

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Élaboration de VTR fondées sur les effets reprotoxiques

- Avis de l'Afsset
- Rapport d'expertise collective



Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 8 avril 2010

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Relatif à l'élaboration de VTR fondées sur des effets reprotoxiques

Saisine Afsset n°2003/AS03

L'Afsset a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement et du travail et d'évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1336-1 du Code de la santé publique).

Dans le cadre du Plan national santé environnement (PNSE) 2004-2008, l'Afsset s'est auto-saisie en 2003 pour proposer une méthode de construction de valeurs toxicologiques de référence (VTR) fondées sur des effets reprotoxiques. Le 25 juillet 2007, l'Afsset s'est vu confiée la mission de construction de VTR par ses ministères de tutelles.

Contexte scientifique

La caractérisation du danger d'une substance a pour objectif, lorsque les données disponibles le permettent, la construction d'une VTR, indice toxicologique permettant d'établir une relation qualitative, voire quantitative, entre une exposition à une substance chimique et un effet sanitaire chez l'homme. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable.

Les VTR sont spécifiques d'un type d'effet, d'une substance, d'une durée d'exposition et d'une voie d'exposition. Leur construction diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance : on parle de VTR « à seuil de dose » pour les substances qui provoquent, au-delà d'une certaine dose, des dommages dont la gravité est proportionnelle à la dose absorbée et de VTR « sans seuil de dose », pour les substances pour lesquelles il existe une probabilité, même infime, qu'une seule molécule pénétrant dans l'organisme provoque des effets néfastes pour cet organisme.

Les VTR à seuil s'expriment comme des doses (ou concentrations) journalières admissibles et correspondent à une estimation théorique de la quantité de substance à laquelle un individu peut théoriquement être exposé sans constat d'effet sanitaire néfaste. Les VTR sans seuil s'expriment comme des excès de risque unitaire et correspondent à la probabilité théorique qu'un individu contracte une pathologie s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance.

Les VTR sont utilisées dans le cadre des évaluations des risques sanitaires. Il s'agit le plus souvent de prévenir l'apparition d'un effet dans une population exposée ou d'estimer un risque en fonction des niveaux d'exposition de la population étudiée.

Présentation de la question posée

En accord avec le plan d'action relatif aux éthers de glycol préparé par la Direction générale de la santé (DGS) et annoncé lors du Comité national de sécurité sanitaire du 26 février 2003, et avec l'action 21 du PNSE 2004-2008, l'Afsset s'est auto-saisie pour établir un programme national sur les VTR visant à la constitution d'une expertise française solide et partagée par les différentes instances compétentes. Conformément à la demande originelle du Conseil supérieur d'hygiène public de France (CSHPF), et compte tenu des préoccupations nationales et internationales actuelles, le domaine des substances chimiques toxiques sur la reproduction et le développement embryofœtal présentes dans différents milieux de vie a été proposé en priorité.

Le 25 juillet 2007, le Directeur général de la santé (DGS) et le Directeur général de la prévention des risques (DGPR) ont saisi l'Afsset afin de soumettre au CES concerné les VTR proposées à l'issue de la phase pilote mise en place lors de l'élaboration de la méthode de construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques, à savoir le linuron, le di-n-butylphtalate (DnBP), le benzylbutylphtalate (BBP), le nonylphénol, le toluène et l'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE).

Organisation de l'expertise

Elaboration d'une méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement

Afin de proposer une méthode de référence pour la construction de VTR pour les substances toxiques sur la reproduction et le développement et d'identifier quelles pourraient être les substances prioritaires devant faire l'objet de la construction de telles VTR, l'Afsset a mis en place en 2004 un groupe de travail inter établissements regroupant l'Ineris, l'INRS, l'Afssa, l'InVS, l'ENSP, le Cnam, l'Inserm, le CNRS, les CAP et l'UIC. Cette réflexion, qui s'inscrit dans un contexte européen, vise principalement à développer une analyse critique sur le choix et la construction de VTR pour les substances chimiques reprotoxiques les plus préoccupantes. Parallèlement, le groupe de travail s'est réuni à 12 reprises entre 2004 et 2006, et a rendu deux rapports d'expertise :

- Un rapport intitulé « Identification d'une liste de substances toxiques pour la reproduction et le développement, et proposition d'une méthode de hiérarchisation pour l'analyse des valeurs toxicologiques de référence ». Ce rapport a été présenté au Comité d'experts spécialisés (CES) « évaluation des risques liés aux substances chimiques » le 28 janvier 2005 ;
- Un rapport intitulé « Document de référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques », présenté au CES évaluation des risques liés aux substances chimiques le 29 septembre 2006 ;

Ces 2 rapports ont fait l'objet d'un avis de l'Agence daté du 16 avril 2007 ; l'ensemble de ces documents sont publiés sur le site internet de l'Afsset.

Elaboration de VTR de substances reprotoxiques dans le cadre d'une phase pilote

Dans le cadre du développement de la méthode de construction de VTR reprotoxiques, une phase pilote a été réalisée pour « tester » la méthodologie proposée par le groupe de travail sur quelques substances modèles. A cette fin, l'Agence a fait appel à différents organismes d'expertise prestataires pour construire, selon le document de référence du groupe de travail, les VTR reprotoxiques des substances suivantes :

- Toluène (INERIS)
- Ether éthylique de l'éthylène glycol ou EGEE (INERIS)
- Linuron (Vincent Nedellec Consultant)
- Benzyl butyl phtalate ou BBP (Vincent Nedellec Consultant)
- Nonylphenol (ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise)
- Di-n-butyl-phtalate ou DnBP (ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise)

La construction et les propositions de VTR pour les six substances étudiées lors de la phase pilote font l'objet des annexes 2 et 3 du « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques. Afsset. Décembre 2006 » disponible en ligne sur <http://www.afsset.fr>. L'élaboration de ces VTR avait pour objet de valider la méthode proposée et les valeurs obtenues n'avaient donc pas fait l'objet d'un avis du CES.

Le 25 juillet 2007, le Directeur général de la santé (DGS) et le Directeur général de la prévention des risques (DGPR) ont demandé à l'Afsset par courrier de faire valider ces VTR proposées à l'issue de la phase pilote. L'Afsset a subséquemment confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine lors de sa séance du 20 septembre 2007. Le CES a mandaté un expert rapporteur pour chaque substance, nommés par décision du Directeur général de l'Afsset, avec pour mission de :

- faire une relecture attentive et une analyse critique du rapport du prestataire ;
- réaliser une analyse critique des choix effectués aux différentes étapes de la construction de VTR au regard des éléments disponibles dans la méthode de construction des VTR pour les effets sur la reproduction et le développement ;
- faire une analyse critique des données bibliographiques publiées depuis la parution de ce rapport ;
- participer à la rédaction du rapport d'expertise collective.

Les travaux des experts rapporteurs ont été soumis et discutés par le CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques aux séances des 29 mai 2008, 10 juillet 2008, 25 septembre 2008, 23 octobre 2008, 27 novembre 2008, 22 janvier 2009, 25 juin 2009 et 17 septembre 2009.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

Le présent avis se fonde, pour ce qui concerne les aspects scientifiques, sur les rapports des organismes experts prestataires regroupés dans le document de référence de l'Afsset, décembre 2006, annexe 2 cité ci-dessus, sur les rapports d'expertise qui ont été adoptés par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » entre le 16 juin 2008 et le 17 septembre 2009 et sur les notes de synthèse du CES :

- **Le linuron** : Validation de VTR fondées sur des effets reprotoxiques : le linuron (CAS 330-55-2). Version finale. Mai 2008 ; Note de synthèse adoptée le 16 juin 2008 ;
- **Le benzylbutylphthalate** : Validation de VTR fondées sur des effets reprotoxiques : le benzylbutylphthalate (CAS 85-68-7). Version finale. Août 2008 ; Note de synthèse adoptée le 25 septembre 2008 ;
- **Le di-n-butylphthalate** : Validation de VTR fondées sur des effets reprotoxiques : le di-n-butylphthalate (CAS 84-74-2). Version finale. Août 2008 ; Note de synthèse adoptée le 25 septembre 2008 ;
- **Les nonylphénols** : Validation de VTR fondées sur des effets reprotoxiques : les nonylphénol (CAS 104-40-5, 84852-15-3, 25154-52-3, 90481-04-2). Version finale. Janvier 2009 ; Note de synthèse adoptée le 6 mars 2009 ;
- **Le toluène** : Validation de VTR fondées sur des effets reprotoxiques : le toluène (CAS 108-88-3). Version finale. Mars 2009 ; Note de synthèse adoptée le 23 avril 2009 ;
- **L'éther éthylique de l'éthylène glycol** : Validation de VTR fondées sur des effets reprotoxiques : l'éther éthylique de l'éthylène glycol (CAS 110-80-5). Version finale. Septembre 2009 ; Note de synthèse adoptée le 17 septembre 2009

Linuron (CAS 330-55-2): VTR reprotoxique par ingestion

- ▶ Le linuron est un herbicide de la famille des urées substituées. La population générale est exposée principalement par voie orale lors de l'ingestion d'aliments contaminés. Une VTR a ainsi été construite pour la voie orale.
- ▶ Il n'existe aucune donnée chez l'homme. Chez l'animal (rat), l'effet sur le développement de l'appareil reproducteur mâle (hypoplasie des testicules et des épидидymes) peut être retenu comme effet critique et est pertinent chez l'homme.
- ▶ Le mécanisme avancé (effet anti-androgénique par compétition avec la testostérone) est plausible.
- ▶ Depuis 2004, le linuron est classé par l'Union européenne (U.E.) comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 2 pour le développement et de catégorie 3 pour la fertilité en application de la Directive 67/548/CE.

L'Afsset propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement. Compte tenu des effets sur le développement de l'appareil génital également mis en évidence, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR est applicable pour une exposition subchronique chez l'homme et la femme.

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|---|---|---|
| Hypoplasie des testicules et des épидидymes | Absence de NOAEL LOAEL = 12,5 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ | 300 | VTR = 0,05 mg.kg⁻¹.j⁻¹ |
| Etude de toxicité prénatale orale chez le rat (GD12-GD21) | <u>Calcul d'une BMD</u> BMD ₀₅ = 18 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ BMDL₀₅ = 14 mg.kg⁻¹.j⁻¹ | UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3 | |
| McIntyre <i>et al.</i> 2000 | | | |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité

inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'une benchmark dose plutôt que d'une dose sans effet, GD : Gestation Day

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT

Parmi les effets précoces, survenant aux plus faibles doses, l'absence de régression des mamelons observée chez les rats mâles est un effet qui ne peut se produire chez l'homme. Néanmoins, il signe une perturbation de la différenciation sexuelle lors de l'embryogenèse, ce qui pourrait se traduire par un effet différent chez l'homme. En outre, la réduction de la distance ano-génitale est considérée comme un marqueur pertinent, facilement identifiable et mesurable chez l'homme et chez l'animal.

Les connaissances sur le caractère perturbateur endocrinien du linuron sont partielles : une seule espèce animale a été testée et l'atteinte de la fertilité n'a pas été étudiée. L'agence recommande donc de réévaluer la VTR en fonction des nouvelles publications scientifiques.

Di-n-butylphthalate (CAS 84-74-2) : VTR reprotoxique par ingestion

- ▶ Le di-n-Butylphthalate (DnBP) est un plastifiant de la famille des phtalates. Bien que l'exposition par voie respiratoire ou cutanée soit possible, l'exposition de la population générale est principalement orale. Il a donc été jugé pertinent de construire une VTR par voie orale.
- ▶ Les effets observés chez l'animal sont des effets sur le développement de l'appareil reproducteur mâle tels que des lésions testiculaires ou de l'épididyme, diminution de la distance anogénitale, augmentation du taux d'hypospadias, persistance des mamelons. Les effets observés chez l'animal paraissent pertinents pour l'homme. Ce point est argumenté par une étude récente chez l'homme qui a mis en évidence une relation entre l'exposition aux phtalates des mères pendant la grossesse et l'atténuation de l'action androgénique chez les bébés mâles.
- ▶ Le mécanisme avancé (effet anti-androgénique lié à une à une diminution importante de la sécrétion de testostérone avec principalement une atteinte des cellules de Sertoli) est plausible chez l'homme.
- ▶ Le métabolisme du DnBP chez l'homme et l'animal est similaire avec production d'un monoester commun (MBuP). Cependant, il existe des différences quantitatives de glucuroconjugaison des métabolites monoesters du DnBP chez le rat et chez l'Homme. Le CES attire l'attention sur l'absence de connaissances sur l'impact de ces différences et leurs conséquences éventuelles sur des variations de toxicité inter-espèces.
- ▶ Depuis 2001, le DnBP est classé par l'U.E. comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement et de catégorie 3 pour la fertilité en application de la Directive 67/548/CE.

L'Afsset propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement pendant la gestation, associé à une exposition subchronique chez l'homme et la femme.

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|---|--|--|
| Diminution spermatocytaire et dysplasies mamelonnaires observées dans la descendance Etude de toxicité prénatale orale chez le rat Sprague-Dawley (GD15-PND21) Lee <i>et al.</i> 2004 | Absence de NOAEL LOAEL = 2 mg.kg⁻¹.j⁻¹ Pas de construction de BMDL | 1000 UF_A 10 UF_H 10 UF_L 10 | VTR = 2 µg.kg⁻¹.j⁻¹ |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité

inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet, GD : Gestation Day, PND : Post Natal Day.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

La VTR est construite sur la base des connaissances actuelles. Or, l'état de ces connaissances sur la toxicité des phtalates dont les plus connus ont une toxicité sur le développement liée à leur activité de perturbateur endocrinien, diffère beaucoup d'une substance à une autre. Les études toxicologiques n'ayant pas été conduites selon les mêmes protocoles pour tous les phtalates, les LOAEL et les NOAEL issus de ces études ne peuvent être mis en regard et les VTR proposées ne peuvent être le reflet direct de la toxicité de ces substances.

Benzylbutylphtalate (CAS 85-68-7): VTR reprotoxique par ingestion

- ▶ Le benzylbutylphtalate (BBP) est un plastifiant de la famille des phtalates. Bien que l'exposition par voie respiratoire ou cutanée soit possible, l'exposition de la population générale est principalement orale. Il a donc été jugé pertinent de construire une VTR par voie orale.
- ▶ Aucune étude humaine ayant investigué les effets sur la reproduction ou le développement n'est disponible spécifiquement pour le benzylbutylphtalate (BBP), mais de nombreuses études ont été réalisées sur l'animal, en particulier pour évaluer les effets développementaux chez le rongeur. Le BBP est capable d'induire des effets sur le développement lors d'exposition *in utero* et des effets sur la fertilité lors d'exposition sur plusieurs générations chez l'animal (rat). Ces effets observés chez le rat paraissent pertinents pour l'homme bien que des différences de métabolites aient été constatées. La diminution de la distance anogénitale peut être retenue comme effet critique.
- ▶ Le mécanisme avancé (perturbation endocrinienne par action anti-androgène) est plausible.
- ▶ Depuis 2004, le BBP est classé par l'UE comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement et de catégorie 3 pour la fertilité en application de la Directive 67/548/CE.

L'Afsset propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement. Compte tenu des effets mis en évidence sur le développement de l'appareil génital, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique (pendant la durée de la gestation). Par manque de données chez la femme, cette VTR s'applique par défaut aux deux sexes.

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|--|--|
| Diminution de la distance anogénitale chez les descendants mâles Etude sur deux générations chez le rat Sprague Dawley exposé par gavage Tyl <i>et al.</i> 2004 | NOAEL = 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹ LOAEL = 250 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Pas de construction de BMDL | 100 UF_A 10 UF_H 10 | VTR = 0,5 mg.kg⁻¹.j⁻¹ |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

Compte tenu des différences de métabolisme entre l'animal et l'homme, l'agence recommande de réaliser une veille scientifique sur le métabolisme du BBP afin de mieux connaître les

métabolites qui seraient responsables de la toxicité reproductive du BBP. Cette veille bibliographique permettra de réévaluer la VTR à l'issue de la publication de nouvelles données. Il est également proposé de réaliser une veille scientifique sur les études de toxicité sur le développement conduites selon le même protocole que l'étude de Lee *et al.* (2004) qui a investigué les effets du di-n-butylphtalate (DnBP) sur le développement et a mis en évidence une diminution spermatocytaires et des dysplasies mamelonnaires pour des doses aussi faibles que $2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Compte tenu de la différence dans les protocoles d'études toxicologiques retenues, l'existence d'un LOAEL plus fort pour le BBP n'implique pas qu'il soit moins toxique que le DnBP.

Nonylphénols (CAS 104-40-5, 84852-15-3, 25154-52-3, 90481-04-2) : VTR reprotoxique par ingestion

- ▶ Les nonylphénols constituent une famille de composés. Bien que l'exposition par voie respiratoire ou cutanée soit possible, la voie orale est la principale voie d'exposition en population générale. Il a donc été jugé pertinent de construire des VTR par voie orale, une pour les composés linéaires et une autre pour les composés ramifiés.
- ▶ Aucune donnée humaine n'est disponible. Chez l'animal, des effets sur les ovaires, l'ouverture vaginale et le développement de la glande mammaire. Les effets de type œstrogénique peuvent être retenus comme effet critique. Ces effets observés chez le rat sont pertinents chez l'homme.
- ▶ Le mécanisme avancé (action œstrogénique) est plausible et corrélé aux effets mis en évidence.
- ▶ Depuis 2004, le 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3) et le n-nonylphénol (CAS 25154-52-3) sont classés par l'UE comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 3 pour le développement et la fertilité en application de la Directive 67/548/CE.

L'Afsset propose ainsi la construction de deux VTR, l'une pour le nonylphénol linéaire et l'autre pour le nonylphénol ramifié, spécifiques aux effets sur le développement et la reproduction. Compte tenu des effets sur le développement, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique. Par manque de données chez le mâle, cette VTR s'applique par défaut aux deux sexes.

-- Nonylphénol ramifié CAS 90481-04-2 et 84852-15-3 --

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|---|---|--|
| Effets sur le développement de la glande mammaire Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez les rates Long Evans Moon <i>et al.</i> , 2007 | Absence de NOAEL LOAEL = $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ Pas de construction de BMDL | 300 UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3 | VTR = $0,03 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

-- Nonylphénol linéaire CAS 25154-52-3 et 104-40-5 --

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|---|---|--|
| Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce (F1) Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rates Sprague-Dawley Nagao <i>et al.</i> , 2001 | NOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ LOAEL = 50 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ Pas de construction de BMDL | 300 UF _A 10 UF _H 10 UF _D 3 | VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_D : Insuffisance de données

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

Il est important de souligner que l'on ne dispose pas des mêmes informations pour la construction des VTR des 2 types de nonylphénol. En effet, la VTR du nonylphénol ramifié est fondée sur des effets sur le développement de la glande mammaire (Moon *et al.*, 2007) alors que ces effets n'ont pas été étudiés spécifiquement pour le nonylphénol linéaire dans l'étude de Nagao *et al.*. Ainsi, l'agence recommande de réaliser une veille scientifique qui permettrait de réévaluer la VTR du nonylphénol linéaire lorsque de nouvelles données prenant en compte ce type d'effet seront publiées.

Enfin, l'Afsset recommande d'étudier les effets des différents isomères de nonylphénols isolément afin d'apprécier l'influence de la longueur de la chaîne principale et de permettre une comparaison des effets toxiques d'une exposition à ces substances chimiques structuralement proches.

Toluène (CAS 108-88-3) : VTR reprotoxique par inhalation

- ▶ Le toluène est une substance chimique volatile largement utilisée. Compte tenu de ses propriétés physico-chimiques et de ses usages, la principale voie d'exposition chez l'homme est la voie inhalée.
- ▶ Chez l'animal (rat), le toluène serait à l'origine d'une diminution de poids à la naissance, effet retenu comme effet critique, mais également de retards de développement post-natal, de diminution du nombre de spermatozoïdes et du poids de l'épididyme. Il existe quelques études humaines qui viennent conforter ces conclusions.
- ▶ Les effets observés chez l'animal (rat) sont retenus par défaut pour l'homme car les mécanismes d'action ne sont pas connus.
- ▶ Depuis 2004, le toluène est classé par l'UE comme substance reprotoxique de catégorie 3 pour le développement chez l'homme en application de la Directive 67/548/CE.

L'Afsset propose ainsi la construction d'une VTR inhalation, spécifique aux effets sur le développement, pour une exposition aiguë par inhalation, pour tenir compte de l'absence de connaissances sur le mécanisme d'action et la période critique de sensibilité. Cette VTR protège aussi des effets sur la fertilité (Afsset, 2007 ; INERIS-Toluène, 2006). Elle est applicable chez l'homme et la femme.

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|--|----------------------------------|
| Diminution du poids de la progéniture (génération F1) Etude sur deux générations chez des rates Wistars Roberts, 2003 | NOAEL = 1875 mg.m ⁻³ LOAEL = 7500 mg.m ⁻³ Pas de construction de BMDL <u>Ajustement temporel</u> NOAEL_{ADJ} = 468,75 mg.m⁻³ | 100 UF _A 10 UF _H 10 | VTR = 5 mg.m⁻³ |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

* Coefficients allométriques : NEANT. Facteur de conversion temporelle : par précaution et en l'absence de lignes directrices précises sur ce thème, le NOAEL de 1875 mg.m⁻³ a été transformé pour tenir compte d'une exposition continue (24 heures sur 24), selon la loi de Haber, car les rats n'étaient exposés que 6 heures sur 24. Ce facteur est justifié par une affinité du toluène pour les graisses, ce qui lui confère un grand volume de distribution et par une cinétique d'élimination longue.

L'étude d'Ono et al. (1996) a décrit un effet sur le poids de l'épididyme et une diminution du nombre de spermatozoïdes chez le rat à la dose de 7500 mg.m⁻³ (2000 ppm) en présence d'une toxicité générale systémique. Considérant que l'étude de Roberts et al. (2003) n'a pas fait mention de ces effets sur la fertilité décrits dans l'étude d'Ono et al. (1996), l'agence attire l'attention sur l'existence possible d'effets sur la fertilité humaine et estime qu'il est nécessaire de poursuivre ces travaux pour améliorer les connaissances des effets sur la fertilité et ainsi pouvoir estimer le risque chez l'homme.

L'Afsset attire l'attention sur le fait que la VTR proposée pour les effets reprotoxiques (toxicité sur le développement) ne protège pas d'autres effets toxiques, en l'occurrence d'effets neurologiques, et n'est donc pas protectrice vis-à-vis de la toxicité neurologique. L'agence recommande donc une analyse critique des VTR existantes fondées sur les effets neurologiques du toluène, et le cas échéant, l'élaboration d'une telle VTR.

Ether éthylique de l'éthylène glycol (CAS 110-80-5) : VTR reprotoxique par inhalation

- ▶ L'Ether éthylique de l'éthylène glycol (EGEE) est un éther de glycol, appelé également 2-éthoxyéthanol. Il fait partie de la famille des éthers de glycol de la série E (éthylénique). La population générale est exposée principalement par inhalation et par absorption cutanée lors d'utilisation de produits de consommation courante. Des VTR ont ainsi été construites pour la voie inhalée.
- ▶ L'EGEE entraîne chez l'animal comme chez l'homme des effets sur les organes reproducteurs mâles (diminution du poids des testicules et de l'épididyme, dégénérescence des tubes séminifères, diminution du taux de spermatozoïdes et de leur motilité, augmentation des spermatozoïdes anormaux et azoospermie) ainsi que des effets sur le développement (augmentation des pertes préimplantatoires, résorptions fœtales et de la mortalité des embryons, diminution du poids du fœtus et du nombre de fœtus vivants par portée et augmentation de l'incidence des malformations des viscères et du squelette).
- ▶ Depuis 1993, l'EGEE est classé par l'UE comme substance reprotoxique de catégorie 2 pour le développement et pour la fertilité chez l'homme en application de la Directive 67/548/CE.

L'Afsset propose ainsi la construction de deux VTR inhalation, pour les effets sur la fertilité et pour les effets sur le développement.

- **VTR fertilité**

L'Afsset propose une VTR par inhalation spécifique aux effets sur la fertilité applicable pour une exposition chronique. Par manque de données chez la femme, cette VTR s'applique par défaut aux deux sexes.

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|--|---|---|-------------------------------------|
| Diminution du poids des testicules et de l'épididyme Etude de toxicité subchronique par inhalation chez des lapins mâles New Zealand White Barbee <i>et al.</i> , 1984 | NOAEL = 380 mg.m ⁻³ LOAEL = 1480 mg.m ⁻³ Pas de construction de BMDL <u>Ajustement temporel</u> NOAEL_{ADJ} = 68 mg.m⁻³ | 1000 UF _A 10 UF _H 10 UF _S 10 | VTR = 0,07 mg.m⁻³ |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_S : transposition d'une exposition subchronique à chronique

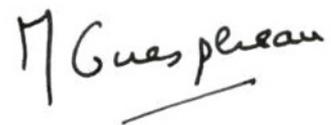
* Coefficients allométriques : NEANT. Facteur de conversion temporelle : par précaution et en l'absence de lignes directrices précises sur ce thème, le NOAEL de 380 mg.m⁻³ a été transformé pour tenir compte d'une exposition continue (24 heures sur 24), selon la loi de Haber, car les lapins n'étaient exposés que 6 heures sur 24 et 5 jours sur 7.

- **VTR développement**

Des effets sur le développement ont été mis en évidence chez l'animal. Cependant, en l'absence de données de qualité suffisante, l'Afsset n'a pas pu construire de VTR pour les effets sur le développement induits par l'EGEE.

Fait en quatre exemplaires,

Le Directeur général



Martin GUESPEREAU

Valeurs toxicologiques de référence (VTR) fondées sur les effets reprotoxiques

Elaboration de VTR reprotoxiques pour le linuron, le di-n-butylphtalate, le benzylbutylphtalate, les nonylphénols, le toluène et l'éther éthylique de l'éthylène glycol

Saisine n°« 2003/AS03 »

RAPPORT d'expertise collective

Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

Groupe de Travail « Valeurs Toxicologiques de Référence »

Novembre 2009

Mots clés

Linuron, di-n-butylphtalate, benzylbutylphtalate, nonylphénol, toluène, éther éthylique de l'éthylène glycol, reprotoxicité, développement, fertilité, valeurs toxicologiques de référence, dose critique, facteurs d'incertitude, effets santé, population générale.

Présentation des intervenants

GROUPE DE TRAVAIL « VALEURS TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE »

Pour l'Ether éthylique de l'éthylène glycol

Président

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise, Institut National de Recherche et de Sécurité

Membres

Mme Magali BOIZE – EDF- Service des études médicales

M. Radhouane CHAKROUN – Institut de Santé et de Sécurité au travail, Tunisie

M. Dany CHEVALIER – Université de Lille

M. Frédéric DOR – Institut de veille sanitaire

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Centre International de Recherche sur le Cancer

M. Michel FALCY – Institut National de Recherche et de Sécurité

M. Sébastien GIRAULT – Cephalon France

Mme Cécile KAIRO - Institut de veille sanitaire

Mme Bénédicte LA ROCCA – Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

M. Rémi MAXIMILIEN – Commissariat à l'Energie Atomique

Mme Bette MEEK - Université d'Ottawa, Canada

M. Jean-Ulrich MULLOT – Service de santé des Armées

M. Mostafa OULD-ELKHIM – Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

M. Alain-Claude ROUDOT – Université de Brest

Mme Sylvie TISSOT - Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

Mme Laurence VIAN – Université de Montpellier

RAPPORTEUR

- **Pour le linuron**

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur d'Université en Toxicologie et Sécurité Alimentaire, Pharmacien-Toxicologue, Institut National Polytechnique Toulouse, LGC/UMR CNRS 5503. Membre du Comité d'Experts Spécialisés « évaluation des risques liés aux substances chimiques ».

- **Pour le di-n-butylphtalate**

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise, INRS. Membre du CES « évaluation des risques liés aux substances chimiques » de l'Afsset.

- **Pour le benzylbutylphthalate**

Mme Annie LAUDET-HESBERT – Pharmacien toxicologue, retraitée de l'INRS, membre du CES « évaluation des risques liés aux substances chimiques »

- **Pour les nonylphénols**

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche INRA, Directeur de l'UMR 406 et du Laboratoire de Toxicologie Environnementale, INRA d'Avignon. Membre du Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

- **Pour le toluène**

M. Luc FERRARI – Pharmacien toxicologue. Membre du Comité d'Experts Spécialisés « évaluation des risques liés aux substances chimiques.

M. Alain-Claude ROUDOT – Enseignant chercheur en statistique et analyse de risque. Membre du Comité d'Experts Spécialisés « évaluation des risques liés aux substances chimiques.

- **Pour l'éther éthylique de l'éthylène glycol**

M. Frédéric DOR – Institut de veille sanitaire. Membre du Groupe de Travail « Valeurs toxicologiques de référence ».

M. Radhouane CHAKROUN – Institut de Santé et de Sécurité au travail, Tunisie. Membre du Groupe de Travail « Valeurs toxicologiques de référence ».

ADOPTION DU RAPPORT PAR LE COMITE D'EXPERTS SPECIALISES

Ce rapport a été soumis pour commentaires au CES :

- Evaluation des risques liés aux substances chimiques – 29 mai 2008, 16 juin 2008, 10 juillet 2008, 25 septembre 2008, 23 octobre 2008, 27 novembre 2008, 22 janvier 2009, 25 juin 2009 et 17 septembre 2009

Président

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie

Membres

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des Universités en biologie environnementale

Mme Claire BEAUSOLEIL – Pharmacien toxicologue responsable des évaluations européennes des substances chimiques. Démission le 28 septembre 2009.

M. Luc BELZUNCES – Directeur de recherche, responsable du laboratoire de toxicologie environnementale à l'INRA

Mme Christine CEZARD – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

M. Michel DESLAURIERS – Médecin toxicologue, pôle de toxicologie industrielle

M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET – Evalueur de risque en santé environnement

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Pharmaco-toxicologue

M. Olivier FARDEL – Professeur des Universités en toxicologie

Mme Hélène FENET – Pharmacien, Maître de conférence en sciences de l'environnement et santé publique

M. Luc FERRARI – Pharmacien toxicologue

M. Luc FONTANA – Maître de Conférences des Universités – Praticien hospitalier, Médecine, Santé au travail

Mme Nathalie FOUILHE SAM-LAI – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

Mme Barbara GOUGET – Chercheur en toxicologie des contaminants physico-chimiques. Démission le 1^{er} juillet 2009.

Mme Dominique GUENOT – Chercheur en cancérologie et neurosciences

M. Cong Khanh HUYNH – Dr ès Science, ingénieur chimiste spécialisé en santé au travail

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise

Mme Béatrice LALERE – Docteur en chimie analytique et en environnement

Mme Annie LAUDET-HESBERT – Pharmacien toxicologue, retraitée de l'INRS

M. Jean-Pierre LEPOITTEVIN – Professeur des universités en dermatochimie

Mme Anne-Christine MACHEREY – Docteur en toxicologie, spécialisée dans la prévention du risque chimique

Mme Florence MENETRIER – Pharmacien, chef de projet dans le domaine de la toxicologie nucléaire, CEA

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur d'Université en toxicologie et sécurité alimentaire, Pharmacien-Toxicologue

M. Daniel PICART – Retraité de l'enseignement et de la recherche en chimie structurale

M. Alain-Claude ROUDOT – Enseignant chercheur en statistique et analyse de risque

Mme Béatrice SECRETAN – Docteur en toxicologie spécialisée dans l'évaluation de la cancérogénicité des substances

Mme Anne STEENHOUT – Chimiste, spécialiste en évaluation intégrée des risques sanitaires

M. Robert TADRIF – Chimiste et toxicologue, spécialisé en santé environnement et santé au travail

M. Eric THYBAUD – Ecotoxicologue.

Après prise en compte des commentaires, les rapports et notes d'expertise collective ont été approuvés par les membres du groupe de travail et adoptées par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » le 10 juillet 2008 pour le linuron, le 25 septembre 2008 pour le benzylbutylphtalate et le du-n-butylphtalate, le 22 janvier 2009 pour les nonylphénols et le toluène et le 17 septembre 2009 pour l'éther éthylique de l'éthylène glycol.

PARTICIPATION AFSSET

Coordination et contribution scientifique

Mme Nathalie BONVALLOT – Chef de projet scientifique – toxicologue – Afsset

M. Christophe ROUSSELLE – Chef d'unité - toxicologue – Afsset

Mme Aurélie MATHIEU – Chargée de projet scientifique – pharmacien – Afsset

M Laurent BODIN – Chef de projet scientifique – toxicologue – Afsset

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX – Afsset

CONTRIBUTIONS EXTERIEURES AU CES

▪ Pour le linuron

« Construction d'une VTR reprotoxique pour le linuron, selon la méthode proposée dans le document de référence. Rapport final. Mai 2006 » M. Vincent NEDELLEC – Evalueur de risque. Vincent Nedellec Consultant. Saulx-les-Chartreux.

▪ Pour le di-n-butylphtalate

M. Bertrand JEHANNIN, Mme le Pr. Dominique PARENT-MASSIN – « Construction d'une VTR reprotoxique pour le nonylphénol (4NP, CAS 84852-15-3) selon la méthode proposée dans le document de référence. Organisation des connaissances. 27 juin 2006 » LTA EA 3880, ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise 29280 PLOUZANE.

▪ Pour le benzylbutylphtalate

« Construction d'une VTR reprotoxique pour le BBP (benzyle butyle phtalate), selon la méthode proposée dans le document de référence. Rapport final. Juin 2006 » M. Vincent NEDELLEC – Evalueur de risque. Vincent Nedellec Consultant. Saulx-les-Chartreux.

▪ Pour les nonylphénols

« Construction d'une VTR reprotoxique pour le nonylphénol (4NP, CAS 84852-15-3) selon la méthode proposée dans le document de référence. Organisation des connaissances. 27 juin 2006 » M. Bertrand JEHANNIN, Mme le Pr. Dominique PARENT-MASSIN – Toxicologue. LTA EA 3880, ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise 29280 PLOUZANE.

▪ Pour le toluène

« Construction d'une VTR reprotoxique pour la substance toluène (cas 108-88-3) selon la méthode proposée dans le document de référence. Organisation des connaissances. 20 novembre 2006 » Mme Michèle BISSON, INERIS.

▪ Pour l'éther éthylique de l'éthylène glycol

« Construction d'une VTR reprotoxique selon le document de référence de l'Afsset – Ether éthylique de l'éthylène glycol (EGEE). 06 novembre 2006 » Mme Blandine DOORNAERT, INERIS

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Présentation des intervenants | 3 |
| Expertise collective : synthèse et conclusions | 10 |
| Abréviations | 63 |
| Liste des tableaux..... | 64 |
| Liste des figures | 64 |
| 1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine..... | 65 |
| 1.1 Contexte..... | 65 |
| 1.2 Objet de la saisine..... | 65 |
| 1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation..... | 66 |
| 2 Linuron (CAS 330-55-2) : VTR reprotoxique par ingestion | 67 |
| 2.1 Recueil des données toxicologiques..... | 67 |
| 2.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR | 68 |
| 2.2.1 Choix de l'effet critique..... | 68 |
| 2.2.2 Choix de l'étude | 68 |
| 2.2.3 Choix de la dose critique..... | 69 |
| 2.2.4 Choix des facteurs d'incertitude..... | 69 |
| 2.3 Conclusions de l'expertise collective..... | 69 |
| 2.4 Bibliographie | 70 |
| 3 Di-n-butylphthalate (CAS 84-74-2) : VTR reprotoxique par ingestion..... | 71 |
| 3.1 Recueil des données toxicologiques..... | 71 |
| 3.1.1 Toxicocinétique | 71 |
| 3.1.2 Toxicité générale..... | 71 |
| 3.1.3 Effets reprotoxiques | 72 |
| 3.1.4 Mécanisme d'action | 72 |
| 3.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR | 73 |
| 3.2.1 Choix de l'effet critique..... | 73 |
| 3.2.2 Choix de l'étude | 73 |
| 3.2.3 Choix de la dose critique..... | 74 |
| 3.2.4 Choix des facteurs d'incertitude..... | 74 |
| 3.3 Conclusions de l'expertise collective..... | 75 |
| 3.4 Bibliographie | 76 |
| 4 Benzylbutylphthalate (CAS 85-68-7) : VTR reprotoxique par ingestion | 77 |
| 4.1 Recueil des données toxicologiques..... | 77 |
| 4.1.1 Toxicocinétique | 77 |
| 4.1.2 Toxicité générale..... | 77 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1.3 | Effets reprotoxiques | 78 |
| 4.1.3.1 | Etudes de toxicité prénatale | 78 |
| 4.1.3.2 | Etudes de fertilité..... | 79 |
| 4.1.3.3 | Etudes sur plusieurs générations | 79 |
| 4.1.4 | Mécanisme d'action | 79 |
| 4.2 | Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR | 79 |
| 4.2.1 | Choix de l'effet critique..... | 79 |
| 4.2.2 | Choix de l'étude | 80 |
| 4.2.3 | Choix de la dose critique..... | 80 |
| 4.2.4 | Choix des facteurs d'incertitude..... | 81 |
| 4.3 | Conclusions de l'expertise collective | 81 |
| 4.4 | Bibliographie | 82 |
| 5 | Nonylphénols (CAS 104-40-5, 84852-15-3, 25154-52-3, 90481-04-2) : VTR reprotoxique par ingestion | 83 |
| 5.1 | Recueil des données toxicologiques..... | 83 |
| 5.1.1 | Toxicocinétique | 84 |
| 5.1.2 | Effets sanitaires | 84 |
| 5.1.2.1 | Effets néphrotoxiques..... | 84 |
| 5.1.2.2 | Effets reprotoxiques | 84 |
| 5.1.3 | Mécanisme d'action | 86 |
| 5.2 | Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR | 87 |
| 5.2.1 | Le nonylphénol ramifié (CAS 90481-04-2 et 84852-15-3)..... | 87 |
| 5.2.1.1 | Choix de l'effet critique | 87 |
| 5.2.1.2 | Choix de l'étude..... | 87 |
| 5.2.1.3 | Choix de la dose critique | 88 |
| 5.2.1.4 | Choix des facteurs d'incertitude | 88 |
| 5.2.1.5 | Synthèse | 88 |
| 5.2.2 | Le nonylphénol linéaire (CAS 25154-52-3 et 104-40-5)..... | 88 |
| 5.2.2.1 | Choix de l'effet critique | 88 |
| 5.2.2.2 | Choix de l'étude..... | 89 |
| 5.2.2.3 | Choix de la dose critique | 89 |
| 5.2.2.4 | Choix des facteurs d'incertitude | 89 |
| 5.2.2.5 | Synthèse | 90 |
| 5.3 | Conclusions de l'expertise collective | 90 |
| 5.4 | Bibliographies | 91 |
| 6 | Toluène (CAS 108-88-3) : VTR reprotoxique par inhalation..... | 93 |
| 6.1 | Recueil des données toxicologiques..... | 93 |
| 6.1.1 | Toxicocinétique | 93 |
| 6.1.2 | Effets sanitaires | 93 |
| 6.1.3 | Effets neurologiques | 94 |
| 6.1.4 | Effets reprotoxiques | 94 |
| 6.1.4.1 | Etudes de développement prénatal..... | 94 |
| 6.1.4.2 | Etudes de fertilité..... | 95 |
| 6.1.4.3 | Etudes sur plusieurs générations | 95 |
| 6.1.5 | Mécanisme d'action | 95 |
| 6.2 | Analyse et évaluation des choix | 96 |
| 6.2.1 | Choix de l'effet critique..... | 96 |

| | | |
|---|--|------------|
| 6.2.2 | Choix de l'étude | 96 |
| 6.2.3 | Choix de la dose critique..... | 97 |
| 6.2.4 | Choix des facteurs d'incertitude..... | 97 |
| 6.3 | Conclusions de l'expertise collective | 97 |
| 6.4 | Bibliographie | 99 |
| 7 | Ether éthylique de l'éthylène glycol (CAS 11-80-5) : VTR reprotoxique par inhalation..... | 100 |
| 7.1 | Recueil des données toxicologiques..... | 100 |
| 7.1.1 | Généralités..... | 100 |
| 7.1.2 | Toxicocinétique | 101 |
| 7.1.3 | Effets sanitaires | 101 |
| 7.1.3.1 | Toxicité aiguë | 101 |
| 7.1.3.2 | Toxicité chronique | 102 |
| 7.1.3.3 | Cancérogénicité et génotoxicité | 102 |
| 7.1.3.4 | Effets reprotoxiques | 102 |
| 7.1.3.4.1 | Effets sur la reproduction | 102 |
| 7.1.3.4.2 | Effets sur le développement..... | 104 |
| 7.1.4 | Mécanisme d'action | 105 |
| 7.2 | Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR | 105 |
| 7.2.1 | VTR existantes pour les effets reprotoxiques | 105 |
| 7.2.2 | VTR pour les effets sur la fertilité..... | 106 |
| 7.2.2.1 | Choix de l'effet critique | 106 |
| 7.2.2.2 | Choix de l'étude..... | 106 |
| 7.2.2.3 | Choix de la dose critique | 106 |
| 7.2.2.4 | Facteur d'ajustement..... | 107 |
| 7.2.2.5 | Choix des facteurs d'incertitude | 107 |
| 7.2.2.6 | Synthèse | 108 |
| 7.2.3 | VTR pour les effets sur le développement..... | 108 |
| 7.2.3.1 | Choix de l'effet critique | 108 |
| 7.2.3.2 | Choix de l'étude..... | 108 |
| 7.3 | Conclusion..... | 109 |
| 7.4 | Récapitulatif des VTR | 111 |
| 7.5 | Bibliographie | 112 |
| ANNEXES | 115 | |
| Annexe 1 : Lettre de saisine..... | 116 | |
| Annexe 2 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine | 118 | |
| Annexe 3 : VTR des nonylphénols : Tableau comparatif des études de Moon <i>et al.</i>, 2007 et de Chapin <i>et al.</i>, 1999..... | 126 | |
| Annexe 4 : VTR des nonylphénols : Tableau comparatif des études de Hossaini <i>et al.</i>, 2001 et Nagao <i>et al.</i>, 2007 | 129 | |
| Annexe 5 : VTR de l'EGEE : Analyse de l'étude de Barbee <i>et al.</i>, 1984..... | 133 | |
| Annexe 6 : VTR de l'EGEE : Analyse de l'étude de Doe, 1984..... | 135 | |

Expertise collective : synthèse et conclusions



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatives à la construction d'une VTR fondée sur les effets reprotoxiques du
Linuron (N°CAS 330-55-2)

Saisine Afsset n°2003/AS03

Ce document synthétise les travaux du prestataire et du rapporteur et présente les compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre du programme de travail de l'Afsset sur les VTR reprotoxiques, une phase pilote a été organisée afin de s'assurer de la mise en pratique de la méthode de construction proposée. Des VTR reprotoxiques ont été construites sous forme de prestation pour le linuron, le di-n-butylphtalate (DnBP), le benzylbutylphtalate (BBP), le nonylphénol, le toluène et le 2-éthoxyéthanol (EGEE). La DGS a saisi l'Afsset le 25 juillet 2007 pour que ces VTR soient validées dans le cadre de l'expertise collective de l'Agence.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté un rapporteur pour l'expertise du linuron qui a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise ».

Description de la méthode de travail

Sur la base du document « construction/ choix d'une VTR reprotoxique pour le Linuron » réalisé par l'équipe de Vincent Nedellec Consultant¹, le rapporteur a évalué la conformité de la méthode employée par rapport aux préconisations du groupe de travail sur les points suivants : i) recherche d'informations et ii) profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Il donne ensuite son avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose pour les effets

¹ Annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques

² NOAEL : « no observed adverse effect level » ; LOAEL : « lowest observed adverse effect level » ; BMDL : limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose.

reprotoxiques (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

Mathématiquement, la construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{\text{Dose critique}}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \text{Dose critique} = \text{NOAEL, LOAEL ou BMDL}^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

La méthode est détaillée dans le document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset. Décembre 2006) et la construction de la VTR du linuron s'appuie sur cette méthode.

Une discussion collégiale au sein du CES a ensuite permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultats de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est basé sur les monographies réalisées antérieurement à ce travail par des instances nationales et sur la littérature parue après ces monographies.

Le linuron est un herbicide de la famille des urées substituées. Il a pour principales caractéristiques chimiques d'être très stable, non volatile, non corrosif, peu soluble dans l'eau et peu toxique pour les mammifères. Son usage est restreint depuis 2002. En Europe, la production annuelle est de 500 à 1000 tonnes par an (principalement en France, Italie, Hollande, Espagne, Angleterre). Compte tenu des usages du linuron en tant qu'herbicide, l'exposition peut se faire lors de l'utilisation de produit en contenant, par voie respiratoire ou cutanée, mais également par voie orale lors de l'ingestion d'aliments contaminés par des traces de linuron. En population générale, l'exposition principale se fait par voie orale.

Le linuron est classé depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement (risque pendant la grossesse d'effet néfaste pour l'enfant) et de catégorie 3 pour la reproduction (risque possible d'altération de la fertilité).

Par voie orale et en exposition chronique, les effets hématologiques (pigmentation anormale du sang caractérisée par un pic d'absorption entre 618 et 620 nm lors de la transformation

de l'hémoglobine en cyanhémoglobine et anémie hémolytique) sont considérés comme les effets néfastes les plus sensibles chez le rat et le chien.

Chez l'animal, il est clairement admis aujourd'hui que le linuron exerce des effets toxiques pour le développement de l'appareil génital mâle du fœtus lors d'expositions maternelles. En revanche, aucun effet n'a été mis en évidence chez les femelles, ni chez les mâles lors d'exposition uniquement pendant l'âge adulte. Il n'existe pas de données chez l'Homme.

Les effets sur le développement peuvent donc être, en l'état actuel des connaissances, considérés comme des effets critiques pour une exposition au linuron orale de courte durée (pendant la gestation).

Ces effets sont décrits chez des rats exposés *in utero* ou pendant le début de la vie (rats immatures). Parmi les effets critiques rapportés, les plus fréquents sont une absence de régression des mamelons, une réduction de la distance ano-génitale, une réduction du poids des organes génitaux mâle, une hypoplasie testiculaire et des épидидymes, une malformation des organes sexuels internes (épидидymes, canal déférent, vésicule séminale) et externes (hypospadias, cryptorchidie).

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, trois études réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés.

La première étude a été réalisée chez des rats exposés 80 jours à partir du 20^{ème} jour après la naissance. L'effet néfaste est une diminution significative du poids de la vésicule séminale et des épидидymes ainsi qu'une augmentation significative de l'âge à la puberté au LOAEL de 40 mg/kg/j (NOAEL = 20 mg/kg/j). A également été mise en évidence une diminution significative du poids des testicules et des épидидymes des mâles de la génération F1 (Gray, 1999).

La deuxième étude a été réalisée chez le rat exposé *in utero* du 12^{ème} au 21^{ème} jour de gestation. Chez les descendants mâles, l'incidence d'hypoplasie des testicules et des épидидymes augmente dès le premier groupe de dose à 12,5 mg/kg/j (McIntyre, 2000).

La troisième étude (Kang, 2004) a été réalisée chez des rats mâles immatures et castrés exposés par gavage pendant 10 jours. On observe une diminution significative du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale, et des glandes de Cowper dans le deuxième groupe de dose (LOAEL = 50 mg/kg/j ; NOAEL = 25 mg/kg/j).

Les trois expérimentations animales sont conduites selon des protocoles rigoureux : lignes directrices de bonnes pratiques de l'US EPA pour la première, protocole similaire à un protocole standardisé pour la seconde et lignes directrices de l'OCDE pour la troisième. Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

Le mécanisme toxique responsable de ces effets serait l'action anti-androgénique (compétition avec la testostérone au niveau des récepteurs androgéniques) responsable d'anomalies dans la différenciation sexuelle au cours de l'embryogenèse. Par ailleurs, l'action anti-androgénique du linuron favoriserait la prolifération d'hormone lutéinique provoquant les tumeurs des cellules de Leydig. Il s'agit donc d'un mécanisme de perturbation endocrinienne.

Au vu de l'ensemble des données disponibles, il apparaît que les effets développementaux observés chez l'animal ne puissent pas être écartés chez l'homme.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Choix de l'effet critique

Les effets sur le développement les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle, d'un point de vue histologique mais aussi fonctionnel. Les principaux

effets ainsi observés sont : absence de régression des mamelons, réduction ano-génitale, réduction du poids des organes génitaux mâle, hypoplasie testiculaire et des épидидymes, malformation des organes sexuels internes (épидидymes, canal déférent, vésicule séminale) et externes (hypospadias, cryptorchidie).

L'effet critique retenu pour l'établissement d'une VTR reprotoxique est en cohérence avec les rapports publiés. L'effet critique pertinent pour l'homme observé à la plus faible dose est **l'hypoplasie des testicules et des épидидymes**.

Choix de l'étude

Les trois études retenues sont de bonne qualité. Elles sont en outre classées 1 selon la classification de Klimisch. Le choix final entre les trois repose essentiellement sur la possibilité de mettre en évidence une relation dose-réponse (plusieurs groupes de doses testés), la publication dans une revue internationale et le caractère plus précautionneux du LOAEL le plus faible, ce qui est en cohérence avec l'état des connaissances actuelles et des préconisations prévues dans le « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques. Afsset. Décembre 2006 ». Le LOAEL le plus faible a été mis en évidence pour l'hypoplasie des testicules et épидидymes, observés dans l'étude de McIntyre (2000).

Ainsi, c'est l'étude de **McIntyre et al. (2000)** qui a été retenue. Cette étude est classée 1 selon Klimisch (respect de lignes directrices autres que l'OCDE) : Des rates en gestation ont été exposées par gavage du 12^{ème} au 21^{ème} jour à 0 - 12,5 - 25 et 50 mg/kg/j de linuron. Chez les descendants mâles (F1), l'incidence d'hypoplasie des testicules et des épидидymes augmente dès la première dose testée : 0 % dans le groupe témoin et respectivement 3,6 % et 1,8°% dans le premier groupe exposé à 12,5 mg/kg/j. Ces taux d'incidence passent respectivement à 11,3 % et 9 % dans le dernier groupe exposé à 50 mg/kg/j. On observe une absence dose dépendante de régression des mamelons mais la différence n'est significative qu'à la plus forte dose (variable continue : pas d'incidence). Est également observée une augmentation significative, uniquement à la plus forte dose, des malformations des épидидymes (6,8 %) et une absence de canal déférent (4,5 %). L'effet retenu est une **hypoplasie des testicules et des épидидymes (p=0,05) chez les nouveau-nés mâles**. Cet effet signe un mécanisme de perturbation endocrinienne.

Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue, l'hypoplasie des testicules et des épидидymes est observée dès la plus faible dose testée, correspondant donc à un **LOAEL de 12,5 mg/kg/j**. Aucun NOAEL ne peut donc être proposé dans cette étude. On peut simplement préciser que le NOAEL se situe entre 0 et 12,5 mg/kg/j.

Pour déterminer ce LOAEL, les auteurs ont utilisé les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA) et d'analyse de la covariance (ANCOVA) suivi d'un test de Dunnett pour tester les effets liés au traitement des animaux par le linuron. Le seuil de 0,05 a été retenu pour la significativité des résultats.

Pendant la phase pilote, l'Afsset a proposé de construire une BMDL sur la base de l'effet retenu. La réponse obtenue est de type dichotomique (effet/absence d'effet). Plusieurs modèles ont été testés (logit, probit, gamma et weibull) et le modèle probit a été retenu car s'ajustant le mieux aux données. Un niveau de réponse (BMR) de 5 % en « extra risk » a été retenu (l'extra risk correspond à l'augmentation du risque comparativement à la probabilité de ne pas être affecté dans le groupe témoin, réponse vraisemblablement plus conservatrice). On obtient une **BMD₀₅ à 18 mg/kg/j** et une **BMDL₀₅ à 14 mg/kg/j** (les résultats de l'ensemble de la démarche sont détaillés dans le « document de référence pour

la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques », annexe 3). On note une variabilité faible dans les résultats de la BMDL.

Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas suffisamment d'élément chez l'homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- $UF_{L/B}$: utilisation d'une BMDL : les préconisations de l'Afsset sont un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Le CES propose un facteur de 3 car l'incidence retenue de 5 % est faible et on note un NOAEL à 20 mg/kg/j dans une autre étude de la littérature, ce qui pencherait en faveur d'un NOAEL proche du LOAEL.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte les résultats de l'expertise collective lors de sa séance du 29 mai 2008 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Le linuron est une substance qui a fait l'objet de plusieurs études (relations dose-réponse et mécanisme d'action) et rapports d'évaluation des risques.
- ▶ Les effets observés chez l'animal (rat) sont pertinents pour l'homme et l'effet sur le développement de l'appareil reproducteur mâle (hypoplasie des testicules et des épидидymes) peut être retenu comme effet critique.
- ▶ Le mécanisme avancé (effet anti-androgénique par compétition avec la testostérone) est plausible.
- ▶ Il n'existe aucune étude chez l'homme.

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement. Compte tenu des effets sur le développement de l'appareil génital mis en évidence, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique.

-- Linuron CAS 330-55-2--

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|--|---|---|---|
| Hypoplasie des testicules et des épидидymes | LOAEL = 12,5 mg/kg/j Absence de NOAEL | 300 | VTR = 0,05 mg/kg/j |
| Etude de toxicité prénatale orale chez le rat (GD12-GD21) McIntyre <i>et al.</i> 2000 | BMD ₀₅ = 18 mg/kg/j BMDL₀₅ = 14 mg/kg/j | UF _A 10 UF _H 10 UF _{L/B} 3 | Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la fertilité) Etude : fort Dose critique : fort VTR : moyen |

*Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT

Recommandations du CES

Parmi les effets précoces, survenant aux plus faibles doses, l'absence de régression des mamelons observée chez les rats mâles est un effet qui ne peut se produire chez l'homme. Néanmoins, il signe une perturbation de la différenciation sexuelle lors de l'embryogenèse, ce qui pourrait se traduire par un effet différent chez l'homme. En outre, la réduction de la distance ano-génitale est considérée comme un marqueur pertinent, facilement identifiable et mesurable chez l'homme et chez l'animal.

Les connaissances sur le caractère perturbateur endocrinien du linuron restent encore actuellement partielles : une seule espèce animale a été testée et l'atteinte de la fertilité n'a pas été étudiée. Le CES recommande donc de ré-évaluer la VTR au vu de nouvelles informations qui seraient publiées sur ce thème.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° d'enregistrement

Enfin, le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique² à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

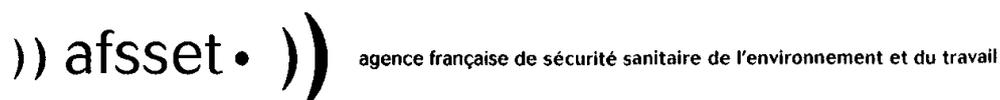
Maisons-Alfort, le 16 juin 2008.

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES



² Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

**Relatives à la construction d'une VTR fondée sur les effets
reprotoxiques du Di-n-butylphtalate (N°CAS 84-74-2)**

Saisine Afsset n°2003/AS03

Ce document synthétise les travaux du prestataire et du rapporteur et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre du programme de travail de l'Afsset sur les VTR reprotoxiques, une phase pilote a été organisée afin de s'assurer de la mise en pratique de la méthode de construction proposée. Des VTR reprotoxiques ont été construites sous forme de prestation pour le linuron, le di-n-butylphtalate (DnBP), le benzylbutylphtalate (BBP), le nonylphénol, le toluène et le 2-éthoxyéthanol (EGEE). La DGS a saisi l'Afsset le 25 juillet 2007 pour que ces VTR soient validées dans le cadre de l'expertise collective de l'Agence.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté un rapporteur pour l'expertise du DnBP qui a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise ».

Description de la méthode de travail

Sur la base du document « construction/ choix d'une VTR reprotoxique pour le DnBP » réalisé par l'équipe du laboratoire de toxicologie de l'Université de Bretagne Occidentale¹, le rapporteur a évalué la conformité de la méthode employée par rapport aux préconisations du groupe de travail sur les points suivants : i) recherche d'informations et ii) profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Il donne ensuite son avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose pour les effets

¹ Annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques

² NOAEL : « no observed adverse effect level » ; LOAEL : « lowest observed adverse effect level » ; BMDL : limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose.

reprotoxiques (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

Mathématiquement, la construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{\text{Dose critique}}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \text{Dose critique} = \text{NOAEL, LOAEL ou BMDL}^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

La méthode est détaillée dans le document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset. Décembre 2006) et la construction de la VTR du DnBP s'appuie sur cette méthode.

Une discussion collégiale au sein du CES a ensuite permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultats de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2. Compte tenu de la richesse de la littérature scientifique sur les effets toxiques du DnBP, le rapport est basé sur les monographies réalisées antérieurement à ce travail par des instances nationales et sur la littérature parue après ces monographies.

Le DnBP est un plastifiant de la famille des esters de phtalates. En Europe, il est utilisé pour majeure partie dans la production des résines et polymères comme le PVC. On le retrouve également dans les adhésifs et les emballages alimentaires. L'exposition majoritaire de l'Homme en général (hors usage spécifique) se fait par voie orale. En outre, les données disponibles ont été principalement obtenues par voie orale. Il a donc été jugé pertinent, dans le cadre de cette expertise, de construire une VTR par voie orale.

Le DnBP est classé depuis 2001 (28^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement (risque pendant la grossesse d'effet néfaste pour l'enfant) et de catégorie 3 pour la reproduction (risque possible d'altération de la fertilité).

Toxicocinétique

Chez les rongeurs, après absorption par voie orale, le DnBP est hydrolysé par des estérases au niveau du tissu intestinal pour former le dérivé majoritaire monoester « monobutylphtalate » ou MBuP, rapidement et largement absorbé par le tractus gastro-

intestinal. Le MBuP peut ensuite subir une oxydation de sa chaîne latérale. Les métabolites urinaires sont principalement le dérivé glucuroconjugué du MBuP et le MBuP libre (environ 66-70 % des métabolites) et les dérivés oxydés du MBuP. Il existe des différences entre espèces concernant l'excrétion des métabolites conjugués ou non. Chez l'Homme, des proportions similaires de MBuP total dans les urines de 24 heures ont été retrouvées chez des volontaires exposés par voie orale (environ 64-73 % des métabolites). Une étude a montré que le MBuP conjugué (essentiellement glucuroconjugué) représentait 94 % du MBuP total urinaire chez l'Homme (Saillenfait et Laudet, 2005).

Toxicité générale

Par voie orale, la prolifération des peroxyosomes hépatiques observée chez le rat exposé au DnBP a longtemps été considérée comme l'effet néfaste le plus sensible. Néanmoins il existe aujourd'hui un consensus scientifique selon lequel cet effet ne peut être transposé à l'homme : la prolifération des peroxyosomes hépatiques serait bien plus faible chez l'homme que chez le rongeur. Les effets hépatiques liés à cette prolifération ne sont donc pas attendus chez l'homme aux doses expérimentales animales. La reprotoxicité et les troubles du développement du DnBP sont donc les deux principaux effets toxiques considérés pour l'homme.

Effets reprotoxiques

Les études de toxicité du DnBP mettent principalement en évidence des troubles du développement au niveau de l'appareil reproducteur mâle. Ces effets sont, en l'état actuel des connaissances, considérés comme les effets critiques pour l'exposition orale au DnBP. Ces effets sont décrits chez des rats exposés *in utero* via l'alimentation maternelle. L'exposition a lieu en fin de gestation, période clef du développement de l'appareil reproducteur. Parmi les effets critiques rapportés, les plus fréquents sont une diminution de la distance anogénitale, une cryptorchidie, un hypospadias, une hypoplasie ou une agénésie épидидymaire, une hypospermie, une dysgénésie testiculaire focale et une persistance mamelonnaire. De tels effets ont également été observés chez l'homme à l'issue d'une étude épidémiologique publiée en 2005, seule étude humaine identifiée à ce jour (Swan *et al.* 2005). Cette étude a montré une relation significative entre les concentrations urinaires de DnBP observées chez la mère pendant la grossesse et les anomalies de l'appareil génital externe chez les nouveau-nés mâles (diminution de la distance anogénitale, trouble de la migration testiculaire, hypoplasie scrotale).

A partir de la revue de la littérature sur la reprotoxicité du DnBP, et en s'appuyant sur les données les plus récentes et les VTR déjà disponibles, trois études réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après.

Une première étude, sur deux générations (Wine, 1997), a été réalisée chez des rats Sprague-Dawley exposés en alimentation continue à 52, 256 et 509 mg/kg/j chez les mâles et 80, 385 et 794 mg/kg/j chez les femelles. Les indices d'accouplement, de gestation et de fertilité de la génération F1 sont inférieurs à ceux de F0 à la dose la plus forte. A partir de 256 mg/kg/j chez les mâles et 385 mg/kg/j chez les femelles, de nombreuses anomalies des organes reproducteurs sont observées (diminution du poids de ces organes, lésions dégénératives de l'épithélium germinal testiculaire, hyperplasie interstitielle, absence ou hypoplasie de l'épididyme). Les effets au niveau de la seconde génération (F2) sont identiques mais plus sévères et apparaissent aux premières doses testées, dès 52 mg/kg/j pour les mâles et 80 mg/kg/j pour les femelles (en l'absence de toxicité maternelle pour la première dose testée). Aucun NOAEL n'a pu être identifié pour la génération F2.

La deuxième étude a été réalisée chez le rat Sprague-Dawley exposé *in utero* via gavage de la mère du 12^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation à 0 – 0,5 – 50 – 100 et 600 mg/kg/j (Mylchreest *et al.* 2000). Chez les nouveaux-nés mâles, de nombreuses lésions de l'appareil reproducteur mâle sont observées dans le groupe de dose le plus élevé. Dès 100 mg/kg/j, une absence de régression des mamelons est constatée. Cet effet apparaît comme un marqueur représentatif d'une altération de la différenciation sexuelle. Le NOAEL a été identifié à 50 mg/kg/j.

La troisième étude (Lee *et al.* 2004) a été réalisée chez le rat Sprague-Dawley exposé *in utero* et pendant la lactation (exposition des mères par voie orale à partir du 15^{ème} jour de gestation et jusqu'au 21^{ème} jour après la mise bas) aux doses de 0 – 2 – 24 – 234 et 1137 mg/kg/j. Une réduction des spermatoocytes testiculaires est constatée au 21^{ème} jour postnatal pour la première dose testée (2 mg/kg/j), ainsi qu'une hypoplasie des bourgeons alvéolaires chez les femelles. Le LOAEL a été identifié à 2 mg/kg/j sur l'observation de la diminution spermatoocytaire et des dysplasies mamelonaires chez les nouveau-nés mâles ou femelles. Aucun NOAEL n'a pu être identifié.

Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action proposé pour le DnBP implique une perturbation endocrinienne avec une action anti-androgénique liée à une diminution importante de la sécrétion de testostérone et une atteinte des cellules de Sertoli.

Au vu de l'ensemble des données disponibles, il apparaît que les effets reprotoxiques et développementaux observés chez l'animal ne puissent pas être écartés chez l'homme.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Choix de l'effet critique

Les effets sur le développement les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle. L'atteinte est aussi bien histologique que fonctionnelle. L'effet critique retenu, à savoir **l'atteinte histologique et fonctionnelle de l'appareil reproducteur mâle**, est en cohérence avec l'ensemble des rapports publiés et ne porte *a priori* pas à discussion. Ces atteintes sont diverses en fonction des études : lésions testiculaires (troubles de la migration, lésions dégénératives des tubes séminifères, diminution des spermatoocytes, hyperplasie des cellules interstitielles), lésions de l'épididyme, des vésicules séminales, diminution de la distance ano-génitale, augmentation du taux d'hypospadias et persistance des mamelons. Ces effets signent un mécanisme de perturbation endocrinienne.

Choix de l'étude

Les trois études retenues décrites ci-dessus sont jugées de bonne qualité et ont été également choisies par des organismes internationaux reconnus dans le cadre de construction de VTR. Les trois expérimentations animales sont conduites selon des protocoles rigoureux : « *National Toxicology Program's, R.A.C.B. Protocol* » pour les deux premières, « *Animal Care and Use Committee of the National Institute of Health Sciences* » (Japan) pour la troisième. Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR. Les deux plus anciennes sont analysées dans le rapport d'évaluation des risques de l'Union Européenne. Elles répondent à une problématique « effets sur le développement » avec des protocoles d'études différents. Seule l'étude de Lee (2004) prend en compte une période d'exposition jusqu'à la fin de la lactation (PND21). Les différences d'effets observés sur les testicules entre l'étude de Mylchreest (2000) et l'étude de Lee (2004) pourraient être liées à l'utilisation de tests non comparables. De même, dans l'étude de Wine (1997), les effets sur le testicule

ne sont pas étudiés pour des doses inférieures à 250 à 400 mg/kg/j, ce qui peut expliquer les différences de résultats avec Lee.

Le choix final entre les trois études repose essentiellement sur :

- La qualité de l'étude (Klimisch 1) ;
- L'observation d'effets signant une perturbation endocrinienne en l'absence d'une toxicité maternelle ;
- L'utilisation d'une période de sensibilité critique ;
- Le suivi post-traitement comprenant une comparaison de l'évolution des signes de toxicité ;
- A critères égaux, l'identification du LOAEL le plus faible.

Ainsi, en l'absence d'éléments permettant de prédire l'impact sanitaire des modifications observées chez l'animal pour l'Homme à long terme, et bien que l'étude de Lee ne permette pas d'identifier un NOAEL, le CES estime prudent de retenir l'étude de **Lee et al. (2004)** comme étude source.

Dans cette étude, des rates Sprague-Dawley (8 animaux par dose) ont été exposées via la nourriture du quinzième jour de gestation (GD15) jusqu'au 21^{ème} jour après la parturition (PND21), soit la fin de la lactation. L'alimentation est supplémentée en DnBP à des concentrations égales à 0 – 20 – 200 – 2000 et 10000 ppm, correspondant à des doses de 0 – 2 – 24 – 234 et 1137 mg/kg/j en poids corporel. Une réduction des spermatozoaires testiculaires est constatée au 21^{ème} jour après la naissance dès la concentration de 20 ppm (2 mg/kg/j) chez 50 % des mâles, de même que des changements au niveau des glandes mammaires chez les nouveau-nés de sexe féminin (hypoplasie des bourgeons alvéolaires). Les effets retenus sont une **diminution spermatocytaire chez le mâle (p<0,05) et des hypoplasies mamelonnaires chez les femelles (p<0,05)**.

Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue, la diminution spermatocytaire et les lésions dysplasiques mamelonnaires sont constatées dès la plus faible dose testée, correspondant à un **LOAEL de 2 mg/kg/j**. Aucun NOAEL ne peut donc être proposé. On peut simplement préciser que le NOAEL se situe entre 0 et 2 mg/kg/j.

Pour déterminer ce LOAEL, les auteurs ont utilisé plusieurs méthodes d'analyse en fonction des données. Les seuils de 0,05 et de 0,01 ont été retenus pour la significativité des résultats. Les lésions histopathologiques ont été comparées par un test de Fischer exact et la sévérité des lésions histopathologiques avec un test de Mann-Whitney (U).

Dans le cadre de l'évaluation des risques du DnBP, l'Union Européenne a proposé un LOAEL de 50 mg/kg/j en se basant sur l'étude de Wine (1997) (European Union, 2003). D'autres études non référencées dans le rapport européen ont été publiées depuis (Mylchreest, 2000 ; Lee et al. 2004). Dans le cadre de ce travail, en tenant compte des éléments récents, un LOAEL 25 fois plus faible, de 2 mg/kg/j, est proposé pour la construction de la VTR sur la base de l'étude de Lee (2004).

Pendant la phase pilote, l'Afsset a proposé de construire une BMDL en considérant la diminution des spermatozoaires. La réponse obtenue est de type dichotomique (effet / absence d'effet). Plusieurs modèles ont été testés, dont les modèles gamma (modèle stochastique) et weibull (modèle de distribution) qui s'appliquent pour des réponses dichotomiques. Un niveau de réponse (BMR) de 10 % en « extra risk » a été retenu (l'extra risk correspond à l'augmentation du risque comparativement à la probabilité de ne pas être affecté dans le groupe témoin, réponse vraisemblablement plus conservatrice). On obtient une BMD₁₀ à 0,08 mg/kg/j et une BMDL₁₀ à 4,4.10⁻⁵ mg/kg/j (les résultats de l'ensemble de la

démarche sont détaillés dans le « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques », annexe 3).

Le LOAEL avait été fixé à 2 mg/kg/j. Ce LOAEL correspond à une incidence de réponse (pour la réduction du développement spermatocytaire) de 50 %, ce qui est très élevé. Il est donc logique que la BMD₁₀ soit très inférieure à ce LOAEL (10 % de réponse). La BMDL est par ailleurs très éloignée de la BMD ; ceci est lié au fait que le nombre de points et le nombre d'animaux testés sont faibles et le niveau d'effet constaté élevé et éloigné de la BMR retenue (10 %). Ces limites méthodologiques ne permettent pas de retenir la BMDL comme dose critique.

Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10. Cela est justifié par les résultats de l'étude épidémiologique de Swan *et al.* (2005) qui semble confirmer que les effets anti-androgéniques mis en évidence chez l'animal peuvent également se produire chez l'Homme. Si la glucuroconjugaison du monobutylphtalate apparaît plus élevée chez l'Homme que chez le rat, on peut penser que la substance est plus rapidement détoxifiée chez l'Homme, mais en l'absence d'éléments quantitatifs plus précis, il reste prudent de considérer un facteur inter-espèce par défaut.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité au sein de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : les préconisations de l'Afsset sont un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Dans le cas du DnBP, deux arguments sont avancés :
 - L'un en faveur de l'application d'un facteur de 3, justifié par l'utilisation de l'étude ayant identifié un LOAEL très faible par rapport aux autres études (dans les autres études, les NOAEL peuvent être jusqu'à 25 fois plus élevés), suggérant que les effets retenus sont très sensibles ;
 - L'autre en faveur de l'application d'un facteur de 10, justifié par la grande variabilité au sein de l'étude comme en témoigne la différence observée entre les valeurs de la BMD et de la BMDL, et l'absence de NOAEL. En outre, la première dose testée entraîne déjà un effet chez 50 % des animaux pour la diminution spermatocytaire et 100 % des animaux pour la dysplasie mamelonnaire.

Le CES choisit au final l'application d'un facteur UF_L de 10, en accord avec la méthode de construction de VTR reprotoxiques de l'Afsset.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte les résultats de l'expertise collective lors de sa séance du 10 juillet 2008 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Le métabolisme du DnBP chez l'Homme et l'animal est globalement similaire avec production d'un monoester commun (MBuP). Cependant il existe des différences quantitatives de glucuroconjugaison des métabolites monoesters du DnBP chez le rat et chez l'Homme. Le CES attire l'attention sur l'absence de connaissances sur l'impact de ces différences et leurs conséquences éventuelles sur des variations de toxicité inter-espèces ;
- ▶ Le mécanisme avancé (effet anti-androgénique lié à une à une diminution importante de la sécrétion de testostérone avec principalement une atteinte des cellules de Sertoli) est plausible chez l'Homme ;
- ▶ Les effets observés chez l'animal sont des effets sur le développement de l'appareil reproducteur mâle telles que lésions testiculaires ou de l'épididyme, diminution de la distance ano-génitale, augmentation du taux d'hypospadias, persistance des mamelons ;
- ▶ Les effets observés chez l'animal paraissent pertinents pour l'Homme. Ce point est argumenté par une étude récente chez l'homme qui a mis en évidence une relation entre l'exposition aux phtalates des mères pendant la grossesse et l'atténuation de l'action androgénique chez les bébés mâles.

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement pendant la gestation, pour une exposition subchronique.

| -- Di-n-butyl phtalate (DnBP) 84-74-2 -- | | | |
|---|--|--|---|
| Effet critique | Dose critique ² | UF | VTR |
| Diminution spermatocytaire et dysplasies mamelonnaires observés dans la descendance | LOAEL = 2 mg/kg/j Absence de NOAEL BMDL peu pertinente | 1000 | VTR = 0,002 mg/kg/j |
| Etude de toxicité prénatale orale chez le rat Sprague-Dawley (GD15-PND21) | | UF _A 10 UF _H 10 UF _L 10 | Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : moyen (incertitude +) Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen |
| Lee <i>et al.</i> 2004 | | | |

La VTR est construite sur la base des connaissances actuelles. Dans le cadre des phtalates, dont les plus connus ont une toxicité sur le développement liée à leur caractère perturbateur

² Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT. Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

Expertise collective : synthèse et conclusions

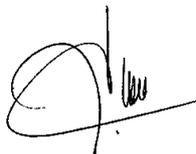
Saisine n° 2003/AS03

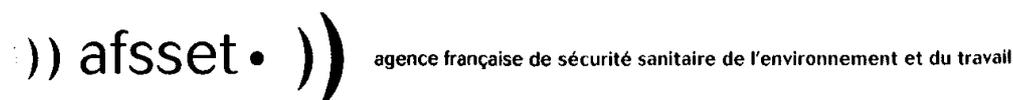
endocrinien, les niveaux de connaissances sont différents d'une substance individuelle à l'autre. Les études toxicologiques n'étant pas conduites selon les mêmes protocoles pour tous les phtalates, les LOAEL et les NOAEL issus de ces études ne peuvent être mis en regard et les VTR proposée ne peuvent être le reflet direct de la toxicité de ces substances. Ainsi, bien que le benzylbeutylphtalate (BBP) et le DnBP aient probablement une toxicité similaire, la VTR proposée pour le DnBP est plus faible que celle du BBP.

Maisons-Alfort, le 25 septembre 2008.

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES





EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

**Relatives à la construction d'une VTR fondée sur les effets reprotoxiques du
benzylbutylphtalate (N°CAS 85-68-7)**

Saisine Afsset n°2003/AS03

Ce document synthétise les travaux du prestataire et du rapporteur et présente les compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Les valeurs toxicologiques de référence (VTR) sont des indices permettant d'établir une relation qualitative, voire quantitative, entre une exposition à une substance chimique et un effet sanitaire chez l'homme. Elles sont largement impliquées dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires, processus décisionnel visant à fournir les éléments scientifiques essentiels à la proposition d'actions correctives par les gestionnaires de risque.

L'Afsset s'est auto-saisie en 2003 afin d'établir un programme national sur les VTR visant à la constitution d'une expertise française solide et partagée par les différentes instances compétentes. Le domaine des substances chimiques reprotoxiques a été proposé comme priorité d'action. Pour répondre à cet objectif, l'Afsset a constitué un groupe de travail en 2004 afin d'élaborer une méthode de construction pour les VTR fondées sur des effets reprotoxiques. Dans le cadre de ces travaux, un appel à contributions restreint a été proposé par l'Afsset pour la construction de VTR reprotoxiques pour 6 substances (le linuron, le DnBP, le BBP, le nonyl-phénol, le toluène et l'EGEE), la finalité étant de :

- s'assurer que la méthode proposée est, en l'état, suffisante pour permettre de construire une VTR reprotoxique ;
- permettre, par un retour d'expérience pratique, d'améliorer la méthode proposée.

La construction et les propositions de VTR pour les 6 substances étudiées lors de la phase pilote font l'objet des annexes 2 et 3 du « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques. Afsset. Décembre 2006 » disponible en ligne sur <http://www.afsset.fr/>.

Cette note de synthèse reprend les principales données rassemblées par le prestataire et prises en compte pour la construction de la VTR du benzylbutylphtalate ainsi que les conclusions du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques ».

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation des VTR produites dans le cadre de la phase pilote. Ce dernier a mandaté un rapporteur pour l'expertise du benzylbutylphtalate (BBP).

Les travaux d'expertise du rapporteur ont été soumis au CES le 29 mai et le 10 juillet 2008. Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en

1 / 9

))) afsset •))) 253 Avenue du Général Leclerc – 94701 Maisons-Alfort Cedex – n° siren 180092348
☎ 01 56 29 19 30 – ☎ 01 43 96 37 67 – site : <http://www.afsset.fr> – mél : afsset@afsset.fr

expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Description de la méthode de travail

Sur la base du document « construction/ choix d'une VTR reprotoxique pour le BBP » réalisé par l'équipe de Vincent Nedellec Consultant¹, le rapporteur a évalué la conformité de la méthode employée par rapport aux préconisations du groupe de travail sur les points suivants : i) recherche d'informations et ii) profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose pour les effets reprotoxiques (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause dans les cas où des informations montrant le contraire sont disponibles.

Mathématiquement, la construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{Dose \cdot critique}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Dose \text{ critique} = NOEL, LOEL \text{ ou } BMDL^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

La méthode est détaillée dans le document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset. Décembre 2006) et la construction de la VTR du BBP s'appuie sur cette méthode.

Une discussion collégiale au sein du CES a ensuite permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOEL ou LOEL, etc.).

¹ Annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques

² NOEL : « no observed adverse effect level » ; LOEL : « lowest observed adverse effect level » ; BMDL : limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose.

Résultats de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2. Compte tenu de la richesse de la littérature scientifique sur les effets toxiques du BBP, le rapport est principalement basé sur la monographie du CERHR (2003), le rapport d'évaluation des risques de l'Union Européenne (2007) et la littérature parue postérieurement à cette monographie.

Le BBP est un plastifiant de la famille des esters de phtalates. En Europe, plus de 90 % du BBP produit est utilisé pour la fabrication de PVC et d'autres polymères retrouvés dans les revêtements de sol, les joints... Il est également présent dans les emballages alimentaires. Peu lié chimiquement à la matrice des polymères dans lesquels il est incorporé, il peut facilement migrer vers la nourriture ou les milieux de l'environnement. Bien que l'exposition par voie respiratoire ou cutanée soit possible, l'exposition de la population générale est de ce fait principalement orale. En outre, les données disponibles ont été principalement obtenues par voie orale. Il a donc été jugé pertinent, dans le cadre de cette expertise, de construire une VTR par voie orale.

Le BBP est classé depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement (risque pendant la grossesse d'effet néfaste pour l'enfant) et de catégorie 3 pour la reproduction (risque possible d'altération de la fertilité).

Toxicocinétique

Chez le rat, le BBP est métabolisé par des estérases en mono-butylphtalate (MBuP) et en mono-benzylphtalate (MBeP) avec une formation préférentielle en MBuP. Les métabolites sont majoritairement retrouvés dans les urines sous forme libre. Chez l'homme, contrairement au rat, le principal métabolite est le MBeP et est surtout retrouvé à l'état conjugué dans les urines (glucuroconjugués). L'impact de ces différences sur la toxicité du BBP entre l'animal et l'homme reste cependant à déterminer (Saillenfait et Laudet, 2005).

Toxicité générale

La toxicité aiguë du BBP est faible par voie orale et cutanée. Dans des études orales subchroniques et chroniques (2 à 26 semaines) chez le rat, des augmentations du poids du foie et des reins sont d'abord observées (≥ 120 - 151 mg/kg/j). Elles sont accompagnées de modifications histologiques ponctuelles aux doses supérieures (foie ≥ 960 mg/kg/j ; reins ≥ 500 mg/kg/j chez les mâles et ≥ 1200 mg/kg/j chez les femelles).

Les essais de génotoxicité *in vivo* et *in vitro* sont pour la plupart négatifs. Concernant la cancérogénicité, une étude du NTP (1995) de 2 ans chez le rat conclut à l'observation d'une cancérogénicité chez le mâle sur la base d'une augmentation de l'incidence des tumeurs pancréatiques. Il existe des preuves équivoques chez la femelle (augmentation marginale d'adénomes du pancréas et de papillomes de la vessie) à une dose élevée (1200 mg/kg/j). Aucun signe de cancérogénicité n'est en revanche présent chez la souris (NTP, 1995 ; Saillenfait et Laudet, 2005).

Effets reprotoxiques

Il est clairement établi que le BBP a des effets toxiques sur la reproduction chez le mâle, comme l'indiquent les lésions des organes reproducteurs et la diminution du nombre de spermatozoïdes notées chez le rat exposé oralement. En outre, l'administration orale de BBP à des rats et des souris pendant la gestation provoque une augmentation de la mortalité embryonnaire, des retards de croissance et des malformations chez les petits. Le

développement de l'appareil reproducteur et la différenciation sexuelle mâles sont particulièrement affectés après exposition pendant une période sensible. Les altérations observées chez les descendants mâles sont des malformations (cryptorchidies, hypospadias...), une diminution de la distance anogénitale, une absence de régression des mamelons et/ ou des altérations de la production de sperme.

A partir de la revue récente de la littérature sur la reprotoxicité du BBP ou de ses métabolites principaux (monoesters), plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après.

Etudes de toxicité prénatale

Une première étude (NTP, 1990) a été réalisée chez la souris CD-1 exposée *in utero* via l'alimentation de la mère du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation. Une mortalité fœtale et des malformations ont été observées pour des expositions de 910 mg/kg/j, accompagnées d'une toxicité maternelle. Le NOAEL a été identifié à 182 mg/kg/j. Dans une autre étude chez le rat Wistar exposé *in utero* du 1^{er} au 20^{ème} jour de la gestation (Ema, 1990), une réduction du gain de poids corporel a été mise en évidence avec un LOAEL de 375 mg/kg/j. Le NOAEL a été identifié à 185 mg/kg/j.

Une troisième étude a été réalisée chez des rats Harlan cpb WU exposés *in utero* par gavage de la mère du 6^{ème} au 15^{ème} ou au 20^{ème} jour de la gestation (Piersma, 2000). Les auteurs ont observé des variations squelettiques (apparition d'une 13^{ème} vertèbre), une diminution du poids des testicules et une augmentation de l'incidence des testicules non descendus dans la progéniture. Des benchmark doses (BMDL) ont été calculées pour différents effets. Une BMD à 5 % a été calculée à 171 mg/kg/j (intervalle de confiance à 95 % 145 à 206 mg/kg/j) ou de 211 mg/kg/j (intervalle de confiance à 95 % de 182 à 254 mg/kg/j) en fonction de la durée de l'exposition (6-20 ou 6-15 GD) et pour les variations squelettiques (plusieurs modèles, maximum de vraisemblance, « additional risk »), mais les auteurs considèrent l'apparition d'une 13^{ème} vertèbre comme une variation mineure non néfaste. Une BMD à 1 % a été proposée pour les testicules non descendus à 163 mg/kg/j (IC95 = 95 à 280 mg/kg/j) ou 251 mg/kg/j (IC95 = 153 à 433 mg/kg/j) en fonction de la durée d'exposition (plusieurs modèles, maximum de vraisemblance, « additional risk »). Le NOAEL est à 350 mg/kg/j pour la plupart des effets (LOAEL à 450 mg/kg/j), excepté pour l'apparition d'une 13^{ème} vertèbre, observée dès la première dose testée (LOAEL = 270 mg/kg/j).

Les effets du MBeP, métabolite principal du BBP chez l'homme, ont été testés chez la rate Wistar exposée par gavage du 15^{ème} au 17^{ème} jour de gestation. Une augmentation significative de l'incidence des testicules non descendus et une réduction de la distance anogénitale ont été observées chez les rats mâles à partir de 250 mg/kg/j (NOAEL = 167 mg/kg/j), mais une toxicité maternelle a été observée à 167 mg/kg/j (gain de poids et consommation alimentaire significativement réduits) (Ema, 2003). Dans une étude de la même équipe, une diminution de la distance anogénitale avait été observée chez les descendants mâles de rates Wistar exposées du 15^{ème} au 17^{ème} jour de la gestation à 500 mg/kg/j, également en présence de toxicité maternelle (Ema, 2002).

Etudes de fertilité

Chez le rat F344 mâle exposé pendant 10 semaines avant accouplement avec des femelles non exposées, une diminution du compte spermatique, sans modification de la fertilité, a été mise en évidence à 200 mg/kg/j (NTP, 1997).

Chez le rat WU exposé par gavage pendant deux semaines avant l'accouplement, aucune baisse de fertilité n'a été observée à 500 mg/kg/j mais une baisse significative de la fertilité et des lésions testiculaires ont été observées à 1000 mg/kg/j (Piersma, 1995).

Chez le rat Wistar, aucune baisse de fertilité n'a été observée dans une étude sur une génération pour des expositions pendant 10 semaines avant l'accouplement, puis jusqu'à la naissance, à la dose de 418 mg/kg/j (absence de LOAEL) (TNO, 1993).

Etudes sur plusieurs générations

Chez le rat Sprague-Dawley exposé avant l'accouplement puis pendant la gestation, un NOAEL de 100 mg/kg/j a été identifié. Une diminution du poids des ovaires chez les rates F0 a été mise en évidence à 500 mg/kg/j mais les performances reproductives (taux d'accouplement, taux de fertilité, durée de la gestation, et nombre de naissances vivantes) restent identiques au groupe témoin. Les descendants F1, exposés *in utero*, pendant la lactation puis par la nourriture (10 semaines) à la dose de 500 mg/kg/j, conservent également des performances reproductives normales bien qu'une diminution de la distance anogénitale et du poids des testicules et épидидymes soit observée. Une diminution transitoire du poids de naissance de la génération F1 est observée à partir de 100 mg/kg/j (NOAEL = 20 mg/kg/j). Aucun effet toxique systémique, développemental ou reproductif n'est observé à la génération F2 (Nagao *et al.* 2000).

Dans une étude plus récente conduite selon les lignes directrices de l'US EPA sur deux générations chez le rat Charles River (Tyl *et al.* 2004), on note une baisse des indices de fertilité (taux d'accouplement et taux de fertilité) des mâles F1 exposés à 750 mg/kg/j *in utero*, pendant l'allaitement, puis par la nourriture jusqu'à l'accouplement pour la génération suivante, ainsi qu'une absence de régression des mamelons et une diminution du poids absolu mais pas relatif des testicules et des épидидymes. La fertilité dans la génération F2 n'est pas étudiée. Une diminution de la distance anogénitale est observée à 250 mg/kg/j.

Mécanisme d'action

Les malformations du squelette semblent dues à une modification des ostéoblastes Py1a chez le rat. La morphologie des cellules exposées au BBP est modifiée au niveau des micro-filaments. Cette modification du cytosquelette compromet la bonne adhésion ultérieure des ostéocytes. Le BBP agirait en outre comme un anti-androgène par une réduction des taux de testostérone foétale, lui conférant des effets sur la distance anogénitale ou la descente des testicules. Le BBP a donc un mécanisme de perturbation endocrinienne.

En l'état actuel des connaissances, malgré l'absence de données sur la reproduction chez l'Homme et les différences de métabolisme constatées entre l'Homme et l'animal, le CES estime que les effets reprotoxiques et développementaux observés chez l'animal pourraient également se produire chez l'Homme.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Choix de l'effet critique

Les différentes études analysées montrent que le BBP est capable d'induire des effets sur le développement lors d'exposition *in utero* mais également des effets sur la fertilité lors d'exposition sur plusieurs générations. En outre, les études récentes tendent à confirmer le caractère de perturbateur endocrinien du BBP, avec une absence de régression des mamelons, une diminution du poids des testicules et des épидидymes ou une diminution de la distance anogénitale chez les descendants mâles lors d'exposition *in utero* ou sur plusieurs générations. A noter que la diminution de la distance anogénitale est le marqueur le plus sensible, puisqu'il est observé aux doses les plus faibles (LOAEL = 250 mg/kg/j dans une étude sur plusieurs générations). **Le CES retient donc la diminution de la distance anogénitale comme effet critique. Cet effet signe une perturbation endocrinienne.**

Choix de l'étude

Les études analysées sont de bonne qualité et toutes classées 1 selon Klimisch (protocoles respectant ceux des lignes directrices OCDE ou autres). Dans les études multigénérationnelles, des marqueurs précoces d'une activité anti-androgénique ont été mis en évidence (diminution de la distance anogénitale ou persistance des mamelons) à des

doses faibles en l'absence d'une toxicité maternelle. Ces éléments sont en accord avec les données sur le BBP qui suggèrent une perturbateur endocrinienne. L'Union Européenne a effectué l'évaluation des risques sanitaires et a classé le BBP reprotoxique de catégorie 2 sur la base de la diminution de la distance anogénitale observée dans l'étude de Tyl (2004) (European Union, 2007). Le CES estime donc cohérent de retenir l'étude de **Tyl et al. (2004)** comme étude source.

Le choix final de l'étude de Tyl et al. (2004) pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique du BBP repose sur :

- La qualité de l'étude (Klimisch 1) ;
- L'observation d'effets signant une perturbation endocrinienne en l'absence de toxicité maternelle ;
- La prise en compte de l'effet toxique le plus sensible (un NOAEL de 50 mg/kg/j a été mis en évidence dans l'étude de Tyl et al. en 2004 pour la réduction de la distance anogénitale et un NOAEL de 100 mg/kg/j a été mis en évidence dans l'étude de fertilité de Nagao et al. en 2000 pour la diminution du poids des ovaires).

Par ailleurs, le choix de l'étude de Tyl et al. (2004) est renforcé par le fait que cette étude a été retenue par l'Union Européenne pour l'établissement du NOAEL pour le BBP.

Dans cette étude, des lots de 30 rats CD mâles et femelles ont été exposés à des doses de BBP de 0 – 50 – 250 et 750 mg/kg/j, via la nourriture, pendant les 70 jours précédant l'accouplement (génération F0). La génération suivante (F1) a ensuite été exposée jusqu'à 70 jours après la naissance et enfin, la deuxième génération (F2) a été exposée pendant 28 jours. A 750 mg/kg/j, les auteurs notent une baisse des indices de fertilité (taux d'accouplement et taux de fertilité) des mâles F1, une augmentation du nombre de mamelons conservés et une diminution du poids absolu mais pas relatif des testicules et des épидидymes. Une diminution de la distance anogénitale est observée à 250 mg/kg/j ($p < 0,001$). Le NOAEL, pour cet effet, est donc de 50 mg/kg/j.

Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue (Tyl et al., 2004), la diminution significative de la distance anogénitale est constatée à **250 mg/kg/j**, correspondant au LOAEL. Le NOAEL est donc identifié à **50 mg/kg/j**.

Pour déterminer ce LOAEL, les auteurs ont utilisé les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA) et de la covariance (ANCOVA). L'hypothèse d'homogénéité de la variance a été examinée à l'aide du test de Levene. Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques attendues pour le choix du niveau de réponse. En effet, la distance anogénitale est un indicateur biologique continu. La construction d'une BMD nécessiterait de définir la variation de la distance anogénitale considérée comme néfaste au regard des données toxicologiques.

Le CES estime cependant que le couple de valeur LOAEL / NOAEL peut être proposé pour la construction de la VTR. Le faible écart entre les deux valeurs, par rapport aux autres études de la littérature, renforce la précision de la VTR.

Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : des différences importantes de métabolisme ont été observées entre l'homme et le rongeur et le facteur retenu est le facteur maximal de 10 par défaut car il n'existe pas de données sur l'impact sanitaire spécifique du MBuP ou du MBeP, métabolites principaux respectivement chez le rat et chez l'homme.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte les résultats de l'expertise collective lors de sa séance du 10 juillet 2008 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Le CES attire l'attention sur les différences de métabolisme du BBP chez le rat et chez l'Homme et l'absence de connaissance de l'impact de ces différences sur les effets sanitaires du BBP.

Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Aucune étude humaine ayant investigué les effets sur la reproduction ou le développement n'est disponible spécifiquement pour le BBP, mais de nombreuses études ont été réalisées sur l'animal, en particulier pour évaluer les effets développementaux chez le rongeur.
- ▶ Le mécanisme avancé (perturbation endocrinienne par action anti-androgène) est plausible.
- ▶ Les effets observés chez l'animal (rat) paraissent pertinents pour l'Homme bien que des différences de métabolites aient été constatées.
- ▶ La diminution de la distance anogénitale peut être retenue comme effet critique.

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement. Compte tenu des effets sur le développement de l'appareil génital mis en évidence, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique (pendant la durée de la gestation). Cette VTR protège également des effets tératogènes mis en évidence chez l'animal, pour lesquels des NOAEL étaient beaucoup plus élevés.

| -- Benzyl butyl phtalate (BBP) 85-68-7 -- | | | |
|---|---|--|---|
| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
| Diminution de la distance anogénitale chez les descendants mâles Etude sur deux générations chez le rat Sprague Dawley exposé par gavage Tyl <i>et al.</i> 2004 | NOAEL = 50 mg/kg/j LOAEL = 250 mg/kg/j | 100 UF _A 10 UF _H 10 | VTR = 0,5 mg/kg/j Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : fort VTR : fort |

*Coefficients allométriques : NEANT. Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique² à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

Recommandations du CES

Compte tenu des différences de métabolisme entre l'animal et l'Homme, le CES recommande de réaliser une veille scientifique sur le métabolisme du BBP afin de mieux

² Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

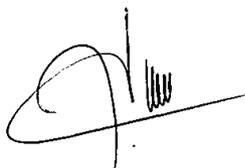
connaître les métabolites qui seraient responsables de la toxicité reproductive du BBP. Cette veille bibliographique permettra de ré-évaluer la VTR à l'issue de la publication de nouvelles données.

Il est également proposé de réaliser une veille scientifique sur les études de toxicité sur le développement conduites selon le même protocole que l'étude de Lee *et al.* (2004) qui a investigué les effets du di-n-butylphtalate (DnBP) sur le développement. En effet, le CES note que dans l'étude de Lee *et al.*, une diminution spermatocytaires et des dysplasies mamelonnaires ont été mises en évidence pour des doses aussi faibles que 2 mg/kg/j, alors qu'il est probable que le BBP et le DnBP aient une toxicité proche. Compte tenu de la différence dans les protocoles d'études toxicologiques retenues, l'existence d'un LOAEL plus faible pour le DnBP n'implique pas qu'il soit plus toxique que le BBP.

Maisons-Alfort, le 25 septembre 2008.

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES





EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

**Relatif à la construction de VTR fondées sur les effets reprotoxiques des
Nonylphénols**

Saisine Afsset n°2003/AS03

Ce document synthétise les travaux du prestataire et du rapporteur et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre du programme de travail de l'Afsset sur les VTR reprotoxiques, une phase pilote a été organisée afin de s'assurer de la mise en pratique de la méthode de construction proposée. Des VTR reprotoxiques ont été construites sous forme de prestation pour le linuron, le di-n-butylphtalate (DnBP), le benzylbutylphtalate (BBP), les nonylphénols, le toluène et le 2-éthoxyéthanol (EGEE). La DGS a saisi l'Afsset le 25 juillet 2007 pour que ces VTR soient validées dans le cadre de l'expertise collective de l'Agence.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté un rapporteur pour l'expertise du nonylphénol qui a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise ».

Description de la méthode

Sur la base du document « construction d'une VTR reprotoxique pour le nonylphénol » réalisé par l'équipe du laboratoire de toxicologie de l'Université de Bretagne Occidentale¹, le rapporteur a évalué la conformité de la méthode employée par rapport aux préconisations du groupe de travail sur les points suivants : i) recherche d'informations et ii) profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Il a ensuite donné son avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose pour les effets reprotoxiques (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

¹ Annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques

² NOAEL : « no observed adverse effect level » ; LOAEL : « lowest observed adverse effect level » ; BMDL : « benchmark dose lower confidence level » (limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose)

- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
253 av. du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. 01.56.29.19.30 Fax 01.43.96.37.67 Mél afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

Mathématiquement, la construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{\text{Dose} \cdot \text{critique}}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \text{Dose critique} = \text{NOAEL, LOAEL ou BMDL}^2 \\ \text{UF} = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

La méthode est détaillée dans le document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset. Décembre 2006) et la construction de la VTR du nonylphénol s'appuie sur cette méthode.

Une discussion collégiale au sein du CES a permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultat de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

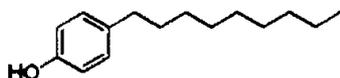
Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est basé sur les monographies réalisées au préalable par des instances nationales et sur la littérature parue postérieurement à ces monographies.

Les nonylphénols constituent une famille de composés de formule $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$ possédant un noyau benzénique et une chaîne carbonée à 9 carbones, linéaire ou ramifiée. Les nonylphénols ramifiés possèdent une chaîne principale de 8 carbones au maximum, le degré de branchements et leurs positions sont très variables selon les isomères. Les principaux composés sont :

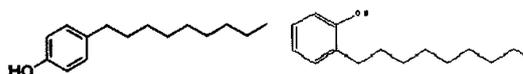
- 4-nonylphénol linéaire, 4-n-nonylphénol ou p-nonylphénol (n°CAS 104-40-5),
- 4-nonylphénol ramifié (n° CAS 84852-15-3),
- n-nonylphénol (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire) (n° CAS 25154-52-3),
- Nonylphénol ramifié (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée) (n° CAS 90481-04-2).

NONYLPHENOL LINEAIRE

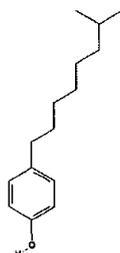
4-nonylphénol linéaire
(n° CAS 104-40-5)



n-nonylphénol, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire
(n° CAS 25154-52-3)

**NONYLPHENOL RAMIFIE**

4-nonylphénol ramifiée
(n° CAS 84852-15-3)



Nonylphénol ramifié, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée
(n° CAS 90481-04-2)

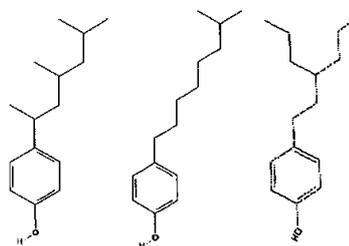


Figure 1 : Formules chimiques des principaux composés

Les données rapportées ci-dessous concernent les formes linéaires et ramifiées. Dans cette note d'expertise, le terme nonylphénol, s'il n'est pas précisé, couvre tous les types de nonylphénol.

Le nonylphénol est utilisé principalement pour la production de surfactants (NP-polyéthoxylates) contenus dans les produits de consommation (produits ménagers, hygiène corporelle, ...), ainsi que pour la production de résines ou de plastiques, dont des plastiques alimentaires. La population générale peut être exposée lors de l'utilisation de produits de consommation courante. La voie d'exposition peut alors être respiratoire (produits ménagers), cutanée (produits d'hygiène), ou orale (lors de la migration du nonylphénol dans la nourriture à partir des matériaux en contact avec les aliments ou de l'eau de boisson). L'évaluation européenne réalisée sur les nonylphénols linéaire et ramifié (n° CAS 84852-15-3 et 25154-52-3) en 2002 conclut que la voie d'exposition principale est la voie orale (UE, 2002).

Le 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3) et le n-nonylphénol (n°CAS 25154-52-3) sont classés depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 3 pour le développement et pour la reproduction (R63 : risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant et R62 : risque possible d'altération de la fertilité). Ces deux composés sont également classés comme substances nocives (R22 : nocif en cas d'ingestion), corrosives (R34 : provoque des brûlures), et dangereuses pour l'environnement (R50-53 : très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique).

Toxicocinétique

Peu de données de toxicocinétique sont disponibles actuellement. Chez l'animal, l'absorption par le tractus gastro-intestinal du nonylphénol serait rapide et probablement importante. Le métabolisme principal passe par une glucurono- et une sulfo-conjugaison. Les voies d'excrétion principales sont les fèces et les urines. Le nonylphénol a été retrouvé inchangé dans la bile lors

d'exposition de rats à de fortes doses, témoignant d'une saturation métabolique ou d'une excrétion du composé parent concomitante à la métabolisation. Chez l'Homme, la biodisponibilité par voie orale a été estimée à 20 % environ. Les métabolites mis en évidence chez le rat et chez l'Homme sont qualitativement identiques entre ces espèces.

Effets sanitaires

Par voie orale et en exposition chronique, des effets rénaux ont été mis en évidence à des faibles doses (15 mg/kg pc/j) chez le rat. Des effets reprotoxiques et développementaux ont également été mis en évidence pour des expositions du même ordre de grandeur et il apparaît pertinent de prendre en compte ces effets pour la construction de VTR reprotoxiques spécifiques.

Aucune donnée humaine n'est disponible.

- *Effets néphrotoxiques*

Une étude de toxicité à dose répétée (90 jours) conduite chez le rat par voie orale a montré une diminution du gain de poids et de la prise alimentaire, ainsi que des lésions histologiques hépatiques (nécrose cellulaire) et rénales (minéralisation notée lors d'une deuxième lecture anatomopathologique) à 140 mg/kg pc/j de 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3) (CMA, 1997, Cunny *et al.*, 1997). Un NOAEL de 50 mg/kg pc/j a été identifié.

Lors d'une étude sur 3 générations (NTP, 1997, Chapin *et al.*, 1999) où des rats Sprague Dawley ont été exposés par voie orale à du 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3), une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins ont été observées à 50 mg/kg pc/j. En outre, dès 15 mg/kg pc/j et pour toutes les générations, des lésions dégénératives et une dilatation tubulaire rénale non dose-dépendantes ont été mises en évidence.

- *Effets reprotoxiques*

Les effets reprotoxiques du nonylphénol ont été décrits chez des rats exposés sur plusieurs générations ou lors d'exposition *in utero*. Les effets observés aux plus faibles doses sont des perturbations du système reproductif des nouveau-nés (précocité de l'ouverture vaginale et une baisse du poids des ovaires et du compte spermatique), probablement sans atteinte fonctionnelle de la reproduction et de la fertilité, et des modifications des épидидymes lors d'expositions pendant la gestation [UE, 2002].

Ces effets reprotoxiques chez les nouveaux-nés sont observés en présence de modifications au niveau du foie et des reins chez les parents lors d'expositions sur plusieurs générations (Nagao *et al.*, 2001). En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'établir un lien de causalité entre la toxicité générale observée sur la génération F0 (modifications histologiques hépatiques et rénales) et la reprotoxicité mise en évidence sur la génération F1. Par prudence, une VTR fondée sur des effets reprotoxiques peut être proposée.

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, plusieurs études de reprotoxicité de bonne qualité réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après. D'autres études ont été conduites par voie intra-péritonéale. Elles n'ont pas été jugées pertinentes pour la construction d'une VTR reprotoxique car le mode d'administration (voie intra-péritonéale) n'est pas représentatif des conditions réelles d'exposition de l'embryon.

- Etudes de toxicité pré ou postnatale

Une première étude réalisée chez des rats Wistar exposés au nonylphénol du 9^{ème} au 15^{ème} jour de gestation n'a pas mis en évidence de toxicité pour le développement jusqu'à 300 mg/kg pc/j (Initiative Umweltrelevante Altstoffe, 1992).

La seconde étude a été réalisée chez des rats Wistar exposés *in utero* à du 4-nonylphénol linéaire (n°CAS 104-40-5) par gavage de la mère du 11^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation aux

doses de 0, 3, 15 et 75 mg/kg pc/j (Hossaini *et al.*, 2001). Les effets ont été observés après la naissance sur la F1 à J11, J21 et J110. A J110, une diminution dose-dépendante du poids absolu de l'épididyme droit a été observée à partir d'une exposition de 15 mg/kg pc/j. Un NOAEL de 3 mg/kg pc/j a été identifié.

Dans la troisième étude, les rats Sprague-Dawley ont été exposés du 7^{ème} jour de la gestation (GD7) à la 10^{ème} semaine postnatale, par gavage de 4-nonylphénol linéaire (De Jager *et al.* 1999). Les auteurs ont observé une mortalité ainsi qu'une diminution du poids absolu des testicules et des épididymes, une diminution du diamètre des tubes séminifères et de l'épaisseur de l'épithélium basal à 100 mg/kg pc/j, en présence d'une mortalité. Une diminution du compte spermatique a également été observée, mais à 250 mg/kg pc/j. Aucun NOAEL n'a pu être identifié.

Récemment, Moon *et al.* (2007) ont réalisé une étude portant sur les effets d'une exposition orale d'un mélange d'isomères branchés du nonylphénol, aux doses de 0, 10 et 100 mg/kg pc/j, sur le développement de la glande mammaire chez des rats Long Evans. Les mères ont été exposées au nonylphénol ramifié du 15^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation et les effets ont été observés chez les femelles F1 au 4^{ème}, 22^{ème}, 33^{ème}, 41^{ème} et 66^{ème} jour post-natal (J4, J22, J33, J41 et J66, respectivement). A 100 mg/kg pc/j, les effets observés sont une augmentation du poids utérin (J41), une augmentation du taux de branchement des canaux primaires en canaux secondaires (J4), une augmentation du nombre de bourgeons alvéolaires et une différenciation des bourgeons de l'extrémité terminale en bourgeons alvéolaires (J33). Dès 10 mg/kg pc/j, il a été observé une diminution des branchements primaires du canal collecteur de la glande mammaire et un retard dans la migration de l'épithélium mammaire vers le nœud lymphatique (J22).

Des effets endocriniens ont été aussi observés à J41 avec une baisse de la LH pituitaire, une augmentation du nombre de récepteurs de l'œstrogène dans le stroma et l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus et une augmentation du nombre de récepteurs de la prolactine dans les glandes mammaires à la dose de 100 mg/kg pc/j. Il peut être noté une augmentation du nombre de récepteurs de la progestérone dans l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus à 10 mg/kg pc/j et une diminution à 100 mg/kg pc/j. A 10 et 100 mg/kg pc/j, une baisse de la TSH pituitaire est observée. Ainsi, en tenant compte de tous ces effets, un LOAEL de 10 mg/kg pc/j peut être proposé. Aucun NOAEL n'est identifié.

- Etude de toxicité sur plusieurs générations

Dans l'étude du NTP (1997), publiée par Chapin *et al.* en 1999, des rats Sprague-Dawley ont été exposés par voie orale à 0, 15, 50 et 160 mg/kg pc/j (0, 200, 650 et 2000 ppm) de 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3). L'exposition a été maintenue sur trois générations (de la semaine 7 pour F0 à la semaine 8 pour F3). La fertilité et les accouplements sont normaux. On note à 160 mg/kg pc/j un allongement du cycle œstral (chez les F1 et F2) et à 50 et 160 mg/kg pc/j, une ouverture vaginale précoce (chez les F1, F2 et F3), une diminution du poids des ovaires (sans lésion histologique), une diminution de la densité spermatique épididymaire et du compte des spermatozoïdes chez les F2. Pour ces modifications spermatiques, l'explication est incertaine. Les perturbations du système reproductif apparaissent mineures et sans retentissement sur la fertilité. Un NOAEL concernant les effets reprotoxiques a été identifié à 15 mg/kg pc/j. Ces effets sont également accompagnés d'une toxicité générale avec une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins à 50 et 160 mg/kg pc/j. Le NOAEL observé dans cette étude est de 15 mg/kg pc/j pour les effets sur la reproduction.

Dans l'étude de Nagao *et al.* (2001), des rats Sprague-Dawley ont été exposés à un mélange d'isomères linéaires du nonylphénol (n°CAS 25154-52-3) par gavage aux doses de 0, 2, 10 et 50 mg/kg pc/j.

Dans le dernier groupe de dose (50 mg/kg pc/j), une diminution du poids corporel a été mise en évidence dans la génération parentale, mais elle n'est pas significative. Une augmentation du poids du foie et des reins, associée dans la génération parentale (F0) à des modifications

histologiques (hypertrophie centrolobulaire, corps éosinophiles), a également été observée à cette dose. Les auteurs concluent à une absence de signification toxicologique claire, ce qui a été également suggéré dans d'autres études (Cunney *et al.*, 1997).

Chez les femelles F0 et F1, une diminution significative du poids absolu et relatif des ovaires est observée à 50 mg/kg pc/j sans atteinte histologique associée. Chez les femelles de la génération F1, une diminution statistiquement significative de la LH sérique (5,5 ng/mL versus 7,2 ng/mL chez les témoins, $p < 0,05$) et une ouverture vaginale précoce (à PND 31,5 en moyenne versus 33,4 chez les témoins, $p < 0,01$) sont observées à la plus forte dose testée. Une diminution statistiquement significative ($p < 0,05$) du nombre de petits par portée (11,5 versus 13,5 en moyenne chez les témoins) et du nombre de sites d'implantation (12,5 versus 14,9 en moyenne chez les témoins) est observée à 50 mg/kg pc/j dans la génération F2. Une augmentation des niveaux de testostérone chez les mâles et du poids de l'utérus chez les femelles de la génération parentale (F0) est reportée à 2 mg/kg pc/j, mais n'est pas observée aux doses supérieures. Une augmentation du poids de la prostate chez les mâles avant sevrage et une diminution des niveaux de FSH chez les mâles adultes sont observés à 2mg/kg pc/j dans la génération F1. Ces effets ne sont plus mis en évidence pour les doses supérieures (10 et 50 mg/kg pc/j). Les auteurs proposent un NOAEL de 10 mg/kg pc/j pour ces effets reprotoxiques.

Toutes les expérimentations animales retenues sont conduites selon des protocoles rigoureux (lignes directrices de l'OCDE ou s'y apparentant). Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

Mécanisme d'action

Seul le mécanisme d'action lié aux effets reprotoxiques a été investigué. Une réponse utérotrophique et une ouverture vaginale précoce ont été clairement mises en évidence lors d'études *in vivo* chez la rate immature ou ovariectomisée, permettant de conclure à l'activité œstrogénique du nonylphénol. Les études *in vitro* confirment cette activité, qui serait 10^3 à 10^6 fois inférieure à celle du 17- β -œstradiol [UE, 2002].

Le test utérotrophique chez la rate est un test reconnu prédictif des effets perturbateurs endocriniens chez l'Homme. Ainsi, au vu de l'ensemble des données disponibles, les effets reprotoxiques observés chez l'animal pourraient également être observés chez l'Homme.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Comme il existe plusieurs formes de nonylphénol, le CES a proposé de construire deux VTR, l'une pour les formes dont la chaîne alkyle est linéaire et l'autre pour les formes dont la chaîne alkyle est ramifiée.

Le nonylphénol ramifié (CAS n° 90481-04-2 et 84852-15-3)

- *Choix de l'effet critique*

Le nonylphénol ramifié a montré une activité œstrogénique aussi bien dans les études *in vitro* (10^3 à 10^6 fois plus faible que celle de l'œstradiol) qu'*in vivo*. Les différentes études analysées mettent en évidence une activité œstrogénique lors d'exposition *in utero* et sur plusieurs générations. Ces études mettent en évidence des effets sur les ovaires (diminution du poids des ovaires sans lésion histologique) et sur les spermatozoïdes des descendants (diminution de la densité spermatique épидидymaire et du nombre de spermatides), une ouverture vaginale précoce, et des effets sur le développement des glandes mammaires (diminution des branchements primaires du canal collecteur et retard de migration de l'épithélium vers les nœuds lymphatiques au 22^{ème} jour après la naissance). Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- La plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- La bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

Il convient de noter que les effets sur la glande mammaire semble être le marqueur le plus sensible puisqu'ils sont observés aux doses les plus faibles (LOAEL = 10 mg/kg pc/j). **Le CES a donc retenu les effets sur la glande mammaire comme effet critique.**

- *Choix de l'étude*

Deux études décrites précédemment (Chapin *et al.*, 1999 ; Moon *et al.*, 2007) peuvent être retenues pour les composés ramifiés du nonylphénol. Un tableau comparatif de ces 2 études se trouve en annexe 3.

Le choix de l'étude de **Moon *et al.* (2007)** pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique du nonylphénol ramifié repose sur :

- La prise en compte de l'effet toxique le plus sensible : un LOAEL de 10 mg/kg pc/j a été mis en évidence dans l'étude de Moon *et al.* (2007) pour les effets sur les glandes mammaires tandis que l'étude de fertilité de Chapin *et al.* (1999) a mis en évidence un NOAEL de 15 mg/kg pc/j pour d'autres effets œstrogéniques. Chapin *et al.* n'ont pas étudié les effets sur les glandes mammaires. Le choix de l'étude de Moon *et al.* permet de protéger des effets apparaissant à des doses plus élevées dans l'étude de Chapin.
- La qualité de l'étude jugée acceptable par les experts, même si elle ne suit pas la totalité des recommandations de l'OCDE (ligne directrice 414).

- *Choix de la dose critique*

Parmi les 2 études sélectionnées, celle ayant conduit à observer des effets aux doses les plus faibles (Moon *et al.*, 2007) a été retenue par les experts pour dériver la dose critique.

Le LOAEL de 10 mg/kg pc/j issu de cette étude a donc été proposé comme dose critique.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

- *Choix des facteurs d'incertitude*

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : Selon la méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement, l'Afsset préconise un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Le CES propose un facteur 3 car le LOAEL issu de l'étude de Moon est plus bas que ceux établis dans d'autres études, suggérant que les effets retenus sont très sensibles.
- UF_D : insuffisance de données : non applicable, les données étant jugées suffisantes.

Le nonylphénol linéaire (CAS n° 25154-52-3 et 104-40-5)

- *Choix de l'effet critique*

Le nonylphénol linéaire a montré aussi bien dans les études *in vivo* qu'*in vitro* une activité œstrogénique, 10³ à 10⁶ fois plus faible que celle de l'œstradiol. Les études multigénérationnelles de bonne qualité scientifique mettent en évidence des **effets sur l'ouverture vaginale et les ovaires** dès 50 mg/kg pc/j, sans modification fonctionnelle de la reproduction. Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- la plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- la bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

- *Choix de l'étude*

Les deux études retenues décrites précédemment (cf. partie effets reprotoxiques) concernant le nonylphénol linéaire sont celles de Hossaini *et al.* (2001) et de Nagao *et al.* (2001). Un tableau comparatif de ces deux études se trouve en annexe 4.

Ces deux études sont de bonne qualité (Klimisch 1). Dans l'étude d'Hossaini *et al.* (2001), uniquement la diminution du poids absolu de l'épididyme droit est rapportée par les auteurs comme statistiquement significative. Par conséquent, l'étude ne sera pas retenue pour la construction de la VTR. Ainsi, l'étude de Nagao *et al.* (2001) qui met en évidence une activité œstrogénique chez les rates F1 exposées au nonylphénol linéaire, est retenue comme étude clé pour construire la VTR.

- *Choix de la dose critique*

Dans l'étude retenue (Nagao *et al.*, 2001), la diminution de la LH sérique et du poids des ovaires, et l'ouverture vaginale précoce sont observées à 50 mg/kg pc/j, dose correspondant au LOAEL.

Il est important de souligner que d'autres modifications biologiques apparaissent à la plus faible dose. En effet, une diminution de la FSH est observée chez les mâles de la génération F1 à 2 mg/kg pc/j, mais pas aux doses supérieures (224 ng/ml vs 302 ng/ml chez les témoins). Les auteurs précisent que les données sur les concentrations hormonales doivent être interprétées avec précaution tant que de nouvelles études n'ont pas confirmé leurs résultats. De même, une augmentation du poids relatif et absolu de la prostate et de la vésicule séminale est rapportée pour la seule dose de 2 mg/kg pc/j (respectivement, 12,8±2 mg vs 11,4±2,2 mg chez les témoins et 76,4±13,6 mg vs 68,4±12,9 mg chez les témoins).

Le CES a décidé de retenir comme dose critique le NOAEL de 10 mg/kg pc/j proposé par les auteurs.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques rencontrées pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

Le CES estime cependant que le couple de valeur LOAEL / NOAEL peut être proposé pour la construction de la VTR. Le faible écart entre les deux valeurs renforce la précision de la VTR.

- *Choix des facteurs d'incertitude*

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'Homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : non applicable
- UF_D : insuffisance de données : dans l'étude retenue (Nagao *et al.*, 2001) ont été étudiés de nombreux effets mais pas ceux sur la glande mammaire. Ces effets semblent pourtant apparaître à des niveaux beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10 mg/kg pc/j comme le montre l'étude de Moon *et al.*, 2007 sur le nonylphénol ramifié. Ainsi, le CES propose un facteur de 3 pour l'absence de données sur la glande mammaire.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 22 janvier 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

- ▶ Le nonylphénol est une famille de composés qui a fait l'objet de plusieurs études de reprotoxicité chez le rongeur. Deux VTRs ont été construites, une pour les composés linéaires et une pour les composés ramifiés.
- ▶ Aucune donnée humaine n'est disponible.
- ▶ L'hypothèse retenue est de considérer que les effets observés chez le rat sont pertinents pour l'Homme et que les effets de type œstrogénique peuvent être retenus comme effets critiques. Le mécanisme avancé (action œstrogénique) est plausible et corrélé aux effets mis en évidence.
- ▶ Même si l'objectif est de construire une VTR reprotoxique, d'autres effets, tels que des effets néphrotoxiques, sont susceptibles de se produire à des niveaux de doses comparables.
- ▶ Le rapport européen conclut à un NOAEL de 15 mg/kg pc/j pour les effets sur la reproduction en se basant sur l'étude du NTP, 1997. Les études choisies ici pour construire les VTR sont plus récentes et de ce fait, n'avaient pas pu être prises en compte dans le rapport européen.

Le CES propose ainsi la construction de deux VTR, pour les nonylphénols linéaire et ramifié, spécifiques aux effets sur le développement et la reproduction. Compte tenu des effets sur le développement, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique.

| -- Nonylphénol ramifié CAS 90481-04-2 et 84852-15-3 -- | | | |
|--|---|---|--|
| Effet critique | Dose critique* | UF** | VTR |
| Effets sur le développement de la glande mammaire Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez le rat Long Evans Moon <i>et al.</i> , 2007 | LOAEL = 10 mg/kg pc/j Pas de construction de BMDL | 300 UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3 | VTR = 0,03 mg/kg/j Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen |

*Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

** UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

| -- Nonylphénol linéaire CAS 25154-52-3 et 104-40-5 -- | | | |
|--|--|---|--|
| Effet critique | Dose critique* | UF** | VTR |
| Diminution LH sériquer, ouverture vaginale précoce (F1) | LOAEL = 50 mg/kg pc/j NOAEL = 10 mg/kg pc/j | 300 | VTR = 0,03 mg/kg/j |
| Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rats Sprague-Dawley | Pas de construction de BMDL | UF _A 10 UF _H 10 UF _D 3 | Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la glande mammaire) Etude : fort Dose critique : fort VTR : moyen |
| Nagao <i>et al.</i> , 2001 | | | |

*Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

** UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

Recommandations du CES

Le CES souligne que l'on ne dispose pas des mêmes informations pour la construction des VTR des 2 types de nonylphénol. En effet, la VTR du nonylphénol ramifié est fondée sur des effets sur le développement de la glande mammaire (Moon *et al.*, 2007) alors que ces effets n'ont pas été étudiés spécifiquement pour le nonylphénol linéaire dans l'étude de Nagao *et al.*. Ainsi, le CES recommande de réaliser une veille scientifique qui permettrait de réévaluer la VTR du nonylphénol linéaire lorsque de nouvelles données prenant en compte ce type d'effet seront publiées.

Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique² à la dose critique car ce type d'ajustement n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

Enfin, le CES recommande d'étudier les effets des différents isomères de nonylphénols isolément afin d'apprécier l'influence de la longueur de la chaîne principale et de permettre une comparaison des effets toxiques d'une exposition à ces substances chimiques structuralement proches.

Maisons-Alfort, le 06 mars 2009

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES



² Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatif à la construction de VTR fondées sur les effets reprotoxiques du toluène

Saisine Afsset n°2003/AS03

Ce document synthétise les travaux du prestataire et du rapporteur et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre du programme de travail de l'Afsset sur les VTR reprotoxiques, une phase pilote a été organisée afin de s'assurer de la mise en pratique de la méthode de construction proposée. Des VTR reprotoxiques ont été construites sous forme de prestation pour le linuron, le di-n-butylphtalate (DnBP), le benzylbutylphtalate (BBP), le nonylphénol, le toluène et le 2-éthoxyéthanol (EGEE). La DGS a saisi l'Afsset le 25 juillet 2007 pour que ces VTR soient validées dans le cadre de l'expertise collective de l'Agence.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté un rapporteur pour l'expertise du toluène qui a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise ».

Description de la méthode

Sur la base du document « construction d'une VTR reprotoxique pour le toluène » réalisé par l'INERIS¹, le rapporteur a évalué la conformité de la méthode employée par rapport aux préconisations du groupe de travail sur les points suivants : i) recherche d'informations et ii) profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Il donne ensuite son avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose pour les effets reprotoxiques (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

¹ Annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques

² NOAEL : « no observed adverse effect level », dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin, issue de l'identification du LOAEL ; LOAEL : « lowest observed adverse effect level », dose minimale entraînant un effet considéré comme néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin ; BMDL : « benchmark dose lower confidence level » (limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose)

• Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
253 av. du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. 01.56.29.19.30 Fax 01.43.96.37.67 Mèl afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

Mathématiquement, la construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{\text{Dose critique}}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \text{Dose critique} = \text{NOAEL, LOAEL ou BMDL}^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

La méthode est détaillée dans le document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset, Décembre 2006) et la construction de la VTR du toluène s'appuie sur cette méthode.

Une discussion collégiale au sein du CES a ensuite permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultat de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'informations, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 » (Afsset, 2006). Le rapport est basé sur les monographies réalisées antérieurement à ce travail par des instances nationales et sur la littérature parue après ces monographies.

Le toluène est une substance chimique volatile largement utilisée, comme intermédiaire de synthèse dans l'industrie chimique, pharmaceutique et cosmétique, mais également en tant que solvant dans les peintures, encres, produits ménagers ou adhésifs ainsi que comme additif dans l'essence. Compte tenu des propriétés physico-chimiques et des usages du toluène, l'exposition peut se faire par voie respiratoire ou cutanée, mais la principale exposition de l'Homme est respiratoire.

Le toluène est classé depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 3 pour le développement (R 63, risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant).

Il est également classé R 11 (facilement inflammable), R 38 (irritant pour la peau), R 48/20 (nocif : risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par inhalation), R 65 (nocif : peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion), R 67 (l'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges).

Toxicocinétique

Chez l'animal, l'absorption par voie orale du toluène par le tractus gastro-intestinal est pratiquement totale. L'absorption respiratoire serait de 50 % à 90 % en fonction du débit

ventilatoire, l'absorption cutanée serait limitée pour le toluène sous forme liquide et négligeable avec des vapeurs de toluène (EC, 2003)

Le métabolisme du toluène est comparable entre le rongeur et l'Homme. Chez l'Homme, le principal métabolite est l'acide benzoïque, issu de l'oxydation du groupement méthyl porté par le noyau benzénique par les cytochromes P450. Une glycoconjugaison peut conduire à la formation de l'acide hippurique. La biotransformation conduit de manière transitoire à la formation de métabolites réactifs toxiques comme les crésols et certaines quinones (méthylhydroquinone, méthylbenzoquinone). Chez l'animal, les données sont comparables, avec production minoritaire de benzoylglucuronide. Enfin, le toluène a une affinité importante pour les tissus ou liquides riches en graisses (tissus adipeux, cerveau, lait maternel).

Effets sanitaires

Par voie respiratoire lors d'une exposition chronique, des effets neurologiques ont été mis en évidence chez le rongeur comme chez l'Homme. Des effets reprotoxiques et développementaux ont également été mis en évidence en particulier chez l'animal ; toutefois, les effets neurologiques sont rapportés pour des concentrations plus faibles que les effets sur la fertilité ou le développement. Chez l'Homme, bien que peu d'études aient investigué les effets reprotoxiques liés au toluène, les niveaux d'exposition associés aux effets reprotoxiques étaient également plus élevés que ceux associés aux effets neurotoxiques. Compte tenu que le toluène est classé comme ayant un potentiel reprotoxique (catégorie 3 au niveau européen), il apparaît pertinent de prendre en compte ces effets pour la construction d'une VTR spécifique pour des effets reprotoxiques.

- *Effets neurologiques*

Chez l'Homme, des expositions à des concentrations élevées de toluène (100 à 500 mg.m⁻³) sont responsables de dysfonctionnements cérébraux, pyramidaux et cognitifs importants entraînant des altérations auditives, visuelles et comportementales. Ces effets ont aussi été observés chez l'animal. Des VTRs spécifiques pour la neurotoxicité ont été construites par d'autres agences. En 2000, l'ATSDR a établie des VTRs par inhalation pour le toluène pour une exposition chronique = 0,3 mg.m⁻³ et pour une exposition aiguë = 3,8 mg.m⁻³.

- *Effets reprotoxiques*

Les effets reprotoxiques du toluène sont décrits chez l'animal, en particulier chez le rat pour lequel l'exposition au toluène ne semble pas induire de malformations mais serait à l'origine d'une diminution du poids de naissance, de retards de développement post-natal et d'altérations comportementales. Concernant les effets sur la fertilité, une seule étude a mis en évidence chez le rat une diminution significative du nombre de spermatozoïdes et du poids de l'épididyme à 7 500 mg.m⁻³ (Ono *et al.*, 1996).

Des effets reprotoxiques sont également suspectés chez l'Homme : certaines études épidémiologiques réalisées en milieu professionnel ont mis en évidence une relation significative entre le risque d'avortements spontanés et une exposition au toluène de l'ordre de 50 à 150 ppm, soit en moyenne de 88 ppm (environ 330 mg.m⁻³) (Ng *et al.*, 1992, cité dans EU, 2003). D'autres études ont observé chez l'Homme une diminution des niveaux de LH, FSH et testostérone sanguine pour des concentrations assez faibles (autour de 100 mg.m⁻³), sans trouble de la fertilité identifié ni altération des organes de la reproduction.

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues par les experts. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés chez l'homme. Concernant les effets sur le développement, compte tenu du nombre important d'études réalisées chez le rongeur, seules les études les mieux cotées selon la classification de Klimisch seront synthétisées ci-après. Pour plus d'éléments, le lecteur pourra se référer à l'annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset, 2007).

- Etudes de développement prénatal

Etude de Roberts *et al.* 2007 :

Cette étude a été réalisée chez des rates Sprague-Dawley exposées pendant la gestation du 6^{ème} au 15^{ème} jour, 6 heures par jour, à 0 – 938 – 2812 – 5625 et 11250 mg.m⁻³. Les auteurs concluent à l'absence d'effets significatifs sur la progéniture à 2812 mg.m⁻³. Un NOAEL a été proposé à 2812 mg.m⁻³ sur la base de l'observation d'une diminution du poids des fœtus et des retards d'ossification à 5625 mg.m⁻³. Les effets sur les mères sont observés pour des doses de 5625 et 11250 mg.m⁻³ (diminution du gain de poids corporel pour la dose la plus élevée, ataxie).

Etude de Thiel et Chahoud, 1997 :

Cette étude a été réalisée chez des rates Wistar qui ont été exposées du 9^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation, 6 heures par jour à 0 – 1130 – 2300 – 3800 et 4560 mg.m⁻³. A partir de 3800 mg.m⁻³, une diminution du poids corporel à la naissance et un retard d'ouverture vaginale d'au moins 5 jours ont été rapportés. On note également une augmentation de la mortalité post-natale avant le sevrage à 4560 mg.m⁻³. Un NOAEL a été proposé à 2300 mg.m⁻³. Une diminution du poids corporel maternel est également rapportée à 3800 et 4560 mg.m⁻³, mais de façon non statistiquement significative.

Etude de Saillenfait *et al.*, 2007 :

Cette étude a été réalisée chez des rates Sprague-Dawley exposées pendant la gestation du 6^{ème} au 20^{ème} jour, 6 heures par jour, à 0 – 1875 – 5625 mg.m⁻³. Une diminution significative du poids corporel des fœtus a été observée à 5625 mg.m⁻³ conduisant à un NOAEL de 1875 mg.m⁻³. Les auteurs rapportent également une diminution du gain de poids maternel du 6^{ème} au 13^{ème} jour de la période d'exposition à 5625 mg.m⁻³.

- Etudes de fertilité

Etude de Ono *et al.* 1996 :

Cette étude a mis en évidence des effets sur la fertilité chez le rat mâle exposé au toluène à 2250 et 7500 mg.m⁻³ : des rats Sprague-Dawley ont été exposés 60 jours (mâles) et 14 jours (femelles) avant l'accouplement puis jusqu'au 7^{ème} jour de gestation pour les femelles. Seule une diminution des poids relatifs et absolus des épидидymes et une diminution du nombre de spermatozoïdes de 20 à 25 % ont été mises en évidence à 7500 mg.m⁻³, sans altération histopathologique ni modification du nombre des cellules spermatogéniques. Un NOAEL a été identifié à 2250 mg.m⁻³.

- Etudes sur plusieurs générations

Etude de Roberts *et al.* 2003 :

Cette étude a investigué les effets liés à une exposition au toluène sur plusieurs générations. Des rats Sprague Dawley Crl:CD[SD]BR ont été exposés à 0 – 375 – 1875 et 7500 mg.m⁻³ par inhalation. Les mâles et les femelles de la première génération (parent, F0) ont été exposés 80 jours avant l'accouplement puis 15 jours pendant la période de l'accouplement, 6 heures par jour et 7 jours par semaine. Les femelles F0 gestantes ont ensuite été exposées de GD1 à GD20 puis la progéniture de PND5 à PND21. La génération F1 sélectionnée pour être mise à la reproduction a été exposée sur le même schéma. Un autre schéma expérimental a consisté à exposer soit les mâles, soit les femelles à 0 et 7500 mg.m⁻³ et à les accoupler avec des animaux non exposés. Les résultats montrent que le poids moyen de la génération F1, chez les mâles comme les femelles, est significativement diminué à 7500 mg.m⁻³ chez les rats issus de deux parents exposés (p<0,01) ou issus d'une mère exposée (p<0,05), mais pas lorsque seul le père était exposé. La fertilité et les performances reproductives n'ont pas été affectées. Le poids a été mesuré pendant la période de lactation à LD1, LD4, LD14 et LD21. Dès le premier jour (LD1), et pour la plus forte dose (7500 mg.m⁻³) le poids des rats est diminué (5,7 ou 5,9 *versus* 6,5 g pour les mâles, 5,3 ou 5,5 *versus* 6 g pour les femelles par rapport aux non

exposés). L'effet retenu est la diminution du poids des petits pour les générations F1 et F2. Le NOAEL a été identifié à 1875 mg.m⁻³ en l'absence d'une toxicité maternelle. Ces expérimentations animales sont conduites selon des protocoles rigoureux (assimilables aux lignes directrices de l'OCDE). Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du toluène à l'origine des effets reprotoxiques n'est pas connu. Au vu de l'ensemble des données disponibles sur le métabolisme et les effets chez l'animal et chez l'Homme, il est prudent de considérer que les effets reprotoxiques du toluène observés chez l'animal puissent aussi survenir chez l'homme.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Choix de l'effet critique

Il est retrouvé dans la plupart des études expérimentales chez le rat et pour des niveaux de doses similaires, une diminution du poids de naissance qui apparaît comme un effet pertinent à prendre en compte. En outre, d'autres études ont rapporté des effets neuro-développementaux chez les ratons pour les mêmes niveaux d'exposition.

Concernant les effets sur la fertilité, une seule étude a montré des effets chez le rat mâle (Ono et al., 1996). Une diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes a été observée à 7500 mg.m⁻³. Cependant, ces effets surviennent à une dose à laquelle une toxicité rénale ainsi qu'une diminution du poids du thymus est également décrite chez les mâles. La NOAEL reprotoxique dérivée de cette étude est de 2250 mg.m⁻³, soit supérieure à la NOAEL reprotoxique issue de l'étude de Roberts 2003 pour un effet sur le développement. Les experts ont décidé de ne pas retenir l'étude de Ono *et al.* pour la construction de la VTR reprotoxique, en raison du faible nombre de doses testées (2250 mg.m⁻³ et 7500 mg.m⁻³) sans pour autant écarter l'existence d'un effet sur la fertilité du toluène.

Ces effets sur la fertilité seraient également pertinents chez l'Homme et il apparaît nécessaire d'assurer une veille scientifique sur les effets du toluène sur la fertilité afin de pouvoir apporter des éléments plus complets.

Concernant les avortements spontanés tardifs observés dans l'étude de Ng et al, celle-ci ne répondant pas aux critères élaborés dans la construction des VTR, n'a pas été retenue par le CES, compte tenu des biais relevés par les experts dans l'estimation des expositions (exposition à d'autres polluants, niveaux d'exposition mal renseignés, faible nombre d'individus impliqués dans l'étude)².

L'effet critique retenu pour l'établissement d'une VTR liée aux effets sur le développement, sera donc la **diminution du poids de naissance** mis en évidence dans plusieurs études. Ceci est en accord avec la caractérisation des risques conduits par l'Union Européenne. La VTR retenue devra également protéger des effets sur la fertilité.

Choix de l'étude

Les données chez l'Homme et chez le rat, ainsi que quelques éléments chez la souris sont en faveur d'effets sur le développement similaires entre les espèces (faible poids de naissance, retard de développement postnatal et neurotoxicité).

² Toutefois, si cette étude avait été utilisée, le même ordre de grandeur aurait été obtenu pour la caractérisation du risque.

Quatre études ont mis en évidence des effets sur le poids de la progéniture. (Roberts, 2007, 2003 ; Thiel and Chahoud, 1997, Saillenfait et al. 2007). Le CES propose de retenir l'étude de Roberts, 2003 comme étude source pour les raisons suivantes :

- Etude menée sur deux générations ;
- Observations et analyse effectuées sur les deux sexes.

Cette étude est classée 1a selon Klimisch (respect des lignes directrices de l'OCDE et des bonnes pratiques de laboratoire).

Concernant l'évaluation des risques réalisés par l'Union Européenne, celle-ci se fonde sur la valeur de LOAEC de 88 ppm (330 mg.m⁻³) chez l'Homme pour la caractérisation du risque d'avortement spontané tardif (étude de Ng *et al.*, 1992) et sur le NOAEC de 600 ppm (2250 mg.m⁻³) (étude d'Ono *et al.*, 1996), pour la caractérisation des risques pour la fertilité et de Thiel *et al.* (1997) pour la caractérisation des risques pour les effets sur le développement liés au toluène. Cependant, ces études n'ont pas été retenues par les experts pour la construction de la VTR reprotoxique, pour les raisons explicitées ci-dessus.

Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue, la diminution du poids est observée à la dose de 7500 mg.m⁻³, correspondant donc au LOAEL. Le NOAEL est à 1875 mg.m⁻³.

Pour déterminer ce LOAEL basé sur des données continues (poids du corps), les auteurs ont utilisé la méthode d'analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de Bartlett. Pour déterminer les différences statistiquement significatives, un test de Dunett ou de Student a été réalisé. L'unité expérimentale était la portée. Les seuils de 0,01 et 0,05 ont été retenus pour la significativité des résultats.

Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas suffisamment d'élément chez l'homme.
- UF_H : variabilité interindividuel : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte les résultats de l'expertise collective lors de sa séance du 26 février 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

- ▶ Le toluène est une substance qui a fait l'objet de plusieurs études de toxicité notamment concernant ses effets sur le développement, même à l'issue d'une période courte d'exposition. Il est d'ailleurs classé reprotoxique de catégorie 3, phrase de risque R63.
- ▶ Les effets observés chez l'animal (rat) sont retenus par défaut pour l'homme car les mécanismes d'action ne sont pas connus.
- ▶ Il existe quelques études humaines qui viennent conforter ces conclusions.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR respiratoire spécifique aux effets sur le développement, pour une exposition aiguë par inhalation pour tenir compte de l'absence de connaissance sur le mécanisme d'action et de la période critique de sensibilité. Cette VTR protège aussi des effets sur la fertilité (Afsset, 2007 ; INERIS-Toluène, 2006).

| -- Toluène - CAS 108-88-3 | | | |
|---|---|--|--|
| Effet critique | Dose critique* | UF** | VTR |
| Diminution du poids de la progéniture (génération F1) | LOAEL = 7500 mg.m ⁻³ (2000 ppm) NOAEL = 1875 mg.m ⁻³ (500 ppm) | 100 | VTR = 5 mg.m⁻³ (1,3 ppm) |
| Etude sur deux générations | NOAEL _{ADJ} = 1875 × $\frac{6}{24}$ = 468,75 mg.m ⁻³ | UF _A 10 UF _H 10 | Niveau de confiance Recueil de données : moyen (peu d'études sur la fertilité) Etude : fort Dose critique : fort VTR : moyen |
| Roberts, 2003 | Absence de BMDL | | |

* Coefficients allométriques : NEANT. Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique³ à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

* Facteur de conversion temporelle : par précaution et en l'absence de lignes directrices précises sur ce thème, le NOAEL de 1875 mg.m⁻³ a été transformé pour tenir compte d'une exposition continue (24 heures sur 24), selon la loi de Haber, car les rats n'étaient exposés que 6 heures sur 24. Ce facteur est justifié par :

- Une affinité du toluène pour les graisses, ce qui lui confère un grand volume de distribution ;
- Une cinétique d'élimination longue.

** UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

Le CES attire l'attention sur le fait que la VTR proposée pour les effets reprotoxiques (toxicité sur le développement) ne protège pas d'autres effets toxiques, en l'occurrence d'effets neurologiques, et n'est donc pas protectrice vis-à-vis de la toxicité neurologique. Le CES recommande donc une analyse critique des VTR existantes VTR fondées sur les effets neurologiques du toluène, et le cas échéant, l'élaboration d'une telle VTR

Considérant que l'étude de Roberts *et al.* (2003) n'a pas fait mention d'effet sur le poids de l'épididyme, ni sur une diminution du nombre de spermatozoïdes, contrairement à l'étude de Ono *et al.* (1996), le CES attire l'attention sur la possibilité d'effets sur la fertilité humaine. Bien que Ono *et al.* (1996) aient décrit ces effets à la dose de 7500 mg.m⁻³ (2000 ppm) en présence d'une toxicité générale systémique, aucune donnée ne permet de conclure que les effets sur les organes de la reproduction male sont secondaires à la toxicité générale. Même si ces effets

³ Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

n'ont pas été associés à une altération fonctionnelle chez le rat, celui-ci disposant d'une réserve spermatique plus importante que l'Homme, le CES estime qu'il est nécessaire de compléter les données de fertilité pour pouvoir estimer le risque chez l'Homme.

Maisons-Alfort, le 23 avril 2009

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES



)) afsset.))

EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relative la construction d'une VTR par inhalation fondée sur les effets reprotoxiques de l'éther éthylique de l'éthylène glycol (N°CAS 110-80-5)

Saisine Afsset n° « 2003/AS03 »

Ce document synthétise les travaux du prestataire, du groupe de travail « Valeurs Toxicologiques de Référence » et présente les compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre du programme de travail de l'Afsset sur les VTR reprotoxiques, une phase pilote a été organisée afin de s'assurer de la mise en pratique de la méthode de construction proposée. Des VTR reprotoxiques ont été construites dans le cadre de prestations pour le linuron, le di-n-butylphtalate (DnBP), le benzylbutylphtalate (BBP), le nonylphénol, le toluène et l'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE).

L'Afsset a été saisie le 25 juillet 2007 par la DGS afin que ces VTR soient validées dans le cadre de l'expertise collective de l'Agence. La VTR de l'EGEE fait l'objet de cette note d'expertise.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » pour l'expertise du rapport du prestataire et la construction de la VTR reprotoxique de l'EGEE. Deux rapporteurs du groupe de travail ont été nommés. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Description de la méthode

Sur la base du document « Construction d'une VTR reprotoxique pour l'éther éthylique de l'éthylène glycol » réalisé par l'INERIS¹, les rapporteurs du groupe de travail VTR ont évalué la conformité de la méthode employée par rapport aux préconisations du groupe de travail sur les points suivants : i) recherche d'informations et ii) profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Ils ont ensuite donné leur avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur le mode d'action toxique de la substance. En l'état actuel des connaissances et des

¹ Annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques

² NOAEL : « no observed adverse effect level » ; LOAEL : « lowest observed adverse effect level » ; BMDL : « benchmark dose lower confidence level » (limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose)

• Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
253 av. du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. 01.56.29.19.30 Fax 01.43.96.37.67 Mèl afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

conventions, on considère généralement que pour les effets reprotoxiques, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

La construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{\text{Dose critique}}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \text{Dose critique} = \text{NOAEL, LOAEL ou BMDL}^2 \\ \text{UF} = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR implique les considérants suivants :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des données obtenues chez l'animal et/ou chez l'homme ;
- application de facteurs pour tenir compte de la variabilité et des incertitudes.

La méthode est détaillée dans le document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset. Décembre 2006) et la construction de la VTR de l'Ether éthylique de l'éthylène glycol s'appuie sur cette méthode.

Une discussion au sein du CES a permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultat de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est basé sur les monographies rédigées au préalable par des instances nationales et sur la littérature parue postérieurement à ces monographies.

L'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE), appelé également 2-éthoxyéthanol, appartient à la famille des éthers de glycol et plus particulièrement à la série E (Éthylénique) (N° CAS 110-80-5).

L'EGEE est classé depuis 1993 (19^{ème} ATP) par l'Union Européenne (UE) comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 2 pour le développement et pour la reproduction (R60 : peut altérer la fertilité, R61 : risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant). Ce composé est également classé comme substance nocive (R22 : nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion)².

² Règlement « Classification, Labelling and Packaging » : Toxicité pour la reproduction catégorie 1B ; Mentions de danger : H226 - Liquide et vapeurs inflammables, H360FD - Peut nuire à la fertilité et au fœtus, H332 - Nocif par inhalation, H312 - Nocif par contact cutané, H302 - Nocif en cas d'ingestion

L'EGEE intervient dans de nombreuses préparations à usage industriel³. Cependant son utilisation a fortement diminué depuis sa classification par l'UE comme R2 en 1993. Ainsi, sur 13 000 préparations enregistrées dans la base SEPIA de l'INRS entre 2000 et 2006, 24 préparations contenaient de l'EGEE (solvant, peintures, vernis, encres d'imprimerie, produits d'entretien ménagers et industriels) [Afsset, 2008]. Les expositions sont ainsi peu fréquentes. La population générale peut être exposée principalement par inhalation et absorption cutanée lors de l'utilisation de produits de consommation courante. L'exposition par voie orale est minime. Ainsi, une VTR sera construite pour la voie inhalée.

Toxicocinétique

Chez l'Homme, comme chez l'animal, l'EGEE est rapidement absorbé par les voies respiratoire, cutanée et digestive, et se distribue rapidement dans tout l'organisme. La voie métabolique majeure est la formation de l'acide 2-éthoxyacétique (2-EAA) (23-35 % chez l'homme, 20-40 % chez le rat) résultant de l'action de l'alcool puis de l'aldéhyde déshydrogénase sur l'EGEE. Le 2-EAA est le principal métabolite responsable des effets toxiques de l'EGEE. Le 2-EAA est éliminé principalement dans les urines (chez l'homme : pic urinaire = 4-12h, temps de demi-vie > 40h, chez le rat : temps de demi-vie 10-12h). D'autres voies métaboliques existent et entraînent la formation d'éthylène glycol, d'acide glycolique, etc. qui sont éliminés dans les urines. Enfin, dans une moindre mesure, l'EGEE peut être éliminé dans l'air expiré sous forme inchangée et sous forme de monoxyde de carbone.

Bien que l'on possède peu d'informations sur les différences entre les espèces, il semblerait que le 2-EAA puisse être présent en plus fortes concentrations et pendant plus longtemps dans le sang humain que dans le sang de rat (plus grande absorption de l'EGEE et métabolisation plus intense en 2-EAA chez l'Homme que chez le rat, clairance rénale du 2-EAA plus lente chez l'Homme).

Effets sanitaires

- Toxicité aiguë

Chez l'animal, l'EGEE et ses métabolites entraînent, quelle que soit la voie d'exposition, une dépression du système nerveux central, une réduction des fonctions respiratoires et des lésions pulmonaires (oedèmes), gastro-intestinales (hémorragies) et rénales. Chez l'Homme, l'EGEE entraîne principalement des effets sur la reproduction et le développement et des altérations hématologiques (légère anémie, granulocytopenie minime) [ECETOC, 2005 ; INRS, 1999].

- Toxicité chronique

Les études disponibles en exposition subaiguë et subchronique, par ingestion, inhalation ou contact cutané, ont montré principalement des effets sur les organes reproducteurs mâles et des effets hématologiques (anémies, leucopénies) [Environnement Canada, 2003].

- Cancérogénicité et génotoxicité

Par voie orale, l'EGEE n'induit pas d'effet cancérogène chez les rongeurs à des doses allant de 0,5 à 2 g.kg⁻¹.j⁻¹ [INSERM 1999].

L'EGEE présente des résultats négatifs dans les tests de mutagenèse *in vitro* sur bactéries (test d'Ames) ou cellules de mammifères en culture (cellules de lymphomes de souris, cellules CHO de hamster chinois). Quelques tests *in vitro* ont mis en évidence une activité clastogène à des doses élevées (supérieures à 9,5 µg.ml⁻¹) : augmentation du taux d'aberrations

³ L'EGEE est soumis à une restriction d'usage interdisant la mise sur le marché et l'importation à destination du grand public de produits de consommation contenant de l'EGEE, ainsi que des préparations en contenant 0,5 % ou plus [Arrêté du 7 août 1997, modifié par l'arrêté du 19 avril 2001]. Depuis l'entrée en vigueur du règlement CLP (Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures), la limite de concentration doit être supérieure ou égale à 0,3 % pour déterminer la classification du mélange comme reprotoxique de catégorie 1B (anciennement catégorie 2 de la Directive 67/548/CE abrogée).

chromosomiques (positif sur cellules CHO de hamster chinois sans activation métabolique mais négatif sur lymphocytes humains et négatif sur cellules V79 de hamster syrien), échanges de chromatides sœurs (positif sur cellules CHO de hamster chinois et lymphocytes humains), effets d'aneuploidie (faiblement positif sur cellules V79) et un test du micronoyau faiblement positif sur cellules V79. Cependant, dans la plupart des cas, la réponse était éliminée après activation métabolique [ECETOC, 2005 ; INSERM, 1999]. Les tests *in vivo* réalisés (aberrations chromosomiques et micronoyau dans la moelle osseuse de souris, létalité récessive liée au sexe chez la drosophile) sont négatifs [ECETOC, 2005].

- Effets sur la reproduction

Chez l'homme

Par voie orale, aucune donnée concernant les effets sur la fertilité n'est disponible. Par inhalation, deux études sont publiées [Ratcliffe *et al.*, 1989 ; Welch *et al.*, 1988] et montrent que les principaux effets sur la fertilité observés en milieu professionnel relèvent d'une toxicité testiculaire : diminution du volume du liquide séminal et de la concentration en spermatozoïdes, augmentation du pH du liquide séminal, augmentation des oligospermies et des spermatozoïdes anormaux. Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution car les travailleurs ont été exposés à d'autres substances pouvant induire des effets reprotoxiques. Ainsi, aucun NOAEL, ni LOAEL n'ont pu être mis en évidence à partir de ces deux études.

Aucun effet sur la fertilité féminine n'a été observé.

Chez l'animal

Les effets sur la reproduction de l'EGEE, et plus particulièrement une diminution de la fertilité, ont été décrits chez le rat ou la souris exposés par voie orale ou par inhalation.

Chez les femelles, très peu d'études ont été réalisées. Elles ont montré des effets sur le cycle œstral et une atrophie de l'utérus après exposition par voie orale [Environnement Canada, 2003].

Des effets sur les organes reproducteurs mâles ont été mis en évidence tels qu'une diminution du poids des testicules et de l'épididyme, une dégénérescence des tubes séminifères, une diminution du taux de spermatozoïdes allant jusqu'à une azoospermie, une diminution la motilité des spermatozoïdes et une augmentation des spermatozoïdes anormaux. En effet, l'EGEE induit une atrophie testiculaire avec une atteinte préférentielle des spermatocytes pachytènes conduisant, à terme, à une altération de la qualité du sperme et à une diminution de la fertilité chez le mâle [INSERM, 1999].

La littérature ne rapporte pas d'élément sur la réversibilité des effets testiculaires induits par l'EGEE. Cependant, l'EGME (éthylène glycol méthyl éther) entraîne les mêmes effets sur les organes reproducteurs mâles et selon le même mécanisme d'action que l'EGEE (cf. partie mécanisme d'action). Les effets testiculaires induits par l'EGME sont réversibles au bout de 8 semaines après l'arrêt de l'exposition, mais sont rémanents après exposition aux concentrations les plus élevées [INSERM 1999]. Une analogie entre l'EGEE et l'EGME ne peut pas être envisagée car le seuil de toxicité testiculaire de l'EGEE est supérieur à celui de l'EGME (5 fois supérieur chez le rat) [INSERM, 1999].

Une revue récente de la littérature a permis d'identifier plusieurs études de reprotoxicité par voie orale. En revanche, seule une étude par inhalation a été trouvée, Barbee *et al.* (1984), dans laquelle dix lapins New Zealand White et 15 rats Sprague-Dawley CD par sexe et par groupe de dose ont été exposés par inhalation 6 heures par jour et 5 jours par semaine, pendant 13 semaines, à 0, 92,5, 380 et 1480 mg.m⁻³ d'EGEE sous forme de vapeurs. Le lapin apparaît l'espèce la plus sensible, pour laquelle une diminution significative du poids corporel chez les 2 sexes a été mise en évidence à 92,5 et 1480 mg.m⁻³ (pas à 380 mg.m⁻³). A 1480 mg.m⁻³, une diminution significative du poids des testicules et de l'épididyme a été mise en évidence (augmentation également observée aux 2 plus faibles doses mais non significative), ainsi qu'une dégénérescence focalisée légère de l'épithélium des tubes séminifères

(3 lapins/10) sans altération de la spermatogenèse. A 1480 mg.m⁻³, une anémie périphérique sans altération centrale (absence d'atteinte de l'érythropoïèse) a été observée. Chez le rat, les effets observés sont non significatifs à toutes les concentrations d'exposition. Les auteurs proposent un NOAEL de 380 mg.m⁻³ chez le lapin et de 1480 mg.m⁻³ chez le rat.

- Effets sur le développement

Chez l'homme

Aucune donnée humaine sur les effets sur le développement de l'EGEE n'est disponible quelle que soit la voie d'exposition.

Chez l'animal

Les effets sur le développement ont été décrits pour toutes les voies d'exposition. Divers effets toxiques ont été mis en évidence chez les rongeurs tels qu'une diminution du taux d'implantation, une augmentation de la résorption fœtale et de la mortalité des embryons, une diminution du poids des fœtus et du nombre de fœtus vivants par portée et une augmentation de l'incidence des malformations viscérales et squelettiques. Par voie inhalée, des modifications du comportement et une augmentation des concentrations de certains neurotransmetteurs (acétylcholine, dopamine, sérotonine, norépinéphrine) dans le cerveau ont été aussi observées chez les rats nouveau-nés.

A partir de la revue de la littérature, deux études chez l'animal ont été retenues pour la voie inhalée.

Andrew et Hardin, 1984 ont réalisé une étude chez des rates Wistar exposées avant l'accouplement pendant 3 semaines à des doses de 585 et 2173 mg.m⁻³ puis après l'accouplement du 1^{er} ou 19^{ème} jour de gestation à 754 et 2830 mg.m⁻³, et des lapines *New Zealand White* exposées du 1^{er} au 18^{ème} jour de gestation à 590 et 2277 mg.m⁻³. Chez les rates, un retard de croissance intra-utérine et une augmentation des anomalies squelettiques ont été mis en évidence à 754 mg.m⁻³. A 2830 mg.m⁻³, une forte mortalité embryonnaire a été observée en présence d'une toxicité maternelle (diminution du gain de poids). Aucun LOAEL, ni NOAEL n'a pu être déterminé car les rates ont été exposées à des concentrations différentes avant et après l'accouplement. Chez les lapines, une augmentation du nombre de résorptions par portée et de l'incidence de malformations ont été mises en évidence à toutes les doses en présence d'une toxicité maternelle (diminution de la prise de nourriture et du gain de poids, augmentation du poids du foie et des reins, modifications histopathologiques au niveau des ovaires et de l'utérus). Ainsi, en tenant compte de tous ces effets, un LOAEL de 590 mg.m⁻³ peut être proposé. Aucun NOAEL n'a été identifié.

Dans la deuxième étude, 24 lapines Dutch et 24 rates Alpk/AP par groupe de dose ont été exposées par inhalation, 6h par jour, du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation pour les rates et jusqu'au 19^{ème} jour pour les lapines, à 0, 36,8, 184 et 920 mg.m⁻³ (rates) et 0, 36,8, 184 et 646 mg.m⁻³ (lapines) de vapeurs d'EGEE [Doe, 1984]. Les résultats ont montré une toxicité maternelle chez les rates à 920 mg.m⁻³ (diminution du taux d'hémoglobine, de l'hématocrite et du volume de globules rouges) ainsi qu'une augmentation significative des pertes préimplantatoires et une diminution significative du nombre de fœtus vivants dans les portées à 36,8 et 184 mg.m⁻³ (non significatif 920 mg.m⁻³). A 920 mg.m⁻³, une augmentation significative du taux de morts intra-utérines tardives a été mise en évidence ainsi que des effets fœtotoxiques tels que des retards de croissance fœtale, une diminution significative du poids fœtal moyen (lié au retard de croissance), une réduction de l'ossification et une augmentation significative d'anomalies mineures externes, viscérales et du squelette. Chez le rat, un LOAEL de 36,8 mg.m⁻³ peut être proposé pour l'augmentation des pertes préimplantatoires et la diminution du nombre de fœtus par portée (significatif pour toutes les doses sauf la plus forte). Chez le lapin, des anomalies cardiovasculaires (non significatif), de la paroi abdominale (non significatif), des anomalies squelettiques mineures, des côtes rudimentaires surnuméraires sont observés chez la progéniture à 646 mg.m⁻³ (absence de toxicité maternelle). Un LOAEL de 646 mg.m⁻³ et un NOAEL de 184 mg.m⁻³ peuvent être proposés chez le lapin.

Mécanisme d'action

Les études mécanistiques chez l'homme indiquent que la toxicité sur la fertilité (toxicité testiculaire) est due à l'acide 2-éthoxyacétique (2-EAA), principal métabolite de l'EGEE. Chez l'animal, les mécanismes d'action ne sont pas bien connus. Cependant, les effets testiculaires seraient induits par un blocage de la spermatogénèse à un stade précoce (spermatocytes I). Les études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que la toxicité de l'EGEE chez l'animal est aussi due à ses métabolites dont le principal est l'2-EAA. Il affecte les cellules cibles en agissant comme un inhibiteur compétitif des acides tricarboxyliques du cycle de Krebs et en interférant avec la biodisponibilité des petites unités carbonées nécessaires à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR**VTR pour les effets sur la fertilité**

- *Choix de l'effet critique*

Les différentes études analysées montrent que l'EGEE est capable d'induire des effets sur la fertilité, et plus particulièrement sur la fertilité masculine. Ces effets ont été observés chez l'animal mais également bien identifiés et décrits chez l'homme avec une diminution du poids des testicules et de l'épididyme, une dégénérescence des tubes séminifères, une diminution du taux de spermatozoïdes et de leur motilité, une augmentation des spermatozoïdes anormaux et une azoospermie.

Aucun effet sur la fertilité féminine n'a été mis en évidence.

Le CES retient donc les effets sur les organes reproducteurs mâles et plus particulièrement la diminution du poids de l'ensemble testicules et épидидyme pour construire une VTR par inhalation.

- *Choix de l'étude*

L'étude de Barbee *et al.* (1984) est l'unique publication disponible qui décrit les effets sur les gonades masculines après une exposition par inhalation et a mis en évidence des effets sur les testicules, organes connus comme l'un des organes cible de l'EGEE chez l'homme. Cette étude présente des données de qualité acceptable (Klimisch 2 e). Dans ces conditions, **l'étude de Barbee *et al.* est retenue comme étude clé pour construire une VTR par inhalation pour les effets sur la fertilité.**

On notera cependant que cette étude n'a pas été conçue préalablement pour étudier spécifiquement la reprotoxicité de l'EGEE. Ainsi, les données relatives aux tests de reprotoxicité (fertilité, gestation, portées et lactation) sont insuffisantes ou absentes dans cette étude.

- *Choix de la dose critique*

L'étude de Barbee *et al.* a été effectuée sur des lapins New Zealand White et des rats Sprague-Dawley CD. Les effets sur la fertilité n'ont été observés que chez le lapin. Une diminution significative du poids des testicules et de l'épididyme ($p < 0,01$) a été observée en l'absence de toxicité maternelle à la plus forte dose de 1480 mg.m^{-3} . Les auteurs proposent un NOAEL de 380 mg.m^{-3} et un LOAEL de 1480 mg.m^{-3} pour cet effet. Les conditions d'expérimentation ne permettent pas d'établir une relation dose-réponse pour la diminution du poids des testicules et de l'épididyme (Tableau I). Toutefois, l'effet critique choisi est plus significatif à la plus forte dose ($p < 0,01$).

Tableau 1 : Relation dose-réponse pour la diminution du poids testiculaire et de l'épididyme chez le lapin (10 animaux par groupe de dose) [Barbee *et al.*, 1984]

| Exposition (mg.m^{-3}) | 0 | 92,5 | 380 | 1480 |
|-----------------------------------|------|------|------|-------|
| Poids des testicules (g) | 8,19 | 8,73 | 8,73 | 6,36* |
| Déviati on standard | 0,82 | 1,19 | 0,69 | 0,99 |

* significatif, $p < 0,01$

Un premier calcul de benchmark dose (BMD) avait été effectué en 2007. Compte tenu du fait qu'une seule dose était statistiquement significative (4 doses testées dont la dose nulle), il paraît peu judicieux de calculer une BMD.

Le NOAEL chez le lapin de 380 mg/m³ issu de cette étude a donc été proposé comme dose critique.

- *Ajustements*

Dans l'étude de Barbee *et al.*, les animaux ont inhalé de l'EGEE 6 heures par jour et 5 jours par semaine pendant 13 semaines. Par précaution, un ajustement au temps a été fait pour extrapoler le NOAEL pour une exposition continue. Ainsi, un NOAEL_{ADJ} a été calculé de la manière suivante : $\text{NOAEL}_{\text{ADJ}} = \text{NOAEL} \times 6\text{h}/24\text{h} \times 5\text{j}/7\text{j} = 68 \text{ mg.m}^{-3}$.

- *Choix des facteurs d'incertitude*

- UF_A (variabilité inter-espèces) : chez l'homme, le métabolite de l'EGEE, le 2-EAA, responsable des effets toxiques, serait plus longtemps en contact avec le fœtus que chez l'animal (temps de demi-vie > 40h chez l'homme, 7h chez le rat). Un facteur 10 a été retenu.
- UF_H (variabilité intra-espèce) : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études effectuées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité au sein de l'espèce humaine.
- UF_S (transposition d'une exposition subchronique à chronique) : les préconisations de l'Afsset sont un facteur de 1, 3 ou 10 en fonction des cas. Dans l'étude clé sélectionnée (Barbee *et al.*, 1984), les animaux ont été exposés 13 semaines ce qui correspond à une exposition subchronique. Cependant, pour étudier la fertilité chez le rat, une exposition pendant 13 semaines est suffisante pour couvrir tous les stades de maturation des spermatozoïdes chez le rat. On pourrait considérer que cette étude est équivalente à une étude chronique pour ce type d'effets. Les experts ont cependant souligné l'absence d'information sur le caractère réversible de cet effet que ce soit dans cette étude ou dans la littérature. Un facteur d'incertitude de 10 a ainsi été ajouté pour en tenir compte et pour permettre à la VTR de s'appliquer pour des expositions chroniques.
- UF_D : insuffisance de données : non applicable, les données étant jugées suffisantes.

Soit une VTR pour les effets sur la fertilité = 0,07 mg.m⁻³

VTR pour les effets sur le développement

- *Choix de l'effet critique*

Les différentes études montrent que l'EGEE est capable d'induire des effets sur le développement lors d'exposition *in utero* tels qu'une augmentation des pertes préimplantatoires, des résorptions fœtales et de la mortalité des embryons, une diminution du poids du fœtus et du nombre de fœtus vivants par portée et une augmentation de l'incidence des malformations des viscères et du squelette. L'augmentation de l'incidence des malformations squelettiques est observée aux doses les plus faibles. Ces effets ont été mis en évidence chez l'animal mais aucune étude montrant les effets sur le développement chez l'homme n'est disponible.

Le CES retient l'augmentation de l'incidence des malformations squelettiques comme effet critique.

- *Choix de l'étude*

Deux études décrites précédemment sont disponibles : Doe, 1984 ; Andrew et Hardin, 1984.

Dans leur étude, **Andrew et Hardin (1984)** n'ont pas établi de NOAEL et de LOAEL chez le rat car ceux-ci ont été exposés avant et après l'accouplement à des concentrations différentes. En revanche, cette étude a permis d'identifier un LOAEL chez le lapin de 590 mg.m⁻³ pour des

effets reprotoxiques observés en présence d'une toxicité maternelle. Cette étude n'est donc pas retenue pour la construction de la VTR.

Doe (1984) s'est intéressé aux effets sur le développement chez le lapin et le rat. Cette étude a été classée 2e selon la classification de Klimisch correspondant à une étude bien documentée et en accord avec les principes scientifiques acceptables pour l'évaluation. Toutefois l'utilisation de cette étude pour construire une VTR présente des limites. En effet, les données de cette étude sont jugées insuffisantes dans ce contexte. L'auteur ne précise pas les tests statistiques utilisés. Le nombre de femelles gestantes (rats ou lapins) inclus dans les analyses n'est pas justifié. Ainsi, à la dose de 184 mg.m⁻³, le nombre de lapines gestantes est beaucoup plus faible (16/24) qu'aux autres doses (21/24 chez les témoins et à 36,8 mg.m⁻³, 22/24 à 646 mg.m⁻³) et aucune hypothèse n'est donnée pour expliquer cette différence. Enfin, la description des malformations et des variations squelettiques chez le lapin, effet critique retenu par le groupe de travail VTR, n'est pas précisée. De surcroît, une forte incidence de l'ensemble des variations squelettiques a été observée chez les témoins (Tableau 2).

Tableau 2 : Incidence des malformations squelettiques chez le lapin Dutch [Doe, 1984]

| Exposition (mg/m ³) | | 0 | 36,8 | 184 | 646 |
|---------------------------------|----------------|------|------|------|-------|
| Nombre progénitures examinées | | 136 | 138 | 96 | 134 |
| Malformations squelettiques | nombre animaux | 44 | 72 | 35 | 87* |
| | % | 32,4 | 52,2 | 36,5 | 64,5* |
| Variations squelettiques | nombre animaux | 70 | 84 | 62 | 106* |
| | % | 51,5 | 60 | 64,6 | 79,1* |

* significatif $p < 0,05$

L'auteur précise qu'à 646 mg.m⁻³, les variations observées sont entièrement dues à l'augmentation de l'incidence des côtes surnuméraires. Les données des témoins historiques concernant l'incidence des côtes surnuméraires chez les lapins Dutch n'ont pas pu être obtenues auprès de l'éleveur des lapins de l'étude (Ranch rabbits). D'après les données de la littérature, l'incidence des côtes surnuméraires chez le lapin Dutch est comprise entre 14 et 46 %.

L'ensemble des insuffisances mises en évidence par le groupe de travail VTR sur les données concernant les effets de l'EGEE sur le développement a conduit le CES à ne pas proposer de VTR pour les effets sur le développement induits par l'EGEE à partir des études disponibles.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 22 octobre 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Conclusions et recommandation de l'expertise collective

➤ L'EGEE est un éther de glycol qui entraîne chez l'animal comme chez l'homme, des effets sur les organes reproducteurs mâles ainsi que des malformations squelettiques sur le fœtus.

- **VTR fertilité**

Le groupe de travail propose une VTR par inhalation spécifique aux effets sur la fertilité applicable pour une exposition chronique. Par manque de données chez la femme, cette VTR s'applique par défaut aux deux sexes.

Malgré la qualité acceptable de l'étude (Klimisch 2e) et la pertinence de l'effet critique retenu, un niveau de confiance faible est attribué à cette VTR du fait de l'absence de relation dose-réponse pour l'effet critique retenu et du peu d'études disponibles dans la littérature par inhalation.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

| Effet critique | Dose critique | UF | VTR |
|---|--|--|-------------------------------|
| Diminution du poids des testicules et de l'épididyme | NOAEL = 380 mg.m ⁻³ LOAEL = 1480 mg.m ⁻³ | 1000 | VTR = 0,07 mg.m ⁻³ |
| Etude de toxicité subchronique par inhalation chez des lapins mâles New Zealand White | Pas de construction de BMDL | UF _A 10 UF _H 10 UF _S 10 | |
| Barbee <i>et al.</i> , 1984 | <u>Ajustement temporel</u> NOAEL _{ADJ} = 68 mg.m ⁻³ | | |

- **VTR développement**

Des effets sur le développement ont été mis en évidence chez l'animal. Cependant, en l'absence de données de qualité suffisante, le groupe de travail n'a pas pu construire de VTR pour les effets sur le développement induits par l'EGEE.

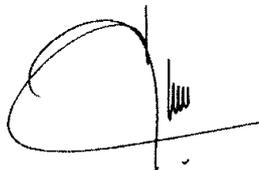
Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 17 septembre 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Maisons-Alfort, le 30/octobre/2009

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES

M. Michel Guerbet



BIBLIOGRAPHIE

Fin de la revue bibliographique : Avril 2009

- **Afsset** (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). (2008) Les éthers de glycol, Synthèse des connaissances sur les expositions de la population générale et professionnelle en France. Septembre 2008. 133 pages.
- **Andrew F.D. et Hardin B.D.** (1984) Developmental effects after inhalation exposure of gravid rabbits and rats to ethylene glycol monoethyl ether. *Environmental Health Perspectives*, 57, 13-23.
- **Barbee S.J., Terrill J.B., DeSousa D.J. et Conaway C.C.** (1984) Subchronic inhalation toxicology of ethylene glycol monoethyl ether in the rat and the rabbit. *Environmental Health Perspectives*, 57, 157-163.
- **Doe J.E.** (1984) Ethylene glycol monoethyl ether and ethylene glycol monoethyl ether acetate teratology studies. *Environmental Health Perspectives*, 57, 33-41.
- **ECETOC** (2005) The toxicology of glycol ethers and its relevance to man. Technical report n°64. Février 2005. Brussels. 502 pages.
- **Environnement Canada** (2003) Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation, 2-éthoxyéthanol. Août 2002.
- **INRS** (1999) 2-éthoxyéthanol. Fiche toxicologique n°58
- **INRS** (2006) 2-éthoxyéthanol (EGEE), Fiche Demeter - N°DEM 010
- **INSERM** (1999) Expertise collective Ethers de glycol, quels risques pour la santé ? 348 pages
- **INSERM** (2006) Expertise collective Ethers de glycol, nouvelles données toxicologiques. 147 pages.
- **Ratcliffe J.M., Schrader S.M., Clapp D.E., Halperin W.E., Turner T.W. et Hornung R.W.** (1989) Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *British Journal of Industrial Medicine* 1989 Jun;46(6):399-406
- **Welch L.S, Schrader S.M., Turner T.W. et Cullen M.R.** (1988) Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters; II. Male reproduction. *American Journal of Industrial Medicine*. 1988; 14(5):509-26

Abréviations

| | |
|--------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| Afsset | Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail |
| BBP | Benzylbutylphtalate |
| BMD | Benchmark Dose |
| BMDL | Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la Benchmark Dose |
| BMR | Benchmark response |
| DnBP | Di-n-butylphtalate |
| 2-EAA | Acide 2-éthoxyacétique |
| EGEE | Ether Ethylique de l'Ethylène Glycol |
| GD | Jour de gestation (« Gestation Day ») |
| LD | Jour de lactation (« Lactation Day ») |
| LOAEC | Concentration minimale entraînant un effet néfaste observe (« Lowest Observed Adverse Effect Concentration ») |
| LOAEL | Dose minimale entraînant un effet néfaste observe (« Lowest Observed Adverse Effect Level ») |
| MBeP | Monobenzylphtalate |
| MBuP | Monobutylphtalate |
| NOAEC | Concentration maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (« No Observed Adverse Effect Concentration ») |
| NOAEL | Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (« No Observed Adverse Effect Level ») |
| OCDE | Organisation de coopération et de développement économiques |
| OEHHA | Office on Environmental Health Hazard Assessment |
| PND | Jour post-natal (« Post natal Day ») |
| RfC | Reference Concentration |
| REL | Reference Exposure Level |
| VTR | Valeur Toxicologique de Référence |
| UE | Union Européenne |
| UF | Facteur d'incertitude (« Uncertainty Factor ») |
| US EPA | United State Environmental Protection Agency (Etats-Unis) |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Valeurs toxicologiques de référence disponibles _____ | 105 |
| Tableau 2 : Relation dose-réponse pour la diminution du poids testiculaire et de l'épididyme chez le lapin [Barbee <i>et al.</i> , 1984] _____ | 106 |
| Tableau 3 : Incidence des malformations squelettiques chez le lapin Dutch [Doe, 1984] _____ | 109 |
| Tableau 4 : Données historiques des côtes surnuméraires chez les lapins Dutch [Chernoff et Rogers, 2004 ; Gibson <i>et al.</i> , 1966] _____ | 109 |
| Tableau 5 : Récapitulatif des VTR existantes et des VTR construites par l'Afsset _____ | 111 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Formules chimiques des nonylphénols des principaux composés _____ | 83 |
| Figure 2 : Formule développée de l'EGEE _____ | 100 |
| Figure 3 : Métabolisme de l'EGEE [INRS, 1999] _____ | 101 |

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action biologiques des substances. Ainsi, si une substance est connue comme ayant une action directe sur le matériel génétique humain (l'ADN), alors on considère que les effets indésirables que peut engendrer une exposition à cette substance (qui sont généralement des cancers, sauf si le matériel génétique atteint est celui des cellules germinales) peuvent se produire même pour la plus petite dose reçue. On parle dans ce cas de « VTR sans seuil d'effet ». En revanche, si une substance n'a pas d'action directe sur le matériel génétique humain, alors on considère en général que l'effet indésirable survient au-delà d'une certaine dose reçue et que c'est la gravité de l'effet qui croît avec la dose plutôt que la probabilité de survenue. On parle alors de « VTR à seuil d'effet ».

Les VTR sont par ailleurs largement impliquées dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires, processus décisionnel visant à fournir des éléments scientifiques utiles à la gestion des risques. L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et codifiée qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. Leur élaboration et leur utilisation s'inscrivent donc dans une procédure exigeante, aux conséquences majeures en termes de santé publique.

L'Afsset s'est auto-saisie en 2003 afin d'établir un programme national sur les VTR visant à la constitution d'une expertise française solide et partagée par les différentes instances compétentes. Le domaine des substances chimiques reprotoxiques a été proposé comme priorité d'action. Pour répondre à cet objectif, l'Afsset a constitué un groupe de travail en 2004 afin d'élaborer une méthode de construction pour les VTR fondées sur des effets reprotoxiques. Dans le cadre de ces travaux, un appel à contributions restreint a été proposé par l'Afsset pour la construction de VTR reprotoxiques pour 6 substances (le linuron, le di-n-butylphtalate ou DnBP, le benzylbutylphtalate ou BBP, le nonylphénol, le toluène et le 2-éthoxyéthanol ou EGEE, la finalité étant de :

- s'assurer que la méthode proposée est, en l'état, suffisante pour permettre de construire une VTR reprotoxique ;
- permettre, par un retour d'expérience pratique, d'améliorer la méthode proposée.

Ces 6 substances ont été choisies parmi une liste hiérarchisée de 450 substances potentiellement reprotoxiques pour lesquelles des données toxicologiques sont disponibles. La construction et les propositions de VTR pour les 6 substances étudiées lors de la phase pilote font l'objet des annexes 2 et 3 du « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques. Afsset. Décembre 2006 » disponible en ligne sur <http://www.afsset.fr/>.

1.2 Objet de la saisine

Le 25 juillet 2007, le Directeur général de la santé (DGS) et le Directeur général de la prévention des risques (DGPR) saisissaient l'Afsset afin de faire valider par le CES concerné les VTR

proposées lors de la phase pilote mise en place lors de l'élaboration de la méthode de construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques, à savoir le linuron, le DnBP, le BBP, le nonylphénol, le toluène et l'EGEE.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a mandaté des rapporteurs pour la réalisation des travaux d'expertise pour le linuron, le di-n-butylphtalate, le benzylbutylphtalate, les nonylphénols et le toluène, et le groupe de travail « Valeur Toxicologique de Référence » pour l'éther éthylique de l'éthylène glycol.

Les travaux des experts rapporteurs et du groupe de travail ont été soumis et discutés par le CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques aux séances des 29 mai 2008, 10 juillet 2008, 25 septembre 2008, 23 octobre 2008, 27 novembre 2008, 22 janvier 2009, 25 juin 2009 et 17 septembre 2009. Le rapport produit par le groupe de travail et des rapporteurs tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Les conclusions présentées dans ce document sont ainsi issues d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

2 Linuron (CAS 330-55-2) : VTR reprotoxique par ingestion

2.1 Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est basé sur les monographies réalisées antérieurement à ce travail par des instances nationales et sur la littérature parue après ces monographies.

Le linuron est un herbicide de la famille des urées substituées. Il a pour principales caractéristiques chimiques d'être très stable, non volatile, non corrosif, peu soluble dans l'eau et peu toxique pour les mammifères. Son usage est restreint depuis 2002. En Europe, la production annuelle est de 500 à 1000 tonnes par an (principalement en France, Italie, Hollande, Espagne, Angleterre). Compte tenu des usages du linuron en tant qu'herbicide, l'exposition peut se faire lors de l'utilisation de produit en contenant, par voie respiratoire ou cutanée, mais également par voie orale lors de l'ingestion d'aliments contaminés par des traces de linuron. En population générale, l'exposition principale se fait par voie orale.

Le linuron est classé depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement (risque pendant la grossesse d'effet néfaste pour l'enfant) et de catégorie 3 pour la reproduction (risque possible d'altération de la fertilité).

Par voie orale et en exposition chronique, les effets hématologiques (pigmentation anormale du sang caractérisée par un pic d'absorption entre 618 et 620 nm lors de la transformation de l'hémoglobine en cyanhémoglobine et anémie hémolytique) sont considérés comme les effets néfastes les plus sensibles chez le rat et le chien.

Chez l'animal, il est clairement admis aujourd'hui que le linuron exerce des effets toxiques pour le développement de l'appareil génital mâle du fœtus lors d'expositions maternelles. En revanche, aucun effet n'a été mis en évidence chez les femelles, ni chez les mâles lors d'exposition uniquement pendant l'âge adulte. Il n'existe pas de données chez l'Homme.

Les effets sur le développement peuvent donc être, en l'état actuel des connaissances, considérés comme des effets critiques pour une exposition au linuron orale de courte durée (pendant la gestation).

Ces effets sont décrits chez des rats exposés *in utero* ou pendant le début de la vie (rats immatures). Parmi les effets critiques rapportés, les plus fréquents sont une absence de régression des mamelons, une réduction de la distance ano-génitale, une réduction du poids des organes génitaux mâle, une hypoplasie testiculaire et des épидидymes, une malformation des organes sexuels internes (épидидymes, canal déférent, vésicule séminale) et externes (hypospadias, cryptorchidie).

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, trois études réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés.

La première étude a été réalisée chez des rats exposés 80 jours à partir du 20^{ème} jour après la naissance. L'effet néfaste est une diminution significative du poids de la vésicule séminale et des épидидymes ainsi qu'une augmentation significative de l'âge à la puberté au LOAEL de 40 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (NOAEL = 20 mg.kg⁻¹.j⁻¹). A également été mise en évidence une diminution significative du poids des testicules et des épидидymes des mâles de la génération F1 [Gray, 1999].

La deuxième étude a été réalisée chez le rat exposé *in utero* du 12^{ème} au 21^{ème} jour de gestation. Chez les descendants mâles, l'incidence d'hypoplasie des testicules et des épидидymes augmente dès le premier groupe de dose à 12,5 mg.kg⁻¹.j⁻¹ [McIntyre, 2000].

La troisième étude [Kang, 2004] a été réalisée chez des rats mâles immatures et castrés exposés par gavage pendant 10 jours. On observe une diminution significative du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale, et des glandes de Cowper dans le deuxième groupe de dose (LOAEL = 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹ ; NOAEL = 25 mg.kg⁻¹.j⁻¹).

Les trois expérimentations animales sont conduites selon des protocoles rigoureux : lignes directrices de bonnes pratiques de l'US EPA pour la première, protocole similaire à un protocole standardisé pour la seconde et lignes directrices de l'OCDE pour la troisième. Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

Le mécanisme toxique responsable de ces effets serait l'action anti-androgénique (compétition avec la testostérone au niveau des récepteurs androgéniques) responsable d'anomalies dans la différenciation sexuelle au cours de l'embryogenèse. Par ailleurs, l'action anti-androgénique du linuron favoriserait la prolifération d'hormone lutéinique provoquant les tumeurs des cellules de Leydig. Il s'agit donc d'un mécanisme de perturbation endocrinienne.

Au vu de l'ensemble des données disponibles, il apparaît que les effets développementaux observés chez l'animal ne puissent pas être écartés chez l'homme.

2.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

2.2.1 Choix de l'effet critique

Les effets sur le développement les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle, d'un point de vue histologique mais aussi fonctionnel. Les principaux effets ainsi observés sont : absence de régression des mamelons, réduction ano-génitale, réduction du poids des organes génitaux mâle, hypoplasie testiculaire et des épидидymes, malformation des organes sexuels internes (épидидymes, canal déférent, vésicule séminale) et externes (hypospadias, cryptorchidie).

L'effet critique retenu pour l'établissement d'une VTR reprotoxique est en cohérence avec les rapports publiés. L'effet critique pertinent pour l'homme observé à la plus faible dose est **l'hypoplasie des testicules et des épидидymes**.

2.2.2 Choix de l'étude

Les trois études retenues sont de bonne qualité. Elles sont en outre classées 1 selon la classification de Klimisch. Le choix final entre les trois repose essentiellement sur la possibilité de mettre en évidence une relation dose-réponse (plusieurs groupes de doses testés), la publication dans une revue internationale et le caractère plus précautionneux du LOAEL le plus faible, ce qui est en cohérence avec l'état des connaissances actuelles et des préconisations prévues dans le « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques. Afsset. Décembre 2006 ». Le LOAEL le plus faible a été mis en évidence pour l'hypoplasie des testicules et épидидymes, observés dans l'étude de McIntyre (2000).

Ainsi, c'est l'étude de **McIntyre et al. (2000)** qui a été retenue. Cette étude est classée 1 selon Klimisch (respect de lignes directrices autres que l'OCDE) : Des rates en gestation ont été exposées par gavage du 12^{ème} au 21^{ème} jour à 0 - 12,5 - 25 et 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹ de linuron. Chez les descendants mâles (F1), l'incidence d'hypoplasie des testicules et des épидидymes augmente dès la première dose testée : 0 % dans le groupe témoin et respectivement 3,6 % et 1,8% dans le premier groupe exposé à 12,5 mg.kg⁻¹.j⁻¹. Ces taux d'incidence passent respectivement à 11,3 % et 9 % dans le dernier groupe exposé à 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹. On observe une absence dose dépendante de régression des mamelons mais la différence n'est significative qu'à la plus forte dose (variable continue : pas d'incidence). Est également observée une augmentation significative, uniquement à la plus forte dose, des malformations des épидидymes (6,8 %) et une absence de canal déférent (4,5 %). L'effet retenu est une **hypoplasie des testicules et des épидидymes (p=0,05) chez les nouveau-nés mâles**. Cet effet signe un mécanisme de perturbation endocrinienne.

2.2.3 Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue, l'hypoplasie des testicules et des épидидymes est observée dès la plus faible dose testée, correspondant donc à un **LOAEL de 12,5 mg.kg⁻¹.j⁻¹**. Aucun NOAEL ne peut donc être proposé dans cette étude. On peut simplement préciser que le NOAEL se situe entre 0 et 12,5 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

Pour déterminer ce LOAEL, les auteurs ont utilisé les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA) et d'analyse de la covariance (ANCOVA) suivi d'un test de Dunnett pour tester les effets liés au traitement des animaux par le linuron. Le seuil de 0,05 a été retenu pour la significativité des résultats.

Pendant la phase pilote, l'Afsset a proposé de construire une BMDL sur la base de l'effet retenu. La réponse obtenue est de type dichotomique (effet/absence d'effet). Plusieurs modèles ont été testés (logit, probit, gamma et weibull) et le modèle probit a été retenu car s'ajustant le mieux aux données. Un niveau de réponse (BMR) de 5 % en « extra risk » a été retenu (l'extra risk correspond à l'augmentation du risque comparativement à la probabilité de ne pas être affecté dans le groupe témoin, réponse vraisemblablement plus conservatrice). On obtient une **BMD₀₅ à 18 mg.kg⁻¹.j⁻¹** et une **BMDL₀₅ à 14 mg.kg⁻¹.j⁻¹** (les résultats de l'ensemble de la démarche sont détaillés dans le « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques », annexe 3). On note une variabilité faible dans les résultats de la BMDL.

2.2.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas suffisamment d'élément chez l'homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_{LB} : utilisation d'une BMDL : les préconisations de l'Afsset sont un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Le CES propose un facteur de 3 car l'incidence retenue de 5 % est faible et on note un NOAEL à 20 mg.kg⁻¹.j⁻¹ dans une autre étude de la littérature, ce qui pencherait en faveur d'un NOAEL proche du LOAEL.

2.3 Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Le linuron est une substance qui a fait l'objet de plusieurs études (relations dose-réponse et mécanisme d'action) et rapports d'évaluation des risques.
- ▶ Les effets observés chez l'animal (rat) sont pertinents pour l'homme et l'effet sur le développement de l'appareil reproducteur mâle (hypoplasie des testicules et des épидидymes) peut être retenu comme effet critique.

- ▶ Le mécanisme avancé (effet anti-androgénique par compétition avec la testostérone) est plausible.
- ▶ Il n'existe aucune étude chez l'homme.

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement. Compte tenu des effets sur le développement de l'appareil génital mis en évidence, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique.

| -- Linuron CAS 330-55-2-- | | | |
|---|--|---|---|
| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
| Hypoplasie des testicules et des épидидymes | Absence de NOAEL LOAEL = 12,5 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ | 300 | VTR = 0,05 mg.kg⁻¹.j⁻¹ |
| Etude de toxicité prénatale orale chez le rat (GD12-GD21) | Calcul d'une BMD BMD ₀₅ = 18 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ BMDL₀₅ = 14 mg.kg⁻¹.j⁻¹ | UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3 | Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la fertilité) Etude : fort Dose critique : fort VTR : moyen |
| McIntyre <i>et al.</i> 2000 | | | |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'une benchmark dose plutôt que d'une dose sans effet, GD : Gestation Day

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT

2.4 Bibliographie

Afsset. Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques-méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement. Avril 2007.

Gray LE, Jr., Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health* 1999;15(1-2):94-118.

Kang IH, Kim HS, Shin JH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, et al. Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology*. 2004;199(2-3):145-59.

McIntyre BS, Barlow NJ, Wallace DG, Maness SC, Gaido KW, Foster PM. Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl:CD(SD)BR rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000 Sep 1;167(2):87-99.

3 Di-n-butylphtalate (CAS 84-74-2) : VTR reprotoxique par ingestion

3.1 Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2. Compte tenu de la richesse de la littérature scientifique sur les effets toxiques du DnBP, le rapport est basé sur les monographies réalisées antérieurement à ce travail par des instances nationales et sur la littérature parue après ces monographies.

Le DnBP est un plastifiant de la famille des esters de phtalates. En Europe, il est utilisé pour majeure partie dans la production des résines et polymères comme le PVC. On le retrouve également dans les adhésifs et les emballages alimentaires. L'exposition majoritaire de l'Homme en général (hors usage spécifique) se fait par voie orale. En outre, les données disponibles ont été principalement obtenues par voie orale. Il a donc été jugé pertinent, dans le cadre de cette expertise, de construire une VTR par voie orale.

Le DnBP est classé depuis 2001 (28^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement (risque pendant la grossesse d'effet néfaste pour l'enfant) et de catégorie 3 pour la reproduction (risque possible d'altération de la fertilité).

3.1.1 Toxicocinétique

Chez les rongeurs, après absorption par voie orale, le DnBP est hydrolysé par des estérases au niveau du tissu intestinal pour former le dérivé majoritaire monoester « monobutylphtalate » ou MBuP, rapidement et largement absorbé par le tractus gastro-intestinal. Le MBuP peut ensuite subir une oxydation de sa chaîne latérale. Les métabolites urinaires sont principalement le dérivé glucuroconjugué du MBuP et le MBuP libre (environ 66-70 % des métabolites) et les dérivés oxydés du MBuP. Il existe des différences entre espèces concernant l'excrétion des métabolites conjugués ou non. Chez l'Homme, des proportions similaires de MBuP total dans les urines de 24 heures ont été retrouvées chez des volontaires exposés par voie orale (environ 64-73 % des métabolites). Une étude a montré que le MBuP conjugué (essentiellement glucuroconjugué) représentait 94 % du MBuP total urinaire chez l'Homme [Saillenfait et Laudet, 2005].

3.1.2 Toxicité générale

Par voie orale, la prolifération des peroxyosomes hépatiques observée chez le rat exposé au DnBP a longtemps été considérée comme l'effet néfaste le plus sensible. Néanmoins il existe aujourd'hui un consensus scientifique selon lequel cet effet ne peut être transposé à l'homme : la prolifération des peroxyosomes hépatiques serait bien plus faible chez l'homme que chez le rongeur. Les effets hépatiques liés à cette prolifération ne sont donc pas attendus chez l'homme aux doses expérimentales animales. La reprotoxicité et les troubles du développement du DnBP sont donc les deux principaux effets toxiques considérés pour l'homme.

3.1.3 Effets reprotoxiques

Les études de toxicité du DnBP mettent principalement en évidence des troubles du développement au niveau de l'appareil reproducteur mâle. Ces effets sont, en l'état actuel des connaissances, considérés comme les effets critiques pour l'exposition orale au DnBP. Ces effets sont décrits chez des rats exposés *in utero* via l'alimentation maternelle. L'exposition a lieu en fin de gestation, période clef du développement de l'appareil reproducteur. Parmi les effets critiques rapportés, les plus fréquents sont une diminution de la distance anogénitale, une cryptorchidie, un hypospadias, une hypoplasie ou une agénésie épидидymaire, une hypospermie, une dysgénésie testiculaire focale et une persistance mamelonaire. De tels effets ont également été observés chez l'homme à l'issue d'une étude épidémiologique publiée en 2005, seule étude humaine identifiée à ce jour [Swan *et al.*, 2005]. Cette étude a montré une relation significative entre les concentrations urinaires de DnBP observées chez la mère pendant la grossesse et les anomalies de l'appareil génital externe chez les nouveau-nés mâles (diminution de la distance anogénitale, trouble de la migration testiculaire, hypoplasie scrotale).

A partir de la revue de la littérature sur la reprotoxicité du DnBP, et en s'appuyant sur les données les plus récentes et les VTR déjà disponibles, trois études réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après.

Une première étude, sur deux générations [Wine, 1997], a été réalisée chez des rats Sprague-Dawley exposés en alimentation continue à 52, 256 et 509 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez les mâles et 80, 385 et 794 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez les femelles. Les indices d'accouplement, de gestation et de fertilité de la génération F1 sont inférieurs à ceux de F0 à la dose la plus forte. A partir de 256 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez les mâles et 385 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez les femelles, de nombreuses anomalies des organes reproducteurs sont observées (diminution du poids de ces organes, lésions dégénératives de l'épithélium germinale testiculaire, hyperplasie interstitielle, absence ou hypoplasie de l'épididyme). Les effets au niveau de la seconde génération (F2) sont identiques mais plus sévères et apparaissent aux premières doses testées, dès 52 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour les mâles et 80 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour les femelles (en l'absence de toxicité maternelle pour la première dose testée). Aucun NOAEL n'a pu être identifié pour la génération F2.

La deuxième étude a été réalisée chez le rat Sprague-Dawley exposé *in utero* via gavage de la mère du 12^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation à 0 – 0,5 – 50 – 100 et 600 mg.kg⁻¹.j⁻¹ [Mylchreest *et al.*, 2000]. Chez les nouveau-nés mâles, de nombreuses lésions de l'appareil reproducteur mâle sont observées dans le groupe de dose le plus élevé. Dès 100 mg.kg⁻¹.j⁻¹, une absence de régression des mamelons est constatée. Cet effet apparaît comme un marqueur représentatif d'une altération de la différenciation sexuelle. Le NOAEL a été identifié à 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

La troisième étude [Lee *et al.*, 2004] a été réalisée chez le rat Sprague-Dawley exposé *in utero* et pendant la lactation (exposition des mères par voie orale à partir du 15^{ème} jour de gestation et jusqu'au 21^{ème} jour après la mise bas) aux doses de 0 – 2 – 24 – 234 et 1137 mg.kg⁻¹.j⁻¹. Une réduction des spermatoocytes testiculaires est constatée au 21^{ème} jour postnatal pour la première dose testée (2 mg.kg⁻¹.j⁻¹), ainsi qu'une hypoplasie des bourgeons alvéolaires chez les femelles. Le LOAEL a été identifié à 2 mg.kg⁻¹.j⁻¹ sur l'observation de la diminution spermatocytaire et des dysplasies mamelonnaires chez les nouveau-nés mâles ou femelles. Aucun NOAEL n'a pu être identifié.

3.1.4 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action proposé pour le DnBP implique une perturbation endocrinienne avec une action anti-androgénique liée à une diminution importante de la sécrétion de testostérone et une atteinte des cellules de Sertoli.

Au vu de l'ensemble des données disponibles, il apparaît que les effets reprotoxiques et développementaux observés chez l'animal ne puissent pas être écartés chez l'homme.

3.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

3.2.1 Choix de l'effet critique

Les effets sur le développement les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle. L'atteinte est aussi bien histologique que fonctionnelle. L'effet critique retenu, à savoir **l'atteinte histologique et fonctionnelle de l'appareil reproducteur mâle**, est en cohérence avec l'ensemble des rapports publiés et ne porte *a priori* pas à discussion. Ces atteintes sont diverses en fonction des études : lésions testiculaires (troubles de la migration, lésions dégénératives des tubes séminifères, diminution des spermatoocytes, hyperplasie des cellules interstitielles), lésions de l'épididyme, des vésicules séminales, diminution de la distance ano-génitale, augmentation du taux d'hypospadias et persistance des mamelons. Ces effets signent un mécanisme de perturbation endocrinienne.

3.2.2 Choix de l'étude

Les trois études retenues décrites ci-dessus sont jugées de bonne qualité et ont été également choisies par des organismes internationaux reconnus dans le cadre de construction de VTR. Les trois expérimentations animales sont conduites selon des protocoles rigoureux : « *National Toxicology Program's, R.A.C.B. Protocol* » pour les deux premières, « *Animal Care and Use Committee of the National Institute of Health Sciences* » (Japan) pour la troisième. Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR. Les deux plus anciennes sont analysées dans le rapport d'évaluation des risques de l'Union Européenne. Elles répondent à une problématique « effets sur le développement » avec des protocoles d'études différents. Seule l'étude de Lee (2004) prend en compte une période d'exposition jusqu'à la fin de la lactation (PND21). Les différences d'effets observés sur les testicules entre l'étude de Mylchreest (2000) et l'étude de Lee (2004) pourraient être liées à l'utilisation de tests non comparables. De même, dans l'étude de Wine (1997), les effets sur le testicule ne sont pas étudiés pour des doses inférieures à 250 à 400 mg.kg⁻¹.j⁻¹, ce qui peut expliquer les différences de résultats avec Lee.

Le choix final entre les trois études repose essentiellement sur :

- La qualité de l'étude (Klimisch 1) ;
- L'observation d'effets signant une perturbation endocrinienne en l'absence d'une toxicité maternelle ;
- L'utilisation d'une période de sensibilité critique ;
- Le suivi post-traitement comprenant une comparaison de l'évolution des signes de toxicité ;
- A critères égaux, l'identification du LOAEL le plus faible.

Ainsi, en l'absence d'éléments permettant de prédire l'impact sanitaire des modifications observées chez l'animal pour l'Homme à long terme, et bien que l'étude de Lee ne permette pas d'identifier un NOAEL, le CES estime prudent de retenir l'étude de **Lee et al. (2004)** comme étude source.

Dans cette étude, des rates Sprague-Dawley (8 animaux par dose) ont été exposées via la nourriture du quinzième jour de gestation (GD15) jusqu'au 21^{ème} jour après la parturition (PND21), soit la fin de la lactation. L'alimentation est supplémentée en DnBP à des concentrations égales à 0 – 20 – 200 – 2000 et 10000 ppm, correspondant à des doses de 0 – 2 – 24 – 234 et 1137 mg.kg⁻¹.j⁻¹ en poids corporel. Une réduction des spermatoocytes testiculaires est constatée au 21^{ème} jour après la naissance dès la concentration de 20 ppm (2 mg.kg⁻¹.j⁻¹) chez 50 % des mâles, de même que des changements au niveau des glandes mammaires chez les nouveau-nés de sexe féminin (hypoplasie des bourgeons alvéolaires). Les effets retenus sont une **diminution spermatocytaire chez le mâle (p<0,05) et des hypoplasies mamelonaires chez les femelles (p<0,05)**.

3.2.3 Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue, la diminution spermatocytaire et les lésions dysplasiques mamelonnaires sont constatées dès la plus faible dose testée, correspondant à un **LOAEL de 2 mg.kg⁻¹.j⁻¹**. Aucun NOAEL ne peut donc être proposé. On peut simplement préciser que le NOAEL se situe entre 0 et 2 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

Pour déterminer ce LOAEL, les auteurs ont utilisé plusieurs méthodes d'analyse en fonction des données. Les seuils de 0,05 et de 0,01 ont été retenus pour la significativité des résultats. Les lésions histopathologiques ont été comparées par un test de Fischer exact et la sévérité des lésions histopathologiques avec un test de Mann-Whitney (U).

Dans le cadre de l'évaluation des risques du DnBP, l'Union Européenne a proposé un LOAEL de 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹ en se basant sur l'étude de Wine (1997) (UE, 2003). D'autres études non référencées dans le rapport européen ont été publiées depuis [Mylchreest, 2000 ; Lee *et al.*, 2004]. Dans le cadre de ce travail, en tenant compte des éléments récents, un LOAEL 25 fois plus faible, de 2 mg.kg⁻¹.j⁻¹, est proposé pour la construction de la VTR sur la base de l'étude de Lee (2004).

Pendant la phase pilote, l'Afsset a proposé de construire une BMDL en considérant la diminution des spermatozoïdes. La réponse obtenue est de type dichotomique (effet / absence d'effet). Plusieurs modèles ont été testés, dont les modèles gamma (modèle stochastique) et weibull (modèle de distribution) qui s'appliquent pour des réponses dichotomiques. Un niveau de réponse (BMR) de 10 % en « extra risk » a été retenu (l'extra risk correspond à l'augmentation du risque comparativement à la probabilité de ne pas être affecté dans le groupe témoin, réponse vraisemblablement plus conservatrice). On obtient une BMD₁₀ à 0,08 mg.kg⁻¹.j⁻¹ et une BMDL₁₀ à 4,4.10⁻⁵ mg.kg⁻¹.j⁻¹ (les résultats de l'ensemble de la démarche sont détaillés dans le « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques », annexe 3).

Le LOAEL avait été fixé à 2 mg.kg⁻¹.j⁻¹. Ce LOAEL correspond à une incidence de réponse (pour la réduction du développement spermatocytaire) de 50 %, ce qui est très élevé. Il est donc logique que la BMD₁₀ soit très inférieure à ce LOAEL (10 % de réponse). La BMDL est par ailleurs très éloignée de la BMD ; ceci est lié au fait que le nombre de points et le nombre d'animaux testés sont faibles et le niveau d'effet constaté élevé et éloigné de la BMR retenue (10 %). Ces limites méthodologiques ne permettent pas de retenir la BMDL comme dose critique.

3.2.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10. Cela est justifié par les résultats de l'étude épidémiologique de Swan *et al.* (2005) qui semble confirmer que les effets anti-androgéniques mis en évidence chez l'animal peuvent également se produire chez l'Homme. Si la glucuroconjugaison du monobutylphtalate apparaît plus élevée chez l'Homme que chez le rat, on peut penser que la substance est plus rapidement détoxifiée chez l'Homme, mais en l'absence d'éléments quantitatifs plus précis, il reste prudent de considérer un facteur inter-espèce par défaut.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité au sein de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : les préconisations de l'Afsset sont un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Dans le cas du DnBP, deux arguments sont avancés :
 - L'un en faveur de l'application d'un facteur de 3, justifié par l'utilisation de l'étude ayant identifié un LOAEL très faible par rapport aux autres études (dans les autres études, les NOAEL peuvent être jusqu'à 25 fois plus élevés), suggérant que les effets retenus sont très sensibles ;

- L'autre en faveur de l'application d'un facteur de 10, justifié par la grande variabilité au sein de l'étude comme en témoigne la différence observée entre les valeurs de la BMD et de la BMDL, et l'absence de NOAEL. En outre, la première dose testée entraîne déjà un effet chez 50 % des animaux pour la diminution spermatocytaire et 100 % des animaux pour la dysplasie mamelonaire.

Le CES choisit au final l'application d'un facteur UF_L de 10, en accord avec la méthode de construction de VTR reprotoxiques de l'Afsset.

3.3 Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Le métabolisme du DnBP chez l'Homme et l'animal est globalement similaire avec production d'un monoester commun (MBuP). Cependant il existe des différences quantitatives de glucuroconjugaison des métabolites monoesters du DnBP chez le rat et chez l'Homme. Le CES attire l'attention sur l'absence de connaissances sur l'impact de ces différences et leurs conséquences éventuelles sur des variations de toxicité inter-espèces ;
- ▶ Le mécanisme avancé (effet anti-androgénique lié à une à une diminution importante de la sécrétion de testostérone avec principalement une atteinte des cellules de Sertoli) est plausible chez l'Homme ;
- ▶ Les effets observés chez l'animal sont des effets sur le développement de l'appareil reproducteur mâle telles que lésions testiculaires ou de l'épididyme, diminution de la distance ano-génitale, augmentation du taux d'hypospadias, persistance des mamelons ;
- ▶ Les effets observés chez l'animal paraissent pertinents pour l'Homme. Ce point est argumenté par une étude récente chez l'homme qui a mis en évidence une relation entre l'exposition aux phtalates des mères pendant la grossesse et l'atténuation de l'action androgénique chez les bébés mâles.

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement pendant la gestation, pour une exposition subchronique.

-- Di-n-butyl phtalate (DnBP) 84-74-2 --

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|---|---|---|
| Diminution spermatocytaire et dysplasies mamelonnaires observées dans la descendance Etude de toxicité prénatale orale chez le rat Sprague-Dawley (GD15-PND21) Lee <i>et al.</i> 2004 | Absence de NOAEL LOAEL = 2 mg.kg⁻¹.j⁻¹ Pas de construction de BMDL | 1000 UF _A 10 UF _H 10 UF _L 10 | VTR = 2 µg.kg⁻¹.j⁻¹ Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : moyen (incertitude +) Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet, GD : Gestation Day, PND : Post Natal Day.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

La VTR est construite sur la base des connaissances actuelles. Dans le cadre des phtalates, dont les plus connus ont une toxicité sur le développement liée à leur caractère perturbateur endocrinien, les niveaux de connaissances sont différents d'une substance individuelle à l'autre.

Les études toxicologiques n'étant pas conduites selon les mêmes protocoles pour tous les phtalates, les LOAEL et les NOAEL issus de ces études ne peuvent être mis en regard et les VTR proposée ne peuvent être le reflet direct de la toxicité de ces substances. Ainsi, bien que le benzylbutylphtalate (BBP) et le DnBP aient probablement une toxicité similaire, la VTR proposée pour le DnBP est plus faible que celle du BBP.

3.4 Bibliographie

- Lee K.Y., Shibutani M., Tagagi H., Kato N., Tagigami S., Uneyama C., Hirose M. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*. 2004 ; 203 : 221-258.
- Mylchreest E., Wallace D.G., Cattley R.C., Foster P.M.D. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicological Sciences*. 2000 ; 55 : 143-151.
- Saillenfait A.M., Laudet-Hesbert A. Phtalates. *EMC-Toxicologie Pathologie 2* (2005) :1-13.
- Swan S.H., Main K.M., Liu F., Stewart S.L., Kruse R.L., Calafat A.M., Mao C.S., Redmon J.B., Ternand C.L., Sullivan S., Teague J.L. The Study for Future Families Research Team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*. 2005 ; 113 : 1056-1061.
- Union européenne. 2003. Risk Assessment Report. Di-n-butyl phthalate (DBP). Institute for Health and Consumer Protection. European Chemical Bureau. Existing Substances. 1st Priority List. Volume 29. EUR 19840 EN. 165 pages.
- Wine R.N., Li L.L., Barnes L.H., Gulati D.K., Chapin R.E. Reproductive Toxicity of Di-n-butylphthalate in a Continuous Breeding Protocol in Sprague-Dawley Rats. *Environmental Health Perspectives*. 1997 ; 105(1) : 102-107.

4 Benzylbutylphtalate (CAS 85-68-7) : VTR reprotoxique par ingestion

4.1 Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2. Compte tenu de la richesse de la littérature scientifique sur les effets toxiques du BBP, le rapport est principalement basé sur la monographie du CERHR (2003), le rapport d'évaluation des risques de l'Union Européenne (2007) et la littérature parue postérieurement à cette monographie.

Le BBP est un plastifiant de la famille des esters de phtalates. En Europe, plus de 90 % du BBP produit est utilisé pour la fabrication de PVC et d'autres polymères retrouvés dans les revêtements de sol, les joints,... Il est également présent dans les emballages alimentaires. Peu lié chimiquement à la matrice des polymères dans lesquels il est incorporé, il peut facilement migrer vers la nourriture ou les milieux de l'environnement. Bien que l'exposition par voie respiratoire ou cutanée soit possible, l'exposition de la population générale est de ce fait principalement orale. En outre, les données disponibles ont été principalement obtenues par voie orale. Il a donc été jugé pertinent, dans le cadre de cette expertise, de construire une VTR par voie orale.

Le BBP est classé depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement (risque pendant la grossesse d'effet néfaste pour l'enfant) et de catégorie 3 pour la reproduction (risque possible d'altération de la fertilité).

4.1.1 Toxicocinétique

Chez le rat, le BBP est métabolisé par des estérases en mono-butylphtalate (MBuP) et en mono-benzylphtalate (MBeP) avec une formation préférentielle en MBuP. Les métabolites sont majoritairement retrouvés dans les urines sous forme libre. Chez l'homme, contrairement au rat, le principal métabolite est le MBeP et est surtout retrouvé à l'état conjugué dans les urines (glucuroconjugués). L'impact de ces différences sur la toxicité du BBP entre l'animal et l'homme reste cependant à déterminer [Saillenfait et Laudet, 2005].

4.1.2 Toxicité générale

La toxicité aiguë du BBP est faible par voie orale et cutanée. Dans des études orales subchroniques et chroniques (2 à 26 semaines) chez le rat, des augmentations du poids du foie et des reins sont d'abord observées ($\geq 120-151 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Elles sont accompagnées de modifications histologiques ponctuelles aux doses supérieures (foie $\geq 960 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$; reins $\geq 500 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les mâles et $\geq 1200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les femelles).

Les essais de génotoxicité *in vivo* et *in vitro* sont pour la plupart négatifs. Concernant la cancérogénicité, une étude du NTP (1995) de 2 ans chez le rat conclut à l'observation d'une cancérogénicité chez le mâle sur la base d'une augmentation de l'incidence des tumeurs pancréatiques. Il existe des preuves équivoques chez la femelle (augmentation marginale d'adénomes du pancréas et de papillomes de la vessie) à une dose élevée ($1200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Aucun signe de cancérogénicité n'est en revanche présent chez la souris [NTP, 1995 ; Saillenfait et Laudet, 2005].

4.1.3 Effets reprotoxiques

Il est clairement établi que le BBP a des effets toxiques sur la reproduction chez le mâle, comme l'indiquent les lésions des organes reproducteurs et la diminution du nombre de spermatozoïdes notées chez le rat exposé oralement. En outre, l'administration orale de BBP à des rats et des souris pendant la gestation provoque une augmentation de la mortalité embryonnaire, des retards de croissance et des malformations chez les petits. Le développement de l'appareil reproducteur et la différenciation sexuelle mâles sont particulièrement affectés après exposition pendant une période sensible. Les altérations observées chez les descendants mâles sont des malformations (cryptorchidies, hypospadias...), une diminution de la distance anogénitale, une absence de régression des mamelons et/ ou des altérations de la production de sperme.

A partir de la revue récente de la littérature sur la reprotoxicité du BBP ou de ses métabolites principaux (monoesters), plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après.

4.1.3.1 Etudes de toxicité prénatale

Une première étude [NTP, 1990] a été réalisée chez la souris CD-1 exposée *in utero* via l'alimentation de la mère du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation. Une mortalité fœtale et des malformations ont été observées pour des expositions de 910 mg.kg⁻¹.j⁻¹, accompagnées d'une toxicité maternelle. Le NOAEL a été identifié à 182 mg.kg⁻¹.j⁻¹. Dans une autre étude chez le rat Wistar exposé *in utero* du 1^{er} au 20^{ème} jour de la gestation [Ema, 1990], une réduction du gain de poids corporel a été mise en évidence avec un LOAEL de 375 mg.kg⁻¹.j⁻¹. Le NOAEL a été identifié à 185 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

Une troisième étude a été réalisée chez des rats Harlan cpb WU exposés *in utero* par gavage de la mère du 6^{ème} au 15^{ème} ou au 20^{ème} jour de la gestation [Piersma, 2000]. Les auteurs ont observé des variations squelettiques (apparition d'une 13^{ème} vertèbre), une diminution du poids des testicules et une augmentation de l'incidence des testicules non descendus dans la progéniture. Des benchmark doses (BMDL) ont été calculées pour différents effets. Une BMD à 5 % a été calculée à 171 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (intervalle de confiance à 95 % 145 à 206 mg.kg⁻¹.j⁻¹) ou de 211 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (intervalle de confiance à 95 % de 182 à 254 mg.kg⁻¹.j⁻¹) en fonction de la durée de l'exposition (6-20 ou 6-15 GD) et pour les variations squelettiques (plusieurs modèles, maximum de vraisemblance, « additional risk »), mais les auteurs considèrent l'apparition d'une 13^{ème} vertèbre comme une variation mineure non néfaste. Une BMD à 1 % a été proposée pour les testicules non descendus à 163 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (IC_{95%} = 95 à 280 mg.kg⁻¹.j⁻¹) ou 251 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (IC_{95%} = 153 à 433 mg.kg⁻¹.j⁻¹) en fonction de la durée d'exposition (plusieurs modèles, maximum de vraisemblance, « additional risk »). Le NOAEL est à 350 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour la plupart des effets (LOAEL à 450 mg.kg⁻¹.j⁻¹), excepté pour l'apparition d'une 13^{ème} vertèbre, observée dès la première dose testée (LOAEL = 270 mg.kg⁻¹.j⁻¹).

Les effets du MBeP, métabolite principal du BBP chez l'homme, ont été testés chez la rate Wistar exposée par gavage du 15^{ème} au 17^{ème} jour de gestation. Une augmentation significative de l'incidence des testicules non descendus et une réduction de la distance anogénitale ont été observées chez les ratons mâles à partir de 250 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (NOAEL = 167 mg.kg⁻¹.j⁻¹), mais une toxicité maternelle a été observée à 167 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (gain de poids et consommation alimentaire significativement réduits) [Ema, 2003]. Dans une étude de la même équipe, une diminution de la distance anogénitale avait été observée chez les descendants mâles de rates Wistar exposées du 15^{ème} au 17^{ème} jour de la gestation à 500 mg.kg⁻¹.j⁻¹, également en présence de toxicité maternelle [Ema, 2002].

4.1.3.2 Etudes de fertilité

Chez le rat F344 mâle exposé pendant 10 semaines avant accouplement avec des femelles non exposées, une diminution du compte spermatique, sans modification de la fertilité, a été mise en évidence à $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ [NTP, 1997].

Chez le rat WU exposé par gavage pendant deux semaines avant l'accouplement, aucune baisse de fertilité n'a été observée à $500 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ mais une baisse significative de la fertilité et des lésions testiculaires ont été observées à $1000 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ [Piersma, 1995].

Chez le rat Wistar, aucune baisse de fertilité n'a été observée dans une étude sur une génération pour des expositions pendant 10 semaines avant l'accouplement, puis jusqu'à la naissance, à la dose de $418 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (absence de LOAEL) [TNO, 1993].

4.1.3.3 Etudes sur plusieurs générations

Chez le rat Sprague-Dawley exposé avant l'accouplement puis pendant la gestation, un NOAEL de $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a été identifié. Une diminution du poids des ovaires chez les rates F0 a été mise en évidence à $500 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ mais les performances reproductives (taux d'accouplement, taux de fertilité, durée de la gestation, et nombre de naissances vivantes) restent identiques au groupe témoin. Les descendants F1, exposés *in utero*, pendant la lactation puis par la nourriture (10 semaines) à la dose de $500 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, conservent également des performances reproductives normales bien qu'une diminution de la distance anogénitale et du poids des testicules et épидидymes soit observée. Une diminution transitoire du poids de naissance de la génération F1 est observée à partir de $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (NOAEL = $20 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Aucun effet toxique systémique, développemental ou reproductif n'est observé à la génération F2 [Nagao *et al.*, 2000].

Dans une étude plus récente conduite selon les lignes directrices de l'US EPA sur deux générations chez le rat Charles River [Tyl *et al.*, 2004], on note une baisse des indices de fertilité (taux d'accouplement et taux de fertilité) des mâles F1 exposés à $750 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ *in utero*, pendant l'allaitement, puis par la nourriture jusqu'à l'accouplement pour la génération suivante, ainsi qu'une absence de régression des mamelons et une diminution du poids absolu mais pas relatif des testicules et des épидидymes. La fertilité dans la génération F2 n'est pas étudiée. Une diminution de la distance anogénitale est observée à $250 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

4.1.4 Mécanisme d'action

Les malformations du squelette semblent dues à une modification des ostéoblastes Py1a chez le rat. La morphologie des cellules exposées au BBP est modifiée au niveau des micro-filaments. Cette modification du cytosquelette compromet la bonne adhésion ultérieure des ostéocytes. Le BBP agirait en outre comme un anti-androgène par une réduction des taux de testostérone fœtale, lui conférant des effets sur la distance anogénitale ou la descente des testicules. Le BBP a donc un mécanisme de perturbation endocrinienne.

En l'état actuel des connaissances, malgré l'absence de données sur la reproduction chez l'Homme et les différences de métabolisme constatées entre l'Homme et l'animal, le CES estime que les effets reprotoxiques et développementaux observés chez l'animal pourraient également se produire chez l'Homme.

4.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

4.2.1 Choix de l'effet critique

Les différentes études analysées montrent que le BBP est capable d'induire des effets sur le développement lors d'exposition *in utero* mais également des effets sur la fertilité lors d'exposition sur plusieurs générations. En outre, les études récentes tendent à confirmer le caractère de perturbateur endocrinien du BBP, avec une absence de régression des mamelons, une diminution

du poids des testicules et des épидидymes ou une diminution de la distance anogénitale chez les descendants mâles lors d'exposition *in utero* ou sur plusieurs générations. A noter que la diminution de la distance anogénitale est le marqueur le plus sensible, puisqu'il est observé aux doses les plus faibles (LOAEL = 250 mg.kg⁻¹.j⁻¹ dans une étude sur plusieurs générations). **Le CES retient donc la diminution de la distance anogénitale comme effet critique. Cet effet signe une perturbation endocrinienne.**

4.2.2 Choix de l'étude

Les études analysées sont de bonne qualité et toutes classées 1 selon Klimisch (protocoles respectant ceux des lignes directrices OCDE ou autres). Dans les études multigénérationnelles, des marqueurs précoces d'une activité anti-androgénique ont été mis en évidence (diminution de la distance anogénitale ou persistance des mamelons) à des doses faibles en l'absence d'une toxicité maternelle. Ces éléments sont en accord avec les données sur le BBP qui suggèrent une perturbation endocrinienne. L'Union Européenne a effectué l'évaluation des risques sanitaires et a classé le BBP reprotoxique de catégorie 2 sur la base de la diminution de la distance anogénitale observée dans l'étude de Tyl *et al.* (2004) [UE, 2007]. Le CES estime donc cohérent de retenir l'étude de Tyl *et al.* (2004) comme étude source.

Le choix final de l'étude de Tyl *et al.* (2004) pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique du BBP repose sur :

- La qualité de l'étude (Klimisch 1) ;
- L'observation d'effets signant une perturbation endocrinienne en l'absence de toxicité maternelle ;
- La prise en compte de l'effet toxique le plus sensible (un NOAEL de 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹ a été mis en évidence dans l'étude de Tyl *et al.* en 2004 pour la réduction de la distance anogénitale et un NOAEL de 100 mg.kg⁻¹.j⁻¹ a été mis en évidence dans l'étude de fertilité de Nagao *et al.* en 2000 pour la diminution du poids des ovaires).

Par ailleurs, le choix de l'étude de Tyl *et al.* (2004) est renforcé par le fait que cette étude a été retenue par l'Union Européenne pour l'établissement du NOAEL pour le BBP.

Dans cette étude, des lots de 30 rats CD mâles et femelles ont été exposés à des doses de BBP de 0 – 50 – 250 et 750 mg.kg⁻¹.j⁻¹, *via* la nourriture, pendant les 70 jours précédant l'accouplement (génération F0). La génération suivante (F1) a ensuite été exposée jusqu'à 70 jours après la naissance et enfin, la deuxième génération (F2) a été exposée pendant 28 jours. A 750 mg.kg⁻¹.j⁻¹, les auteurs notent une baisse des indices de fertilité (taux d'accouplement et taux de fertilité) des mâles F1, une augmentation du nombre de mamelons conservés et une diminution du poids absolu mais pas relatif des testicules et des épидидymes. Une diminution de la distance anogénitale est observée à 250 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (p < 0,001). Le NOAEL, pour cet effet, est donc de 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

4.2.3 Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue [Tyl *et al.*, 2004], la diminution significative de la distance anogénitale est constatée à **250 mg.kg⁻¹.j⁻¹**, correspondant au **LOAEL**. Le **NOAEL** est donc identifié à **50 mg.kg⁻¹.j⁻¹**.

Pour déterminer ce LOAEL, les auteurs ont utilisé les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA) et de la covariance (ANCOVA). L'hypothèse d'homogénéité de la variance a été examinée à l'aide du test de Levene. Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques attendues pour le choix du niveau de réponse. En effet, la distance anogénitale est un indicateur biologique continu. La construction d'une BMD nécessiterait de définir la variation de la distance anogénitale considérée comme néfaste au regard des données toxicologiques.

Le CES estime cependant que le couple de valeur LOAEL / NOAEL peut être proposé pour la construction de la VTR. Le faible écart entre les deux valeurs, par rapport aux autres études de la littérature, renforce la précision de la VTR.

4.2.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : des différences importantes de métabolisme ont été observées entre l'homme et le rongeur et le facteur retenu est le facteur maximal de 10 par défaut car il n'existe pas de données sur l'impact sanitaire spécifique du MBuP ou du MBeP, métabolites principaux respectivement chez le rat et chez l'homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte les résultats de l'expertise collective lors de sa séance du 10 juillet 2008 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Le CES attire l'attention sur les différences de métabolisme du BBP chez le rat et chez l'Homme et l'absence de connaissance de l'impact de ces différences sur les effets sanitaires du BBP.

4.3 Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Aucune étude humaine ayant investigué les effets sur la reproduction ou le développement n'est disponible spécifiquement pour le BBP, mais de nombreuses études ont été réalisées sur l'animal, en particulier pour évaluer les effets développementaux chez le rongeur.
- ▶ Le mécanisme avancé (perturbation endocrinienne par action anti-androgène) est plausible.
- ▶ Les effets observés chez l'animal (rat) paraissent pertinents pour l'Homme bien que des différences de métabolites aient été constatées.
- ▶ La diminution de la distance anogénitale peut être retenue comme effet critique.

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement. Compte tenu des effets sur le développement de l'appareil génital mis en évidence, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique (pendant la durée de la gestation). Cette VTR protège également des effets tératogènes mis en évidence chez l'animal, pour lesquels des NOAEL étaient beaucoup plus élevés.

-- Benzyl butyl phtalate (BBP) 85-68-7 --

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|--|---|
| Diminution de la distance anogénitale chez les descendants mâles Etude sur deux générations chez le rat Sprague Dawley exposé par gavage Tyl <i>et al.</i> 2004 | NOAEL = 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹ LOAEL = 250 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Pas de construction de BMDL | 100 UF_A 10 UF_H 10 | VTR = 0,5 mg.kg⁻¹.j⁻¹ Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : fort VTR : fort |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT. Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique¹ à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

4.4 Bibliographie

National Toxicology Program (NTP). 1995. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Butyl Benzyl Phthalate (CAS No. 85-68-7) in F344 Rats (Feed Studies). [TR-458 \(NTIS N°PB98-131089\)](#).

Saillenfait A.M., Laudet-Hesbert A. Phtalates. EMC-Toxicologie Pathologie 2 (2005) :1-13.

Union Européenne. 2007. Risk Assessment Report. Benzyl butyl phthalate (BBP). Institute for Health and Consumer Protection. European Chemical Bureau. Existing Substances. 3rd Priority List. Volume 76. EUR 22733 EN. 259 pages.

¹ Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.

5 Nonylphénols (CAS 104-40-5, 84852-15-3, 25154-52-3, 90481-04-2) : VTR reprotoxique par ingestion

5.1 Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est basé sur les monographies réalisées au préalable par des instances nationales et sur la littérature parue postérieurement à ces monographies.

Les nonylphénols constituent une famille de composés de formule $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$ possédant un noyau benzénique et une chaîne carbonée à 9 carbones, linéaire ou ramifiée. Les nonylphénols ramifiés possèdent une chaîne principale de 8 carbones au maximum, le degré de branchements et leurs positions sont très variables selon les isomères. Les principaux composés sont :

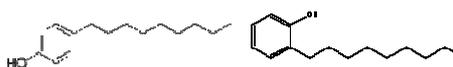
- 4-nonylphénol linéaire, 4-n-nonylphénol ou p-nonylphénol (CAS 104-40-5),
- 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3),
- n-nonylphénol (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire) (CAS 25154-52-3),
- Nonylphénol ramifié (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée) (CAS 90481-04-2).

NONYLPHENOL LINEAIRE

4-nonylphénol linéaire
(n°CAS 104-40-5)

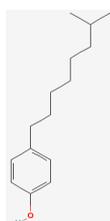


n-nonylphénol, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire
(n°CAS 25154-52-3)



NONYLPHENOL RAMIFIE

4-nonylphénol ramifiée
(n°CAS 84852-15-3)



Nonylphénol ramifié, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée
(n°CAS 90481-04-2)

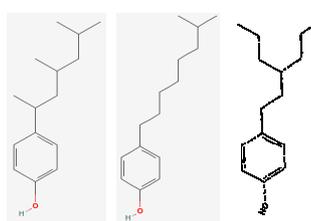


Figure 1 : Formules chimiques des nonylphénols des principaux composés

Les données rapportées ci-dessous concernent les formes linéaires et ramifiées. Dans cette note d'expertise, le terme nonylphénol, s'il n'est pas précisé, couvre tous les types de nonylphénol.

Le nonylphénol est utilisé principalement pour la production de surfactants (NP-polyéthoxylates) contenus dans les produits de consommation (produits ménagers, hygiène corporelle, ...), ainsi

que pour la production de résines ou de plastiques, dont des plastiques alimentaires. La population générale peut être exposée lors de l'utilisation de produits de consommation courante. La voie d'exposition peut alors être respiratoire (produits ménagers), cutanée (produits d'hygiène), ou orale (lors de la migration du nonylphénol dans la nourriture à partir des matériaux en contact avec les aliments ou de l'eau de boisson). L'évaluation européenne réalisée sur les nonylphénols linéaire et ramifié (CAS 84852-15-3 et 25154-52-3) en 2002 conclut que la voie d'exposition principale est la voie orale (UE, 2002).

Le 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3) et le n-nonylphénol (CAS 25154-52-3) sont classés depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 3 pour le développement et pour la reproduction (R63 : risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant et R62 : risque possible d'altération de la fertilité). Ces deux composés sont également classés comme substances nocives (R22 : nocif en cas d'ingestion), corrosives (R34 : provoque des brûlures), et dangereuses pour l'environnement (R50-53 : très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique).

5.1.1 Toxicocinétique

Peu de données de toxicocinétique sont disponibles actuellement. Chez l'animal, l'absorption par le tractus gastro-intestinal du nonylphénol serait rapide et probablement importante. Le métabolisme principal passe par une glucurono- et une sulfo-conjugaison. Les voies d'excrétion principales sont les fèces et les urines. Le nonylphénol a été retrouvé inchangé dans la bile lors d'exposition de rats à de fortes doses, témoignant d'une saturation métabolique ou d'une excrétion du composé parent concomitante à la métabolisation. Chez l'Homme, la biodisponibilité par voie orale a été estimée à 20 % environ. Les métabolites mis en évidence chez le rat et chez l'Homme sont qualitativement identiques entre ces espèces.

5.1.2 Effets sanitaires

Par voie orale et en exposition chronique, des effets rénaux ont été mis en évidence à des faibles doses ($15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) chez le rat. Des effets reprotoxiques et développementaux ont également été mis en évidence pour des expositions du même ordre de grandeur et il apparaît pertinent de prendre en compte ces effets pour la construction de VTR reprotoxiques spécifiques.

Aucune donnée humaine n'est disponible.

5.1.2.1 Effets néphrotoxiques

Une étude de toxicité à dose répétée (90 jours) conduite chez le rat par voie orale a montré une diminution du gain de poids et de la prise alimentaire, ainsi que des lésions histologiques hépatiques (nécrose cellulaire) et rénales (minéralisation notée lors d'une deuxième lecture anatomopathologique) à $140 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3) [CMA, 1997, Cunny *et al.*, 1997]. Un NOAEL de $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a été identifié.

Lors d'une étude sur 3 générations [NTP, 1997, Chapin *et al.*, 1999] où des rats Sprague Dawley ont été exposés par voie orale à du 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3), une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins ont été observées à $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. En outre, dès $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et pour toutes les générations, des lésions dégénératives et une dilatation tubulaire rénale non dose-dépendantes ont été mises en évidence.

5.1.2.2 Effets reprotoxiques

Les effets reprotoxiques du nonylphénol ont été décrits chez des rats exposés sur plusieurs générations ou lors d'exposition *in utero*. Les effets observés aux plus faibles doses sont des

perturbations du système reproductif des nouveau-nés (précocité de l'ouverture vaginale et une baisse du poids des ovaires et du compte spermatique), probablement sans atteinte fonctionnelle de la reproduction et de la fertilité, et des modifications des épидидymes lors d'expositions pendant la gestation [UE, 2002].

Ces effets reprotoxiques chez les nouveau-nés sont observés en présence de modifications au niveau du foie et des reins chez les parents lors d'expositions sur plusieurs générations [Nagao *et al.*, 2001]. En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'établir un lien de causalité entre la toxicité générale observée sur la génération F0 (modifications histologiques hépatiques et rénales) et la reprotoxicité mise en évidence sur la génération F1. Par prudence, une VTR fondée sur des effets reprotoxiques peut être proposée.

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, plusieurs études de reprotoxicité de bonne qualité réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après. D'autres études ont été conduites par voie intra-péritonéale. Elles n'ont pas été jugées pertinentes pour la construction d'une VTR reprotoxique car le mode d'administration (voie intra-péritonéale) n'est pas représentatif des conditions réelles d'exposition de l'embryon.

- Etudes de toxicité pré ou postnatale

Une première étude réalisée chez des rats Wistar exposés au nonylphénol du 9^{ème} au 15^{ème} jour de gestation n'a pas mis en évidence de toxicité pour le développement jusqu'à 300 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ [Initiative Umweltrelevante Altstoffe, 1992].

La seconde étude a été réalisée chez des rats Wistar exposés *in utero* à du 4-nonylphénol linéaire (n°CAS 104-40-5) par gavage de la mère du 11^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation aux doses de 0, 3, 15 et 75 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ [Hossaini *et al.*, 2001]. Les effets ont été observés après la naissance sur la F1 à J11, J21 et J110. A J110, une diminution dose-dépendante du poids absolu de l'épididyme droit a été observée à partir d'une exposition de 15 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Un NOAEL de 3 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ a été identifié.

Dans la troisième étude, les rats Sprague-Dawley ont été exposés du 7^{ème} jour de la gestation (GD7) à la 10^{ème} semaine postnatale, par gavage de 4-nonylphénol linéaire [De Jager *et al.*, 1999]. Les auteurs ont observé une mortalité ainsi qu'une diminution du poids absolu des testicules et des épидидymes, une diminution du diamètre des tubes séminifères et de l'épaisseur de l'épithélium basal à 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, en présence d'une mortalité. Une diminution du compte spermatique a également été observée, mais à 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Aucun NOAEL n'a pu être identifié.

Récemment, Moon *et al.* (2007) ont réalisé une étude portant sur les effets d'une exposition orale d'un mélange d'isomères branchés du nonylphénol, aux doses de 0, 10 et 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, sur le développement de la glande mammaire chez des rats Long Evans. Les mères ont été exposées au nonylphénol ramifié du 15^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation et les effets ont été observés chez les femelles F1 au 4^{ème}, 22^{ème}, 33^{ème}, 41^{ème} et 66^{ème} jour post-natal (PND 4, 22, 33, 41 et 66, respectivement). A 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, les effets observés sont une augmentation du poids utérin (PND41), une augmentation du taux de branchement des canaux primaires en canaux secondaires (PND4), une augmentation du nombre de bourgeons alvéolaires et une différenciation des bourgeons de l'extrémité terminale en bourgeons alvéolaires (PND33). Dès 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, il a été observé une diminution des branchements primaires du canal collecteur de la glande mammaire et un retard dans la migration de l'épithélium mammaire vers le nœud lymphatique (PND22).

Des effets endocriniens ont été aussi observés à PND41 avec une baisse de la LH pituitaire, une augmentation du nombre de récepteurs de l'œstrogène dans le stroma et l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus et une augmentation du nombre de récepteurs de la prolactine dans les glandes mammaires à la dose de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Il peut être noté une augmentation du

nombre de récepteurs de la progestérone dans l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus à $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et une diminution à $100 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. A 10 et $100 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, une baisse de la TSH pituitaire est observée. Ainsi, en tenant compte de tous ces effets, un LOAEL de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ peut être proposé. Aucun NOAEL n'est identifié.

- o Etude de toxicité sur plusieurs générations

Dans l'étude du NTP (1997), publiée par Chapin *et al.* en 1999, des rats Sprague-Dawley ont été exposés par voie orale à 0, 15, 50 et $160 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (0, 200, 650 et 2000 ppm) de 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3). L'exposition a été maintenue sur trois générations (de la semaine 7 pour F0 à la semaine 8 pour F3). La fertilité et les accouplements sont normaux. On note à $160 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ un allongement du cycle œstral (chez les F1 et F2) et à 50 et $160 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, une ouverture vaginale précoce (chez les F1, F2 et F3), une diminution du poids des ovaires (sans lésion histologique), une diminution de la densité spermatique épидидymaire et du compte des spermatozoïdes chez les F2. Pour ces modifications spermatiques, l'explication est incertaine. Les perturbations du système reproductif apparaissent mineures et sans retentissement sur la fertilité. Un NOAEL concernant les effets reprotoxiques a été identifié à $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Ces effets sont également accompagnés d'une toxicité générale avec une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins à 50 et $160 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Le NOAEL observé dans cette étude est de $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les effets sur la reproduction.

Dans l'étude de Nagao *et al.* (2001), des rats Sprague-Dawley ont été exposés à un mélange d'isomères linéaires du nonylphénol (CAS 25154-52-3) par gavage aux doses de 0, 2, 10 et $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Dans le dernier groupe de dose ($50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$), une diminution du poids corporel a été mise en évidence dans la génération parentale, mais elle n'est pas significative. Une augmentation du poids du foie et des reins, associée dans la génération parentale (F0) à des modifications histologiques (hypertrophie centrolobulaire, corps éosinophiles), a également été observée à cette dose. Les auteurs concluent à une absence de signification toxicologique claire, ce qui a été également suggéré dans d'autres études [Cunny *et al.*, 1997].

Chez les femelles F0 et F1, une diminution significative du poids absolu et relatif des ovaires est observée à $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ sans atteinte histologique associée. Chez les femelles de la génération F1, une diminution statistiquement significative de la LH sérique ($5,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ versus $7,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ chez les témoins, $p < 0,05$) et une ouverture vaginale précoce (à PND 31,5 en moyenne versus 33,4 chez les témoins, $p < 0,01$) sont observées à la plus forte dose testée. Une diminution statistiquement significative ($p < 0,05$) du nombre de petits par portée (11,5 versus 13,5 en moyenne chez les témoins) et du nombre de sites d'implantation (12,5 versus 14,9 en moyenne chez les témoins) est observée à $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ dans la génération F2. Une augmentation des niveaux de testostérone chez les mâles et du poids de l'utérus chez les femelles de la génération parentale (F0) est reportée à $2 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, mais n'est pas observée aux doses supérieures. Une augmentation du poids de la prostate chez les mâles avant sevrage et une diminution des niveaux de FSH chez les mâles adultes sont observés à $2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ dans la génération F1. Ces effets ne sont plus mis en évidence pour les doses supérieures (10 et $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Les auteurs proposent un NOAEL de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour ces effets reprotoxiques.

Toutes les expérimentations animales retenues sont conduites selon des protocoles rigoureux (lignes directrices de l'OCDE ou s'y apparentant). Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

5.1.3 Mécanisme d'action

Seul le mécanisme d'action lié aux effets reprotoxiques a été investigué. Une réponse utéro-trophique et une ouverture vaginale précoce ont été clairement mises en évidence lors d'études *in vivo* chez la rate immature ou ovariectomisée, permettant de conclure à l'activité

œstrogénique du nonylphénol. Les études *in vitro* confirment cette activité, qui serait 10^3 à 10^6 fois inférieure à celle du 17- β -œstradiol [UE, 2002].

Le test utéroprothique chez la rate est un test reconnu prédictif des effets perturbateurs endocriniens chez l'Homme. Ainsi, au vu de l'ensemble des données disponibles, les effets reprotoxiques observés chez l'animal pourraient également être observés chez l'Homme.

5.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Comme il existe plusieurs formes de nonylphénol, le CES a proposé de construire deux VTR, l'une pour les formes dont la chaîne alkyle est linéaire et l'autre pour les formes dont la chaîne alkyle est ramifiée.

5.2.1 Le nonylphénol ramifié (CAS 90481-04-2 et 84852-15-3)

5.2.1.1 Choix de l'effet critique

Le nonylphénol ramifié a montré une activité œstrogénique aussi bien dans les études *in vitro* (10^3 à 10^6 fois plus faible que celle de l'œstradiol) qu'*in vivo*. Les différentes études analysées mettent en évidence une activité œstrogénique lors d'exposition *in utero* et sur plusieurs générations. Ces études mettent en évidence des effets sur les ovaires (diminution du poids des ovaires sans lésion histologique) et sur les spermatozoïdes des descendants (diminution de la densité spermatique épидидymaire et du nombre de spermatides), une ouverture vaginale précoce, et des effets sur le développement des glandes mammaires (diminution des branchements primaires du canal collecteur et retard de migration de l'épithélium vers les nœuds lymphatiques au 22^{ème} jour après la naissance). Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- La plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- La bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

Il convient de noter que les effets sur la glande mammaire semble être le marqueur le plus sensible puisqu'ils sont observés aux doses les plus faibles (LOAEL = $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$). **Le CES a donc retenu les effets sur la glande mammaire comme effet critique.**

5.2.1.2 Choix de l'étude

Deux études décrites précédemment [Chapin *et al.*, 1999 ; Moon *et al.*, 2007] peuvent être retenues pour les composés ramifiés du nonylphénol. Un tableau comparatif de ces 2 études se trouve en annexe 3.

Le choix de l'étude de **Moon *et al.* (2007)** pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique du nonylphénol ramifié repose sur :

- La prise en compte de l'effet toxique le plus sensible : un LOAEL de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a été mis en évidence dans l'étude de Moon *et al.* (2007) pour les effets sur les glandes mammaires tandis que l'étude de fertilité de Chapin *et al.* (1999) a mis en évidence un NOAEL de $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour d'autres effets œstrogéniques. Chapin *et al.* n'ont pas étudié les effets sur les glandes mammaires. Le choix de l'étude de Moon *et al.* permet de protéger des effets apparaissant à des doses plus élevées dans l'étude de Chapin.
- La qualité de l'étude jugée acceptable par les experts, même si elle ne suit pas la totalité des recommandations de l'OCDE (ligne directrice 414).

5.2.1.3 Choix de la dose critique

Parmi les 2 études sélectionnées, celle ayant conduit à observer des effets aux doses les plus faibles [Moon *et al.*, 2007] a été retenue par les experts pour dériver la dose critique.

Le LOAEL de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ issu de cette étude a donc été proposé comme dose critique.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

5.2.1.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : Selon la méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement, l'Afsset préconise un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Le CES propose un facteur 3 car le LOAEL issu de l'étude de Moon est plus bas que ceux établis dans d'autres études, suggérant que les effets retenus sont très sensibles.
- UF_D : insuffisance de données : non applicable, les données étant jugées suffisantes.

5.2.1.5 Synthèse

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|---|--|
| Effets sur le développement de la glande mammaire | Absence de NOAEL LOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ | 300 | VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ |
| Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez les rates Long Evans | Pas de construction de BMDL | UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3 | Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen |
| Moon <i>et al.</i> , 2007 | | | |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

5.2.2 Le nonylphénol linéaire (CAS 25154-52-3 et 104-40-5)

5.2.2.1 Choix de l'effet critique

Le nonylphénol linéaire a montré aussi bien dans les études *in vivo* qu'*in vitro* une activité œstrogénique, 10³ à 10⁶ fois plus faible que celle de l'œstradiol. Les études multigénérationnelles de bonne qualité scientifique mettent en évidence des **effets sur l'ouverture vaginale et les**

ovaires dès 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, sans modification fonctionnelle de la reproduction. Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- la plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- la bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

5.2.2.2 Choix de l'étude

Les deux études retenues décrites précédemment (cf. partie effets reprotoxiques) concernant le nonylphénol linéaire sont celles de Hossaini *et al.* (2001) et de Nagao *et al.* (2001). Un tableau comparatif de ces deux études se trouve en annexe 4.

Ces deux études sont de bonne qualité (Klimisch 1). Dans l'étude d'Hossaini *et al.* (2001), uniquement la diminution du poids absolu de l'épididyme droit est rapportée par les auteurs comme statistiquement significative. Par conséquent, l'étude ne sera pas retenue pour la construction de la VTR. Ainsi, l'étude de **Nagao *et al.* (2001)** qui met en évidence une activité œstrogénique chez les rates F1 exposées au nonylphénol linéaire, est retenue comme étude clé pour construire la VTR.

5.2.2.3 Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue [Nagao *et al.*, 2001], la diminution de la LH sérique et du poids des ovaires, et l'ouverture vaginale précoce sont observées à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, dose correspondant au LOAEL.

Il est important de souligner que d'autres modifications biologiques apparaissent à la plus faible dose. En effet, une diminution de la FSH est observée chez les mâles de la génération F1 à 2 mg/kg pc/j, mais pas aux doses supérieures (224 ng.mL⁻¹ vs 302 ng.mL⁻¹ chez les témoins). Les auteurs précisent que les données sur les concentrations hormonales doivent être interprétées avec précaution tant que de nouvelles études n'ont pas confirmé leurs résultats. De même, une augmentation du poids relatif et absolu de la prostate et de la vésicule séminale est rapportée pour la seule dose de 2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (respectivement, 12,8±2 mg vs 11,4±2,2 mg chez les témoins et 76,4±13,6 mg vs 68,4±12,9 mg chez les témoins).

Le CES a décidé de retenir comme dose critique le NOAEL de 10 mg/kg pc/j proposé par les auteurs.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques rencontrées pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

Le CES estime cependant que le couple de valeur LOAEL / NOAEL peut être proposé pour la construction de la VTR. Le faible écart entre les deux valeurs renforce la précision de la VTR.

5.2.2.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'Homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : non applicable

- UF_D : insuffisance de données : dans l'étude retenue [Nagao *et al.*, 2001] ont été étudiés de nombreux effets mais pas ceux sur la glande mammaire. Ces effets semblent pourtant apparaître à des niveaux beaucoup plus faibles, de l'ordre de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ comme le montre l'étude de Moon *et al.*, 2007 sur le nonylphénol ramifié. Ainsi, le CES propose un facteur de 3 pour l'absence de données sur la glande mammaire.

5.2.2.5 Synthèse

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|------------------------------------|---|
| Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce (F1) | NOAEL = $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ LOAEL = $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ | 300 | VTR = $0,03 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ |
| Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rates Sprague-Dawley | Pas de construction de BMDL | UF_A 10 UF_H 10 UF_D 3 | Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la glande mammaire) Etude : fort Dose critique : fort |
| Nagao <i>et al.</i> , 2001 | | | VTR : moyen |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = uncertainty factors (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_D : Insuffisance de données

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

5.3 Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Le nonylphénol est une famille de composés qui a fait l'objet de plusieurs études de reprotoxicité chez le rongeur. Deux VTRs ont été construites, une pour les composés linéaires et une pour les composés ramifiés.
- ▶ Aucune donnée humaine n'est disponible.
- ▶ L'hypothèse retenue est de considérer que les effets observés chez le rat sont pertinents pour l'Homme et que les effets de type œstrogénique peuvent être retenus comme effets critiques. Le mécanisme avancé (action œstrogénique) est plausible et corrélé aux effets mis en évidence.
- ▶ Même si l'objectif est de construire une VTR reprotoxique, d'autres effets, tels que des effets néphrotoxiques, sont susceptibles de se produire à des niveaux de doses comparables.
- ▶ Le rapport européen conclut à un NOAEL de $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les effets sur la reproduction en se basant sur l'étude du NTP, 1997. Les études choisies ici pour construire les VTR sont plus récentes et de ce fait, n'avaient pas pu être prises en compte dans le rapport européen.

Le CES propose ainsi la construction de deux VTR, pour les nonylphénols linéaire et ramifié, spécifiques aux effets sur le développement et la reproduction. Compte tenu des effets sur le développement, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique.

-- Nonylphénol ramifié CAS 90481-04-2 et 84852-15-3 --

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|---|--|
| Effets sur le développement de la glande mammaire | Absence de NOAEL LOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ | 300 | VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ |
| Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez les rates Long Evans | Pas de construction de BMDL | UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3 | Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen |
| Moon <i>et al.</i> , 2007 | | | |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

-- Nonylphénol linéaire CAS 25154-52-3 et 104-40-5 --

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|---|---|
| Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce (F1) | NOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ LOAEL = 50 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ | 300 | VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ |
| Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rates Sprague-Dawley | Pas de construction de BMDL | UF _A 10 UF _H 10 UF _D 3 | Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la glande mammaire) Etude : fort Dose critique : fort VTR : moyen |
| Nagao <i>et al.</i> , 2001 | | | |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UFD : Insuffisance de données

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

5.4 Bibliographies

Chapin RE, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G, The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study, *Toxicological science*, 1999 Nov;52(1):80-91

Chemicals Manufacturers Association, Uterine weight assay of p-nonylphenol and p-octylphenol ethoxylate-5 (OPE-5) administered orally to ovariectomized Sprague Dawley rats, 1997, MB Research Labs Project NMB9 6-4960.07.

Cunny HC, Mayes BA, Rosica KA, Trutter JA, Van Miller JP, Subchronic toxicity (90-day) study with para-nonylphenol in rats, 1997, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 26, 172-178.

- Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Frandsen H, Larsen JJ, In utero reproductive study in rats exposed to nonylphénol, *Reproductive Toxicology*, 2001 Sep-Oct;15(5):537-43
- Moon HJ, Han SY, Shin JH, Kang IH, Kim TS, Hong JH, Kim SH, Fenton SE, Gestational exposure to nonylphenol causes precocious mammary gland development in female rat offspring, *Journal of reproduction and development*, 2007 Apr;53(2):333-44
- Nagao T, Wada K, Marumo H, Yoshimura S, Ono H, Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study, *Reproductive Toxicol*, 2001 May-Jun;15(3):293-315.
- National Toxicological Program, Nonylphenol : multigenerational reproductive effect in Sprague-Dawley rats when exposed to nonylphenol in the diet, 1997, R.O.W. Sciences study N° 8989-30. In European Assessment Report on Existing Substances (2002): 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol, EUR 20387 EN, Series : 2nd Priority List vol. 10.
- Union Européenne, 2002. Risk Assessment Report. 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol Institute for Health and Consumer Protection. European Chemical Bureau. Existing Substances. 2nd Priority List. Volume 10. EUR 20387 EN. 244 pages.

6 Toluène (CAS 108-88-3) : VTR reprotoxique par inhalation

6.1 Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'informations, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 » [Afsset, 2006]. Le rapport est basé sur les monographies réalisées antérieurement à ce travail par des instances nationales et sur la littérature parue après ces monographies.

Le toluène est une substance chimique volatile largement utilisée, comme intermédiaire de synthèse dans l'industrie chimique, pharmaceutique et cosmétique, mais également en tant que solvant dans les peintures, encres, produits ménagers ou adhésifs ainsi que comme additif dans l'essence. Compte tenu des propriétés physico-chimiques et des usages du toluène, l'exposition peut se faire par voie respiratoire ou cutanée, mais la principale exposition de l'Homme est respiratoire.

Le toluène est classé depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 3 pour le développement (R 63, risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant).

Il est également classé R 11 (facilement inflammable), R 38 (irritant pour la peau), R 48/20 (nocif : risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par inhalation, R 65 (nocif : peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion), R 67 (l'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges).

6.1.1 Toxicocinétique

Chez l'animal, l'absorption par voie orale du toluène par le tractus gastro-intestinal est pratiquement totale. L'absorption respiratoire serait de 50 % à 90 % en fonction du débit ventilatoire, l'absorption cutanée serait limitée pour le toluène sous forme liquide et négligeable avec des vapeurs de toluène [EC, 2003].

Le métabolisme du toluène est comparable entre le rongeur et l'Homme. Chez l'Homme, le principal métabolite est l'acide benzoïque, issu de l'oxydation du groupement méthyle porté par le noyau benzénique par les cytochromes P450. Une glycoconjugaison peut conduire à la formation de l'acide hippurique. La biotransformation conduit de manière transitoire à la formation de métabolites réactifs toxiques comme les crésols et certaines quinones (méthylhydroquinone, méthylbenzoquinone). Chez l'animal, les données sont comparables, avec production minoritaire de benzoylglucuronide. Enfin, le toluène a une affinité importante pour les tissus ou liquides riches en graisses (tissus adipeux, cerveau, lait maternel).

6.1.2 Effets sanitaires

Par voie respiratoire lors d'une exposition chronique, des effets neurologiques ont été mis en évidence chez le rongeur comme chez l'Homme. Des effets reprotoxiques et développementaux ont également été mis en évidence en particulier chez l'animal ; toutefois, les effets neurologiques sont rapportés pour des concentrations plus faibles que les effets sur la fertilité ou le développement. Chez l'Homme, bien que peu d'études aient investigué les effets reprotoxiques liés au toluène, les niveaux d'exposition associés aux effets reprotoxiques étaient également plus élevés que ceux associés aux effets neurotoxiques. Compte tenu que le toluène est classé comme

ayant un potentiel reprotoxique (catégorie 3 au niveau européen), il apparaît pertinent de prendre en compte ces effets pour la construction d'une VTR spécifique pour des effets reprotoxiques.

6.1.3 Effets neurologiques

Chez l'Homme, des expositions à des concentrations élevées de toluène (100 à 500 mg.m⁻³) sont responsables de dysfonctionnements cérébraux, pyramidaux et cognitifs importants entraînant des altérations auditives, visuelles et comportementales. Ces effets ont aussi été observés chez l'animal. Des VTRs spécifiques pour la neurotoxicité ont été construites par d'autres agences. En 2000, l'ATSDR a établie des VTRs par inhalation pour le toluène pour une exposition chronique = 0,3 mg.m⁻³ et pour une exposition aiguë = 3,8 mg.m⁻³.

6.1.4 Effets reprotoxiques

Les effets reprotoxiques du toluène sont décrits chez l'animal, en particulier chez le rat pour lequel l'exposition au toluène ne semble pas induire de malformations mais serait à l'origine d'une diminution du poids de naissance, de retards de développement post-natal et d'altérations comportementales. Concernant les effets sur la fertilité, une seule étude a mis en évidence chez le rat une diminution significative du nombre de spermatozoïdes et du poids de l'épididyme à 7 500 mg.m⁻³ [Ono *et al.*, 1996].

Des effets reprotoxiques sont également suspectés chez l'Homme : certaines études épidémiologiques réalisées en milieu professionnel ont mis en évidence une relation significative entre le risque d'avortements spontanés et une exposition au toluène de l'ordre de 50 à 150 ppm, soit en moyenne de 88 ppm (environ 330 mg.m⁻³) [Ng *et al.*, 1992, cité dans EU, 2003]. D'autres études ont observé chez l'Homme une diminution des niveaux de LH, FSH et testostérone sanguine pour des concentrations assez faibles (autour de 100 mg.m⁻³), sans trouble de la fertilité identifié ni altération des organes de la reproduction.

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues par les experts. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés chez l'homme. Concernant les effets sur le développement, compte tenu du nombre important d'études réalisées chez le rongeur, seules les études les mieux cotées selon la classification de Klimisch seront synthétisées ci-après. Pour plus d'éléments, le lecteur pourra se référer à l'annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques [Afsset, 2007].

6.1.4.1 Etudes de développement prénatal

Etude de Roberts *et al.* 2007

Cette étude a été réalisée chez des rates Sprague-Dawley exposées pendant la gestation du 6^{ème} au 15^{ème} jour, 6 heures par jour, à 0 – 938 – 2812 – 5625 et 11250 mg.m⁻³. Les auteurs concluent à l'absence d'effets significatifs sur la progéniture à 2812 mg.m⁻³. Un NOAEL a été proposé à 2812 mg.m⁻³ sur la base de l'observation d'une diminution du poids des fœtus et des retards d'ossification à 5625 mg.m⁻³. Les effets sur les mères sont observés pour des doses de 5625 et 11250 mg.m⁻³ (diminution du gain de poids corporel pour la dose la plus élevée, ataxie).

Etude de Thiel et Chahoud, 1997

Cette étude a été réalisée chez des rates Wistar qui ont été exposées du 9^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation, 6 heures par jour à 0 – 1130 – 2300 – 3800 et 4560 mg.m⁻³. A partir de 3800 mg.m⁻³, une diminution du poids corporel à la naissance et un retard d'ouverture vaginale d'au moins 5 jours ont été rapportés. On note également une augmentation de la mortalité post-natale avant le sevrage à 4560 mg.m⁻³. Un NOAEL a été proposé à 2300 mg.m⁻³. Une diminution du poids

corporel maternel est également rapportée à 3800 et 4560 mg.m⁻³, mais de façon non statistiquement significative.

Etude de Saillenfait et al., 2007

Cette étude a été réalisée chez des rates Sprague-Dawley exposées pendant la gestation du 6^{ème} au 20^{ème} jour, 6 heures par jour, à 0 – 1875 – 5625 mg.m⁻³. Une diminution significative du poids corporel des fœtus a été observée à 5625 mg.m⁻³ conduisant à un NOAEL de 1875 mg.m⁻³. Les auteurs rapportent également une diminution du gain de poids maternel du 6^{ème} au 13^{ème} jour de la période d'exposition à 5625 mg.m⁻³.

6.1.4.2 Etudes de fertilité

Etude d'Ono et al. 1996:

Cette étude a mis en évidence des effets sur la fertilité chez le rat mâle exposé au toluène à 2250 et 7500 mg.m⁻³ : des rats Sprague-Dawley ont été exposés 60 jours (mâles) et 14 jours (femelles) avant l'accouplement puis jusqu'au 7^{ème} jour de gestation pour les femelles. Seule une diminution des poids relatifs et absolus des épидидymes et une diminution du nombre de spermatozoïdes de 20 à 25 % ont été mises en évidence à 7500 mg.m⁻³, sans altération histopathologique ni modification du nombre des cellules spermatogéniques. Un NOAEL a été identifié à 2250 mg.m⁻³.

6.1.4.3 Etudes sur plusieurs générations

Etude de Roberts et al. 2003

Cette étude a investigué les effets liés à une exposition au toluène sur plusieurs générations. Des rats Sprague Dawley Crl:CD[SD]BR ont été exposés à 0 – 375 – 1875 et 7500 mg.m⁻³ par inhalation. Les mâles et les femelles de la première génération (parent, F0) ont été exposés 80 jours avant l'accouplement puis 15 jours pendant la période de l'accouplement, 6 heures par jour et 7 jours par semaine. Les femelles F0 gestantes ont ensuite été exposées de GD1 à GD20 puis la progéniture de PND5 à PND21. La génération F1 sélectionnée pour être mise à la reproduction a été exposée sur le même schéma. Un autre schéma expérimental a consisté à exposer soit les mâles, soit les femelles à 0 et 7500 mg.m⁻³ et à les accoupler avec des animaux non exposés. Les résultats montrent que le poids moyen de la génération F1, chez les mâles comme les femelles, est significativement diminué à 7500 mg.m⁻³ chez les ratons issus de deux parents exposés (p<0,01) ou issus d'une mère exposée (p<0,05), mais pas lorsque seul le père était exposé. La fertilité et les performances reproductives n'ont pas été affectées. Le poids a été mesuré pendant la période de lactation à LD1, LD4, LD14 et LD21. Dès le premier jour (LD1), et pour la plus forte dose (7500 mg.m⁻³) le poids des ratons est diminué (5,7 ou 5,9 versus 6,5 g pour les mâles, 5,3 ou 5,5 versus 6 g pour les femelles par rapport aux non exposés). L'effet retenu est la diminution du poids des petits pour les générations F1 et F2. Le NOAEL a été identifié à 1875 mg.m⁻³ en l'absence d'une toxicité maternelle.

Ces expérimentations animales sont conduites selon des protocoles rigoureux (assimilables aux lignes directrices de l'OCDE). Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

6.1.5 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du toluène à l'origine des effets reprotoxiques n'est pas connu.

Au vu de l'ensemble des données disponibles sur le métabolisme et les effets chez l'animal et chez l'Homme, il est prudent de considérer que les effets reprotoxiques du toluène observés chez l'animal puissent aussi survenir chez l'homme.

6.2 Analyse et évaluation des choix

6.2.1 Choix de l'effet critique

Il est retrouvé dans la plupart des études expérimentales chez le rat et pour des niveaux de doses similaires, une diminution du poids de naissance qui apparaît comme un effet pertinent à prendre en compte. En outre, d'autres études ont rapporté des effets neuro-développementaux chez les rats pour les mêmes niveaux d'exposition.

Concernant les effets sur la fertilité, une seule étude a montré des effets chez le rat mâle [Ono *et al.*, 1996]. Une diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes a été observée à 7500 mg.m⁻³, Cependant, ces effets surviennent à une dose à laquelle une toxicité rénale ainsi qu'une diminution du poids du thymus est également décrite chez les mâles. La NOAEL reprotoxique dérivée de cette étude est de 2250 mg.m⁻³, soit supérieure à la NOAEL reprotoxique issue de l'étude de Roberts 2003 pour un effet sur le développement. Les experts ont décidé de ne pas retenir l'étude d'Ono *et al.* pour la construction de la VTR reprotoxique, en raison du faible nombre de doses testées (2250 mg.m⁻³ et 7500 mg.m⁻³) sans pour autant écarter l'existence d'un effet sur la fertilité du toluène.

Ces effets sur la fertilité seraient également pertinents chez l'Homme et il apparaît nécessaire d'assurer une veille scientifique sur les effets du toluène sur la fertilité afin de pouvoir apporter des éléments plus complets.

Concernant les avortements spontanés tardifs observés dans l'étude de Ng *et al.*, celle-ci ne répondant pas aux critères élaborés dans la construction des VTR, n'a pas été retenue par le CES, compte tenu des biais relevés par les experts dans l'estimation des expositions (exposition à d'autres polluants, niveaux d'exposition mal renseignés, faible nombre d'individus impliqués dans l'étude)².

L'effet critique retenu pour l'établissement d'une VTR liée aux effets sur le développement, sera donc la **diminution du poids de naissance** mis en évidence dans plusieurs études. Ceci est en accord avec la caractérisation des risques conduits par l'Union Européenne. La VTR retenue devra également protéger des effets sur la fertilité.

6.2.2 Choix de l'étude

Les données chez l'Homme et chez le rat, ainsi que quelques éléments chez la souris sont en faveur d'effets sur le développement similaires entre les espèces (faible poids de naissance, retard de développement postnatal et neurotoxicité).

Quatre études ont mis en évidence des effets sur le poids de la progéniture [Roberts, 2007, 2003 ; Thiel and Chahoud, 1997 ; Saillenfait *et al.*, 2007]. Le CES propose de retenir l'étude de **Roberts, 2003** comme étude source pour les raisons suivantes :

- Etude menée sur deux générations ;
- Observations et analyse effectuées sur les deux sexes.

Cette étude est classée 1a selon Klimisch (respect des lignes directrices de l'OCDE et des bonnes pratiques de laboratoire).

² Toutefois, si cette étude avait été utilisée, le même ordre de grandeur aurait été obtenu pour la caractérisation du risque.

Concernant l'évaluation des risques réalisés par l'Union Européenne, celle-ci se fonde sur la valeur de LOAEC de 88 ppm (330 mg.m⁻³) chez l'Homme pour la caractérisation du risque d'avortement spontané tardif [Ng *et al.*, 1992] et sur le NOAEC de 600 ppm (2250 mg.m⁻³) [Ono *et al.*, 1996], pour la caractérisation des risques pour la fertilité et de Thiel *et al.* (1997) pour la caractérisation des risques pour les effets sur le développement liés au toluène. Cependant, ces études n'ont pas été retenues par les experts pour la construction de la VTR reprotoxique, pour les raisons explicitées ci-dessus.

6.2.3 Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue, la diminution du poids est observée à la dose de 7500 mg.m⁻³, correspondant donc au LOAEL. Le NOAEL est à 1875 mg.m⁻³.

Pour déterminer ce LOAEL basé sur des données continues (poids du corps), les auteurs ont utilisé la méthode d'analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de Bartlett. Pour déterminer les différences statistiquement significatives, un test de Dunnett ou de Student a été réalisé. L'unité expérimentale était la portée. Les seuils de 0,01 et 0,05 ont été retenus pour la significativité des résultats.

6.2.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas suffisamment d'élément chez l'homme.
- UF_H : variabilité interindividuel : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.

6.3 Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Le toluène est une substance qui a fait l'objet de plusieurs études de toxicité notamment concernant ses effets sur le développement, même à l'issue d'une période courte d'exposition. Il est d'ailleurs classé reprotoxique de catégorie 3, phrase de risque R63.
- ▶ Les effets observés chez l'animal (rat) sont retenus par défaut pour l'homme car les mécanismes d'action ne sont pas connus.
- ▶ Il existe quelques études humaines qui viennent conforter ces conclusions.

Le CES propose ainsi la construction d'une VTR respiratoire spécifique aux effets sur le développement, pour une exposition aiguë par inhalation pour tenir compte de l'absence de connaissance sur le mécanisme d'action et de la période critique de sensibilité. Cette VTR protège aussi des effets sur la fertilité [Afsset, 2007 ; INERIS-Toluène, 2006].

| -- Toluène CAS 108-88-3 -- | | | |
|---|---|--|----------------------------------|
| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
| Diminution du poids de la progéniture (génération F1) | NOAEL = 1875 mg.m ⁻³ LOAEL = 7500 mg.m ⁻³ | 100 | VTR = 5 mg.m⁻³ |
| Etude sur deux générations chez des rates Wistars | Pas de construction de BMDL | UF _A 10 UF _H 10 | |
| Roberts, 2003 | <u>Ajustement temporel</u> NOAEL_{ADJ} = 468,75 mg.m⁻³ | | |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

* Coefficients allométriques : NEANT. Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique³ à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

Facteur de conversion temporelle : par précaution et en l'absence de lignes directrices précises sur ce thème, le NOAEL de 1875 mg.m⁻³ a été transformé pour tenir compte d'une exposition continue (24 heures sur 24), selon la loi de Haber, car les rats n'étaient exposés que 6 heures sur 24. Ce facteur est justifié par une affinité du toluène pour les graisses, ce qui lui confère un grand volume de distribution et par une cinétique d'élimination longue.

Le CES attire l'attention sur le fait que la VTR proposée pour les effets reprotoxiques (toxicité sur le développement) ne protège pas d'autres effets toxiques, en l'occurrence d'effets neurologiques, et n'est donc pas protectrice vis-à-vis de la toxicité neurologique. Le CES recommande donc une analyse critique des VTR existantes fondées sur les effets neurologiques du toluène, et le cas échéant, l'élaboration d'une telle VTR

Considérant que l'étude de Roberts *et al.* (2003) n'a pas fait mention d'effet sur le poids de l'épididyme, ni sur une diminution du nombre de spermatozoïdes, contrairement à l'étude de Ono *et al.* (1996), le CES attire l'attention sur la possibilité d'effets sur la fertilité humaine. Bien que Ono *et al.* (1996) aient décrit ces effets à la dose de 7500 mg.m⁻³ (2000 ppm) en présence d'une toxicité générale systémique, aucune donnée ne permet de conclure que les effets sur les organes de la reproduction male sont secondaires à la toxicité générale. Même si ces effets n'ont pas été associés à une altération fonctionnelle chez le rat, celui-ci disposant d'une réserve spermatique plus importante que l'Homme, le CES estime qu'il est nécessaire de compléter les données de fertilité pour pouvoir estimer le risque chez l'Homme.

³ Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.

6.4 Bibliographie

- Afsset. Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques-méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement. Avril 2007.
- European Union - Risk Assessment Report- Volume 30-Toluene. 2003
- INERIS. Rapport d'étude N°NERIS-DRC-06-70355/ETSC/ MBs-06DR136.doc. Construction de VTR reprotoxiques selon le document de référence de l'Afsset- Toluène.
- Ono A, Sekita K, Ohno K, et al. Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. I. Teratogenicity study of inhalation exposure in pregnant rats. *J Toxicol Sci.* 1995 May;20(2):109-34.
- Ono A, Sekita K, Ogawa Y, et al.. Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. *Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1996;15(1):9-20
- Ng TP, Foo SC, Yoong T. Risk of spontaneous abortion in workers exposed to toluene. *Br J Ind Med.* 1992 Nov;49(11):804-8.
- Roberts LG, Bevans AC, Schreiner CA. Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in the rat. I. Reproductive toxicity. *Reprod Toxicol.* 2007 Jun;23(4):521-31
- Roberts LG, Bevans AC, Schreiner CA. Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in the rat II. Developmental toxicity. *Reprod Toxicol.* 2003 Nov-Dec;17(6):649-58.
- Saillenfait AM, Gallissot F, Sabaté JP, Bourges-Abella N, Muller S. Developmental toxic effects of ethylbenzene or toluene alone and in combination with butyl acetate in rats after inhalation exposure. *J Appl Toxicol.* 2007 Jan-Feb;27(1):32-42..
- Thiel R, Chahoud I. Postnatal development and behaviour of Wistar rats after prenatal toluene exposure ; *Arch Toxicol.* 1997;71(4):258-65.

7 Ether éthylique de l'éthylène glycol (CAS 11-80-5) : VTR reprotoxique par inhalation

7.1 Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le résumé des travaux effectués en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote (INERIS). Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est fondé sur les monographies déjà publiées par des instances nationales et sur la littérature parue ultérieurement à ces monographies, ainsi que sur l'expertise collective sur les éthers de glycol de l'INSERM (1999, 2006).

7.1.1 Généralités

L'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE), appelé également 2-éthoxyéthanol, appartient à la famille des éthers de glycol et plus particulièrement à la série E (Ethylénique) (CAS 110-80-5). Sa formule chimique développée est la suivante :

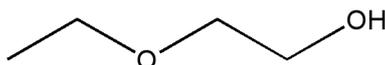


Figure 2 : Formule développée de l'EGEE

L'EGEE est classé depuis 1993 (19^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 2 pour le développement et pour la reproduction (R60 : peut altérer la fertilité, R61 : risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant). Ce composé est également classé comme substance nocive (R20/21/22 : nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion)⁴.

L'EGEE est l'objet de multiples usages industriels⁵. Cependant son utilisation a fortement diminué depuis sa classification par l'UE comme R2 en 1993. Ainsi, sur 13 000 préparations enregistrées dans la base SEPIA de l'INRS entre 2000 et 2006, 24 préparations contenaient de l'EGEE (solvant, peintures, vernis, encres d'imprimerie, produits d'entretien ménagers et industriels) [Afsset, 2008]. Les expositions sont ainsi peu fréquentes. La population générale peut être exposée principalement par inhalation et absorption cutanée lors de l'utilisation de produits de consommation courante. L'exposition par voie orale est minime. Ainsi, une VTR sera construite pour la voie inhalée.

⁴ Règlement « Classification, Labelling and Packaging » : Toxicité pour la reproduction catégorie 1B ; Mentions de danger : H226 - Liquide et vapeurs inflammables, H360FD - Peut nuire à la fertilité et au fœtus, H332 - Nocif par inhalation, H312 - Nocif par contact cutané, H302 - Nocif en cas d'ingestion

⁵ L'EGEE est soumis à une restriction d'usage interdisant la mise sur le marché et l'importation à destination du grand public de produits de consommation contenant de l'EGEE, ainsi que des préparations en contenant 0,5 % ou plus [Arrêté du 7 août 1997, modifié par l'arrêté du 19 avril 2001]. Depuis l'entrée en vigueur du règlement CLP (Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures), la limite de concentration doit être supérieure ou égale à 0,3 % pour déterminer la classification du mélange comme reprotoxique de catégorie 1B (anciennement catégorie 2 de la Directive 67/548/CE abrogée).

7.1.2 Toxicocinétique

Chez l'Homme, comme chez l'animal, l'EGEE est rapidement absorbé par les voies respiratoire, cutanée et digestive, et se distribue rapidement dans tout l'organisme. La voie métabolique majeure est la formation de l'acide 2-éthoxyacétique (2-EAA) (23-35 % chez l'homme, 20-40% chez le rat) résultant de l'action de l'alcool et de l'aldéhyde déshydrogénase sur EGEE. L'2-EAA est le principal métabolite responsable des effets toxiques de l'EGEE. L'2-EAA est éliminé principalement dans les urines (chez l'homme : pic urinaire = 4-12h, temps de demi-vie > 40h, chez le rat : temps de demi-vie d'élimination 10-12h). D'autres voies métaboliques existent et entraînent la formation d'éthylène glycol, d'acide glycolique, etc. Ces métabolites sont éliminés dans les urines. Enfin, dans une moindre mesure, l'EGEE peut être éliminé dans l'air expiré sous forme inchangée et sous forme de monoxyde de carbone.

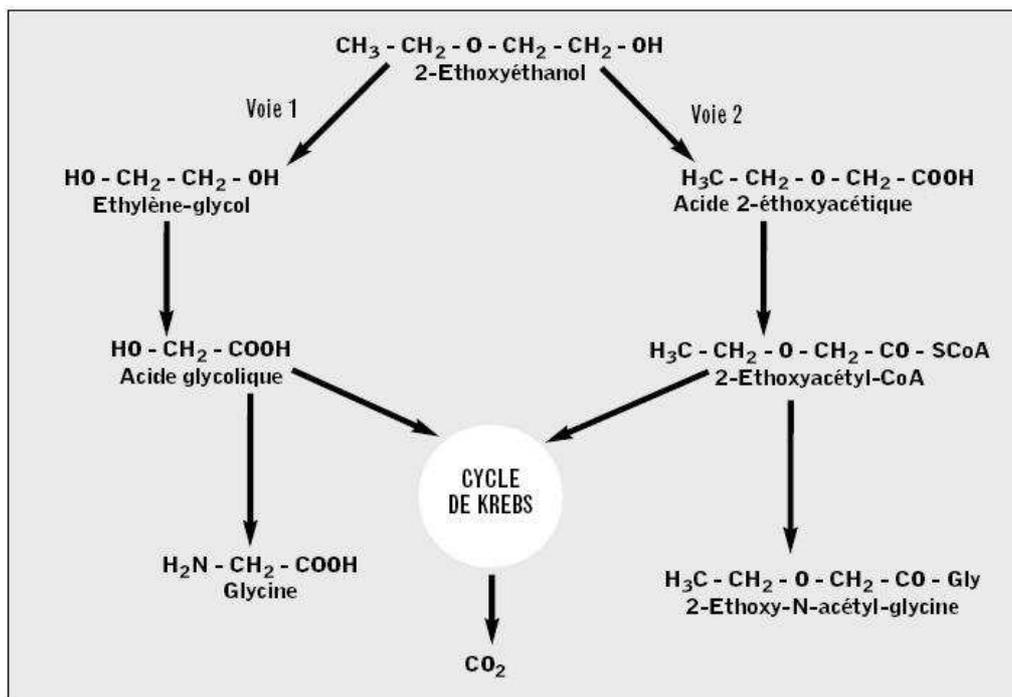


Figure 3 : Métabolisme de l'EGEE [INRS, 1999]

Bien que l'on possède peu d'informations sur les différences entre les espèces, il semblerait que le 2-EAA puisse être présent en plus fortes concentrations et pendant plus longtemps dans le sang humain que dans le sang de rat (plus grande absorption et plus grand métabolisme de l'EGEE en 2-EAA chez l'Homme que chez le rat, clairance rénale du 2-EAA plus lente chez l'Homme).

7.1.3 Effets sanitaires

7.1.3.1 Toxicité aiguë

Peu de données sur les effets de l'EGEE **chez l'Homme** sont disponibles. Elles proviennent principalement de cas d'empoisonnements accidentels lors d'expositions professionnelles ou volontaires lors de conduite suicidaire. Les principaux effets observés sont des effets sur le développement, sur les testicules et des altérations hématologiques (légère anémie, granulocytopenie minime). Suite à une exposition aiguë, d'autres effets réversibles peuvent être observés tels que acidose métabolique, insuffisance rénale et des effets délétères sur le système nerveux central (vertiges, pertes de connaissance) et le foie. Chez l'homme, aucune irritation ou sensibilisation de la peau n'a été rapportée malgré de fortes expositions à l'EGEE [INRS, 1999].

Chez les animaux, l'EGEE et ses métabolites présentent une faible toxicité aiguë quelle que soit la voie d'exposition. Pour de nombreuses espèces (rat, souris, cobaye, lapin), les DL_{50} par voie orale sont comprises entre 1,4 et 5,5 g.kg pc^{-1} . Pour la voie cutanée, la DL_{50} est de 3,3 à 3,9 g.kg pc^{-1} chez le lapin. Par inhalation, la CL_{50} est de 5,5 à 7,4 g.m⁻³ chez le rat et la souris. Les effets observés sont une dépression du système nerveux central, une réduction des fonctions respiratoires et des lésions pulmonaires (œdèmes), gastro-intestinales (hémorragies) et rénales [ECETOC, 2005].

7.1.3.2 Toxicité chronique

Les études disponibles en exposition subaiguë et subchronique, par ingestion, inhalation ou contact cutané, ont montré principalement des effets sur les organes reproducteurs mâles et des effets hématologiques (anémie, leucopénie).

L'EGEE n'est pas irritant cutané mais peut causer une irritation oculaire et nasale lors d'une exposition subchronique par inhalation (92 mg.m⁻³) chez le rat et le lapin [Environnement Canada, 2003].

7.1.3.3 Cancérogénicité et génotoxicité

Par voie orale, l'EGEE n'induit pas d'effet cancérogène chez les rongeurs à des doses allant de 0,5 à 2 g.kg⁻¹.j⁻¹ [INSERM 1999].

L'EGEE présente des résultats négatifs dans les tests de mutagénèse *in vitro* sur bactéries (test d'Ames) ou cellules de mammifères en culture (cellules de lymphomes de souris, cellules CHO de hamster chinois) [ECETOC, 2005 ; INSERM, 1999].

Quelques tests *in vitro* ont mis en évidence une activité clastogène à des doses élevées (> 9,5 µg.ml⁻¹) : augmentation du taux d'aberrations chromosomiques (positif sur cellules CHO de hamster chinois sans activation métabolique mais négatif sur lymphocytes humains et négatif sur cellules V79 de hamster syrien), échanges de chromatides sœurs (positif sur cellules CHO de hamster chinois et lymphocytes humains), effets d'aneuploïdie (faiblement positif sur cellules V79) et un test du micronoyau faiblement positif sur cellules V79. Cependant, dans la plupart des cas, la réponse est éliminée après activation métabolique [ECETOC, 2005 ; INSERM, 1999].

Les tests *in vivo* réalisés (aberrations chromosomiques et micronoyau dans la moelle osseuse de souris, létalité récessive liée au sexe chez la drosophile) sont restés négatifs [ECETOC, 2005].

7.1.3.4 Effets reprotoxiques

7.1.3.4.1 *Effets sur la reproduction*

- Chez l'homme

Par voie orale, aucune donnée concernant les effets sur la fertilité chez l'homme n'est disponible. Par inhalation, deux études sont publiées. Les principaux effets sur la fertilité observés chez des populations professionnelles exposées à l'EGEE sont une toxicité testiculaire : diminution du volume du liquide séminal et de la concentration en spermatozoïdes, augmentation du pH du liquide séminal, augmentation des oligospermies et des spermatozoïdes anormaux. Ratcliffe *et al.* (1989) ont mis en évidence une diminution significative de la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat des travailleurs exposés à une dose de 17,67 mg.m⁻³ (4,8 ppm). Welch *et al.* (1988) ont observé une diminution du nombre de spermatozoïdes par éjaculat et du volume du liquide séminal pour une concentration d'exposition de 9,9 mg.m⁻³ (2,6 ppm). Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution car les travailleurs ont été exposés à d'autres substances pouvant induire des effets reprotoxiques. Ainsi, aucun NOAEL, ni LOAEL n'ont pu être mis en évidence à partir de ces deux études.

Veulemans *et al.* (1993) ont réalisé une étude cas témoins chez des patients d'une clinique spécialisée dans les troubles de la reproduction (1 019 cas subfertiles/non fertiles vs 475 témoins). L'exposition possible aux éthers de glycol a été évaluée par la présence du métabolite de l'EGEE/A, le 2-EAA, dans les urines à des concentrations de 1,3 à 71,0 mg.mL⁻¹ chez 36 cas et 6 témoins (OR = 3,11, p = 0,004) [Veulemans *et al.*, 1993]. Une forte association entre la présence d'2-EAA dans les urines et l'altération de la fertilité a été établie. Aucune corrélation significative n'a été observée entre la concentration urinaire en 2-EAA et la qualité du sperme, ce qui pourrait s'expliquer par le temps de latence entre l'exposition et les effets observés.

Aucun effet sur la fertilité féminine n'a été observé.

- Chez l'animal

Les effets sur la reproduction de l'EGEE ont été décrits chez le rat ou la souris exposés par voie orale ou par inhalation. Une diminution de la fertilité a été observée chez les rongeurs.

Chez les femelles, très peu d'études ont été réalisées. Elles ont montré des effets sur le cycle œstral et une atrophie de l'utérus suite à une exposition par voie orale [NTP, 1993].

Des effets sur les organes reproducteurs mâles ont été mis en évidence tels qu'une diminution du poids des testicules et de l'épididyme, une dégénérescence des tubes séminifères, une diminution du taux de spermatozoïdes allant jusqu'à une azoospermie, une diminution de la motilité des spermatozoïdes et une augmentation des spermatozoïdes anormaux. En effet, l'EGEE induit une atrophie testiculaire avec une atteinte préférentielle des spermatocytes pachytènes conduisant, à terme, à une altération de la qualité du sperme et à une diminution de la fertilité chez le mâle.

La littérature ne rapporte pas d'élément sur la réversibilité des effets testiculaires induits par l'EGEE. Cependant, l'EGME (éthylène glycol méthyl éther) entraîne les mêmes effets sur les organes reproducteurs mâles et selon le même mécanisme d'action que l'EGEE (7.1.4). Les effets testiculaires induits par l'EGME sont réversibles au bout de 8 semaines après l'arrêt de l'exposition dans le cas d'atteintes des spermatocytes leptotènes et zygotènes et des spermatides jeunes à noyaux ronds [Foster *et al.*, 1983, INSERM 1999]. Cependant, à des niveaux d'exposition plus élevés (spermatogonies et spermatides à noyaux allongées, plus vieilles, touchées), la réversibilité des lésions est compromise en raison d'une perte du pool de cellules souches [INSERM, 1999]. Cependant, une analogie entre l'EGEE et l'EGME ne peut pas être envisagée car le seuil de toxicité testiculaire de l'EGEE est supérieur à celui de l'EGME (5 fois supérieur chez le rat) [INSERM, 1999].

Une revue récente de la littérature a permis d'identifier plusieurs études de reprotoxicité par voie orale. En revanche, seule une étude par inhalation a été trouvée, Barbee *et al.*, 1984 dans laquelle dix lapins New Zealand White et 15 rats Sprague-Dawley CD par sexe et par groupe de dose ont été exposés par inhalation 6h par jour et 5 jours par semaine, pendant 13 semaines, à 0, 92,5, 380 et 1480 mg.m⁻³ d'EGEE sous forme de vapeurs. Le lapin est l'espèce la plus sensible, pour laquelle une diminution significative du poids corporel chez les 2 sexes a été mise en évidence à 92,5 et 1480 mg.m⁻³ (pas à 380 mg.m⁻³). A 1480 mg.m⁻³, une diminution significative du poids des testicules et de l'épididyme a été mise en évidence (augmentation également observée aux 2 plus faibles doses mais non significative), ainsi qu'une dégénérescence focalisée de l'épithélium des tubes séminifères (3 lapins/10) sans altération de la spermatogenèse après observation de changements histologiques. A 1480 mg.m⁻³, une anémie périphérique sans altération centrale (absence d'atteinte de l'érythropoïèse) a été observée. Chez le rat, les effets observés sont non significatifs à toutes les concentrations d'exposition. Les auteurs proposent chez le lapin un NOAEL de 380 mg.m⁻³ et de 1480 mg.m⁻³ chez le rat.

7.1.3.4.2 Effets sur le développement

- Chez l'homme

Aucune donnée humaine sur les effets sur le développement de l'EGEE n'est disponible quelle que soit la voie d'exposition. Cependant, plusieurs études épidémiologiques sur des populations professionnelles décrivent des malformations suite à une exposition aux éthers de glycol lors de la grossesse, telles que des fentes palatines et oro-faciales et des anomalies du tube neural, [Cordier *et al.*, 1997 et 2001 ; Lorente *et al.*, 2000 ; Chevrier *et al.*, 2006] ou des avortements spontanés [Swan *et al.*, 1995 ; Schenker *et al.*, 1995 ; Huel *et al.*, 1990, Pastides *et al.*, 1988 ; Correa *et al.*, 1996].

- Chez l'animal

Les effets sur le développement ont été décrits pour toutes les voies d'exposition (peu de données pour les voies cutanée et orale). Divers effets toxiques ont été mis en évidence chez les rongeurs tels qu'une diminution du taux d'implantation, une augmentation de la résorption foetale et de la mortalité des embryons, une diminution du poids du foetus et du nombre de foetus vivants par portée et une augmentation de l'incidence des malformations des viscères et du squelette. Pour la voie inhalée, des modifications du comportement et une augmentation des concentrations de certains neurotransmetteurs (acétylcholine, dopamine, sérotonine, nor-épinéphrine) dans le cerveau ont été aussi observées chez les rats nouveau-nés.

A partir de la revue de la littérature, deux études chez l'animal ont été retenues pour la voie inhalée.

Une première étude a été effectuée chez des lapines New Zealand White et des rates Wistar. Les lapines ont été exposées du 1^{er} au 18^{ème} jour de gestation à 590 et 2 277 mg.m⁻³ (160 et 617 ppm) [Andrew et Hardin, 1984]. Les rates ont été exposées avant l'accouplement pendant 3 semaines à des doses de 585 et 2173 mg.m⁻³ (150 et 649 ppm) puis après l'accouplement du 1^{er} ou 19^{ème} jour de gestation à 754 et 2830 mg.m⁻³ (202 et 767 ppm). Chez les rates, un retard de croissance intra-utérine et une augmentation des anomalies squelettiques ont été mis en évidence à 754 mg.m⁻³. A 2830 mg.m⁻³, une forte mortalité embryonnaire a été observée en présence d'une toxicité maternelle (diminution du gain de poids). Aucun LOAEL, ni NOAEL n'a pu être déterminé car les rates sont exposées deux fois (avant et après l'accouplement) à des concentrations différentes. Chez les lapines, une augmentation du nombre de résorptions par portée et de l'incidence de malformations ont été mises en évidence à toutes les doses en présence d'une toxicité maternelle (diminution de la prise de nourriture et du gain de poids, augmentation du poids du foie et des reins, modifications histopathologiques au niveau des ovaires et de l'utérus). Ainsi, en tenant compte de tous ces effets, un LOAEL de 590 mg.m⁻³ peut être proposé. Aucun NOAEL n'a été identifié.

Dans la deuxième étude, 24 lapines Dutch et 24 rates Alpk/AP par groupe de dose ont été exposées par inhalation, 6h par jour, du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation pour les rates et au 19^{ème} jour pour les lapines, à 0, 36,8, 184 et 920 mg.m⁻³ (rates) et 0, 36,8, 184 et 646 mg.m⁻³ (lapines) de vapeurs d'EGEE [Doe, 1984]. Les résultats ont montré une toxicité maternelle chez les rates à 920 mg.m⁻³ (diminution de l'hémoglobine, de l'hématocrite et du volume de globules rouges). Une augmentation significative des pertes préimplantatoires et une diminution significative du nombre de foetus en vie dans les portées ont été observées à 36,8 et 184 mg.m⁻³ (non significatif 920 mg.m⁻³). Une augmentation significative du taux de morts intra-utérines tardives a été mise en évidence à 920 mg.m⁻³. Des effets foetotoxiques ont été observés à 920 mg.m⁻³ tels que des retards de croissance foetale, une diminution significative du poids foetal moyen (lié au retard de croissance), une réduction de l'ossification et une augmentation significative des anomalies mineures externes, viscérales et du squelette. Un LOAEL de 36,8 mg.m⁻³ peut être proposé pour l'augmentation des pertes préimplantatoires et la diminution du nombre de foetus par portée (significatif pour toutes les doses sauf la plus forte). Chez le lapin, des anomalies cardiovasculaires (non significatif), de la paroi abdominale (non significatif), des anomalies

squelettiques mineures, des côtes rudimentaires surnuméraires sont observés chez la progéniture à 646 mg.m⁻³ (absence de toxicité maternelle). Le NOAEL dans cette étude est de 184 mg.m⁻³.

7.1.4 Mécanisme d'action

Les études mécanistiques chez l'homme indiquent que la toxicité sur la fertilité (toxicité testiculaire) est due à l'acide 2-éthoxyacétique (2-EAA), principal métabolite de l'EGEE. Chez l'animal, les mécanismes d'action ne sont pas bien connus. Cependant, les effets testiculaires seraient induits par un blocage de la spermatogénèse à un stade précoce (spermatocytes I). Les études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que la toxicité de l'EGEE est due à ses métabolites dont le principal est l'2-EAA. Il affecte les cellules cibles en agissant comme un inhibiteur compétitif des acides tricarboxyliques du cycle de Krebs et en interférant avec la biodisponibilité des petites unités carbonées nécessaires à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

7.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

La population générale étant exposée principalement par inhalation et absorption cutanée, le GT a décidé de construire des VTR pour la voie inhalée.

7.2.1 VTR existantes pour les effets reprotoxiques

L'US-EPA et l'OEHHA ont proposé une VTR chronique pour la voie inhalée basée sur des effets reprotoxiques et hématologiques induits par l'EGEE (Tableau 1). Aucune VTR pour les autres effets n'a été proposée.

Tableau 1 : Valeurs toxicologiques de référence disponibles

| Organisme (année) | Voie d'exposition | VTR | Effet critique | Espèces | Dose critique | UF | Etude clé |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|--|-----------------|--|--|---|
| US EPA/IRIS (1991) | Inhalation | RfC = 0,2 mg.m ⁻³ | Reproduction (diminution du poids des testicules, dégénérescence des tubes séminifères) Effet hématologique (diminution de l'hémoglobine) | Lapins | NOAEL = 380 mg.m ⁻³ (103 ppm) NOAEL _{ADJ} = 68 mg.m ⁻³ | 300 UF _A = 10 UF _H = 3 UF _S = 10 | Barbee <i>et al.</i> , 1984 |
| OEHHA (2005) | Inhalation | REL = 0,07 mg.m ⁻³ | Reproduction (diminution du poids des testicules, dégénérescence des tubes séminifères) Effet hématologique (diminution de l'hémoglobine) | Lapins | NOAEL = 380 mg.m ⁻³ (103 ppm) NOAEL _{ADJ} = 68 mg.m ⁻³ | 1000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _S = 10 | Barbee <i>et al.</i> , 1984 |
| OEHHA (2008) | Aiguë (t = 6h) Inhalation | REL = 0,37 mg.m ⁻³ | Développement (défauts du squelette dont retard d'ossification des vertèbres cervicales et des sternèbres et côtes surnuméraires) | Rates gestantes | LOAEL = 185 mg.m ⁻³ (50 ppm) NOAEL = 37 mg.m ⁻³ (10 ppm) | 100 UF _A = 10 UF _H = 3 | Tinston <i>et al.</i> , 1983 Doe, 1984 |

7.2.2 VTR pour les effets sur la fertilité

7.2.2.1 Choix de l'effet critique

Les différentes études analysées montrent que l'EGEE est capable d'induire des effets sur la fertilité, et plus particulièrement sur la fertilité masculine. Ces effets ont été observés chez l'animal mais également bien identifiés et décrits chez l'homme avec une diminution du poids des testicules et de l'épididyme, une dégénérescence des tubes séminifères, une diminution du taux de spermatozoïdes et de leur motilité, une augmentation des spermatozoïdes anormaux et une azoospermie.

Aucun effet sur la fertilité féminine n'a été mis en évidence.

Le GT VTR retient donc les effets sur les organes reproducteurs mâles et plus particulièrement la diminution du poids des testicules et de l'épididyme qui sont les effets observés dans la seule étude permettant de construire une VTR par inhalation.

7.2.2.2 Choix de l'étude

L'étude de Barbee *et al.* (1984) est l'unique publication disponible qui décrit les effets sur les gonades masculines après une exposition par inhalation (Annexe 5) et a mis en évidence des effets sur les testicules, organes connus comme l'un des organes cible de l'EGEE chez l'homme. Cette étude présente des données de qualité acceptable (Klimisch 2e). Dans ces conditions, **l'étude de Barbee *et al.* est retenue comme étude clé pour construire une VTR par inhalation pour les effets sur la fertilité.**

On notera cependant que cette étude n'a pas été conçue préalablement pour étudier spécifiquement la reprotoxicité de l'EGEE. Ainsi, les données relatives aux tests de reprotoxicité (fertilité, gestation, portées et lactation) sont insuffisantes dans cette étude.

7.2.2.3 Choix de la dose critique

L'étude de Barbee *et al.* a été effectuée sur des lapins New Zealand White et des rats Sprague-Dawley CD. Les effets sur la fertilité n'ont été observés que chez le lapin. Une diminution significative du poids des testicules et de l'épididyme ($p < 0,01$) a été observée à la plus forte dose de 1480 mg.m^{-3} en l'absence de toxicité maternelle. Les auteurs proposent un NOAEL de 380 mg.m^{-3} et un LOAEL de 1480 mg.m^{-3} pour cet effet. Les conditions d'expérimentation ne permettent pas d'établir une relation dose-réponse pour la diminution du poids des testicules et de l'épididyme (Tableau 2). Toutefois, l'effet critique choisi est plus significatif à la plus forte dose ($p < 0,01$).

Tableau 2 : Relation dose-réponse pour la diminution du poids testiculaire et de l'épididyme chez le lapin [Barbee *et al.*, 1984]

| Exposition (mg.m^{-3}) | 0 | 92,5 | 380 | 1480 |
|-----------------------------------|------|------|------|-------|
| Nombre d'animaux examinés | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Poids des testicules (g) | 8,19 | 8,73 | 8,73 | 6,36* |
| Déviati on standard | 0,82 | 1,19 | 0,69 | 0,99 |

* significatif à 1480 mg.m^{-3} , $p < 0,01$

Un premier calcul de benchmark dose (BMD) avait été effectué (les résultats de l'ensemble de la démarche sont détaillés dans le « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques », annexe 3) en 2007 mais compte tenu du fait qu'une seule dose était

statistiquement significative de la réponse à dose nulle (4 doses testées dont la dose nulle), il paraît peu judicieux de calculer une BMD.

Le NOAEL chez le lapin de 380 mg/m³ issu de cette étude a donc été proposé comme dose critique.

7.2.2.4 Facteur d'ajustement

- Ajustement temporel

Dans l'étude de Barbee *et al.*, les animaux ont inhalé de l'EGEE 6h par jour et 5 jours par semaine pendant 13 semaines. Par précaution, un ajustement au temps a été fait pour extrapoler le NOAEL pour une exposition continue. Ainsi, un NOAEL_{ADJ} a été calculé de la manière suivante :

$$\text{NOAEL}_{\text{ADJ}} = \text{NOAEL} \times 6\text{h}/24\text{h} \times 5\text{j}/7\text{j} = 68 \text{ mg.m}^{-3}$$

- Ajustement allométrique

L'objectif est de réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce afin de déterminer une concentration équivalente humaine (CEH). D'après l'US EPA [US EPA, 1994], pour un gaz entraînant un effet extra-respiratoire, tel que l'EGEE, la formule de calcul est la suivante :

$$\text{Dose}_{\text{CEH}} = \text{Dose} \times \lambda_{\text{A}} / \lambda_{\text{H}}$$

où λ_{A} représente le coefficient de transfert du gaz entre air et sang chez l'animal et λ_{H} , le coefficient de transfert du gaz entre air et sang chez l'homme.

En l'absence de données relatives à ces coefficients, l'US EPA préconise de considérer le rapport $\lambda_{\text{A}} / \lambda_{\text{H}}$ égal à 1, ce qui est le cas de l'EGEE.

$$\text{NOAEL}_{\text{CEH}} = \text{NOAEL}_{\text{ADJ}} \times 1 = 68 \text{ mg.m}^{-3}$$

7.2.2.5 Choix des facteurs d'incertitude

UF_A (variabilité inter-espèces) : chez l'homme, le métabolite de l'EGEE, le 2-EAA, responsable des effets toxiques, serait plus longtemps en contact avec le fœtus que chez l'animal (temps de demi-vie > 40h chez l'homme, 7h chez le rat). Un facteur 10 a été retenu.

UF_H (variabilité intra-espèce) : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études effectuées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité au sein de l'espèce humaine.

- UF_S (transposition d'une exposition subchronique à chronique) : les préconisations de l'Afsset sont un facteur de 1, 3 ou 10 en fonction des cas. Dans l'étude clé sélectionnée (Barbee *et al.*, 1984), les animaux ont été exposés 13 semaines ce qui correspond à une exposition subchronique. Cependant, pour étudier la fertilité chez le rat, une exposition pendant 13 semaines est suffisante pour couvrir tous les stades de maturation des spermatozoïdes chez le rat. On pourrait considérer que cette étude est équivalente à une étude chronique pour ce type d'effets. Les experts ont cependant souligné l'absence d'information sur le caractère réversible de cet effet que ce soit dans cette étude ou dans la littérature. Un facteur d'incertitude de 10 a ainsi été ajouté pour en tenir compte et pour permettre à la VTR de s'appliquer pour des expositions chroniques.
- UF_D : insuffisance de données : non applicable, les données étant jugées suffisantes.

7.2.2.6 Synthèse

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|---|--|--|-------------------------------------|
| Diminution du poids des testicules et de l'épididyme | NOAEL = 380 mg.m ⁻³ LOAEL = 1480 mg.m ⁻³ | 1000 | VTR = 0,07 mg.m⁻³ |
| Etude de toxicité subchronique par inhalation chez des lapins mâles New Zealand White | Pas de construction de BMDL | UF _A 10 UF _H 10 UF _S 10 | |
| Barbee <i>et al.</i> , 1984 | Ajustement temporel NOAEL_{ADJ} = 68 mg.m⁻³ | | |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_S : transposition d'une exposition subchronique à chronique

* Coefficients allométriques : NEANT. Facteur de conversion temporelle : par précaution et en l'absence de lignes directrices précises sur ce thème, le NOAEL de 380 mg.m⁻³ a été transformé pour tenir compte d'une exposition continue (24 heures sur 24), selon la loi de Haber, car les lapins n'étaient exposés que 6 heures sur 24 et 5 jours sur 7.

7.2.3 VTR pour les effets sur le développement

7.2.3.1 Choix de l'effet critique

Les différentes études montrent que l'EGEE est capable d'induire des effets sur le développement lors d'exposition *in utero* tels qu'une augmentation des pertes préimplantatoires, des résorptions fœtales et de la mortalité des embryons, une diminution du poids du fœtus et du nombre de fœtus vivants par portée et une augmentation de l'incidence des malformations des viscères et du squelette. L'augmentation de l'incidence des malformations squelettiques est observée aux doses les plus faibles. Ces effets ont été mis en évidence chez l'animal mais aucune étude montrant les effets sur le développement chez l'homme n'est disponible.

Le GT VTR retient l'augmentation de l'incidence des malformations squelettiques comme effet critique.

7.2.3.2 Choix de l'étude

Deux études décrites précédemment sont disponibles : Doe, 1984 ; Andrew et Hardin, 1984.

Dans leur étude, **Andrew et Hardin (1984)** n'ont pas établi de NOAEL et de LOAEL car les rats ont été exposés deux fois, avant et après l'accouplement à des concentrations différentes. En revanche, cette étude a permis d'identifier un LOAEL chez le lapin de 590 mg.m⁻³ pour des effets reprotoxiques observés en présence d'une toxicité maternelle. Cette étude n'est donc pas retenue pour la construction de la VTR.

Dans son étude, **Doe (1984)** s'est intéressé aux effets sur le développement chez le lapin et le rat (Annexe 6). Cette étude a été classée 2e selon la classification de Klimisch correspondant à une étude bien documentée et en accord avec les principes scientifiques acceptable pour l'évaluation. Toutefois, son utilisation de cette étude pour construire une VTR présente des limites. En effet, les données de cette étude sont jugées insuffisantes dans ce contexte. L'auteur ne précise pas les tests statistiques utilisés. Le nombre de femelles gestantes (rats ou lapins) inclus dans les analyses n'est pas justifié. Ainsi, pour la dose de 184 mg.m⁻³, le nombre de lapines gestantes est beaucoup plus faible (16/24) que celui des autres doses (21/24 chez les témoins et à 36,8 mg.m⁻³, 22/24 à 646 mg.m⁻³) et aucune explication n'est donnée pour expliquer cette différence. Enfin, la

description des malformations et des variations squelettiques chez le lapin, effet critique retenu par le GT VTR, n'est pas précisée.

De surcroît, une forte incidence de l'ensemble des variations squelettiques a été observée chez les témoins (Tableau 4).

Tableau 3 : Incidence des malformations squelettiques chez le lapin Dutch [Doe, 1984]

| Exposition (mg.m ⁻³) | 0 | 36,8 | 184 | 646 |
|--|------|------|------|-------|
| Nombre progénitures examinées | 136 | 138 | 96 | 134 |
| Malformations squelettiques (nombre animaux) | 44 | 72 | 35 | 87* |
| Malformations squelettiques (%) | 32,4 | 52,2 | 36,5 | 64,5* |
| Variations squelettiques (nombre animaux) | 70 | 84 | 62 | 106* |
| Variations squelettiques (%) | 51,5 | 60 | 64,6 | 79,1* |

* significatif $p < 0,05$

L'auteur précise qu'à 646 mg.m⁻³, les variations observées sont entièrement dues à l'augmentation de l'incidence des côtes surnuméraires. Nous avons cherché les données des témoins historiques concernant l'incidence des côtes surnuméraires chez les lapins Dutch. Ces données n'ont pas pu être obtenues auprès de l'éleveur des lapins de l'étude de Doe (Ranch rabbits) mais ont été publiées dans d'autres études (Tableau 4) : l'incidence des côtes surnuméraires chez le lapin Dutch est comprise entre 14 et 46 %.

Tableau 4 : Données historiques des côtes surnuméraires chez les lapins Dutch [Chernoff et Rogers, 2004 ; Gibson *et al.*, 1966]

| Etude | Nombre de fœtus | Incidence des côtes surnuméraires |
|-----------------------------|-----------------|---|
| Gibson <i>et al.</i> , 1966 | 249 | 36,9% Droit : 6,8% Gauche : 7,2% 2 côtés : 22,9% |
| Hatman, 1974 | 60 | 46 % (côtes lombaires) |
| Hartman, 1974 | 250 | 14 % (côtes lombaires) |
| Hartman, 1974 | 1700 | 28 % (côtes lombaires) |

L'ensemble des insuffisances mises en évidence par le GT sur les données concernant les effets de l'EGEE sur le développement a conduit le groupe de travail à ne pas proposer de VTR pour les effets sur le développement induits par l'EGEE à partir des études disponibles.

7.3 Conclusion

L'EGEE est un éther de glycol qui entraîne chez l'animal comme chez l'homme :

- des effets sur les organes reproducteurs mâles
- des malformations squelettiques.

- **VTR fertilité**

Le GT VTR propose la construction d'une VTR par inhalation spécifique aux effets sur la fertilité applicable pour une exposition chronique. Par manque de données chez la femme, cette VTR s'applique par défaut aux deux sexes.

-- Ether éthylique de l'éthylène glycol CAS 110-80-5 --

| Effet critique | Dose critique* | UF | VTR |
|--|---|---|-------------------------------------|
| Diminution du poids des testicules et de l'épididyme Etude de toxicité subchronique par inhalation chez des lapins mâles New Zealand White Barbee <i>et al.</i> , 1984 | NOAEL = 380 mg.m ⁻³ LOAEL = 1480 mg.m ⁻³ Pas de construction de BMDL <u>Ajustement temporel</u> NOAEL_{ADJ} = 68 mg.m⁻³ | 1000 UF _A 10 UF _H 10 UF _S 10 | VTR = 0,07 mg.m⁻³ |

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_S : transposition d'une exposition subchronique à chronique

Malgré la qualité acceptable de l'étude (Klimisch 2e) et la pertinence de l'effet critique retenu, un niveau de confiance faible est attribué à cette VTR du fait de l'absence de relation dose-réponse pour l'effet critique retenu dans l'étude de Barbee *et al.* et du peu d'études par inhalation disponibles dans la littérature.

- **VTR développement**

Des effets sur le développement ont été mis en évidence chez l'animal. Cependant, en l'absence de données de qualité suffisante, le groupe de travail n'a pas pu construire de VTR pour les effets sur le développement induits par l'EGEE.

7.4 Récapitulatif des VTR

Tableau 5 : Récapitulatif des VTR existantes et des VTR construites par l'Afsset

| Organisme (année) | Durée /voie exposition | VTR | Effet critique | Espèces | Dose critique | UF | Etude clé |
|--------------------|---------------------------|--------------------------------|--|-----------------|--|--|---|
| US EPA/IRIS (1991) | Inhalation | RfC = $0,2 \text{ mg.m}^{-3}$ | Reproduction (diminution du poids des testicules, dégénérescence des tubes séminifères) Effet hématologique (diminution de l'hémoglobine) | Lapins | NOAEL = 380 mg.m^{-3} (103 ppm) NOAEL _{ADJ} = 68 mg.m^{-3} | 300 UF _A = 10 UF _H = 3 UF _S = 10 | Barbee <i>et al.</i> , 1984 |
| OEHHA 2005 | Chronique Inhalation | REL = $0,07 \text{ mg.m}^{-3}$ | Reproduction (diminution du poids des testicules, dégénérescence des tubes séminifères) Effet hématologique (diminution de l'hémoglobine) | Lapins | NOAEL = 380 mg.m^{-3} (103 ppm) NOAEL _{ADJ} = 68 mg.m^{-3} | 1000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _S = 10 | Barbee <i>et al.</i> , 1984 |
| Afsset 2009 | Chronique Inhalation | VTR = $0,07 \text{ mg.m}^{-3}$ | Reproduction : diminution du poids relatif des testicules et de l'épididyme | Lapins | NOAEL = 380 mg.m^{-3} NOAEL _{ADJ} = 68 mg.m^{-3} | 1000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _S = 10 | Barbee <i>et al.</i> , 1984 |
| OEHHA 2008 | Aiguë (t = 6h) Inhalation | REL = $0,37 \text{ mg.m}^{-3}$ | Développement (défauts du squelette dont retard d'ossification des vertèbres cervicales et des sternèbres et côtes surnuméraires) | Rates enceintes | LOAEL = 185 mg.m^{-3} (50 ppm) NOAEL = 37 mg.m^{-3} (10 ppm) | 100 UF _A = 10 UF _H = 3 | Tinston <i>et al.</i> , 1983 Doe, 1984 |
| Afsset 2009 | Aiguë Inhalation | Pas de construction de VTR | Développement | - | - | - | Doe, 1984 |

7.5 Bibliographie

Fin de la revue bibliographique : Avril 2009

- Afsset (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). (2008) Les éthers de glycol, Synthèse des connaissances sur les expositions de la population générale et professionnelle en France. Septembre 2008. 133 pages.
- Andrew F.D. et Hardin B.D. (1984) Developmental effects after inhalation exposure of gravid rabbits and rats to ethylene glycol monoethyl ether. *Environmental Health Perspectives*, 57, 13-23.
- Barbee S.J., Terrill J.B., DeSousa D.J. et Conaway C.C. (1984) Subchronic inhalation toxicology of ethylene glycol monoethyl ether in the rat and the rabbit. *Environmental Health Perspectives*, 57, 157-163.
- Chernoff N. et Rogers J.M. (2004) Supernumerary ribs in developmental toxicity bioassays and in human populations: incidence and biological significance. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 7:437–449, 2004
- Chevrier C, Dananché B, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Cordier S. (2006) Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occupational and Environmental Medicine* 2006 Sep;63(9):617-23. Epub 2006 Apr 27.
- Cordier S, Bergeret A, Goujard J, Ha MC, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HE, Knill-Jones R, Candela S, Dale I, Dananché B, de Vigan C, Fevotte J, Kiel G, Mandereau L. (1997) Congenital malformation and maternal occupational exposure to glycol ethers. *Occupational Exposure and Congenital Malformations Working Group. Epidemiology*. 1997 Jul;8(4):355-63
- Cordier S, Szabova E, Fevotte J, Bergeret A, Plackova S, Mandereau L. (2001) Congenital malformations and maternal exposure to glycol ethers in the Slovak Republic. *Epidemiology*. 2001 Sep;12(5):592-3.
- Correa A, Gray RH, Cohen R, Rothman N, Shah F, Seacat H, Corn M. (1996) Ethylene glycol ethers and risks of spontaneous abortion and subfertility. *American journal of epidemiology*. 1996 Apr 1;143(7):707-17
- Doe J.E. (1984) Ethylene glycol monoethyl ether and ethylene glycol monoethyl ether acetate teratology studies. *Environmental Health Perspectives*, 57, 33-41.
- ECETOC (2005) The toxicology of glycol ethers and its relevance to man. Technical report n°64. Février 2005. Brussels. 502 pages.
- Environnement Canada (2003) Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation, 2-éthoxyéthanol. Août 2002.
- Foster P.M., Creasy D.M., Foster J.R., Thomas L.V., Cook M.W. et Gangolli S.D. (1983) Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*. 1983 Jul;69(3):385-99
- Huel G, Mergler D, Bowler R. (1990) Evidence for adverse reproductive outcomes among women microelectronic assembly workers. *British Journal of Industrial Medicine*. 1990 Jun;47(6):400-4.

- Gibson J.P., Staples R.E. et Newberne J.W. (1966) Use of the rabbit in teratogenicity studies. *Toxicology and applied pharmacology*, 9, 398-408
- INRS (1999) 2-éthoxyéthanol. Fiche toxicologique n°58
- INRS (2006) 2-éthoxyéthanol (EGEE), Fiche Demeter - N°DEM 010
- INSERM (1999) Expertise collective Ethers de glycol, quels risques pour la santé ? 348 pages
- INSERM (2006) Expertise collective Ethers de glycol, nouvelles données toxicologiques. 147 pages.
- Lorente C, Cordier S, Bergeret A, De Walle HE, Goujard J, Aymé S, Knill-Jones R, Calzolari E, Bianchi F. (2000) Maternal occupational risk factors for oral clefts. *Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. Scandinavian journal of work, environment & health*. 2000 Apr;26(2):137-45.
- NTP (1993) NTP technical report on toxicity studies of ethylene glycol ethers 2-methoxyethanol, 2-ethoxyethanol, 2-butoxyethanol (CAS Nos. 109-86-4, 110-80-5, 111-76-2) administered in drinking water to F344/N rats and B6C3F1 mice. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program.
- OEHHA (2008) Chronic toxicity summary. Ethylene glycol monoethyl ether. Appendix D.3 Chronic RELs and toxicity summaries using the previous version of the Hot Spots Risk Assessment guidelines (OEHHA 1999). P240-247 <http://www.oehha.org/air/allrels.html>
- OEHHA (2008) Acute toxicity summary. glycol monoethyl ether. Appendix D.2 Acute RELs and toxicity summaries using the previous version of the Hot Spots Risk Assessment guidelines (OEHHA 1999). Jun 2008. p96-101 <http://www.oehha.org/air/allrels.html>
- Pastides H, Calabrese EJ, Hosmer DW Jr, Harris DR Jr. (1988) Spontaneous abortion and general illness symptoms among semiconductor manufacturers. *Journal of Occupational Medicine*. 1988 Jul;30(7):543-51.
- Ratcliffe J.M., Schrader S.M., Clapp D.E., Halperin W.E., Turner T.W. et Hornung R.W. (1989) Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *British Journal of Industrial Medicine* 1989 Jun;46(6):399-406
- Schenker MB, Gold EB, Beaumont JJ, Eskenazi B, Hammond SK, Lasley BL, McCurdy SA, Samuels SJ, Saiki CL, Swan SH. (1995) Association of spontaneous abortion and other reproductive effects with work in the semiconductor industry. *American Journal of Industrial Medicine*. 1995 Dec;28(6):639-59.
- Swan SH, Beaumont JJ, Hammond SK, VonBehren J, Green RS, Hallock MF, Woskie SR, Hines CJ, Schenker MB. (1995) Historical cohort study of spontaneous abortion among fabrication workers in the Semiconductor Health Study: agent-level analysis. *American journal of industrial medicine*. 1995 Dec;28(6):751-69.
- Veulemans H., Steeno O., Masschelein R. et Groeseneken D. (1993) Exposure to ethylene glycol ethers and spermatogenic disorders in man: a case-control study. *British Journal of Industrial Medicine* 1993;50:71-78
- US EPA (1991) IRIS (Integrated Risk Information System): 2-Ethoxyethanol (CASRN 110-80-5) <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0513.htm>

Welch L.S, Schrader S.M., Turner T.W. et Cullen M.R. (1988) Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters; II. Male reproduction. American Journal of Industrial Medicine. 1988; 14(5):509-26

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA JEUNESSE ET
DES SPORTS

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DU
DÉVELOPPEMENT ET DE L'AMÉNAGEMENT
DURABLES

Direction générale de la santé

Direction de la prévention des pollutions et des
risques

COURRIER REÇU LE

30 JUIL. 2007

2672

Paris le

25 JUIL. 2007

Le Directeur général de la santé

Le Directeur de la prévention des pollutions
et des risques

à

Madame la Directrice générale de l'Agence
Française de Sécurité Sanitaire de
l'Environnement et du Travail
253 Avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort

GL ←

Objet : Valeurs toxicologiques de référence

Copie : DGT

Par courrier en date du 16 avril 2007, vous nous avez proposé une méthode de construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances toxiques pour la reproduction et le développement et vous nous avez transmis un rapport intitulé « Identification d'une liste de substances toxiques pour la reproduction et le développement et proposition d'une méthode de hiérarchisation pour l'analyse des valeurs toxicologiques de référence ».

Suite à la réunion du 15 juin 2007 entre nos services, nous souhaitons vous confirmer les orientations suivantes.

Il nous paraît en premier lieu pertinent que votre agence poursuive ses travaux méthodologiques. Il nous semble notamment important que l'agence puisse diffuser et valoriser le rapport intitulé « Document de référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques ». A ces fins, nous vous encourageons à assurer, ou faire assurer, la traduction en anglais de ce document pour un meilleur partage des méthodologies scientifiques au niveau européen et une visibilité accrue de l'agence sur la scène européenne et internationale. Par ailleurs, nous souhaitons que l'agence poursuive ses travaux méthodologiques sur les VTR pour les substances cancérigènes et puisse élargir le champ de la méthode de construction élaborée pour les VTR fondées sur des effets reprotoxiques aux effets à seuil.

En ce qui concerne les substances pour lesquelles des VTR nationales devraient être construites, en premier lieu, et pour l'année 2007, nous vous invitons à faire valider par le comité d'experts spécialisés concerné les VTR utilisées lors de la phase pilote de l'élaboration de la méthodologie : toluène, ether éthylique de l'éthylène glycol, linuron, benzyl butyl phtalate, nonylphénol et di-n-

butyl-phtalate. Ainsi, ces six VTR pourront être utilisées en France dans les évaluations des risques sanitaires.

De manière plus globale, nous souhaitons définir à l'avenir un programme national restreint et prioritaire de VTR à élaborer. Ce programme de travail pourra être arrêté sur la base de la liste établie par votre agence ainsi qu'en fonction des priorités de gestion, notamment signalées par nos services déconcentrés en charge de l'instruction des dossiers d'évaluations des risques sanitaires. De plus, il nous semble intéressant de mener les travaux d'élaboration de VTR en synergie avec les autres travaux menés par l'agence sur les substances chimiques. Aussi, nous serions intéressés par la transmission de la liste totale des substances concernées par vos travaux relatifs aux CMR, VLEP, valeurs guides...

En fonction de ces différentes données, une liste prioritaire de substances VTR à élaborer par votre agence pour 2008 vous sera communiquée.

Par ailleurs, nous souhaiterions que votre agence puisse développer et tenir à jour une base de données des VTR nationales, issues du programme évoqué ci-dessus, ou issues de dossiers locaux, où des VTR auront été construites selon les lignes méthodologiques de votre agence et validées par vos soins.

Enfin, en réponse à votre courrier du 27 avril 2007 relatif à l'analyse de la méthode d'élaboration des VTR cancérogènes utilisée par l'INERIS, nous estimons que la construction par l'INERIS des VTR suivant les lignes méthodologiques en cours de définition au sein de votre agence peut être considérée comme phase pilote de l'élaboration de cette méthodologie nationale.

En conséquence, une fois votre méthodologie finalisée et validée, nous vous invitons à faire valider définitivement ces VTR (1,2-dichloroéthane, tétrachlorure de carbone, chloroforme et chlorure de méthylène) par le CES compétent.

Le Directeur général de la santé

LE CHEF DE SERVICE
ADJOINT DU DIRECTEUR GÉNÉRAL
DE LA SANTÉ PAR INTÉRIM

Didier HOUSSIN

Didier EYSSARTIER

**Le Directeur de la prévention des pollutions et
des risques**

Laurent MICHEL

Annexe 2 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

| | |
|--------------|--|
| IP-A | Interventions ponctuelles : autres |
| IP-AC | Interventions ponctuelles : activités de conseil |
| IP-CC | Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation |
| IP-RE | Interventions ponctuelles : rapports d'expertise |
| IP-SC | Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc. |
| LD | Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...) |
| PF | Participation financière dans le capital d'une entreprise |
| SR | Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment) |
| SR-A | Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel) |
| VB | Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme |

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU CES PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

| NOM | Prénom | Date de déclaration des intérêts |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Analyse Afsset : | <i>Rubrique de la DPI</i> | |
| | Description de l'intérêt <i>en cas de lien déclaré</i> | |

| | | |
|-------------------------|-------------------------|---|
| BADOT | Pierre-Marie | 29 novembre 2007 03 novembre 2008 16 février 2009 |
| Analyse Afsset : | Aucun lien déclaré / | |
| BEAUSOLEIL | Claire | 20 septembre 2007 04 mars 2009 Démission le 28 septembre 2009 |

| | | |
|----------------------------------|---|-------------------|
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| BELZUNCES Luc | | 19 avril 2008 |
| | VB Étude du mode d'action de l'acétamipride financée par Aventis donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (INRA) (10 % du budget du laboratoire) (2001-2003) | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| CÉZARD Christine | | 19 décembre 2006 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| DESLAURIERS Michel | | 26 juin 2007 |
| | LD Médecin du travail au sein d'EDF-GDF | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| EMPEREUR-BISSONNET Pascal | | 15 avril 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| ENRIQUEZ Brigitte | | 20 septembre 2007 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| FARDEL Olivier | | 26 juin 2007 |
| | VB Collaboration scientifique avec EDF-SEM (Service des études médicales) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Rennes I) (6 % du budget du laboratoire) (2007-2009) | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| FÉNET Hélène | | 20 septembre 2007 |
| | Aucun lien déclaré | |

| | | |
|--|--|-------------------|
| Analyse Afsset : / | | |
| FERRARI Luc | | 11 octobre 2007 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| FONTANA Luc | | 20 juin 2008 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| FOUILHÉ SAM-LAÏ Nathalie | | 20 septembre 2007 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| GOUGET Barbara | | 08 février 2008 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Démission le 1 juillet 2009 | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| GUENOT Dominique | | 20 septembre 2007 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| GUERBET Michel | | 26 juin 2007 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| HUYNH Cong Khanh | | 20 septembre 2007 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| LAFON Dominique | | 14 avril 2008 |
| LD | | |
| Médecin du travail pour Dassault Falcon Service | | |
| Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | | |
| LALÈRE Béatrice | | 26 juin 2007 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| LAUDET Annie | | 20 septembre 2007 |
| Aucun lien déclaré | | |
| Analyse Afsset : / | | |
| LEPOITTEVIN Jean-Pierre | | 26 septembre 2008 |

| | | |
|-------------------------|--|-------------------|
| | <p>IP-SC</p> <p>Financement de thèses par L'Oréal jusqu'en 2006, par le COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) jusqu'en 2007 et par Firmenich jusqu'en 2009 au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)</p> <p>Contrat en préparation avec le COLIPA au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)</p> | |
| | <p>IP-AC</p> <p>Conseil Sécurité produits chez L'Oréal donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)</p> <p>Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine</p> <p>Analyse Afsset :</p> | |
| MACHEREY | Anne-Christine | 26 juin 2007 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| MÉNÉTRIER | Florence | 22 avril 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| PFOHL-LESZKOWICZ | Annie | 12 avril 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| PICART | Daniel | 26 septembre 2007 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| ROUDOT | Alain-Claude | 26 mars 2008 |
| | <p>Lien d'intérêt : affilié au laboratoire de l'université de Brest, prestataire pour l'Afsset pour le recueil des données toxicologiques du DnBP et les nonylphénols</p> <p>Risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique. Alain-Claude ROUDOT a assisté à aucune étape des travaux d'expertise aboutissant à la création des VTR reprotoxiques du DnBP et des nonylphénols.</p> | |
| Analyse Afsset : | | |
| SECRETAN | Béatrice | 27 juin 2008 |

| | | |
|-------------------------|--|--|
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| STEENHOUT | Anne | 20 février 2008 |
| | IP-CC Évaluation de projets pour Ecetoc (2002) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB) | |
| | VB Participation à un programme de recherche « Méthodologie générale » financé par le CEFIC (European Chemical Industry Council) sur l'exposition des consommateurs, donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB) | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| TARDIF | Robert | 23 janvier 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| THYBAUD | Éric | 04 juillet 2008 25 septembre 2008 18 novembre 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU GT PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

| NOM | Prénom | Date de déclaration des intérêts |
|-------------------------|--|--|
| Analyse Afsset : | | |
| BOIZE | Magali | 17 avril 2008 17 juillet 2008 25 novembre 2008 26 février 2009 |
| | LD | |
| | Pharmacien évaluateur de risques sanitaires au sein d'EDF-SEM (Service des études médicales) | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| CHAKROUN | Radhouane | 28 mai 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| CHEVALIER | Dany | 11 avril 2008 05 novembre 2008 21 novembre 2008 29 janvier 2009 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| DOR | Frédéric | 29 mai 2008 |
| | IP-AC | |
| | Membre du Conseil scientifique d'ADP (Aéroports de Paris) depuis 2006 | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| EL GHISSASSI | Fatiha | 18 avril 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| FALCY | Michel (membre du CES « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel ») | 15 avril 2008 |

| | | |
|---|---|------------------------------------|
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| GIRAULT Sébastien | | 05 mai 2008 |
| LD | | |
| | Chef du Service de Toxicologie de Cephalon France | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| KAIRO Cécile | | 03 mai 2008 |
| LD | | |
| | Évaluateur de risques sanitaires au sein d'ICF Environnement jusqu'en 2004 | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| LA ROCCA Bénédicte | | 14 avril 2008 |
| LD | | |
| | Ingénieur toxicologue à l'INERIS | |
| Analyse Afsset : | Appartenance au laboratoire ayant réalisé l'expertise sur la VTR reprotoxique de l'EGEE | |
| | Risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique. Bénédicte LA ROCCA a assisté à aucune étape des travaux d'expertise aboutissant à la création des VTR reprotoxiques de l'EGEE. | |
| LAFON Dominique (membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques ») | | 14 avril 2008 |
| LD | | |
| | Médecin du travail pour Dassault Falcon Service | |
| Analyse Afsset : | Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine | |
| MAXIMILIEN Rémi | | 14 avril 2008 22 septembre 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |
| MEEK Bette | | 14 mai 2008 |
| | Aucun lien déclaré | |
| Analyse Afsset : | / | |

| | | |
|---|--|---|
| <p>MULLOT Jean-Ulrich</p> <p>Aucun lien déclaré</p> <p>Analyse Afsset : /</p> | | <p>05 avril 2008</p> <p>07 janvier 2009</p> |
| <p>OULD-ELHKIM Mostafa</p> <p>Aucun lien déclaré</p> <p>Analyse Afsset : /</p> | | <p>26 mai 2008</p> <p>26 septembre 2008</p> |
| <p>ROUDOT Alain-Claude (membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »)</p> <p>Lien d'intérêt : affilié au laboratoire de l'université de Brest, prestataire pour l'Afsset pour le recueil des données toxicologiques du DnBP et les nonylphénols</p> <p>Risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique. Alain-Claude ROUDOT a assisté à aucune étape des travaux d'expertise aboutissant à la création des VTR reprotoxiques du DnBP et des nonylphénols.</p> <p>Analyse Afsset :</p> | | <p>26 mars 2008</p> |
| <p>TISSOT Sylvie</p> <p>LD</p> <p>Responsable de l'unité expertise collective des substances chimiques à l'INERIS</p> <p>Appartenance au laboratoire ayant réalisé l'expertise sur la VTR reprotoxique de l'EGEE</p> <p>Analyse Afsset : Risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique. Bénédicte LA ROCCA a assisté à aucune étape des travaux d'expertise aboutissant à la création des VTR reprotoxiques de l'EGEE.</p> | | <p>05 mai 2008</p> |
| <p>VIAN Laurence</p> <p>Aucun lien déclaré</p> <p>Analyse Afsset : /</p> | | <p>14 avril 2008</p> |

Annexe 3 : VTR des nonylphénols : Tableau comparatif des études de Moon *et al.*, 2007 et de Chapin *et al.*, 1999

| Référence | Chapin <i>et al.</i> , 1999 | Moon <i>et al.</i> , 2007 |
|---|--|--|
| Type d'étude | Etude sur la reproduction sur 3 générations | Etude de toxicité prénatale par gavage sur le développement de la glande mammaire |
| Substances chimiques, pureté, composition | Nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3) provenant de Schnectady International | Nonylphénol (mélange de composés branchés dont 85% d'isomère p), provenant de Kluka Chemical Atrazine (pureté = 97,1%) provenant de Novartis Crop Protection |
| Voie d'exposition | Voie orale (nourriture) | Voie orale (gavage) |
| Espèce - souche étudiée - âge - poids | Rats CrI-CD (Charles River) âgés de 11 semaines | Rates Long Evans gestantes, GD ⁶ 10 |
| Conditions de vie | Quarantaine de 8 jours. Animaux en cage individuelle dans une pièce à 68-74 °F et 30-70% d'humidité. Cycle lumineux de 12h. Nourriture et eau <i>ad libitum</i> . | Animaux en cage individuelle dans une pièce maintenue à 20-24°C et 40-50% d'humidité. Cycle lumineux : 14h jour/ 10h nuit Nourriture et eau <i>ad libitum</i> |
| Sexe et nombre d'animaux par lot | 30 couples par dose | 7-8 rates gestantes par groupe de dose |
| Groupe témoin et nombre | 30 couples par dose | 7-8 rates gestantes par groupe de dose |
| Fréquence et durée de l'exposition | Exposition continue de la première dose au F0 jusqu'à l'autopsie des F3 | GD15 – GD 19 |
| Doses ou concentrations d'expositions | 0, 15, 50 et 160 mg/kg pc/j (0, 200, 650 et 2000 ppm) | 0 (huile de maïs), 10 et 100 mg/kg pc/j Atrazine : 100 mg/kg pc/j |
| Observations | Accouplement confirmé par lavage vaginal. Les femelles sont remises dans les cages des mâles 2 semaines après ou si présence d'un bouchon vaginale. F0 Autopsie (après PND 21) : motilité du sperme, densité du sperme dans l'épididyme, poids corporel, poids foie, reins, rate, ovaires, vagin/col/utérus, épидидyme, testicule droit, prostate et vésicule séminale. TSHC (testicular | Délivrance = GD 21, naissance PND ⁷ 0 PND 4 = toutes les portées sont mélangées puis reconstituées au hasard avec 10 rats/portées, avec au moins 6 femelles dans chaque. PND 22 (sevrage) = séparation des femelles et mises en cage par 3-4. <i>Observations quotidienne</i> : mortalité, morbidité, comportement, conditions générales, toxicité, poids corporel |

⁶ GD : Gestational Day

⁷ PND : PostNatal Day

| | | |
|--|--|---|
| | <p>spermatid head counts)</p> <p>Sur l'épididyme gauche et le testicule gauche : motilité, morphologie et TSHC pour le groupe témoin et 160 mg/kg pc/j</p> <p><u>F1</u></p> <p>PND 1, 4, 7, 14 et 21 : Nbr de petits, poids ;</p> <p>PND 1 et 21 : distance anogénitale.</p> <p>Autopsie à PND 21 d'un mâle et une femelle par portée : poids foie, reins, rate, ovaires, vagin/col/utérus, épидидyme et testicule droit.</p> <p>1 rat par sexe et par portée est sélectionné pour former un couple : évaluation journalière ouverture vaginale (à partir de PND 30), descente testiculaire (à partir de PND 16) et séparation préputiale (à partir PND 35).</p> <p>Les mêmes observations sont faites sur les générations suivantes.</p> | <p><i>Autopsie</i> : poids des ovaires, utérus, vagin et hypophyse des femelles (PND 41), dissection des utérus et ovaires</p> <p><i>Evaluation du développement des glandes mammaires</i> : critères morphologiques (PND 4, 22, 33, 41 et 66)</p> <p><i>Immuno-histochimie</i> : récepteurs à l'œstrogène, la progestérone et la prolactine</p> <p><i>Radio-immuno-essai</i> : LH, FSH, TSH et prolactine sérique (à partir du sang collecté à l'autopsie)</p> |
| <p>Effets observés - toxicité générale / maternelle</p> | <p><u>F0</u></p> <p>Pas de lésions microscopiques sur l'épididyme gauche ou le testicule gauche</p> <p>Chez les mâles, dilatation tubulaire rénale à toutes les doses et ↗ poids relatif des reins à 50 et 160 mg/kg pc/j (PND 55-58)</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel chez les femelles</p> <p><u>F1</u></p> <p>Dilatation tubulaire rénale chez les mâles à toutes les doses et chez les femelles à 160 mg/kg pc/j</p> <p>50 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel chez les femelles.</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel, ↗ poids relatif des reins (PND 55-58) chez les femelles et les mâles</p> <p><u>F2</u></p> <p>Dilatation tubulaire rénale chez les mâles à toutes les doses et chez les femelles aux 2 dernières doses</p> <p>50 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel et ↗ poids relatifs des reins chez les mâles</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel et ↗ poids relatif des reins chez les mâles et les femelles, ↗ poids absolu du foie chez les femelles</p> <p><u>F3</u></p> <p>Dilatation tubulaire rénale chez les mâles et les femelles à toutes les doses</p> <p>50 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel chez</p> | |

| | | | |
|--------------------------------------|--|---|---|
| | <p>les femelles (PND 21) (pas observé à 160 mg/kg pc/j), √ poids corporel chez les femelles adultes</p> <p>160 mg/kg pc/j : √ poids corporel (males et femelles adultes)</p> | | |
| Effets reprotoxiques observés | <p><u>F0</u></p> <p>160 mg/kg pc/j : √ du nombre de petits vivants par portée</p> <p><u>F1</u></p> <p>50 et 160 mg/kg pc/j : Ouverture vaginale précoce (PND 30), ↗ poids relatif du vagin et utérus (PND 21)</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↗ longueur du cycle œstral, séparation préputiale retardée, √ poids absolu des ovaires, de la prostate et du testicule droit (PND 55-58)</p> <p><u>F2</u></p> <p>% de spermatozoïdes anormal augmenté à toutes les doses, ↗ longueur de la gestation à toutes les doses</p> <p>15 mg/kg pc/j : Descente testiculaire précoce (pas observé à 650 ppm)</p> <p>50 et 160 mg/kg pc/j : Ouverture vaginale précoce, √ poids absolu et relatif des ovaires, √ compte spermatique épидидymaire</p> <p>50 mg/kg pc/j : √ index de fertilité</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↗ longueur du cycle œstral, descente testiculaire précoce, √ nombre de spermatides par mg testicule et √ têtes de spermatides par testicule</p> <p><u>F3</u></p> <p>50 mg/kg pc/j : Descente testiculaire retardée (pas observée à 160 mg/kg pc/j)</p> <p>50 et 160 mg/kg pc/j : Ouverture vaginale précoce, √ poids absolu de l'épididyme droit</p> <p>50 mg/kg pc/j : √ poids absolu des ovaires</p> | <p><u>Poids des organes (F1)</u></p> <p>100 mg/kg pc/j : ↑ poids utérin (PND 41)</p> <p><u>Effets sur le développement des glandes mammaires (F1)</u></p> <p>10 mg/kg pc/j : ↓ des branchements primaires du canal collecteur et retard de migration de l'épithélium vers les nœuds lymphatiques (PND 22)</p> <p>100 mg/kg pc/j : migration de la glande mammaire du mamelon vers le nœud lymphatique (PND 4), ↑ du taux de branchements des canaux primaires en canaux secondaires (PND 4), ↑ du nombre de bourgeons alvéolaires et différenciation des bourgeons de l'extrémité terminale en bourgeons alvéolaires chez les femelles (PND 33)</p> <p><u>Effets sur les taux d'hormones (F1)</u></p> <p>10 mg/kg pc/j : ↓ TSH hypophysaire, ↑ du nombre de récepteurs de la progestérone dans l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus</p> <p>100 mg/kg pc/j : ↓ significative des niveaux de LH et FSH hypophysaire pendant la période de gestation (pas ↑ correspondante dans le sérum), ↑ du nombre de récepteurs de l'œstrogène dans le stroma et l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus, √ du nombre de récepteurs de la progestérone, ↑ du nombre de récepteurs de la prolactine (dose non précisée mais 100 mg/kg selon fig 4)</p> | |
| | Effet critique pris en compte | Augmentation du cycle œstral, ouverture vaginale précoce, diminution du poids des ovaires, diminution du compte spermatique épидидymaire | Effets sur le développement des glandes mammaires |
| | Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL | NOAEL = 15 mg/kg pc/j (= 200 ppm) LOAEL = 50 mg/kg pc/j (= 650 ppm) | LOAEL = 10 mg/kg pc/j |
| | Qualité de l'étude (cotation Klimisch) | 1a (lignes directrices de l'OCDE et les bonnes pratiques de laboratoire) | 2 |

Annexe 4 : VTR des nonylphénols : Tableau comparatif des études de Hossaini *et al.*, 2001 et Nagao *et al.*, 2007

| Référence | Hossaini <i>et al.</i> , 2001 | Nagao <i>et al.</i> , 2001 |
|---|--|--|
| Type d'étude | Etude de toxicité prénatale par gavage | Etude de la reproduction sur 2 générations |
| Substances chimiques, pureté, composition | n-Nonylphénol (n°CAS 104-40-5) Pureté de 99,5% | Nonylphénol (n° CAS 25154-52-3, mélange de composés avec une chaîne alkyle linéaire) provenant de Mitsui Chemical Co, Tokyo Pureté : au moins 99,0 % |
| Voie d'exposition | Voie orale (gavage) des mères -> exposition <i>in utero</i> | Voie orale (gavage) |
| Espèce - souche étudiée - âge - poids | Rats Wistar (mol:Wist/han) Femelles âgées de 12-14 semaines | Rats Crj:CD(SD)IGS Rats mâles âgés de 6 semaines (poids moyens des rats âgés de 5 semaines = 117,1 ± 2,7 g) Rats femelles âgés de 13 semaines (poids moyens des rats âgés de 10 semaines = 207,0 ± 5,3 g) |
| Conditions de vie | Animaux en cage individuelle dans une pièce à 22 ± 1°C et 55 ± 5 % d'humidité. Cycle lumineux de 12h. Nourriture semi-synthétique et eau <i>ad libitum</i> . | Animaux en cage dans une pièce maintenue à 23-25 °C et 50-65% d'humidité. Les femelles sont placées dans des cages individuelles une fois fécondées. Cycle lumineux de 12h. Nourriture et eau <i>ad libitum</i> |
| Sexe et nombre d'animaux par lot | ? | 25 rats de chaque sexe par groupe de dose |
| Groupe témoin et nombre | ? | 25 rats de chaque sexe par groupe de dose |
| Fréquence et durée de l'exposition | Exposition de GD11 - GD18 | Exposition continue de la première dose administrée aux F0 jusqu'à l'autopsie des F2. F0 : Les mâles F0 sont exposés de 12 semaines avant la cohabitation (2 semaines) jusqu'à l'autopsie tandis que les femelles le sont de 2 semaines jusqu'à l'autopsie (gestation, délivrance et allaitement de 21 jours). F1 : après la période de sevrage (J22) jusqu'à leur autopsie F2 : jusqu'à l'autopsie |
| Doses ou concentrations d'expositions | 0 (huile d'arachide), 3, 15 et 75 mg/kg pc/j Témoin positif : diéthylstilbestrol (30 µg/kg pc/j) | 0 (huile de maïs), 2, 10 et 50 mg/kg pc/j |
| Observations | Après la délivrance = le nombre de rats / portées est ajusté à 10 (tous les mâles sont gardés en vie) | GD0 = jour où preuve de l'insémination (présence de sperme ou d'un « bouchon vaginal ») |

| | | |
|--|--|---|
| | <p><u>F0</u> Poids (toutes les semaines jusqu'à GD 14 puis tous les jours jusqu'à la délivrance, enfin toutes les semaines jusqu'au sevrage)</p> <p><u>F1</u> Distance ano-génitale et poids chez les mâles et les femelles (PND 1, 5, 10, 15 et 21) Analyse rLH et rFSH (PND 21 et 110), estradiol (PND 21, mâles) et progesterone (PND 110, mâles) <i>Femelles</i> : Age de l'ouverture vaginale (examen à partir PND 28, 30, 32 et 34, puis tous les jours jusqu'à l'ouverture vaginale) <i>Mâle</i> : Age de la séparation préputiale (examen tous les jours à partir de PND35). PND 110 : Analyse du sperme (motilité et nombre). PND 21 et 110 : ALAT, cholinestérase, créatinine, protéines totales, urée, glucose, cholestérol total, phosphate et LDH sanguin.</p> <p><u>F0 et F1</u> <i>Femelles</i> : autopsie (PND 21 pour les F0 et après l'ouverture vaginale pour les F1) : poids corporel, poids du foie, reins et surrénales. <i>Mâle F1</i> : autopsie à PND 11, 21 ou 110 : poids du foie, chaque testicule et en plus pour les PND 110, poids surrénales, chaque épидидyme, vésicules séminales et prostate.</p> | <p>Naissance = PND0</p> <p><u>F0</u> Observations des signes cliniques 1-2 fois par jour. Pesés 2 fois/semaines avant la cohabitation pour les 2 sexes et pour les femelles à GD0, 4, 7, 14 et 20 de la gestation et J0, 4, 7, 14 et 21 après la naissance. Mesure de la consommation de nourriture 2 fois/semaines avant la cohabitation pour les 2 sexes mais aussi à GD 1-2, 7-8, 13-14 et 19-20 et J3-4, 6-7 et 9-10 chez les femelles. <i>Femelles</i> : Avant la cohabitation : frottis vaginal tous les matins Autopsie à J22. Pesées du cerveau, cœur, poumons, foie, rate, surrénales, thymus, ovaires, utérus, thyroïde et hypophyse chez 10 femelles dans les groupe de 50 mg/kg pc/j et les témoins (foie : aux doses de 2 et 10 mg/kg pc/j). Examen histologique (ovaires, trompes, utérus, vagin, cœur, foie, reins, vessie, rate, poumons, thymus, glandes mammaires, thyroïde, parathyroïde, hypophyse et surrénales) chez 10 femelles dans les groupe de 50 mg/kg pc/j et les témoins (foie : aux doses de 2 et 10 mg/kg pc/j).</p> <p><i>Mâles</i> : Autopsie à 23 semaines. Pesée du cerveau, cœur, poumon, foie, rate, reins, surrénales, thymus, testicules, épидидymes, prostate, vésicules séminales, thyroïde, hypophyse. Quantité de sperme dans épидидyme droit, mobilité spermatique</p> <p><u>F1</u> Nombre de petits vivants à la naissance, viabilité (PND 0-4 et 4-21), anomalies à PND 0, distance anogénitale, poids corporel (PND 0, 4, 7, 14, 21 puis une fois par semaine jusqu'à âge de 13 semaines), développement réflexes neuro et physique (PND 4), maturation sexuelle (ouverture vaginale, séparation préputiale PND 4) LH, FSH, TSH, T3 et T4, testostérone, prolactine et 17 bêta estradiol Poids des testicules, épидидymes, vésicule séminale, prostate, ovaires, utérus Examen histopathologique Tests comportementaux et fonctionnels</p> <p><u>F2</u> Autopsie à PND 21</p> |
|--|--|---|

| | | |
|---|---|--|
| <p>Tests statistiques utilisés</p> | <p>Logiciel SAS 6,12</p> <p>Analyse de variance à un facteur : poids corporel, poids du foie, des reins et des surrénales, taille des portées, poids à la naissance</p> <p>Taille des portées utilisées comme covariance, puis test de Dunett</p> <p>Analyse de variance à un facteur ajusté sur taille des portées : distance ano-génitale, ouverture vaginale et séparation du préputiale, paramètres de motilité du sperme. Si significatif -> test de Dunett ($p < 0,05$)</p> <p>« Proc mixed » avec 2 facteurs principaux (âge et traitements) : poids corporel, niveaux hormonaux, poids du foie et des testicules. Si effets du traitement significatif -> two-tailed t test</p> | <p>Test de Fisher pour les indices de fertilité et d'accouplement</p> <p>Test de Mann-Whitney pour les différences histologiques entre les 2 groupes, suivi par un test de Fisher pour le nombre de positifs</p> <p>Données issues des portées considérées comme un seul échantillon. Test de Barlett pour homogénéité des variances.</p> <p>Si Ok → analyse de variance puis si différence significative entre les groupes → test de Dunett (multiples comparaisons)</p> <p>Si non ou si variance = 0 → analyse des rangs Kruskal-Wallis, puis si significatif → test de Dunett (multiples comparaisons).</p> <p>Test de Student pour les concentrations sériques d'hormones</p> <p>Pour les tests, $p \leq 0,05$ et $p \leq 0,01$</p> |
| <p>Effets observés</p> | <p><u>F1</u></p> <p>15 mg/kg pc/j : ↓ poids absolu du foie chez les mâles (PND 11 et 21) et ↓ poids absolu de l'épididyme droit mais pas du poids relatif (PND 110)</p> <p>75 mg/kg pc/j : ↓ poids absolu du foie chez les mâles F1 (PND 21) mais pas chez les mâles adultes F1 (PND 110)</p> | <p><u>F0</u></p> <p>2 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : √ poids cerveau (poids relatif), ↗ poids cœur, thyroïde, surrénales et épидидymes (poids absolu), √ T3 et T4 et ↗ testostérone</p> <p><i>Femelles</i> : ↗ poids de l'utérus (relatif et absolu)</p> <p>50 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ poids cerveau, poumons, thyroïde, surrénales (poids relatif), √ poids du thymus, ↗ poids du foie (poids relatif) et reins (poids absolu et relatif) associé à des modifications histologiques (↗ hypertrophie centrolobulaire des hépatocytes, √ corps éosinophiles rénaux) et ↗ TSH</p> <p><i>Femelles</i> : √ poids des ovaires (relatif et absolu)</p> <p><u>F1 avant sevrage</u></p> <p>2 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ poids relatif et absolu prostate et vésicule séminale (pas D/R) et √ TSH et T4</p> <p><i>Femelles</i> : √ TSH, T3 et T4</p> <p>50 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ FSH et √ T3</p> <p><i>Femelles</i> : √ LH et TSH, et ↗ T3</p> <p><u>F1 après sevrage</u></p> <p>2 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : √ poids relatif thymus et √ FSH et T3</p> <p>50 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ poids relatifs foie et reins associé à des modifications histologiques au niveau du foie (↗ hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires), √ T3 et ↗ concentration spermatique</p> <p><i>Femelles</i> : √ poids corporel, √ poids relatif et absolu des ovaires, ↗ hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires et ouverture</p> |

| | | |
|---|---|---|
| | | vaginale précoce F2 50 mg/kg pc/j : ↘ nombre de sites d'implantation et du nombre des petits par portées |
| Effet critique pris en compte | ↓ poids absolu de l'épididyme droit | Activité œstrogénique (ouverture vaginale précoce, ↘ LH et ↘ du poids des ovaires) |
| Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL | NOAEL = 3 mg/kg pc/j LOAEL = 15 mg/kg pc/j | NOAEL = 10 mg/kg pc/j LOAEL = 50 mg/kg pc/j |
| Toxicité maternelle | ND | non |
| Qualité de l'étude (cotation Klimisch) | 1 | 1 |

Annexe 5 : VTR de l'EGEE : Analyse de l'étude de Barbee et al., 1984

| Référence | Barbee et al., 1984 |
|--|---|
| Type d'étude | Etude de toxicité subchronique |
| Substances chimiques, pureté, composition | EGEE provenant d'Eastman Chemical Products, Inc. (Kingsport, TN) Pureté : 99,59% |
| Voie d'exposition | Inhalation (vapeur) |
| Espèce - souche étudiée - âge - poids | Lapins New Zealand White (2,1-3,3 kg) Rats Sprague-Dawley CD (149 - 257 g) |
| Conditions de vie | Animaux en cage individuelle dans une pièce maintenue à une température et une humidité relative contrôlées. Cycle lumineux 12h Aliments et eau disponible <i>ad libitum</i> sauf pendant la période d'exposition Acclimatation 15 jours pour les rats et 22 jours pour les lapins |
| Sexe et nombre d'animaux par lot | <u>Lapins</u> : 10 lapins de chaque sexe par groupe <u>Rats</u> : 15 rats de chaque sexe par groupe |
| Groupe témoin et nombre | <u>Lapins</u> : 10 lapins de chaque sexe par groupe <u>Rats</u> : 15 rats de chaque sexe par groupe |
| Fréquence et durée de l'exposition | Exposition 6h/jour, 5 jours par semaines pendant 13 semaines. |
| Doses ou concentrations d'expositions | 0, 92,5, 380 et 1480 mg.m ⁻³ (25, 100 et 400 ppm) Concentrations analytiques : 25, 103 et 403 ppm |
| Observations | Observation 2 fois/jour des signes de toxicité et de morbidité Pesée une fois par semaine Examen ophtalmologique Tests cliniques de laboratoire (10 rats/sexe/groupe, tous les lapins) : <ul style="list-style-type: none"> - hématologiques : hémoglobine, hématocrite, nombre de réticulocytes, d'érythrocytes, de plaquettes, de leucocytes totaux, de leucocytes différenciés, volume corpusculaire moyen, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, morphologie des érythrocytes, - biochimiques : ALAT, ASAT, phosphatase alcaline, azote uréique sanguin, glucose, cholestérol, protéine totale, albumine, globuline, créatinine, bilirubine totale, bilirubine directe, sodium, potassium, chlorure, calcium, phosphore inorganique - analyses urinaires (rats) : apparence, densité, pH, protéines, glucose, cétones, bilirubine, sang, urobilinogène, observation microscopique Autopsie Pesée du foie, reins, testicules dont épидидymes, cerveau, rate, thymus, surrénales et hypophyse + calcul ratio poids organe/poids corporel |
| Tests statistiques utilisés | Tests de Bartlett, ANOVA, Dunnett, Kruskal-Wallis, Dunn, régression, Jonckheere |
| Effets observés - toxicité générale/maternelle | <u>Lapins et rats</u> ↗ incidence de larmolement (lapin espèce + sensible) <u>Lapins</u> |

| | |
|---|--|
| | <p>Femelles et à toutes les doses : ↗ du poids relatif du cerveau et ↘ significative cholestérol</p> <p>92,5 mg.m⁻³</p> <p>↘ significative du poids des surrénales (mâle)</p> <p>92,5 et 1480 mg.m⁻³</p> <p>↘ significative du poids corporel chez les 2 sexes (non significatif chez les femelles à 1480 mg.m⁻³)</p> <p>1480 mg.m⁻³</p> <p>↘ significative d'hémoglobine, hématocrite et du nombre d'érythrocytes (anémie périphérique sans altération centrale avec ↗ de l'élimination des érythrocytes circulants)</p> <p>↗ significative concentration protéines totales (mâles),</p> <p><u>Rats</u></p> <p>380 mg.m⁻³</p> <p>↘ significative du poids absolu de la rate chez la femelle</p> <p>1480 mg.m⁻³</p> <p>↘ significative du poids relatif et absolu de l'hypophyse chez les mâles</p> <p>↘ du compte de leucocytes chez la femelle</p> <p>↘ significative de l'azote uréique sanguin (femelles)</p> |
| Effets reprotoxiques observés | <p><u>Lapins</u></p> <p>1480 mg.m⁻³</p> <p>↘ significative du poids testicules+épididyme (↗ non significative à 92,5 et 380 mg.m⁻³)</p> <p>dégénérescence focale légère de l'épithélium des tubes séminifères sans altération de la spermatogénèse (3 lapins/10)</p> <p><u>Rats</u></p> <p>Effets non significatifs aux 3 doses d'exposition</p> |
| Effet critique pris en compte | <p><u>Lapins</u></p> <p>↘ du poids des testicules et dégénérescence focale légère de l'épithélium des tubes séminifères sans altération de la spermatogénèse</p> |
| Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL | <p><u>Lapins</u></p> <p>NOAEL = 380 mg.m⁻³ (100 ppm)</p> <p>LOAEL = 1480 mg.m⁻³ (400 ppm)</p> <p><u>Rats</u></p> <p>NOAEL = 1480 mg.m⁻³ (400 ppm)</p> |
| Qualité de l'étude (cotation Klimisch) | 2e |

Annexe 6 : VTR de l'EGEE : Analyse de l'étude de Doe, 1984

| Référence | Doe, 1984 |
|---|--|
| Type d'étude | Etude sur le développement par inhalation |
| Substances chimiques, pureté, composition | EGEE provenant d'Imperial Chemical Industries PLC, Petrochemicals and Plastics Division, Wilton, Middlebrough, UK) Pureté : ≥ 99% EGEA |
| Voie d'exposition | Inhalation |
| Espèce - souche étudiée - âge - poids | Rates Alpk/AP (200-280 g) âgées d'environ 11-13 semaines Lapines Dutch (1,7 - 2,8 kg) âgées de 5-7 mois |
| Conditions de vie | Dans une chambre d'exposition (3,4 m ³ , 22°C, 50% d'humidité relative) après l'accouplement |
| Sexe et nombre d'animaux par lot | 24 animaux par groupe de dose |
| Groupe témoin et nombre | 24 animaux par groupe de dose |
| Fréquence et durée de l'exposition | <u>Rates</u> 6h/jour, à partir du 6 ^{ème} jour de gestation jusqu'au 15 ^{ème} jour <u>Lapines</u> 6 h/ jour, à partir du 6 ^{ème} jour de gestation jusqu'au 19 ^{ème} jour |
| Doses ou concentrations d'expositions | <u>Rates</u> : 0, 36,8, 184, 920 mg.m ⁻³ (0, 10, 50 et 250 ppm) <u>Lapines</u> : 0, 36,8, 184, 646 mg.m ⁻³ (0, 10, 50 et 175 ppm) |
| Observations | <u>Rates</u> GD0 = jour où preuve de l'insémination (détection spermatozoïdes) Observations journalières de l'état clinique Mesure du poids corporel (GD 0, 5, 6 à 15, 16 et 21) GD 21 : Euthanasie. Echantillons sanguins prélevés pour une analyse hématologique Mesures du poids de la rate, du thymus et de l'utérus gravide. Dissection de l'utérus gravide. Nombre de corps jaune dans chaque ovaire, d'implantations, morts intra-utérines (tardives et précoces). Examen des fœtus vivants : pesée, anomalies, examen viscéral de la moitié des fœtus de chaque portée (examen des organes de la cage thoracique et de l'abdomen, sexe fœtus) et examen du squelette pour l'autre moitié (évaluation du développement morphologique et du degré d'ossification) <u>Lapines</u> GD0 = jour de l'accouplement Observations journalières de l'état clinique Mesure du poids corporel (GD 0, 5 à 19, 24 et 28) GD 29 : Euthanasie |

| | |
|---|--|
| | <p>Echantillons sanguins prélevés pour une analyse hématologique, frottis de moelle osseuse (os fémoral)</p> <p>Pesée de la rate et de l'utérus gravide.</p> <p>Dissection de l'utérus gravide. Nombre de corps jaune dans chaque ovaire, d'implantations, morts intra-utérines (tardives et précoces).</p> <p>Examen des fœtus vivants : pesée, anomalies, examen viscéral de la moitié des fœtus de chaque portée (examen peau, yeux, principaux organes de l'abdomen et du thorax et position des principaux vaisseaux du thorax et cœur, sexe fœtus) et examen du squelette pour l'autre moitié (évaluation du développement morphologique et du degré d'ossification)</p> |
| Tests statistiques utilisés | ? |
| Effets observés – toxicité générale/maternelle | <p><u>Rates F0</u></p> <p>920 mg.m⁻³ : ↘ significative de l'hémoglobine, de l'hématocrite et du volume de globules rouges</p> <p><u>Lapines F0</u></p> <p>Pas de toxicité maternelle</p> |
| Effets reprotoxiques observés | <p><u>Rats F1</u></p> <p>36,6 - 184 et 920 mg.m⁻³ :</p> <p>↗ pertes préimplantatoires (non significative pour 920 mg.m⁻³ car le nombre de femelles gravides < chez les rates exposées par rapport à celles exposées aux autres doses),</p> <p>↗ non significative des pertes post-implantatoires (due à ↗ de l'incidence des morts utérines tardives et du % de petits atteints)</p> <p>↘ nombre de fœtus en vie (non significative pour 920 mg.m⁻³)</p> <p>36,6 et 920 mg.m⁻³:</p> <p>↘ significative du poids total des portées</p> <p>↗ anomalies mineurs externes et viscérales* (non significatif à 36,6 mg.m⁻³ ; du à ↗ significative de l'incidence des mauvaises rotations de membre à 36,6 mg.m⁻³ et ↗ significative de l'incidence de dilatation des reins à 920 mg.m⁻³ ; pas de signification toxicologique)</p> <p>920 mg.m⁻³ :</p> <p>↗ significative du taux de mort intra-utérine tardive</p> <p>↗ significative des anomalies mineurs du squelette* (due à une ↗ partielle ou non ossification crâne, « thoracic centra », « lumbar centra », vertèbres lombaires et sternèbre, ↗ des anomalies du sternèbre ↗ incidence des vertèbres pré sacrées ; ↗ significative ossification des vertèbres pré sacrées à 36,6 mg.m⁻³ ; ossification partielle du 2nd sternèbre, non ossification du centre cervical à 184 mg.m⁻³)</p> <p>Retard de croissance fœtale, ↘ non significative du poids fœtal moyen (lié au retard de croissance)</p> <p><u>Lapins F1</u></p> <p>646 mg.m⁻³ :</p> <p>↗ significative incidence des anomalies mineures du squelette*</p> |

| | |
|---|--|
| | ↗ significative incidences des variations squelettiques* (côtes surnuméraires, apparition de côte d'une longueur supérieure à la normale) |
| Effet critique pris en compte | <p><u>Rats</u></p> <p>Augmentation des pertes préimplantatoires et diminution du nombre de fœtus par portée (significatives à 36,6 et 184 mg.m⁻³ mais pas à 920 mg.m⁻³)</p> <p><u>Lapins</u></p> <p>Augmentation de l'incidence des anomalies squelettiques mineures et des variations squelettiques (côtes surnuméraires)</p> |
| Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL | <p><u>Rats</u></p> <p>LOAEL : 36,6 mg.m⁻³</p> <p><u>Lapins</u></p> <p>LOAEL : 646 mg.m⁻³</p> <p>NOAEL : 184 mg.m⁻³</p> |
| Toxicité maternelle | <p><u>Rats</u></p> <p>LOAEL maternel : 250 ppm</p> <p>NOAEL maternel : 50 ppm</p> |
| Qualité de l'étude (cotation Klimisch) | 2e |

Notes



))) **afsset** .)))

agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

253, avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. +33 1 56 29 19 30
afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

ISBN 978-2-11-098867-6

