n'a été notée. Aucune précision n'est donnée sur la dilution ou non de l'OMC. De plus, une formulation contenant de l'OMC (concentration non précisée) a été appliquée sur la peau de 50 sujets, ne montrant aucun effet indésirable.

Deux tests de Draize par application répétée sous occlusion, ont été réalisés chez 53 sujets traités par une solution (véhicule non précisé) à 2 % d'OMC et chez 54 individus traités par de l'OMC à 7,5 % dans du pétrolatum. Aucune irritation n'a été observée dans les deux tests.

Une solution d'OMC diluée à 10 % dans du diméthylphtalate a été appliquée sur le dos de 12 hommes et 46 femmes, âgés de 18 à 63 ans. Il est à noter que 6 sujets ont été exclus de l'étude pour des raisons non liées au protocole sans que toutefois les raisons ne soient explicitées dans l'avis du SCCS. L'application a été réalisée 24 heures, sous occlusion, 3 fois par semaine durant 3 semaines. Deux semaines après le traitement, une autre application de la solution sous occlusion sur un autre site du dos durant 24 heures, a été effectuée. Le site d'application a ensuite été observé 0, 24 et 48 heures après avoir ôté le patch. Aucun effet indésirable n'a été observé.

3.1.4. Irritation oculaire

Une quantité de 0,1 mL d'OMC non diluée a été instillée dans le sac conjonctival de 4 lapins (souche non précisée). Dans un groupe, aucun autre traitement n'a été effectué et dans l'autre groupe, l'instillation a été suivie d'un lavage. Aucun signe d'irritation n'a été observé.

Un test de Draize dont le protocole n'est pas rapporté, a été réalisé avec de l'OMC non diluée. Le CSSC conclut que l'OMC est faiblement irritant.

3.1.5. Sensibilisation

Vingt cochons d'Inde ont été traités par de l'OMC non diluée 2 fois par jour durant 16 jours. Après 3 jours de suite sans traitement, un challenge quotidien a été réalisé pendant 3 jours. Aucune réaction de sensibilisation n'a été observée. La dose n'est pas précisée.

Une autre étude mettant en jeu 2 groupes, constitués de 4 cochons d'Inde par groupe, a été réalisée. Le premier groupe a été exposé quotidiennement durant 5 jours à 0,05 mL d'OMC non diluée par injection ; le type d'injection n'est cependant pas précisé. L'autre groupe a été traité par une application d'une solution d'OMC diluée dans 50 % d'acétone, sur une zone de 2 cm² rasée, au niveau des côtés. Aucune réaction de sensibilisation n'a été notée.

Les autres tests de sensibilisation ont été réalisés chez l'Homme. Un test de Draize par application répétée sous occlusion, a été réalisé sur 53 individus traités par une solution d'OMC à 2 % (véhicule non précisé). Aucune réaction de sensibilisation n'a été rapportée.

Sur 54 individus, une formulation contenant 7,5 % d'OMC et du pétrolatum a été appliquée sous occlusion pendant 48 heures. Au total, 11 applications sous occlusion durant 48 heures ont été effectuées. Quatorze jours après le traitement, un challenge unique a été réalisé. Aucun effet indésirable n'a été noté.

Enfin, le CSSC rapporte que dans une série de tests où l'OMC a été étudié sous occlusion, les réponses allergiques étaient très rares.

Par ailleurs, le CSSC précise que le dossier soumis fourni par le Colipa souligne que des tests ont montré que l'OMC ne provoque pas de photosensibilisation, sans qu'aucun détail de ces tests ne soit fourni. Dans la suite du présent rapport, une analyse des données de sensibilisation de l'OMC disponibles dans la littérature scientifique a été réalisée.

3.1.6. Développement et Tératogenèse

Une étude de développement chez le lapin (souche non précisée) a été réalisée. Ainsi, 4 groupes de 20 femelles ont été accouplées et ont été traitées par gavage par de l'OMC aux doses de 0, 80, 200 et 500 mg/kg pc./j. durant la période d'organogenèse sans que toutefois les premier et dernier jour de traitement ne soient précisés. Excepté une légère réduction du poids des mères et des fœtus du groupe traité à la plus forte dose, aucune anomalie n'a été observée. Aucun autre détail n'est renseigné sur cette étude et par ailleurs, il n'est pas précisé si la réduction de poids précitée est statistiquement significative ou non.

Une autre étude de développement est rapportée dans l'avis du CSSC mais cette fois chez le rat (souche non précisée). Après une étude préliminaire, 4 groupes de 36 femelles par groupe ont été accouplées puis traitées par voie orale (gavage ou aliment non précisé) aux doses de 0, 250, 500 et 1000 mg/kg pc./j. du 6^{ème} au 14^{ème} jour de la gestation. En raison d'une erreur de manipulation, l'étude a été répétée de façon identique pour le groupe contrôle. Chaque groupe d'animaux a mis bas les petits et les a élevés. Le pourcentage de perte de fœtus était plus important dans le groupe traité à la plus forte dose. Les auteurs précisent cependant que ce taux de perte correspond aux témoins historiques du laboratoire pour cette souche de rat et qu'il n'est pas dû à un effet toxique de la substance. Aucune anomalie des fœtus n'a été observée.

3.1.7. Toxicocinétique

3.1.7.1. Etudes in vitro

Une étude sur peau de rat rasée a été réalisée sur cellule de diffusion. Une solution d'OMC à 1 % dans du carbitol a été appliquée et les quantités déposées correspondaient à 120, 360 et 1200 µg/cm². L'OMC a été retrouvé majoritairement dans les « strips » (le nombre de « strips » n'est pas précisé) ; une petite partie est retrouvée dans le *stratum corneum* et le reste dans le compartiment receveur. Les quantités retrouvées dans le compartiment receveur avoisinaient : après 6 heures 1,13 % ; après 16 heures 11,4 % ; et après 24 heures 17,9 %. Les résultats combinés pour les « strips » et l'épiderme étaient de 31,4 % ; 44,4 % et 45,7 % (pourcentage de la dose appliquée) respectivement pour des quantités appliquées de 120, 360 et 1200 µg/cm². Le CSSC conclut que la quantité d'OMC ne semble pas modifier les résultats.

Un ensemble d'études *in vitro* a été réalisée avec diverses quantités de « Parsol 1789 » (4-tert-butyl-4'-méthoxydibenzoylméthane) ajouté à une formulation contenant de l'OMC. Aucun protocole n'est détaillé (ni le type de peau utilisé, ni la méthode, ni les concentrations en OMC). Le CSSC conclut qu'il semblerait que l'ajout de « Parsol 1789 » n'ait aucun effet sur l'absorption de l'OMC.

Une étude a été conduite sur de la peau de mini-porc montée sur cellule de diffusion ; le « Parsol 1789 » et l'OMC ont été utilisés comme dans l'étude précédente. Trois types de formulation (concentration en OMC non précisée) ont été utilisés et environ 3 % ont été retrouvés dans le compartiment récepteur. Une formulation commercialisée (contenant 2 % de « Parsol 1789 » et 7,5 % d'OMC) a également été utilisée et 2,2 % de la quantité d'OMC appliquée a été retrouvée dans le compartiment récepteur. Les auteurs de l'étude ont calculé une quantité absorbée pour un individu de 60 kg qui correspond à 56 mg soit 0,9 mg/kg pc. Le CSSC a néanmoins de nouveau réalisé les calculs et trouvé une valeur inférieure égale à 0,2 mg/kg pc. Néanmoins, le détail du calcul n'est pas présenté dans l'avis du CSSC (SCC, 1996).

Enfin, une étude sur peau humaine (abdomen) montée sur cellule de diffusion a été réalisée. Une formulation à 7,5 % en OMC a été appliquée et une quantité de 0,03 % d'OMC a été retrouvée dans le compartiment récepteur après 2 heures, 0,26 % après 6 heures et 2 % après 18 heures. Diverses combinaisons de « Parsol 1789 » et d'OMC ont été utilisées dans cette étude (concentrations non précisées). Les calculs montrent que ces résultats indiqueraient une quantité absorbée d'OMC d'environ 0,2 mg/kg pc.

3.1.7.2. Etudes in vivo

Des quantités d'OMC radiomarké (aucune concentration n'est spécifiée) ont été appliquées sur huit volontaires au niveau de la région interscapulaire. Un groupe de 4 volontaires a reçu les applications sous un verre de montre et l'autre groupe, sous occlusion avec une bande de gaz. Une quantité de 0,2 % a été retrouvée dans l'urine des volontaires.

Une étude préliminaire a été réalisée dans laquelle les volontaires ont pris, par voie orale, une capsule contenant 100 mg d'OMC. En tant que substance lipophile, l'OMC est susceptible d'être métabolisé, il est notamment connu que cette substance est hydrolysée par les estérases du plasma de manière lente. L'élimination urinaire de l'OMC après 24 heures a été étudiée par une méthode analytique (GS/MS) mesurant le dérivé ester méthylé. Après 24 heures, des quantités de cinnamate correspondant au cinquième de ce qui aurait dû être retrouvé si la dose totale avait été absorbée, ont été retrouvées dans les urines. Presque tous les métabolites ont été retrouvés après 6 heures.

A la suite de cette étude préliminaire, une étude a été réalisée mettant en jeu l'application d'une crème à 10 % en OMC. Deux grammes de cette crème, soit 200 mg d'OMC, ont été appliqués sur la région interscapulaire de 5 hommes volontaires (de 29 à 46 ans), sous occlusion (bande de gaz) pendant 12 heures. La région traitée correspondait à 750 cm² de peau. Des prélèvements sanguins ont été réalisés à 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7 et 24 heures. L'urine a été collectée à 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 24, 48, 72 et 96 heures.

Le plasma contrôle a montré une quantité d'OMC de 10 ng/mL sans aucune application préalable. Les résultats ne montrent pas de pic en OMC dans le plasma durant l'étude. Les urines ont montré un taux « physiologique » (aucune valeur, ni explication de ce taux « physiologique » n'est précisé dans l'avis du CSSC) en OMC compris entre 100 et 300 ng/mL. Aucune augmentation significative des quantités d'OMC n'a été notée quel que soit l'échantillon urinaire. Le CSSC précise que cette étude a été conduite en prenant soin de respecter chaque point du protocole. Les auteurs concluent qu'une très petite quantité d'OMC est absorbée après application sur la peau en comparaison avec les valeurs retrouvées pour l'absorption orale.

3.1.8. Génotoxicité

Aucun protocole, ni ligne directrice OCDE n'est précisé pour les tests de génotoxicité cités dans l'avis du CSSC. Seuls les résultats sont présentés.

Un test d'Ames a été réalisé sur les souches généralement utilisées (non précisées). Ce test est positif dans la souche TA 1538 sans activation métabolique. Le CSSC précise que ce résultat serait à lier au lot d'échantillons analysés.

Un autre laboratoire a montré également une très faible réponse positive dans le test d'Ames pour la souche TA 1538 sans activation métabolique à une dose de 10 µl/boîte de pétri ; ce résultat n'a pas été retrouvé ni dans deux échantillons répliqués, ni dans un second test d'Ames.

Les résultats des tests de génotoxicité dans lesquels l'OMC a été étudié sont présentés dans le tableau 1. Il est à noter qu'aucune information n'est donnée sur la nature des tests dans l'avis du CSSC, les informations rapportées dans le tableau 1 ne sont donc pas précises.

Tableau 1 : Résumé des études explorant le potentiel génotoxique de l'OMC (SCC, 1996)

	Tests utilisés	Résultats
<i>in vitro</i>	Test de mutagenèse sur <i>S. cerevisiae</i>	Négatif
	Test de mutagenèse sur V79	Légère augmentation des colonies mutantes, dose-dépendante
	Test sur lymphocytes humains → le test n'est pas précisé	Négatif
	Test sur cellules murines Balb/c 3T3	Négatif
<i>in vitro ou in vivo (non précisé)</i>	Test UDS (synthèse non programmée de l'ADN)	Négatif
<i>in vivo</i>	Test de mutagenèse sur drosophile	Négatif
	Test de micronoyaux (souris)	Négatif

Au vu des résultats présentés dans le tableau 1, le CSSC a considéré que l'OMC ne présentait pas de potentiel génotoxique.

3.1.9. Photogénotoxicité

Un test de photomutagenèse a été réalisé sur *S. cerevisiae*. Pour rappel, ce test a également été réalisé mais en l'absence de rayonnement UV, et les résultats rapportés sont négatifs (cf. paragraphe précédent). L'OMC a été dissous dans du DMSO et des doses de 0,5 à 625 µg/mL ont été testées ; les rayonnements UVA et UVB appliqués avaient respectivement pour valeur 500 000 J.m⁻² et 12 000 J.m⁻². La chlorpromazine a été utilisée en tant que témoin positif. Des témoins négatifs ont également été utilisés sans que leur nature ne soit précisée. Le CSSC précise que cette étude a été conduite selon l'état de l'art. Les résultats montrent que l'OMC n'est pas photomutagène, que les rayonnements UVA et UVB sont mutagènes et que l'OMC protège des effets mutagènes des rayonnements UVA et UVB.

Un test d'aberrations chromosomiques sur CHO, selon les bonnes pratiques de laboratoire (BPL), a été réalisé. L'intensité des rayonnements UVA et UVB était respectivement comprise entre 200 et 2000 mJ.cm² et 4 et 25 mJ.cm². Le témoin positif utilisé dans cette étude est la chlorpromazine. Les témoins négatifs ont consisté en des cultures cellulaires irradiées sans OMC et non irradiées mais avec de l'OMC. Les doses d'OMC étudiées étaient de 5 à 25 µg/mL. Il a été observé un effet clastogène avec la plus forte dose d'irradiation UV dans les cellules sans OMC mais un effet protecteur de l'OMC vis-à-vis de cet effet a été observé pour les cellules traitées avec l'OMC. Le contrôle positif a montré une activité clastogène afin de valider les conditions du test. Les résultats rapportés montrent une absence de potentiel photoclastogène.

3.1.10. Phototoxicité

Une étude de phototoxicité a été réalisée chez 10 volontaires. De l'OMC (dose et concentration non précisées) a été appliqué sous occlusion durant 24 heures puis, le site d'application (zone non précisée) a subi une exposition à un rayonnement UV (UVA ou UVB, non précisé) tel que permettant une réaction subérythémateuse. Aucune phototoxicité n'a été mise en évidence.

3.1.11. Test d'inhibition des tumeurs induites par le rayonnement UV

Des souris imberbes ont été exposées à des doses répétées de rayonnement UV (à l'aide d'un dispositif simulant l'énergie solaire). Après une période sans irradiation UV (durée non précisée), 3 applications en 1 semaine de 12-o-tétradécanoyl phorbol-13-acétate (TPA), substance promotrice de tumeurs cutanées (d'abord 10 µg/mL, puis 2 µg/mL, la plus forte concentration s'étant révélée irritante). Des animaux témoins ont été également utilisés. Un groupe d'animaux a été complètement protégé par 50 % d'OMC. Il a été suggéré que l'OMC pouvait être lui-même promoteur de tumeurs mais le CSSC précise qu'aucune preuve n'a été apportée par cette étude.

3.2. SYNTHÈSE DE L'AVIS DU COMITÉ SCIENTIFIQUE POUR LA SÉCURITÉ DES CONSOMMATEURS DE 2001

Comme précisé dans le contexte du présent rapport, le CSSC a été saisi en 2001 par la Commission européenne afin d'évaluer les potentiels oestrogéniques des filtres UV utilisés dans les produits cosmétiques, suggérés par la publication de Schlumpf *et al.* (2001) dont l'OMC.

Ainsi, le CSSC a analysé les travaux de Schlumpf *et al.* (2001), ces derniers ayant évalué les effets oestrogéniques de l'OMC à l'aide de deux tests :

- *in vitro* par le test de prolifération cellulaire de la lignée tumorale MCF-7 (test de *screening*) ;
- *in vivo* par le test utéro-trophique sur rat femelle immature.

Il est à noter que la classification de l'OMC en catégorie 1 dans le rapport DHI est basée d'une part sur l'étude *in vivo* suscitée et d'autre part sur une étude *in vivo* chez le poisson (Inui, *et al.*, 2003).

Les résultats du test de prolifération cellulaire de la lignée tumorale MCF-7 ont montré une EC₅₀ (concentration nécessaire pour induire 50 % de la prolifération maximale des cellules) égale à 2,37 µM pour l'OMC (*versus* 1,22 pM pour 17-β-oestradiol). Comme le souligne le CSSC (SCCNFP, 2001), ce test correspond à un test de *screening* et ne permet pas de conclure de manière définitive sur les effets perturbateurs endocriniens d'une substance *in vivo*. En effet, dans cette étude, le filtre UV évalué (4-méthylbenzylidène camphor) comme ayant l'activité PE la plus élevée *in vitro* s'est

révélé comme ayant une faible activité PE *in vivo*. Par ailleurs, seules des données *in vivo* via les concentrations plasmatiques peuvent permettre d'extrapoler les effets observés *in vitro* aux effets potentiels.

En ce qui concerne le test utéro-trophique sur rat femelle immature, les résultats montrent une ED₅₀ (dose nécessaire pour induire 50 % de l'augmentation maximale du poids de l'utérus) égale à 934 mg/kg pc./j (*versus* 0,818 µg/kg pc./j pour l'éthynyl œstradiol).

Par rapport à cette étude *in vivo*, le CSSC (SCCNFP, 2001) précise que l'étude de Schlumpf *et al.* (2001) a été réalisée avant la publication du « draft » de l'OCDE relatif au protocole de ce test. Ainsi, le protocole suivi par Schlumpf *et al.* (2001) comporte de nombreuses déviations et par ailleurs ne suit pas les BPL. Les déviations identifiées par le CSSC sont les suivantes :

- la souche de rat utilisée (Long-Evans) est inhabituelle et son choix n'est pas expliqué ;
- l'exposition des rats jusqu'au 26^{ème} jour après la naissance n'est pas adaptée puisque cette période est trop proche du début de la puberté ;
- les conditions de l'exposition cutanée sont inappropriées : immerger les petits dans l'huile d'olive n'est pas une procédure standard et la forme galénique utilisée (OMC dans de l'huile d'olive chauffée) ne reflète pas celle utilisée dans les formulations de produits de protection solaire ;
- le calcul de la dose absorbée après exposition cutanée n'est pas clair et l'absorption par voie orale par les animaux ne peut être exclue ;
- la différence entre le potentiel PE de l'éthynyl œstradiol et celui de l'OMC est de l'ordre d'environ 1 million d'unité ;
- le test utéro-trophique est un essai de dépistage *in vivo* à court terme, qui renseigne sur un seul mécanisme endocrinien, à savoir le potentiel d'induction d'effets oestrogéniques.

On peut ajouter que les travaux de Schlumpf *et al.* (2001) correspondent à des études mécanistiques, permettant de mettre en exergue un mode d'action et non des effets avérés. Seules, des études de développement et surtout sur deux générations, permettent de confirmer ces effets et leurs impacts.

Le CSSC a recalculé la MoS à l'aide des données de Schlumpf *et al.* (2001). Ainsi, une NOEL (pour l'activité oestrogénique) égale à 522 mg/kg pc./j. a été retenue par le CSSC. Il est à noter que cette NOEL est supérieure à la NOAEL retenue dans l'évaluation du CSSC de 1996 (NOAEL = 450 mg/kg pc./j. dans une étude de toxicité à dose répétée sur 13 semaines par voie orale chez le rat). De ce fait, la MoS est supérieure à celle calculée en 1996 et égale à 870.

3.3. DONNEES ISSUES DE LA LITTERATURE SCIENTIFIQUE ET DU RAPPORT FOURNI PAR INGREGOS

Le rapport fourni par Ingrecos mentionne uniquement les résumés des études bibliographiques issues de la littérature scientifique ; ces dernières ont été analysées par l'Afssaps. Par ailleurs, certaines études du rapport fourni par Ingrecos ont été analysées dans l'avis du CSSC (SCC, 1996), elles ne seront donc pas rapportées dans ce paragraphe.

3.3.1. Toxicocinétique

Les études de toxicocinétique présentes dans le rapport d'Ingrecos sont reprises par l'avis du CSSC (SCC, 1996). Une étude issue de la littérature scientifique (Janjua *et al.*, 2004) est également présentée dans le rapport d'Ingrecos. Cette étude a été analysée dans le présent rapport.

Les objectifs de cette étude (Janjua *et al.*, 2004) sont d'une part de rechercher les quantités plasmatiques et urinaires en OMC chez l'homme et d'autre part de mesurer les effets systémiques de l'OMC sur les taux endogènes des hormones de la reproduction. Ainsi, 32 volontaires caucasiens ont été intégrés dans cette étude : 15 hommes (âge : 23-29 ans, moyenne 26 ans) et 17 femmes ménopausées (âge : 54-86 ans, moyenne 65 ans). Ces sujets ont utilisé un produit de protection solaire fourni par les auteurs de l'étude. L'exercice physique, les bains de soleil, la caféine, la nicotine et l'alcool ont été proscrits. L'étude a duré deux semaines comprenant une semaine contrôle suivie d'une semaine de traitement, chaque sujet étant son propre contrôle. Chaque matin, un échantillon urinaire a été prélevé. Immédiatement après le premier prélèvement sanguin, une crème basique sans filtre UV a été appliquée sur tout le corps des volontaires et ceci quotidiennement, pendant 4 jours. Le même protocole a été réalisé la deuxième semaine mais cette fois avec un produit de protection

solaire contenant 10 % d'OMC. Une quantité de 2 mg/cm² de crème a été appliquée, correspondant à 40 g pour une surface corporelle moyenne de 2 m². Les taux d'inhibine B³ sérique ont été mesurés chez les hommes mais non chez les femmes ménopausées qui ne sécrètent pas d'inhibine B. Les taux de FSH, LH, SHBG⁴, œstradiol et testostérone ont également été mesurés.

Les résultats rapportent un taux plasmatique de 10 ng/mL d'OMC retrouvé les volontaires femmes et 20 ng/mL chez les volontaires hommes, 3 à 4 heures après l'application. Chez les femmes, les concentrations plasmatiques en OMC étaient les mêmes 24 comme 96 heures après la première application, indiquant une absence d'accumulation durant la semaine de traitement. Chez les hommes, les concentrations plasmatiques en OMC étaient significativement supérieures après 96 heures *versus* 24 heures.

Au niveau des taux urinaires en OMC, un taux de 5 ng/mL a été retrouvé chez les femmes et 8 ng/mL chez les hommes. Aucun changement des taux urinaires en OMC n'a été constaté 24 comme 96 heures après la première application, pour les deux sexes.

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans les taux hormonaux (FSH, LH et SHBG) ni chez les femmes et ni chez les hommes, entre les échantillons prélevés lors de la « semaine contrôle » *versus* la « semaine traitement ». Cette observation est identique pour les taux en œstradiol. Une différence statistiquement significative, est néanmoins rapportée chez les femmes pour le taux en testostérone retrouvé la « semaine contrôle » *versus* la « semaine traitement » à 0, 3 et 24 heures, mais pas à 4 et 96 heures. Etant donné que cette observation est rapportée au début de l'étude avant que le produit de protection solaire ne soit appliqué, cette dernière n'est pas liée à l'OMC. Enfin, chez les hommes, des augmentations faibles mais significatives sont observées pour les taux en inhibine B (0 à 3 heures), en œstradiol (2 à 4 heures) mais également une diminution du taux de testostérone (4 heures), entre les deux semaines. Néanmoins, les auteurs considèrent que ces changements ne sont pas pertinents pour des effets biologiques et ne sont donc pas reliés à l'utilisation de l'OMC.

Ainsi, l'OMC est absorbé par la peau et éliminé dans l'urine. Les auteurs concluent que l'OMC ne semble pas modifier les taux hormonaux chez l'homme jeune et la femme ménopausée.

3.3.2. Données de sensibilisation

Une analyse des données de sensibilisation de l'OMC disponibles dans la littérature scientifique a été réalisée.

3.3.2.1. Fréquence de l'allergie à l'OMC

Bien que la prévalence des réactions aux produits de protection solaire ne soit pas connue, le faible nombre de cas rapportés dans la littérature laisse penser que les allergies et photoallergies aux filtres UV surviennent rarement.

Néanmoins, des cas de photoallergies de contact sont rapportés dans la littérature scientifique : Helsing *et al.* (1991), Kimura *et al.* (1995), Ferriols *et al.* (2000) et Collaris *et al.* (2008). Seuls des cas de photoallergie de contact sans allergie de contact simple ont été répertoriés. Dans 1 cas seulement, un autre filtre UV, l'isoamyl-p-méthoxycinnamate a été testé avec un résultat positif en photopatch - test.

Récemment, cinq grandes séries de patients ont fait l'objet de recherche pour une photoallergie de contact.

Ainsi, en France, Leonard *et al.* (2005) ont montré que les résultats de photopatch - tests étaient positifs pour les photoallergènes testés, pour un ou plusieurs tests, chez 856 patients sur 2067 patients testés. Les 2 filtres éthylhexyl para-méthoxycinnamate et isoamyl p-méthoxycinnamates ont été testés. Dans 8 cas, l'OMC donne un résultat positif en photopatch - test, avec dans 1 seul cas, une positivité avec le patch test simple et une aggravation en présence d'UV. L'autre filtre, l'isoamyl p

³ L'inhibine B, seule forme active d'inhibine chez l'homme, est produite par les cellules de Sertoli et constitue un reflet direct de la spermatogenèse au niveau des tubes séminifères. Chez la femme l'inhibine B est produite sous le contrôle de la FSH par les cellules de la granulosa des petits follicules antraux de moins de 8 mm et par les follicules pré-antraux. Son dosage permet donc chez la femme, d'évaluer la réserve ovarienne.

⁴ La SHBG est une protéine qui joue un rôle dans le transport des stéroïdes (notamment testostérone et œstradiol) et la réduction/régulation des effets des androgènes. Une diminution de la concentration de SHBG est associée avec des taux élevés d'androgènes et des effets excessifs de ces derniers.

méthocycinnamate est positif à 6 reprises. Les filtres UV entraînant le plus fréquemment des photoallergies sont les benzophénones avec 62 cas dont 54 avec la benzophénone-3 puis les dibenzoylméthanés avec 61 cas.

L'octocrylène n'a pas été testé, car il n'est inclus dans la batterie standardisée des photopatch - tests « Chemotechnique » que depuis 2005.

En Colombie, chez 82 patients testés positifs avec le photopatch test, Rodriguez *et al.* (2006) ont observé que le, filtre UV le plus souvent impliqué est la benzophénone-3 (22 patients), suivi par l'OMC (8 patients). L'OMC n'entraîne pas de réaction allergique sans irradiation. La photoallergie aux autres filtres UV testés est beaucoup plus rare. L'isoamyl-p-méthoxycinnamate et l'octocrylène n'ont pas été testés.

L'étude de Bryden *et al.* (2006) concerne 1155 patients britanniques chez qui des photopatch - tests ont été réalisés. Parmi ces patients, 130 ont présenté une réaction photoallergique, le plus souvent aux filtres UV. L'octocrylène n'a pas été testé. Deux cinnamates ont été testés. Les réactions les plus fréquentes concernent la benzophénone 3 (27 patients), le butylmethoxydibenzoylméthane (22 patients), l'isoamyl p-methoxycinnamate (14 patients) puis l'OMC (8 patients) ; les autres filtres UV entraînent plus rarement des réactions photoallergiques. Dans 5 cas, il y a eu une réaction de contact sans photoaggravation pour l'isoamyl p-methoxycinnamate et dans 4 cas avec l'OMC.

Dans l'étude italienne de Pigatto *et al.* (2008), sur 1082 patients testés par photopatch- tests pour suspicion de photoallergie de contact, il est noté :

- 234 patients avec réactions positives à au moins une substance, soit 21,6 % des patients testés ;
- 95 patients avec réactions positives à un filtre UV avec par ordre de fréquence : octocrylène (23 patients), benzophénone 10 (16 patients), benzophénone 3 (15 patients), OMC (13 patients), le butylmethoxydibenzoylméthane (9 patients) puis l'isoamyl-p-methoxycinnamate (4 patients) ;
- les réactions à l'OMC sont de type strictement photoallergiques dans 11 cas et allergiques de contact avec photoaggravation dans 2 cas.

Enfin, aux Etats-Unis, l'étude de Scalf *et al.* (2009) a concerné 182 patients ayant fait l'objet de photopatch - tests. L'isoamyl p-hydroxycinnamate et l'octocrylène n'ont pas été testés. L'OMC donne des résultats positifs de photoallergie chez seulement 3 patients (avec également allergie de contact simple), derrière la benzophénone 4 (8 patients) et la 2 hydroxy-4-methoxybenzone (5 patients).

3.3.2.2. Allergies croisées avec les cinnamates

Les cinnamates sont un groupe de substances dérivées de l'acide cinnamique. Il a été suggéré par Fisher *et al.* (1992) que les methoxycinnamates pourraient donner des réactions allergiques croisées avec les autres cinnamates présents dans les parfums, les médicaments appliqués par voie cutanée ou les produits cosmétiques. Une étude récente de Pentiga *et al.* (2009) n'a pas confirmé cette hypothèse. En effet, cette étude prospective a été menée chez 18 patients présentant un test épicutané positif avec « *fragrance mix* » et « baume du Pérou », contenant des dérivés cinnamiques. Des photopatch -tests ont été effectués avec les substances parfumantes dérivées du « *cinnamon* » ainsi que les 2 filtres UV, OMC et isoamyl p-methoxycinnamate. Les filtres UV n'entraînent ni allergie ni photoallergie, alors qu'une positivité en patch avec ou sans irradiation est obtenue chez 13 patients avec les autres dérivés cinnamiques. En dépit du faible nombre de patients testés, cette étude suggère une absence de réaction de sensibilisation croisée suite à l'utilisation de l'OMC et de l'isoamyl p-methoxycinnamate chez des patients déjà sensibilisés aux autres cinnamates.

3.3.3. Reprotoxicité

L'étude de Schneider *et al.* (2005, étude présente dans le document fourni par Ingreco) explore la reprotoxicité de l'OMC sur deux générations de rats Wistar. Cette étude suit la ligne directrice OCDE 416 et les BPL. Quatre groupes de 25 femelles et 25 mâles ont été constitués et traités par de l'OMC incorporé à leur nourriture aux doses de : 0, 150, 450 et 1000 mg/kg pc./j. Les parents F0 ont été traités avant l'accouplement, durant 73 jours puis jusqu'au sevrage des petits F1. Dans la

génération F1, 25 mâles et 25 femelles par groupe de dose ont été sélectionnés et traités de la même manière que la génération F0, jusqu'au sevrage de la génération F2.

▪ Résultats des observations pour la génération F0 :

Les doses absorbées calculées sont les suivantes :

- pour les mâles : 153, 460 et 1015 mg/kg pc./j. ;
- pour les femelles : 156, 468 et 1039 mg/kg pc./j et 152, 451 et 1025 mg/kg pc./j pendant la gestation.

Les effets observés sont les suivants :

- deux animaux du groupe traité à la plus forte dose ont présenté une fourrure imbibée d'urine (semaine 7 à 17) ;
- une femelle non gestante traitée à la dose de 150 mg/kg pc./j est morte durant la dernière semaine de traitement à la suite d'une glomérulonéphrite sévère non liée au traitement ;
- une diminution de 10 % de la consommation de la nourriture a été notée pour les mâles traités à la plus forte dose ;
- une légère diminution de la consommation de nourriture a été observée pour les femelles traitées à la plus forte dose pendant la période d'allaitement (de 4 à 14 jours) et pour les femelles traitées à 450 mg/kg pc./j avant l'accouplement (semaine 2 à 9) et pendant la gestation (de 0 à 14 jours) ;
- une diminution de 16 % du poids corporel des mâles traités à la plus forte dose, cette diminution, moins marquée (- 5 %) est également observée chez les femelles traitées à la même dose ;
- à l'autopsie, des effets sur les organes des femelles traitées à la plus forte dose ont été notés : une augmentation du poids du foie et une réduction du poids des ovaires ;
- l'histopathologie a révélé une légère éosinophilie cytoplasmique hépatique chez presque tous les animaux traités à la plus forte dose, mâles et femelles ;
- une ulcération de la muqueuse de l'estomac a été observée chez un mâle traité à la plus forte dose et quelques femelles (0, 1, 3 et 4 femelles respectivement traitées à 0, 150, 450 et 1000 mg/kg pc./j) ;
- aucun effet sur le nombre, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes n'a été noté.

▪ Résultats des paramètres reproductifs pour la génération F0 et les petits F1 :

- le traitement n'a eu aucun effet sur la durée du cycle ovarien, le temps d'accouplement aboutissant à une gestation, la durée de gestation, les pertes post-implantatoires, le sexe et la survie des petits, les indices de fertilité, de natalité et d'allaitement ;
- à la dose de 1000 mg/kg pc./j., une diminution du nombre d'implantations par femelle a été observée associée à une diminution de la taille de la portée, une réduction du gain de poids des petits du jour 4 au jour 21 post-partum, d'un retard d'ouverture du vagin et de la séparation préputiale des petits F1 ;
- un retard d'ouverture du vagin a également été noté pour les petits F1 à la dose de 450 mg/kg pc./j..

Les auteurs concluent qu'au regard des témoins historiques du laboratoire, seule la diminution du gain de poids des petits à la plus forte dose peut être considérée comme pertinente. Ainsi, les auteurs concluent que cette diminution de gain de poids ralentit la maturation des organes sexuels avec pour conséquence un retard général du développement des petits F1, et que la substance n'entraîne pas un effet spécifique.

▪ Résultats des observations pour la génération F1 :

Les doses absorbées calculées sont les suivantes :

- pour les mâles : 154, 461 et 1028 mg/kg pc./j. ;
- pour les femelles : 158, 474 et 1057 mg/kg pc./j. et 149, 443 et 976 mg/kg pc./j. pendant la gestation.

Les effets observés sont les suivants :

- une fourrure imbibée d'urine chez quatre mâles et quatre femelles du groupe traité à la plus forte dose (semaine 7 à 15) ;

- une femelle moribonde traitée à 450 mg/kg pc./j. et présentant une dilatation sévère du caecum et du jéjunum a été sacrifiée avant l'accouplement ;
- la mort avant la mise bas d'une femelle traitée à 450 mg/kg pc./j., sans qu'aucune raison ne soit identifiée ;
- une réduction de la consommation de nourriture d'environ 10 % chez les mâles traités à la plus forte dose durant les 7 premières semaines précédant l'accouplement et chez les femelles traitées à la plus forte dose durant la gestation et l'allaitement ;
- une diminution de 10 % du poids des mâles et des femelles traitées à la plus forte dose avant l'accouplement, la gestation et l'allaitement mais également à l'autopsie (moins 14 % pour les mâles et moins 4 % pour les femelles) ;
- une augmentation du poids du foie des femelles traitées à 450 et 1000 mg/kg pc./j. et ce, de manière dose-dépendante, par rapport au groupe témoin ;
- une légère éosinophilie cytoplasmique hépatique chez tous les mâles et chez la moitié des femelles traitées à la plus forte dose ;
- une diminution du poids des ovaires des femelles traitées à la plus forte dose sans aucune modification histopathologique ;
- des ulcérations de la muqueuse de l'estomac chez les mâles traités à la plus forte dose ;
- une diminution unilatérale de la taille des testicules et une dégénération tubulaire diffuse chez un mâle traité à la plus forte dose ; mais sans baisse de la fertilité puisque ce dernier a réussi à s'accoupler et par ailleurs, ces effets ont été observés chez les témoins historiques du laboratoire ;
- pas d'effet rapporté sur le nombre, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes.

▪ Résultats des paramètres reproductifs pour la génération F1 et les petits F2 :

- comme pour la génération F0, le traitement n'a pas eu d'effet sur la durée du cycle ovarien, le temps d'accouplement aboutissant à une gestation, la durée de gestation, les pertes post-implantatoires, le sexe et la survie des petits, les indices de fertilité, de naissance et d'allaitement ;
- le nombre de sites d'implantation a été significativement réduit pour les animaux traités aux doses de 450 et 1000 mg/kg pc./j. par rapport aux témoins, néanmoins les auteurs indiquent que les résultats du groupe témoin étaient spécifiquement élevés dans cette étude par rapport aux témoins historiques ;
- une diminution du gain de poids a été observée pour les petits F2 à la dose de 1000 mg/kg pc./j. du jour 4 au jour 21 post-partum ;
- un retard d'ouverture du vagin chez les petits F2, a également été noté à la plus forte dose.

Comme précédemment, les auteurs ont comparé leurs résultats par rapport à ceux rapportés pour les témoins historiques. Ainsi, ils considèrent que tous les changements observés n'ont pas été considérés comme liés à l'administration de la substance.

Par conséquent, les auteurs établissent une NOAEL de 450 mg/kg pc./j. pour les paramètres de fertilité et de reproduction mais aussi pour la toxicité parentale et de développement. Cette NOAEL est basée sur la réduction des poids corporels, l'augmentation du poids du foie, l'éosinophilie cytoplasmique hépatique et le retard de maturation sexuelle des petits à la dose de 1000 mg/kg pc./j.

3.3.4. Etudes explorant le potentiel perturbateur endocrinien

Plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo*, issus de la littérature scientifique ont étudié le potentiel perturbateur endocrinien de l'OMC. Ces travaux sont rapportés dans le présent rapport.

3.3.4.1. Etudes *in vitro*

- ***UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. (Ma et al., 2003)***

Dans cette étude, le potentiel d'interaction de l'OMC (dissous dans de l'éthanol à 10^{-5} M) avec les récepteurs androgènes a été évalué. Ainsi, des cellules MDA-kb2 exprimant des récepteurs androgéniques et des récepteurs des glucocorticoïdes, ont été exposées à de l'OMC en l'absence et en présence de 0,1 ou 0,5 nM de 5 α -dihydrotestostérone (DHT), substance agoniste androgénique. Les résultats montrent que l'OMC n'entraîne pas d'activité agoniste des récepteurs androgéniques en

l'absence de DHT. Par ailleurs, l'OMC n'inhibe pas l'activation des récepteurs androgéniques par le DHT.

- ***Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. (Schreurs et al., 2005)***

Ces travaux étudient le potentiel d'interaction de l'OMC (dissous dans de l'éthanol à 10^{-4} M) avec les récepteurs androgéniques (cellules U2-OS), à la progestérone (cellules U2-OS) et oestrogéniques (cellules 293HEK).

Afin de mesurer l'activité antioestrogénique de l'OMC, les cellules ont été incubées avec l'OMC ou du 17β -œstradiol à une concentration de 3 à 100 pM, pour les récepteurs hER α et hER β . Une faible activité oestrogénique est observée sur le récepteur hER α , néanmoins aucune activité sur le récepteur hER β n'est notée. Par ailleurs, aucune activité antioestrogénique n'est observée.

Comme dans l'étude de Ma et al. (2003), du DHT à une concentration de 0,1 nM a été utilisé afin de mesurer l'activité antiandrogénique. Les résultats montrent que l'OMC ne possède pas d'activité androgénique et ne réprime pas l'activité du DHT.

Enfin, concernant l'activité antiprogestatique, de l'ORG2058 a été utilisé comme témoin agoniste des récepteurs à la progestérone et du RU486 comme témoin antagoniste des récepteurs à la progestérone. Les résultats rapportent que l'OMC ne possède pas d'activité sur les récepteurs à la progestérone.

- ***Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. (Morohoshi et al., 2005)***

Le potentiel de liaison de l'OMC au récepteur hER α a été évalué dans cette étude, en absence et en présence de systèmes d'activation métabolique (S9 mix). Par ailleurs, l'activité agoniste/antagoniste oestrogénique de l'OMC a également été étudiée dans un modèle de levure (*S. cerevisiae*) exprimant les récepteurs hER α avec le gène de la β -galactosidase, toujours en absence ou en présence de S9 mix. L'OMC est dilué dans du DMSO. Les résultats montrent que l'OMC n'a pas d'activité oestrogénique dans ces deux tests. Les auteurs comparent leurs résultats à ceux de Schreurs et al. (2005) qui rapportent une faible activité oestrogénique de l'OMC. Ainsi, les auteurs supposent que la différence de résultats provient de la différence des concentrations utilisées. En effet, Morohoshi et al. (2005) ont utilisé des concentrations d'OMC respectivement de 37,5 μ M et de 10 μ M pour le premier et le deuxième test, alors que Schreurs et al. (2005) ont utilisé une concentration de 100 μ M.

- ***Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. (Seidlova-Wuttke et al., 2006b)***

Cette étude comporte deux parties : une partie *in vitro* avec des ER α et ER β et une partie *in vivo* sur rats femelles Sprague Dawley ovariectomisés (étude rapportée dans le paragraphe 3.3.4.2.).

Dans la partie *in vitro*, l'OMC ne présente pas d'activité oestrogénique ni pour l'ER α , ni pour l'ER β , à une concentration de 10^{-3} M.

- ***Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. (Kunz et al., 2006)***

Dans ces travaux l'OMC a été étudié dans un modèle de levure (*S. cerevisiae*) exprimant les récepteurs hER α avec le gène de la β -galactosidase. Les résultats de ce test montrent une absence d'activité oestrogénique de l'OMC. Néanmoins, l'OMC inhibe l'activité oestrogénique de l'E2 à forte concentration, $4 \cdot 10^{-3}$ M.

Par ailleurs, un autre test, toujours avec un modèle de levure (*S. cerevisiae*), a été réalisé afin de mesurer l'activité androgénique sur les récepteurs androgènes (AR). Les résultats montrent une légère activité androgénique de l'OMC avec une EC $_{50}$ de $1 \cdot 10^{-2}$ M versus $2 \cdot 10^{-9}$ M pour le DHT. Ainsi, Kunz et al. (2006) montrent une faible activité androgénique de l'OMC, activité non rapportée dans les précédentes études. Par ailleurs, l'OMC montre une activité antiandrogénique avec une IC $_{50}$ de $3 \cdot 10^{-4}$ M versus $4 \cdot 10^{-6}$ M pour le flutamide, substance antiandrogénique.

3.3.4.2. Etudes in vivo

- ***Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. (Schmutzler et al., 2004)***

Ces travaux étudient l'activité de l'OMC sur les hormones thyroïdiennes, chez des rats femelles Sprague Dawley ovariectomisées. Les animaux ont été traités durant 12 semaines par voie orale, l'OMC étant incorporé à l'aliment. Trois groupes, comportant 8 à 11 animaux chacun, ont été constitués. Un groupe a été traité par de l'OMC à la dose de 2,5 g/kg d'aliment et le deuxième par de l'OMC à la dose de 12,5 g/kg d'aliment. Le troisième groupe a été traité à la même dose que le deuxième groupe avec une présence de soja dans l'aliment (quantité non précisée), contenant un flavonoïde (la génistéine) connu pour modifier les fonctions thyroïdiennes. Les résultats des études avec aliment contenant ou non du soja ont pu ainsi être comparés. Les doses ingérées par les animaux correspondaient respectivement à 54, 285 et 266 mg/animal/jour (soit environ 180, 950, 886 mg/kg pc./j.) pour le premier, deuxième et troisième groupe. Après le traitement, les animaux ont été sacrifiés. Les organes ont été congelés à - 80°C puis analysés.

Sur le foie, les reins et le cœur des animaux, les auteurs déterminent l'impact de l'OMC sur l'enzyme malique connue pour constituer un marqueur de l'activité thyroïdienne. Dans le foie, l'OMC induit une légère stimulation de l'activité de cette enzyme malique chez tous les animaux traités mais de manière non significative. Par ailleurs, l'OMC associé au soja stimule également l'activité de l'enzyme malique mais cette fois, de manière significative. Dans le cœur, aucune différence d'activité de l'enzyme malique n'est notée pour les deux groupes traités par de l'OMC et de l'OMC associé au soja. Enfin, dans le rein, l'activité de l'enzyme malique est augmentée pour les deux groupes traités par de l'OMC seul.

Les auteurs étudient ensuite l'activité de la 5'deiodinase hépatique, connue pour être stimulée par les hormones thyroïdiennes T3. L'activité de cette enzyme a été significativement réduite pour tous les groupes traités par de l'OMC, y compris ceux traités par de l'OMC+soja.

Enfin, les animaux traités par de l'OMC seul ne présentent pas de modification des taux sériques en TSH ni en T3. Pour les taux sériques en T4, seuls les animaux traités à la plus faible dose, présentent une diminution significative de ces taux *versus* le groupe contrôle. Les animaux traités par de l'OMC+soja présentent une diminution significative des taux sériques en T4 et une augmentation significative en TSH *versus* le groupe contrôle.

Par conséquent, des effets de perturbation de l'axe thyroïdien sont observés dans cette étude sans toutefois présenter une logique sur son fonctionnement physiologique, notamment les rétrocontrôles. Les auteurs n'apportent pas non plus d'explication sur les résultats observés et en particulier que l'impact sanitaire chez l'Homme de ces mêmes effets.

- ***Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. (Klammer et al., 2005)***

Dans cette étude, un test utéro-trophique sur rongeurs a été réalisé. Il est à noter que le protocole suit les lignes directrices OCDE de 2001 en version « *draft* », la validation de ces lignes directrices a été effectuée en 2007 (OCDE 440), soit 2 ans après la publication de cet article. Les auteurs précisent que cette étude suit les BPL.

Des rats femelles Sprague Dawley ont été ovariectomisées à l'âge de 12 semaines, l'OCDE 440 recommande cette opération sur des femelles âgées entre 6 et 8 semaines. Par ailleurs, même si ce test peut être réalisé sur femelles ovariectomisées, il est préférable d'utiliser des femelles immatures. En effet, la méthode utilisant des femelles immatures, dont l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadique (HPG) est intact, est peut-être moins spécifique mais couvre un champ d'investigation plus large que celle pratiquée sur des animaux ovariectomisés, parce qu'elle est sensible à des substances qui interagissent avec l'axe HPG et non pas uniquement avec les récepteurs aux œstrogènes (OCDE 440).

Cinq groupes de rats femelles ont été traités quotidiennement pendant 5 jours par de l'OMC dans de l'huile d'olive à des doses de : 10, 33, 100, 333 et 1000 mg/kg pc./j., par gavage. Plusieurs paramètres ont été analysés dont les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Effets de l'OMC en comparaison avec de l'oestradiol, d'après Klammer et al. (2005)

Parameter	CTL	E2	OMC-1000	Type of change
Uterine wet weight (percent of bw)	0.029 ± 0.004	0.104 ± 0.013*	0.046 ± 0.0052*	Estrogenic
Uterus, C3 expression	100 ± 47	16830 ± 10491*	1378 ± 895*	Estrogenic
Uterus, ERβ expression	100 ± 28.8	12 ± 5.9*	144.3 ± 50.3*	Non-estrogenic
Pituitary, TERP1 expression	100 ± 33	5747 ± 2811*	631 ± 425*	Estrogenic
Liver, IGF1 expression	100 ± 14.1	53.6 ± 18.8*	70.7 ± 32*	Estrogenic
Leptin (ng/ml)	2 ± 0.69	0.93 ± 0.24*	2.15 ± 0.57	No effect
Cholesterol (mg/dl)	124.5 ± 12.5	45.2 ± 7.1*	97.6 ± 15.5*	Estrogenic
HDL (mg/dl)	84.1 ± 8.7	33.1 ± 6.9*	78.9 ± 11.6	No effect
LDL (mg/dl)	26.6 ± 7.1	4.3 ± 1.4*	12.7 ± 3*	Estrogenic
Triglyceride (mg/dl)	127.7 ± 40.1	132.8 ± 38.4	64.9 ± 8.9*	Non-estrogenic
Glucose (mg/dl)	267.1 ± 45.3	249.4 ± 39.6	231.4 ± 50.3	No effect

CTL, control; E2, estradiol-valerate; OMC-1000, 1000 mg/kg bodyweight per day treatment group. Data are shown as mean ± S.D., n = 8-12.

* p < 0.05 vs. CTL. All expression data are related to CTL = 100%.

Les auteurs ont calculé des NOAEL, LOAEL, BMD et BMDL à l'aide des résultats ci-dessus, ces valeurs sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Valeurs des NOAEL, LOAEL et BMD, d'après Klammer et al. (2005)

Parameter	NOEL	LOEL	BMD (5%)	BMDL	BMD1/BMD2
Uterine wet weight	100	333	29.9	10.8	1.5
Uterus, C3 expression	333	1000	269.4	55.4	1.2
Uterus, ERβ expression	333	1000	11.0	1.5	3.6
Pituitary, TERP1 expression	100	333	29.7	4.5	1
Liver, IGF1 expression	333	1000	858.3	46.8	1.1
Cholesterol	333	1000	914.0	364.1	1.1
LDL	333	1000	89.9	16.6	1
Triglyceride	333	1000	87.3	19.5	3.1

NOEL, no observed effect level; LOEL, lowest observed effect level; BMD, benchmark dose; BMD1/BMD2, BMD ratio of applied models. All values except BMD ratio are given in mg/kg bodyweight.

Ainsi, l'OMC ressort positif dans ce test utérotrophique sur rats femelles ovariectomisées puisqu'une augmentation du poids de l'utérus est observée pour les femelles traitées *versus* le contrôle. Néanmoins, les NOAEL, LOAEL, BMD et BMDL retenues ne peuvent pas être utilisées pour calculer une marge de sécurité, cet essai restant un essai de dépistage et de mécanistique et non une étude de toxicité générale et à long-terme permettant de mettre en évidence l'ensemble des effets systémiques.

- **Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC) – 2 filters of UV-light – on several uterine, vaginal and bone parameters.** (Seidlova-Wuttke et al., 2006a)

Dans cette étude, des rats femelles Sprague Dawley ovariectomisées ont été traitées pendant 3 mois. L'âge des animaux avant l'ovariectomie n'est pas précisé ; les animaux ont été ovariectomisés 2 semaines après leur arrivée.

Cinq groupes (11 animaux/groupe) ont été constitués :

- un groupe contrôle non traité et non ovariectomisé ;
- un groupe contrôle non traité mais ovariectomisé ;
- deux groupes traités par de l'OMC incorporé dans l'aliment, avec des doses de 57,5 et 275 mg pour 20 g d'aliment ;
- un groupe traité par de l'oestradiol 17β (E2), témoin positif, avec une dose de 0,6 mg pour 20 g d'aliment.

Les paramètres vaginaux, utérins et osseux ont été analysés.

Les résultats rapportés montrent chez les groupes traités comparés aux témoins pour les paramètres utérins :

- aucune modification du poids de l'utérus des groupes traités *versus* le groupe témoin négatif ;
- une augmentation significative de l'épaisseur au niveau de l'utérus de l'épithélium et de l'endomètre pour tous les groupes traités *versus* le groupe témoin négatif ;
- une augmentation significative de l'épaisseur du myomètre utérin pour les groupes traités par de l'E2 et de l'OMC à la plus faible dose *versus* le groupe témoin négatif ;
- une augmentation de l'expression des ER α pour les animaux traités à la plus faible dose *versus* le groupe témoin négatif (aucune modification n'est rapportée pour les ER β) ;
- des effets sur le récepteur de la progestérone et le récepteur à l'IGF-1 pour tous les groupes traités *versus* le groupe témoin négatif.

Les résultats montrent chez les groupes traités comparés aux témoins pour les paramètres vaginaux :

- aucun effet sur l'expression des ER β pour tous les groupes traités ;
- une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium vaginal pour tous les groupes traités ;
- une augmentation de l'expression du récepteur à la progestérone chez le groupe traité à la faible dose ;
- une augmentation de l'expression du récepteur à l'IGF-1 pour tous les groupes traités.

Les résultats montrent chez les groupes traités comparés aux témoins pour les paramètres osseux :

- une diminution significative de la densité osseuse pour les groupes traités, diminution observée aussi chez les femelles ovariectomisées non traitées ;
- une diminution significative de l'ostéocalcine pour le groupe traité à la plus forte dose ;
- une diminution significative du sérum C-terminal qui élimine les produits du collagène-1 α 1 pour le groupe traité à la plus faible dose.

▪ ***Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. (Seidlova-Wuttke et al., 2006b)***

Cette étude comporte deux parties : une partie *in vitro* concernant les récepteurs ER α et ER β (rapportée dans le paragraphe 3.3.4.1.) et une partie *in vivo* sur rats femelles Sprague Dawley ovariectomisées (âge non précisé). Les animaux ont été traités immédiatement après leur ovariectomie et ce, pendant 3 mois.

Quatre groupes (12 animaux/groupe) ont été constitués :

- un groupe contrôle non traité ;
- deux groupes traités par de l'OMC incorporé dans la nourriture, avec des doses de 53 et 279 mg pour 20 g de nourriture ;
- un groupe traité par de l'œstradiol 17 β (E2), témoin positif, avec une dose de 0,325 mg pour 20 g de nourriture.

Plusieurs paramètres ont été analysés : la LH, TSH, les T3 et T4, le cholestérol, HDL et LDL, les triglycérides et la leptine.

Les résultats rapportés montrent une légère augmentation significative du poids de l'utérus pour les animaux traités à la plus forte dose d'OMC *versus* le groupe témoin.

Concernant les paramètres analysés, les résultats rapportés montrent une augmentation significative du taux sérique en LH pour les animaux traités à la plus forte dose d'OMC, tandis qu'une diminution de ce taux est observée pour le groupe traité par de l'E2 *versus* le groupe témoin. Par ailleurs, une diminution significative du taux sérique en T4 pour le groupe traité à la plus faible dose est observée *versus* le groupe témoin. Néanmoins, aucun changement n'est observé quant aux taux sériques en TSH, en T3, ni pour les groupes traités par de l'OMC, ni par l'E2.

Au niveau du gain de poids, des diminutions significatives sont observées pour les 2 groupes traités par de l'OMC et le groupe traité par de l'E2 *versus* le groupe témoin.

Enfin, en ce qui concerne les paramètres lipidiques :

- une diminution significative du taux de cholestérol et d'HDL est observée pour les groupes traités par de l'OMC à la plus forte dose et pour celui traité par de l'E2 *versus* le groupe témoin ;
- une diminution significative du taux de LDL est observée pour le groupe traité par de l'OMC aux deux doses *versus* le groupe témoin ;

- une diminution significative du taux de triglycérides est observée pour le groupe traité par de l'OMC à la plus forte dose *versus* le groupe témoin.

Il est important de noter que les effets rapportés ci-dessus sont plus marqués chez les animaux traités par de l'E2 *versus* ceux traités par de l'OMC.

- ***Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate in vivo: a 5-day sub-acute pharmacodynamic study with ovariectomized rats. (Klammer et al., 2007)***

Les auteurs s'intéressent ici aux effets de l'OMC sur l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadique (HPG). Il est important de noter que des rats femelles ovariectomisées sont utilisées dans cette étude or, comme le précise la ligne directrice OCDE 440, l'axe HPG n'est pas intact chez ces animaux, il est donc préférable d'utiliser des rats femelles immatures.

Des rats femelles Sprague Dawley ont été ovariectomisées à l'âge de 12 semaines, la ligne directrice OCDE 440 recommande que cette intervention chirurgicale soit réalisée sur des animaux âgés de 6 à 8 semaines. Néanmoins, cette étude ne correspond pas à un test utérutrophique.

Plusieurs groupes d'animaux ont été constitués et traités quotidiennement pendant 5 jours de la façon suivante par de :

- l'E2 à une dose de 600 µg/kg pc./j. ou ;
- l'OMC aux doses de 10, 33, 100, 333 ou 1000 mg/kg pc./j.

L'exploration de l'axe HPG a consisté en l'analyse de plusieurs paramètres. Les résultats rapportés montrent :

- une diminution significative des taux sériques de T3 pour le groupe traité à la plus forte dose, de T4 et de TSH pour les groupes traités à 333 et à 1000 mg/kg pc./j. *versus* le groupe témoin ;
- l'expression de la TRH dans l'hypothalamus et d'un facteur-clé de la fonction thyroïdienne, le « sodium-iodide-symporter » (NIS), reste inchangée ;
- une augmentation significative de l'expression du récepteur à la TSH pour le groupe traité à la plus forte dose ;
- une activité identique de la thyroïde peroxydase (TPO) ;
- une diminution significative de l'activité de la 5'-deiodinase dans le foie pour les groupes traités à 333 et à 1000 mg/kg pc./j.

Aucun changement n'est observé pour le groupe traité par l'E2 pour ces paramètres.

- ***In vitro effect of octyl-methoxycinnamate (OMC) on the release of Gn-RH and amino acid neurotransmitters by hypothalamus of adult rats. (Carbone et al., 2010)***

Ces travaux consistent en l'étude des effets *ex vivo* de l'OMC sur l'axe Gn-RH chez le rat Wistar adulte. Ainsi, quatre groupes intacts (sans modification préalable telle qu'une castration ou un stérilisation des animaux) ont reçu une injection de véhicule correspondant à de l'huile de sésame (durée du traitement non précisée) ;

1. des mâles et des femelles intacts ont reçu une injection de véhicule correspondant à de l'huile de sésame (durée du traitement non précisée) ;
2. des mâles castrés et des femelles stérilisées ont respectivement reçu une injection de véhicule 48 et 72 h avant le sacrifice (la castration et la stérilisation ayant été réalisées 30 jours avant le sacrifice) ;
3. des mâles castrés ont reçu une injection de 1mg/kg pc. de propionate de testostérone dissous dans de l'huile de sésame 48 h avant le sacrifice ;
4. des femelles stérilisées ont reçu une injection de 20 µg/kg pc. d'E2 dissous dans de l'huile de sésame.

Le type d'injection n'est pas précisé.

Après le sacrifice, des fragments d'hypothalamus ont été prélevés à partir des cerveaux de tous les animaux. Une partie de ces fragments a été exposée à de l'OMC à une concentration de $2,63 \cdot 10^{-7}$ M et l'autre partie a constitué le groupe contrôle.

Les résultats montrent :

- o chez les rats mâles :
 - une diminution significative de la libération de Gn-RH des fragments d'hypothalamus traités par de l'OMC après prélèvement chez les rats intacts et les rats castrés traités avec de la testostérone, *versus* le contrôle ;

- une diminution significative de la libération de glutamate et une augmentation significative du GABA des fragments d'hypothalamus traités par de l'OMC après prélèvement chez les rats intacts et les rats castrés traités avec de la testostérone *versus* le contrôle.
- o chez les rats femelles :
 - une diminution significative de la libération de Gn-RH des fragments d'hypothalamus traités par de l'OMC après prélèvement chez les rats femelles non stérilisées et les rats femelles stérilisées traitées par de l'E2, *versus* le contrôle ;
 - une augmentation significative de la libération de Gn-RH des fragments d'hypothalamus traités par de l'OMC après prélèvement chez les rats femelles stérilisées traitées par de l'E2, *versus* le contrôle ;
 - une diminution significative de la libération d'aspartate et du glutamate des fragments d'hypothalamus traités par de l'OMC après prélèvement chez les rats femelles non stérilisées et stérilisées traitées par de l'E2, *versus* le contrôle. Aucun changement n'a été observé dans la libération de GABA.
- ***Effects of pre- and postnatal exposure of the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. (Axelstad et al., 2011)***

Le but de cette étude est d'une part d'évaluer le potentiel perturbateur endocrinien de l'OMC sur les systèmes de développement prénatal et d'autre part sur les hormones thyroïdiennes. Cette étude a également pour objectif d'investiguer de quelle manière les modifications des taux en hormones thyroïdiennes induites par l'OMC peuvent impacter sur le développement neurologiques des petits.

Des rats femelles Wistar gestantes de 3 jours (J3) ont été utilisées. Ainsi, quatre groupes (18 animaux par groupe) ont été constitués, dont un contrôle. Au jour 7 de la gestation (J7) jusqu'au 17^{ème} jour après la mise bas, les animaux ont été traités par de l'OMC dilué dans de l'huile de maïs à des doses de 0 (véhicule), 500, 750 et 1000 mg/kg pc./j. De nombreux paramètres ont été analysés. Seuls certains petits (1 ou 2 mâles et 1 ou 2 femelles par portée) ont été préservés jusqu'au 28^{ème} jour après la naissance afin d'être observés durant la puberté et l'âge adulte ; les autres petits ont été euthanasiés.

Les résultats rapportés sont les suivants :

- o gestation et croissance post-natale :
 - le gain de poids des mères a été significativement réduit pendant la gestation pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle néanmoins, une augmentation du gain de poids a été observée chez tous les groupes traités durant l'allaitement rééquilibrant ainsi les poids au moment du sevrage des petits ;
 - aucun changement n'a été observé pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle au niveau de la durée de gestation, du nombre de portées par animal, des pertes post-implantatoires, des mises bas prématurées, du nombre de petits, mâles ou femelles, par portée ;
 - aucune différence significative dans la distance ano-génitale et la rétention des mamelons n'a été notée pour les petits des groupes traités *versus* ceux nés du groupe contrôle ;
 - le poids des petits de tous les groupes traités a été significativement réduit *versus* les petits du groupe contrôle dès la naissance, les femelles des groupes traités ont néanmoins présenté une absence de différence de poids par rapport au groupe contrôle dès le 50^{ème} jour après la naissance et ce, jusqu'à la fin de l'étude ;
 - aucune différence significative n'a été notée au niveau de la maturation des organes sexuels notamment l'ouverture du vagin ou la séparation du prépuce.
- o taux hormonaux des mères et des petits :
 - une diminution significative des taux en T4 a été observée chez les mères au 15^{ème} jour de gestation et les petits au 15^{ème} jour après la naissance et ce, pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle ;
 - au 16^{ème} jour après la naissance, les petits femelles des groupes traités n'ont pas montré de différence significative dans les taux en T4 *versus* le groupe contrôle ;
 - aucune différence significative des taux de progestérone et d'œstradiol n'a été notée pour les mères de tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle ;

- au 28^{ème} jour après la naissance, les petits femelles de tous les groupes traités ont montré une diminution significative des taux de progestérone *versus* le groupe contrôle tandis qu'une diminution significative des taux en œstradiol n'a été notée qu'aux deux plus fortes doses ;
- chez les petits mâles, une diminution statistiquement significative au 16^{ème} jour après la naissance a été notée pour tous les groupes traités, néanmoins, les taux en testostérone étaient normaux à la fin de l'étude.

o poids des organes, histopathologie et expression des gènes chez les petits :

- une augmentation du poids relatif de la thyroïde a été notée pour les groupes traités aux deux plus fortes doses, l'histopathologie au 16^{ème} jour après la naissance n'a révélé aucun effet de l'OMC sur la thyroïde ;
- aucun effet de l'OMC n'a été noté sur l'épididyme après analyse histopathologique ;
- une diminution significative du poids relatif de la prostate accompagnée de changements histopathologiques (de manière dose-dépendante) du groupe traité à la plus forte dose a été notée ;
- une augmentation du poids relatif du foie des animaux traités aux deux plus fortes doses a été constatée alors que le poids relatif ni des surrénales, ni des épididymes, ni des ovaires, n'a été affecté par le traitement par de l'OMC ;
- aucun changement histopathologique du foie n'a été révélé ;
- aucun changement de l'expression des gènes des testicules, de la prostate et des surrénales n'a été observé ;
- aucun changement des poids de l'utérus et des ovaires n'a été observé.

o autres paramètres :

- les petits femelles ont montré une diminution de l'activité motrice aux deux plus fortes doses *versus* le groupe contrôle ;
- aucun autre changement significatif des groupes traités *versus* le groupe contrôle n'a été observé pour les autres paramètres comportementaux.

o taux hormonaux, poids des organes et qualité spermatique des petits à l'âge adulte :

- les poids corporels des mâles étaient plus faibles dans tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle mais pour rappel, cette diminution a été observée dès la naissance ;
- aucune différence de poids de la thyroïde, du foie, des ovaires et des utérus n'a été notée entre les groupes traités et le groupe contrôle ;
- le poids de la prostate pour le groupe traité à la plus forte dose était significativement diminué, accompagné de changements histopathologiques ;
- une diminution du nombre de spermatozoïdes a été notée pour les groupes traités *versus* le groupe contrôle sans que les paramètres de mobilité ne soient affectés.

Par conséquent, des effets sur la thyroïde, les hormones et organes reproducteurs, après traitement par de l'OMC, sont observés. Le tableau 4 résume les effets rapportés dans cette étude.

Tableau 4 : Résumé des effets de l'OMC rapportés dans l'étude d'Axelstad *et al.* (2011)

Endpoint	OMC dose
T ₄ levels in dams GD 15 and PND 15	Reduced at 500
T ₄ levels male offspring PND 16	Reduced at 500
Testosterone levels male offspring PND 16	Reduced at 500
Progesterone levels female offspring PND 28	Reduced at 500
Estradiol levels female offspring PND 28	Reduced at 500 (but not 1000)
Body weight female offspring PND 7-14	Reduced at 500
Body weight female offspring PND 21-50	Reduced at 1000
Body weight male offspring (all study)	Reduced at 500
Testes weight PND 16	Reduced at 750
Testes histology PND 16	Affected at 1000
Prostate weight PND 16	Reduced at 1000
Prostate histology PND 16	Affected at 750
Thyroid gland weight PND 16	Increased at 750
Liver weight PND 16	Increased at 750
Motor activity PNW 9 female	Reduced at 750
Motor activity PNW 17 female	Reduced at 1000
Motor activity adult male	Increased at 750 (but not 1000)
RAM performance male	Improved at 500 (but not 750)
Sperm count	Reduced at 500
Prostate weight adult	Reduced at 1000

3.4. CONCLUSIONS SUR LE DANGER

Le résumé des études présentées dans l'avis du CSSC (SCC, 1996) est généralement très succinct et de nombreuses précisions manquent dans ces études.

Le CSSC conclut à une faible toxicité aiguë de l'OMC. L'OMC semble être une substance faiblement irritante et faiblement sensibilisante chez l'animal. Les investigations chez l'homme ont montré que ce composé semble être rarement responsable de réactions allergiques. Concernant les données de sensibilisation relatives à l'OMC, disponibles dans la littérature scientifique, il en ressort que les cinnamates ne sont pas les filtres les plus photosensibilisants. Les benzophénones, en particulier la benzophénone 3 est la plus souvent responsable de photoallergie, de même que récemment l'octocrylène. Les cinnamates en tant que filtre UV, dont l'OMC, sont responsables parfois d'allergie de contact simple photoaggravée mais plus souvent de photoallergie de contact uniquement. Il ne semble pas y avoir d'allergie croisée avec les autres cinnamates.

Le potentiel génotoxique de l'OMC a été exploré et s'avère négatif. La NOAEL retenue par le CSSC pour le calcul de la MoS est de 450 mg/kg pc./j. issue de l'étude de 13 semaines chez le rat (voie orale) en raison des effets hépatiques rapportés à la dose de 1000 mg/kg pc./j.

En ce qui concerne l'absorption cutanée, un taux de 2 % a été retenu pour le calcul de la MoS. Il est difficile de vérifier ce taux d'absorption cutanée puisque les études sont peu décrites et aucun tableau de résultats avec les écarts-types n'est présenté. Néanmoins, il est à noter que le NTP (*National Toxicology Program*, 2008) précise que l'absorption cutanée de l'OMC correspondrait à une quantité inférieure à 3 %.

Ainsi, considérant l'absorption cutanée de 2 % et la NOAEL de 450 mg/kg pc./j., une MoS égale à 750 a été calculée par le CSSC.

Il est important de noter qu'aucune étude sur deux générations n'est disponible dans l'avis du CSSC de 1996. Par ailleurs, au vu des données rapportées par le CSSC, les études de développement semblent être de mauvaise qualité. Toutefois, des données de reprotoxicité sont disponibles dans la littérature scientifique.

Concernant le potentiel perturbateur endocrinien de l'OMC, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* sont présentes dans la littérature scientifique. Le tableau 5 (ci-après) résume les résultats des études *in vitro*.

Au vu des résultats des études *in vitro*, l'OMC présente des résultats négatifs dans les études *in vitro* de perturbation endocrinienne. Quelques études montrent de faibles activités oestrogénique, androgénique et antidrogénique mais à de fortes concentrations d'OMC.

Tableau 5 : Résumé des résultats des études *in vitro* évaluant le potentiel PE de l'OMC

Effets étudiés	Résultats	Références
Activité androgénique	Négatif (10^{-5} M)	Ma <i>et al.</i> , 2003
Activité oestrogénique	Faible affinité pour ER α (100 μ M) mais pas d'affinité pour ER β Négatif Négatif	Schreurs <i>et al.</i> , 2005
Activité androgénique		
Activité progestatique		
Activité oestrogénique	Négatif (10 et 37,5 μ M)	Morohoshi <i>et al.</i> , 2005
Activité oestrogénique	Négatif (10^{-3} M)	Seidlova-Wuttke <i>et al.</i> , 2006a
Activité oestrogénique	Faible activité oestrogénique ($4 \cdot 10^{-3}$ M)	Kunz <i>et al.</i> , 2006
Activité androgénique	Faible activité androgénique ($EC_{50} = 10^{-2}$) Faible activité antiandrogénique ($IC_{50} = 10^{-4}$)	

En ce qui concerne les études *in vivo* issues de la littérature scientifique, elles sont généralement d'ordre mécanistique, hormis l'étude sur deux générations de Schneider *et al.* (2005). Dans ces études, les effets observés concernent principalement l'étude de la régulation thyroïdienne.

Ainsi, les taux sériques en T4 sont diminués dans de nombreuses études (Schmutzler *et al.*, 2004 ; Seidlova-Wuttke *et al.*, 2006a ; Klammer *et al.*, 2007 et Axelstad *et al.*, 2011). Par ailleurs, deux études font état d'une diminution significative de l'activité de la 5'deiodinase (enzyme stimulée par les hormones thyroïdiennes) dans le foie des rats traités par de l'OMC (Schmutzler *et al.*, 2004 ; Klammer *et al.*, 2007). Enfin, dans l'étude d'Axelstad *et al.* (2011), une augmentation du poids de la thyroïde a été observée chez les petits à la dose de 750 mg/kg pc./j. Toutefois, les auteurs n'expliquent pas ces effets thyroïdiens et précisent que d'autres travaux sont nécessaires afin de déterminer le mécanisme d'action de l'OMC sur les fonctions thyroïdiennes.

A de fortes doses d'OMC, supérieures à 750 mg/kg pc./j., d'autres effets sur les organes reproducteurs sont observés dans l'étude d'Axelstad *et al.* (2011). Par ailleurs, un test utérutrophique s'est révélé positif à 1000 mg/kg pc./j. (Klammer *et al.*, 2005).

La plupart de ces études relatives au potentiel perturbateur endocrinien, ne permettent pas de retenir une NOAEL. Néanmoins, il est important de noter que les effets rapportés se situent à des doses supérieures ou égales à 500 mg/kg pc./j., ce qui conforte le choix de la NOAEL de 450 mg/kg pc./j. retenue dans l'étude de Schneider *et al.*, (2005) sur la base des paramètres de fertilité et de reproduction mais aussi pour la toxicité parentale et de développement. Cette NOAEL est basée sur la réduction des poids corporels, l'augmentation du poids du foie, l'éosinophilie cytoplasmique hépatique, la diminution du poids corporel et le retard de maturation sexuelle des petits à la dose de 1000 mg/kg pc./j. Il est important de noter que cette NOAEL est égale à la NOAEL retenue par le CSSC pour le calcul de la MoS. En effet, le CSSC a retenu dans son évaluation une NOAEL de 450 mg/kg pc./j. issue de l'étude de 13 semaines chez le rat (voie orale) en raison des effets hépatiques rapportés pour la dose de 1000 mg/kg pc./j.

4. Exposition et évaluation du risque

En réponse au courrier du 9 septembre 2010 envoyé aux représentants de l'industrie cosmétique, il apparaît que l'OMC est utilisé actuellement en France dans les types de produits cosmétiques suivants :

- produits de protection solaire : concentration maximale : 10 % ;
- baume à lèvres : concentration maximale : 7,5 % ;
- gel douche : concentration maximale : 0,12 % ;
- huile : concentration maximale : 0,2 %.

Le tableau 6 résume l'exposition à l'OMC en fonction des catégories de produits cosmétiques appliqués.

Tableau 6 : Exposition à l'OMC en fonction des catégories de produits cosmétiques appliqués

Paramètres	Produits de protection solaire		Baume lèvres	Gel douche	Huile
Concentration en OMC	10 %		7,5 %	0,12 %	0,20 %
Quantité d'exposition quotidienne (g/j.)	18	36	0,057	0,19	7,82 (non défini par le CSSC, assimilation à une lotion corporelle)
Quantité relative d'exposition quotidienne (mg/kg pc./j.)	-	-	0,95	3,17	130,3
Taux d'absorption cutanée (%)	2	2	2	2	2
SED (mg/kg pc./j.)	0,6	1,2	$1,43 \cdot 10^{-3}$	$7,6 \cdot 10^{-5}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$

D'après le tableau des résultats, la SED maximaliste retenue est de 0,6 mg/kg pc./j. pour 18 g de quantité appliquée et 1,2 mg/kg pc./j. pour 36 g de quantité appliquée. Considérant une NOAEL de 450 mg/kg pc./j., la MoS peut être calculée de la façon suivante :

MoS = NOAEL/SED

MoS = 750 (pour 18 g)

MoS = 375 (pour 36 g)

5. Conclusion générale

Les études *in vitro*, issues de la littérature scientifique montrent de faibles activités oestrogénique, androgénique et antidrogénique de l'OMC à fortes doses.

In vivo, des effets sur les organes reproducteurs sont observés dans une étude, après exposition à de fortes doses d'OMC, de 750 jusqu'à 1000 mg/kg pc./j. (Axelstad *et al.*, 2011). Par ailleurs, un test utérothrophique s'est révélé positif à 1000 mg/kg pc./j. (Klammer *et al.*, 2005). Les autres études issues de la littérature scientifique s'intéressent principalement aux effets thyroïdiens sans toutefois pouvoir mettre en exergue un mécanisme d'action et en expliquer l'impact pour la santé humaine.

L'étude de Schneider *et al.* (2005), sur deux générations, est l'étude pertinente retenue dans cette évaluation. De plus, elle est conforme aux lignes directrices OCDE 416 et aux BPL. Les effets pertinents, permettant de retenir une NOAEL de 450 mg/kg pc./j., sont basés sur la réduction du poids corporel, l'augmentation du poids du foie, l'éosinophilie cytoplasmique hépatique et le retard de maturation sexuelle des petits à la dose de 1000 mg/kg pc./j.

En tenant compte de cette NOAEL et d'une exposition maximaliste, des MoS de 750 et 375 respectivement pour 18 g et 36 g de quantité appliquée, peuvent être calculées. Par conséquent, sur la base des données disponibles, l'utilisation de l'OMC dans les produits cosmétiques à une concentration maximale de 10 %, ne semble pas présenter un risque pour la santé des consommateurs dans les conditions prévisibles d'utilisation.

6. Références bibliographiques

- Axelstad M., Boberg J., Hougaard K.S., Christiansen S., Jacobsen R.P., Mandrup K.R., *et al.* (2011). Effects of pre- and postnatal exposure of the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 250: 278-290.
- Bryden A.M., Moseley H., Ibbotson S.H., Chowdhury M.M., Beck M.H., Bourke J., *et al.* (2006). Photopatch testing of 1155 patients: Results of the UK multicenter photopatch study group. *British Journal of Dermatology*, 155: 737-747.
- Carbone S., Szwarcfarb B., Reynoso R., Ponzo O.J., Cardoso N., Ale E., *et al.* (2010). In vitro effect of octyl-methoxycinnamate (OMC) on the release of Gn-RH and amino acid neurotransmitters by hypothalamus of adult rats. *Experimental and Clinical Diabetes*, 118: 298-303.
- Collaris E.J. and Frank J. (2008). Photoallergic contact dermatitis caused by ultraviolet filters in different sunscreens. *International Journal of Dermatology*, 47: 35-37.
- Ferriols A.P. and Boniche A.A. (2000). Photoallergic eczema caused by sunscreens in a 12-year-old girl. *Contact Dermatitis*, 43: 229-230.
- Helsing P. and Austad J. (1991). Contact dermatitis mimicking photodermatosis in a 1-year-old child. *Contact Dermatitis*, 24: 140-141.
- Inui M., Adachi T., Takenaka S., Inui H., Nakazawa M., Ueda M., Wanatabe H., *et al.* (2003). Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology*, 194: 43-50.
- Janjua N.R., Mogensen B., Andersson A.M., Petersen J.H., Henriksen M., Skakkebaek N.E. *et al.* (2004). Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene) camphor after whole body topical application and reproductive hormone levels in humans. *Journal of Investigative Dermatology*, 123: 57-61.
- Kimura K. and Katoh T. (1995). Photoallergic contact dermatitis from the sunscreen ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX). *Contact Dermatitis*, 32: 304-305.
- Klammer H., Schlecht C., Wuttke W., Jarry H. (2005). Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate in vivo: a 5-day sub-acute pharmacodynamic study with ovariectomized rats. *Toxicology*, 215: 90-96.
- Klammer H., Schlecht C., Wuttke W., Schmutzler C., Gotthardt I., Köhrle J., *et al.* (2007). Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology*, 238: 192-199.
- Kunz P.Y., Galicia F., Fent K. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicological Sciences*, 90: 349-361.
- Leonard F., Adamski H., Bonneville A., Bottlaender A., Bourrain J.L., Goujon-Henry C., *et al.* (2005). Etude prospective multicentrique 1991-2001 de la batterie standard des photopatch-tests de la Société Française de Photodermatologie. *Annales de Dermatologie et Vénéréologie*, 132 : 213-220.
- Ma R., Cotton B., Lichtensteiger W., Schlumpf M. (2003). UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences*, 74: 43-50.
- Morohoshi K., Yamamoto H., Kamate R., Shiraishi F., Koda T., Morita M. (2005). Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in vitro*, 19:457-469.

National Toxicology (2008). NTP Research Concept: 2-Ethylhexyl *p*-Methoxycinnamate.
En ligne : http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/Noms/Final_ResConcept/EHMC.pdf

Pentiga S.E., Kuik D.J., Bruynzeel D.P., Rustemeyer T. (2009). Do "cinnamon sensitive" patients react to cinnamate UV filters? *Contact Dermatitis*, 60: 210-213.

Pigatto P.D., Guzzi G., Schena D., Guarrera M., Foti C., Francalanci S., *et al.* (2008). Photopatch tests: an Italian multicentre study from 2004 to 2006. *Contact Dermatitis*, 59: 103-108.

Rodriguez E., Valbuena M.C, Rey M., Porras De Quintana L. (2006). Causal agents of photoallergic contact dermatitis diagnosed in the national institute of dermatology of Colombia. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, 22: 189-192.

Scalf L.A., Davis M.D., Rohlinger A.L., Connolly S.M. (2009). Photopatch testing of 182 patients: a 6 year experience at the mayo clinic. *Dermatitis*, 20: 44-52.

Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V. Steinmann, B. and Lichtensteiger, W. (2001). *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives*, 109: 3: 239-244.

Schmutzler C., Hamanna I., Hofmann P.J., Kovacs G., Stemmler L., Mentrup B. *et al.* (2004). Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205 : 95-102.

Schneider S., Deckardt K., Hellwig J., Küttler K., Mellert W., Schulte S., *et al.* (2005). Octyl methoxycinnamate: two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1083-1092.

Schreurs R.H.M.M., Sonneveld E., Jansen J.H.J., Seinen W., Van der Burg B. (2005). Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Science*, 83: 264-272

Scientific committee on cosmetology (SCC). (1996). Opinion on 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (Colipa S28).

Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers (SCCNFP). (2001). Opinion on the evaluation of potentially estrogenic effects of UV-filters adopted by the SCCNFP.

En ligne :

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/sccnfp_opinions_97_04/sc_cp_out145_en.htm

Seidlova-Wuttke D., Jarry H., Christoffel J., Rimoldi G., Wuttke W. (2006a). Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC) – 2 filters of UV-light – on several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210: 246-254.

Seidlova-Wuttke D., Christoffel J., Rimoldi G., Jarry H., Wuttke W. (2006b). Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 214: 1-7.

Wong T. and Orton D. (2011). Sunscreen allergy and its investigation. *Clinics in Dermatology*, 29: 306-310.