

**anses**

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



*Connaître, évaluer, protéger*

# Caractérisation des dangers et des expositions du 4-tert-octylphénol

Avis de l'Anses

Rapports d'expertise collective

Décembre 2015

Édition scientifique



**anses**

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



*Connaître, évaluer, protéger*

# Caractérisation des dangers et des expositions du 4-tert-octylphénol

Avis de l'Anses

Rapports d'expertise collective

Décembre 2015

Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 10 décembre 2015

## **AVIS** **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

**relatif à la caractérisation des dangers et des expositions du**  
**4-chloro-3-méthylphénol ou *p*-chlorocrésol (n° CAS 59-50-7), 4-nitrophénol (n° CAS 100-02-7), 4-*tert*-octylphénol (n° CAS 140-66-9), DEGME (ou 2-(2-méthoxyéthoxy)ethanol) (n° CAS 11-77-3), 4-*tert*-butylphénol (n° CAS 98-54-4), 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5)**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

L'Agence a été saisie le 9 juin 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) afin d'effectuer une évaluation des risques sanitaires (ERS) liés à l'exposition à des substances reprotoxiques de catégorie 2 (R2) (selon la directive 67/548/CE)<sup>1</sup> et/ou perturbatrices endocriniennes (PE) présentes dans des produits de consommation mis sur le marché en France.

Cette expertise visait la population générale, incluant les populations vulnérables, et les personnes en milieu de travail manipulant des produits de consommation dits «grand public» du fait de leur activité professionnelle (hors fabrication, transformation, distribution et élimination). Une liste d'une trentaine de substances chimiques reprotoxiques de catégorie 2 (selon le Règlement (CE) No 1272/2008 dit CLP)<sup>2</sup> et/ou PE susceptibles d'être présentes dans des mélanges et/ou articles mis sur le marché à destination du public a été annexé à la saisine. Cette liste incluait des dérivés phénoliques, des éthers de glycol, le toluène, le n-hexane ainsi que des bisphénols, phtalates, perfluorés, polybromés, etc...

---

<sup>1</sup> Directive n° 67/548/CEE du 27/06/67 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses

<sup>2</sup> Règlement (CE) No 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges. Ce règlement se substitue à partir de 2015 à la directive susmentionnée et à la directive 1999/45/CE.

Une première liste de 12 substances susceptibles d'être retrouvées dans des mélanges à usage grand public (vernis, colles, peintures, etc.) a été évaluée par l'Anses. Parmi ces substances, le chloroacétamide (n° CAS 79-07-2), ayant entre temps, fait l'objet d'une interdiction par voie réglementaire pour les usages entrant dans le champ de la saisine, a été écarté de la liste des substances soumises à l'expertise de l'Agence.

S'agissant de cinq d'entre elles, l'Agence a publié en mai 2014 un rapport d'expertise collective relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence d'o-phénylphénol (OPP), de toluène, de n-hexane, de chlorure de *cis*-1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azonia adamantane (*cis*-CTAC) et de méthyl-*tert*-butyléther (MTBE) dans les produits de consommation. Le rapport comporte, outre les conclusions sur l'évaluation des risques substance par substance, des fiches complètes sur les expositions (usages, filières, estimation des expositions) et les dangers. Dans les cas jugés pertinents par les experts, les risques pour les professionnels amenés à utiliser ces produits en milieu de travail ont également été évalués, comme prévu dans la saisine de la DGS.

Le présent avis présente les résultats de l'expertise portant sur les six substances restantes de la liste : 4-chloro-3-méthylphénol ou *p*-chlorocrésol (n° CAS 59-50-7), 4-nitrophénol (n° CAS 100-02-7), 4-*tert*-octylphénol (n° CAS 140-66-9), DEGME (ou 2-(2-méthoxyéthoxy)éthanol) (n° CAS 11-77-3), 4-*tert*-butylphénol (n° CAS 98-54-4), 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5).

Le tableau 1 présente les réglementations applicables à ces substances.

**Avis de l'Anses**  
Saisine n° «2009-SA-0331»

**Tableau 1 : Cadre réglementaire et classification PE appliqués aux six substances chimiques**

Substance	N°CAS	REACH - règlement (CE) n° 1907/2006	CLP - règlement (CE) n°1272/2008 Dont Classification CMR	Réglementation BIOCIDES - règlement (UE) n°528/2012	Réglementation MCDA	Autres réglementations <sup>3</sup>	Classement PE
4-chloro-3-méthylphénol ou <i>p</i> -chlorocrésol	59-50-7		Acute tox.4 H302 Acute tox.4 H312 Skin Sens1, H317 Eye Dam.1 H318 Aquatic Acute 1. H400 (CLP00) <sup>6</sup>	<i>p</i> -chlorocrésol doit faire l'objet d'une évaluation pour : TP 1 : Produits biocides destinés à l'hygiène humaine TP 2 : Désinfectants et produits algicides non destinés à l'application directe sur des êtres humains ou des animaux TP 3 : Produits biocides destinés à l'hygiène vétérinaire TP 6 : Protection des produits pendant le stockage TP 9 : Produits de protection des fibres, du cuir, du caoutchouc et des matériaux polymérisés TP 13 : Produits de protection des fluides de travail ou de coupe	Non concerné	Règlement (CE) n° 68/2004 relatif aux détergents : En tant qu'agent conservateur, le chlorocrésol doit être inscrit sur l'étiquetage quelle que soit sa concentration. Règlement (CE) n° 1107/2009 relatif aux produits phytopharmaceutiques : chlorocrésol non inclus comme substance active, donc tout produit phytopharmaceutique contenant du <i>p</i> -chlorocrésol doit être retiré du marché	PE2 (BKH, 2002 et DHI, 2007)
4-tert-octylphénol	140-66-9	Substance SVHC <sup>4</sup> RMOA <sup>5</sup> Substance dans les articles	Skin Irrit 2. H315 Eye Dam 1. H318 Aquatic Acute 1 H400 Aquatic Chronic 1	Substance non incluse dans le règlement « biocides »	Substance non autorisée dans les matériaux en contact avec les denrées alimentaires	Règlement (CE) n° 689/2008 concernant les exportations et importations de	PE1 (BKH <sup>8</sup> , 2002 et DHI <sup>9</sup> , 2007)

<sup>3</sup> Revue de la réglementation à l'exclusion des réglementations liées aux matériaux destinés aux produits de santé, et dispositifs médicaux ainsi qu'aux médicaments à usages humain et vétérinaire.

<sup>4</sup> Substance of very high concern (substances extrêmement préoccupantes)

<sup>5</sup> Risk Management Option Analysis

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substance	N°CAS	REACH - règlement (CE) n° 1907/2006	CLP - règlement (CE) n°1272/2008 Dont Classification CMR	Réglementation BIOCIDES - règlement (UE) n°528/2012	Réglementation MCDA	Autres réglementations <sup>3</sup>	Classement PE
			H410 Limite de concentration spécifique : M = 10 (ATP01) <sup>6</sup>			produits chimiques dangereux, dit règlement « PIC <sup>7</sup> » : substance soumise à la procédure de notification d'exportation	
4-nitrophénol	100-02-7	Substance enregistrée	Acute Tox. 4 H302 Acute Tox. 4 H312 Acute Tox. 4 H332 STOT RE 2 H373 ** (CLP00)	Substance non incluse dans le règlement « biocides »	Substance non autorisée dans les matériaux en contact avec les denrées alimentaires		PE2 (DHI)
2-(méthoxyéthoxy)éthanol ou DEGME	111-77-3	Annexe XVII : 0,1% <sub>w</sub> DEGME dans les peintures, décapants, agents de nettoyage, émulsions auto-lustrantes et produits d'étanchéité pour planchers.	Repr.2 (susceptible de nuire au fœtus) (CLP00)	Substance non incluse dans le règlement « biocides »	Substance non autorisée dans les matériaux en contact avec les denrées alimentaire	VLEP (8h) = 5,1mg.m <sup>-3</sup>	NC
4-tert-butylphénol	98-54-4	Substance enregistrée	Skin Irrit.2 H315 Eye Dam.1 H318	Substance non incluse dans le règlement « biocides »	Peut être utilisé comme monomère ou autre	Arrêté du 18 Décembre 2012 =	PE2 (BKH, 2002 et DHI,

<sup>8</sup> BKH : Rapports européens commandités par la Commission européenne dans le cadre de l'étude des composés PE

<sup>9</sup> DHI : Rapports européens commandités par la Commission européenne dans le cadre de l'étude des composés PE

<sup>6</sup> La substance n'a pas de classification harmonisée concernant le caractère CMR, ce qui peut signifier : soit que ces effets n'ont pas été étudiés, soient que les données étaient indisponibles pour classer la substance CMR, soit que les données étaient suffisantes et ont conclu que la substance n'était pas CMR

<sup>7</sup> PIC : Prior informed consent (consentement préalable informé)

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substance	N°CAS	REACH - règlement (CE) n° 1907/2006	CLP - règlement (CE) n°1272/2008 Dont Classification CMR	Réglementation BIOCIDES - règlement (UE) n°528/2012	Réglementation MCDA	Autres réglementations <sup>3</sup>	Classement PE
		PACT List = RMOA et Evaluation des dangers	Repr.2 H361f (ATP06)		substance de départ ou macromolécule obtenue par fermentation microbienne. Limite de migration spécifique = 0,05mg.kg-1 de denrée alimentaire.	Interdit comme substance parfumante, allergisante dans les jouets :	2007
4-nonylphénol	104-40-5	Le 4-nonylphénol linéaire, le 4-nonylphénol ramifié, les nonylphénols (NPs) ainsi que les éthoxylates de nonylphénol (NPEs) sont inscrits sur la liste candidate des substances soumises à autorisation	Pas de classification harmonisée	Substance non incluse dans le règlement « biocides »	<u>Substance non autorisée dans les matériaux en contact avec les denrées alimentaires</u>	<u>Règlement (CE) n° 689/2008</u> : substance soumise à la procédure de notification d'exportation	PE1 selon le DHI <sup>10</sup>

<sup>10</sup> A noter que les mélanges de nonylphénols (n°CAS : 25154-52-3) et le 4-nonylphénol ramifié (n°CAS : 84852-15-3) sont également classés PE1 (BKH, 2000) et toxique pour la reproduction de catégorie 2 selon l'annexe VI du règlement CLP.

Certaines de ces 6 substances font l'objet de réglementations sectorielles (cf. tableau 1) et sont enregistrées au titre du règlement n° 1907/2006<sup>11</sup> (REACH).

- Le DEGME est inscrit à l'annexe XVII du règlement REACH concernant une restriction de mise sur le marché en tant que substance ou comme constituant de mélanges à une concentration égale ou supérieure à 0,1 % en masse dans les peintures, les décapants peintures, les agents de nettoyage, les émulsions auto-lustrantes et les produits d'étanchéité pour plancher destinés à la vente au public.
- L'utilisation des nonylphénols et des éthoxylates de nonylphénols a fait l'objet de mesures restrictives dès 2005 (inscription en annexe I de la directive 2003/53/CE<sup>12</sup> puis en annexe XVII du règlement REACH), limitant leur concentration à 0,1 % en masse pour les utilisations dans les nettoyants industriels et domestiques, le traitement des textiles et du cuir, l'industrie du papier et carton, les cosmétiques et autres produits d'hygiène, les formulants ou co-formulants de phytosanitaires et biocides, les émulsifiants de produits agricoles, les produits pour l'usinage des métaux. La saisine concerne exclusivement le 4-nonylphénol linéaire, et la restriction détaillée ci-dessus s'applique aux mélanges de nonylphénols (dont le 4-nonylphénol linéaire peut faire partie) et aux nonylphénols ramifiés.
- Par ailleurs, le 4-*tert*-octylphénol et les nonylphénols ramifiés, linéaires, ainsi que les éthoxylates ont été inscrits sur la liste des substances extrêmement préoccupantes candidates en vue d'une autorisation de mise sur le marché respectivement depuis le 19/12/2011 et le 20/06/2013.

La caractérisation des expositions réalisée par l'Agence dans le présent avis porte sur les expositions à des produits commercialisés destinés au grand public, selon l'approche décrite dans le rapport « Méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation » (Anses, 2014). Elle exclut les expositions *via* l'alimentation ou liées à une exposition à ces six substances du fait de l'utilisation de produits phytopharmaceutiques, de médicaments à usages humain ou vétérinaire, de produits cosmétiques ou de dispositifs médicaux. Les substances utilisées dans les produits cosmétiques font l'objet de travaux de l'Agence nationale de sécurité des médicaments (ANSM), et aucun produit phytopharmaceutique utilisé en France n'est concerné par les substances initialement incluses dans la liste de la saisine de la DGS.

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

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) ».

Le groupe de travail « Perturbateurs endocriniens » (GT PE), rattaché au Comité d'experts spécialisé « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » (CES Substances) a été mobilisé par l'Anses pour répondre à cette saisine.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 31 décembre 2014 et septembre 2015. Les rapports produits par le groupe de travail tiennent compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Les travaux des experts ont conduit à l'élaboration des documents suivants :

<sup>11</sup> Règlement N° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH).

<sup>12</sup> Directive 2003/53/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 juin 2003 portant vingt-sixième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil concernant la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (nonyl- phénol, éthoxylate de nonylphénol et ciment)

Pour chaque substance :

- Un rapport sur la caractérisation des dangers aux substances PE et/ou reprotoxiques 2 qui inclut le profil toxicologique des substances, jusqu'à la sélection des doses critiques à considérer pour une éventuelle ERS.
- Un rapport sur les filières, usages et exposition qui présente les données d'exposition à ces substances : les propriétés physico-chimiques, la réglementation applicable, les résultats de l'enquête de filières, de l'extraction des bases de données et de la revue bibliographique ayant servi à identifier les produits de consommation contenant ces substances et les données de composition associées ainsi que les données de contamination environnementale (air intérieur, air extérieur et poussières sédimentées).

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

#### ■ METHODOLOGIE DE L'EXPERTISE COLLECTIVE

**Concernant la caractérisation des dangers**, l'analyse des études scientifiques disponibles portant sur les effets des six substances, en particulier sur les effets reprotoxiques et perturbateurs endocriniens, a permis d'identifier des effets critiques jugés pertinents pour la conduite éventuelle d'une évaluation des risques pour la santé (ERS) pour ces 6 substances (analyse bibliographiques jusqu'en 2014).

**Concernant la caractérisation des expositions et de l'approche par «usages»**, une enquête de filières a été réalisée auprès de 37 000 industriels français entre août 2010 et mai 2011 afin d'identifier les produits sur le marché contenant ces substances. Cette enquête a été complétée par une recherche bibliographique et l'extraction de bases de données renseignant la composition de produits de consommation telles que la Banque nationale des produits et compositions (BNPC)<sup>13</sup> gérée par les centres antipoison (CAP), et les banques de données Sepia<sup>14</sup> de l'INRS et Simmbad<sup>15</sup> du ministère en charge de l'environnement ; ou des mesures d'exposition aux substances chimiques pour des activités professionnelles (base de données Colchic). Ces recherches ont été réalisées sur la période 2000 – 2012. Pour rappel, dans le cadre de ces travaux, les expositions ont été évaluées pour la population générale (incluant les populations vulnérables, femmes enceintes, enfants) et, lorsque cela a été jugé pertinent, les professionnels manipulant des produits de consommation, dits «grand public» (hors fabrication, transformation, distribution et élimination). En complément, les données de contamination dans l'air et les poussières sédimentés ont été recherchées à partir d'une revue de la littérature sur la période 2000-2014.

<sup>13</sup>La BNPC rassemble les informations validées utiles aux médecins des centres antipoison dans l'exercice de leurs activités de réponse téléphonique à l'urgence toxicologique, d'information et d'expertise toxicologique, de toxicovigilance, de prévention des intoxications.

<sup>14</sup> La base de données Sepia répertorie les mélanges chimiques très toxiques, toxiques, corrosifs ou biocides, à déclaration obligatoire, mises sur le marché français ainsi que les mélanges transmis suite à une demande de l'INRS ou, dans une moindre mesure, les renseignements transmis spontanément par les industriels.

<sup>15</sup> La base de données Simmbad accessible au grand public répertorie les produits biocides qui ont été déclarés par les industriels auprès du ministère de l'environnement et dont la déclaration a été acceptée.

## ■ RESULTAT DE L'EXPERTISE COLLECTIVE

### CARACTERISATION DES DANGERS ET DES USAGES

Les dangers pris en compte par les experts portent **sur les effets liés à la reproduction et au développement**. Les dangers retenus suite à une exposition de modèles expérimentaux animaux à ces molécules et qui ont servi à caractériser les effets chez l'Homme sont synthétisés ci-dessous (cf. annexe1).

#### **4-chloro-3-méthylphénol (*p*-chlorocrésol) (n° cas 59-50-7)**

Caractérisation des dangers : Les données *in vivo* sont essentiellement issues des rapports industriels non publiés de Bayer (1988, 1991). Une étude sub-chronique par voie cutanée [13 semaines, 6h/j et 5 j/semaine à 0, 20, 100, et 500 mg/kg pc/j (Bayer 1991a)] n'a pas montré d'effets chez des rats Wistar. Le NOAEL<sup>16</sup> pour l'exposition par contact cutané fut établi par les auteurs à 500 mg/kg/j. Une étude sur le développement a été réalisée chez des rates exposées par voie orale à 0, 30, 100, et 300 mg/kg de pc /j entre les jours 6 et 15 de gestation. Une toxicité maternelle est observée à 100 mg/kg/j. L'exposition *in utero* à la dose de 300 mg/kg/j, montre une toxicité sur le fœtus se traduisant par une baisse du poids fœtal et une augmentation de malformation au niveau oculaire (microphthalmie et anophthalmie). Un NOAEL a été établi par les auteurs à 30 mg/kg/j.

Identification des usages : Du fait de ses propriétés biocides, le *p*-chlorocrésol est utilisé en tant qu'agent conservateur et agent désinfectant dans des produits grand public et dans des produits et matériaux professionnels. Les données de concentration disponibles dans les produits concernent principalement les nettoyants et désinfectants. Chez l'Homme, des données relatives à des observations sur d'éventuels effets de sensibilisation et d'irritation de la substance après contact cutané, du fait de l'utilisation de la substance comme conservateur dans les préparations cosmétiques permettent de conclure à l'absence d'effets pour les concentrations utilisées (1 à 5%).

Conclusion : Les études disponibles sont jugées de très bonne qualité et peuvent être retenues pour une ERS. Sur la base de ces données, les experts retiennent un NOAEL maternel de 30 mg/kg pc/j, basé sur l'absence d'effets chez des rates gravides Wistar (Bayer 1991b). La réalisation par l'agence d'une ERS liée à la présence du chlorocrésol dans les produits de consommation n'apparaît pas pertinente du fait de l'utilisation de la substance comme conservateur dans les préparations cosmétiques (concentrations utilisées 1 à 5%) où aucun effet toxique n'est observé.

#### **4-tert-octylphénol (n° cas 140-66-9)**

Caractérisation des dangers : Huit études ont été recensées, dont 4 études sur la reprotoxicité et 4 études sur le développement, toutes chez le rat. Les NOAEL se situent entre 100 et 400 mg/kg/j. La plupart des études n'ont pas été conduites selon un protocole standardisé et ont été réalisées à des doses de 4-tert-octylphénol (4tOP) relativement fortes. De ce fait, les effets observés sont hétérogènes et parfois contradictoires. Les effets sur la reproduction et le développement chez les rats mâles montrent principalement une diminution du poids brut des organes reproducteurs et des paramètres spermatiques (NOAEL = 150 mg/kg pc/j, voie orale chez le rat adulte), des atteintes histologiques au niveau du testicule avec une réduction de la taille des tubes séminifères, une

<sup>16</sup> NOAEL : No Observed Adverse Effect Level (Dose maximale sans effet néfaste observé)

désorganisation des cellules de la spermatogénèse (LOAEL = 571 mg/kg/j, par voie sous-cutanée, chez les rats prépubères de 4 semaines), une diminution du nombre de spermatozoïdes et une augmentation significative des anomalies de la tête et du flagelle des spermatozoïdes (LOAEL = 66 mg/kg/j, voie sous-cutanée, chez les rats âgés de 8 semaines). Chez les femelles, est observée une diminution du nombre de cycles ovariens de 4 à 5 jours, une augmentation de la durée du dioestrus (NOEL = 100 mg/kg/j, voie orale, chez les rates âgées de 25 jours), des troubles du cycle œstral, l'apparition d'un œstrus persistant (NOAEL = 25 mg/kg/j, voie sous-cutanée, chez les rates âgées de 11 semaines), une baisse statistiquement significative du poids (relatif et absolu) de l'utérus chez les rates femelles [NOAEL = 2000 ppm (soit de 111 à 369 mg/kg/j, chez les rates âgées de 6-17 semaines), voie orale], une diminution des performances sexuelles, une baisse de la fertilité chez les mâles, une diminution du taux d'implantation. Sont observés également des effets sur le développement : une augmentation de la mortalité pré et postnatale, une diminution de la taille des portées (NOAEL = 250 mg/kg/j, voie orale), une augmentation statistiquement significative de l'incidence de pertes post-implantatoires par portée (NOAEL = 15,6 mg/kg/j, voie orale, chez les rates âgées de 12-15 semaines).

Identification des usages : Le 4tOP n'entre pas directement dans la formulation de produits finis. Il est utilisé comme intermédiaire dans la synthèse de résines phénoliques et d'éthoxylates d'octylphénol (OPEs), aux utilisations industrielles diverses.

Il n'est pas exclu que du 4tOP libre n'ayant pas été polymérisé soit libéré au cours de l'utilisation des produits fabriqués à partir des résines (colles, peintures, vernis, matières plastiques). Les données de concentrations résiduelles ne sont généralement pas disponibles.

Conclusion : La réalisation d'une ERS liée à la présence du 4-*tert*-octylphénol dans des produits de consommation n'apparaît pas possible du fait de l'absence de données permettant de quantifier les expositions liées aux usages identifiés. Cependant, les études identifiées et retenues par les experts autant pour ce qui concerne le développement que la reprotoxicité sont jugées de bonne qualité pour une ERS.

#### **4-nitrophénol (n° cas 100-02-7)**

Caractérisation des dangers : Huit études ont été recensées dont 5 études sur le développement (2 *in utero* et 3 périnatales) dont 4 études chez le rat et une *in utero* chez la souris. A des niveaux d'exposition relativement élevés, aucun effet n'est observé sur la reproduction et le développement chez l'animal, et ce même en approchant les valeurs létales (cas des souris traitées à 400 mg/kg/j, alors que la DL<sub>50</sub> déterminée pour cette espèce est de l'ordre de 625,7 mg/kg). Une exposition *in utero* montre des effets sur la viabilité des petits et leur poids corporel ; les mères ayant été exposées par voie orale à des doses comprises entre 300 et 400 mg/kg/j. A noter que cette substance a fait l'objet d'une étude sur deux générations et d'études de toxicité chroniques, considérées par la réglementation comme suffisantes pour étudier la fertilité. Par contre, ces études sur le développement ont été réalisées selon des protocoles non standardisés (une seule dose, temps d'exposition court ...) et ne peuvent être considérées comme suffisantes pour identifier un risque pour le développement.

Identification des usages : Les données de la bibliographie indiquent que le 4-nitrophénol est utilisé pour la fabrication de produits tels que les colorants azoïques aux utilisations industrielles diverses (teinturerie, cuir, peintures et vernis, papier, encres...), les matières plastiques, certains composants utilisés dans l'industrie de la photographie et certains produits pharmaceutiques, biocides et phytopharmaceutiques.

Pour toutes ces utilisations, le 4-nitrophénol est utilisé comme intermédiaire et n'entre donc pas directement dans la formulation du produit fini bien que le 4-nitrophénol puisse être retrouvé en

faibles quantités dans les mélanges et articles concernés. Les données de concentrations résiduelles ne sont généralement pas disponibles. Les seules données de concentration disponibles sont issues de la BNPC<sup>17</sup> et concernent des produits phytopharmaceutiques, dont l'évaluation n'entre pas dans le champ de la saisine.

Conclusion : Une ERS liée à la présence du 4-nitrophénol dans des produits de consommation n'est pas pertinente du fait de l'absence de données permettant de quantifier les expositions liées aux usages identifiés grand public. De plus, les données de toxicité existantes semblent indiquer une sensibilité plus grande des animaux jeunes et prépubères quant aux effets de perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire.

### **DEGME (ou 2-(méthoxyéthoxy)éthanol) (n° CAS 11-77-3)**

Caractérisation des dangers : Les données toxicologiques chez l'animal portant sur la fertilité chez le mâle montrent, d'une manière générale, une absence d'effet ou des effets à des doses d'exposition élevées supérieures à 1000 mg/kg/j par voie orale. Quatre études sur le développement ont été identifiées entre 1983 et 2009 chez le rat et le lapin. Les effets sur le développement montrent principalement la présence de malformations cardiovasculaires (NOAEL : 720 mg/kg/j par voie orale), une diminution du poids de la portée et des retards d'ossification (NOAEL : 250 mg/kg/j par voie sous-cutanée), en particulier de l'os hyoïde (NOAEL : 50 mg/kg/j par voie cutanée).

Identification des usages : Le DEGME est utilisé comme solvant et entre dans la composition de produits tels que les peintures et leurs décapants, les produits phytosanitaires, les produits d'entretien et de finition du bois, les produits de nettoyage à usages domestique et industriel et les produits d'entretien mécanique. Le DEGME est également utilisé dans l'industrie des textiles et du cuir et entre dans la composition des encres. Le DEGME est également employé dans les produits biocides, les cosmétiques, les produits dérouillant, les produits pour le bâtiment, pour la céramique, la verrerie et les émaux et comme matière première dans la synthèse de plastifiants. Il serait enfin utilisé dans l'industrie électronique pour la fabrication de circuits imprimés. Parmi les usages identifiés, les données de concentration disponibles dans les produits concernent les produits nettoyants de surface, les produits lave – glace automobiles, les détachants textiles, les cires pour chaussures, les vernis et les produits d'entretien et de finition du bois. La présence de DEGME dans ces articles et préparations fait l'objet d'une restriction européenne.

Conclusion : Les données permettant de mener une ERS ne sont disponibles que pour les usages (cf. tableau 1) pour lesquels le DEGME est déjà réglementé et restreint à 0,1% massique en composition.

L'étude de Scortichini et coll. (1986) a été retenue comme étude de qualité avec un NOAEL identifié par les auteurs à 50 mg/kg/j par voie sous-cutanée. L'effet identifié pour une éventuelle ERS est un retard d'ossification, apparition d'ostéophytes cervicaux et des retards d'ossification de l'os hyoïde. Cependant, la pertinence de conduire une ERS est faible pour les usages déjà réglementés.

### **4-tert-butylphénol (n° CAS 98-54-4)**

Caractérisation des dangers : Concernant la fertilité, une étude de type OCDE 416 - étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, réalisée chez le rat aux doses de 70, 200 et 600 mg/kg pc/j par voie orale a montré des effets systémiques chez les animaux parents et des effets sur la reproduction à partir de 200 mg/kg pc/j. Un NOAEL de 70 mg/kg pc/j pour la reprotoxicité a été déterminé sur la base des effets ovariens et de l'atrophie vaginale observée à partir de 200

<sup>17</sup> Base nationale des produits et compositions.

mg/kg pc/j. A noter que chez le rat l'administration par voie orale de 4-tertbutylphénol à une dose de 200 mg/Kg pc/j montre des effets reprotoxiques mais également des effets systémiques. Une seule étude de type OCDE 422, réalisée par voie orale chez le rat Sprague Dawley (exposition de 4 semaines, chez les mâles et exposition 14 jours avant l'accouplement chez les femelles jusqu'au 4<sup>émé</sup> jour de lactation) n'a pas montré d'effet reprotoxique chez les parents ou la descendance jusqu'à la dose de 200 mg/kg pc/j. Un NOAEL de 60 mg/kg pc/j pour la toxicité systémique a été déterminé sur la base des effets observés à 200 mg/kg pc/j chez les mâles et les femelles (dyspnée chez les femelles et modifications des paramètres hématologiques chez les mâles).

Identification des usages : Le 4-*tert*-butylphénol est utilisé comme intermédiaire de synthèse dans la fabrication des résines phénoliques et époxydes et des polycarbonates dont les applications industrielles sont diverses. Il n'est pas exclu que de faibles concentrations de 4-*tert*-butylphénol libre puissent se retrouver dans les produits ainsi fabriqués. Les données de concentrations résiduelles ne sont généralement pas disponibles. Les seuls produits destinés au grand public pour lesquels des données de concentration en 4-*tert*-butylphénol ont été identifiées sont un siccatif pour peintures à l'huile (utilisation marginale) et une colle (bois, caoutchouc, plastiques, cuir, liège, moquettes, métaux). Ce dernier usage apparaît comme l'utilisation prédominante du 4-*tert*-butylphénol telle que recensée dans la base de données Sepia et la bibliographie.

Conclusion : Le 4-*tert*-butylphénol est utilisé comme intermédiaire de synthèse dans la fabrication des résines phénoliques et époxydes et des polycarbonates. Parmi les usages identifiés, des données de composition sont disponibles pour seulement les colles et les textiles. Pour l'usage colle, il existe une évaluation européenne (2008) qui conclut en l'absence de risque pour les usages domestiques. Pour l'usage textile, des travaux sont en cours à l'Agence en réponse à la saisine n°2014-SA-0237.

La réalisation d'une ERS liée à la présence du 4-*tert*-butylphénol dans des produits de consommation n'apparaît pas possible du fait de l'absence de données permettant de quantifier les expositions liées aux usages identifiés grand public.

Selon les données rapportées par l'ECHA<sup>18</sup> (2011), une étude reprotoxique de «screening» (Japan, MHW, 1996) mentionne une absence de toxicité à la dose maximale (NOAEL : 200 mg/kg/j). Une étude sur le développement (Clubb and Jardine 2006) mentionne un NOAEL de 70 mg/kg/j sur la base d'une diminution du nombre d'implantations et du nombre de petits vivants par portée, de la taille de la portée et du poids de la portée ainsi que du gain de poids de la portée à 600 mg/kg pc/j chez les F0 et les F1. Les deux études sont jugées de bonne qualité. Néanmoins, seule l'étude sur le développement peut être retenue pour une ERS car l'ECHA ne recommande pas d'utiliser les études de screening ne montrant pas de toxicité.

#### **4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5)**

Caractérisation des dangers : Huit études ont été identifiées entre 2000 et 2014 dont 6 sur le développement et 2 sur la reproduction chez différentes espèces de rats exposés en prénatal et/ou postnatal ou sur plusieurs générations.

Des études réalisées chez des rats exposés en péri-, postnatal ou sur plusieurs générations par voie orale à au moins 50 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> ont mis en évidence des effets chez la femelle (tels qu'une ouverture vaginale précoce, modification de la durée du cycle œstral, diminution du poids absolu et relatif des ovaires sans atteinte histologique associée, diminution de la LH sérique). Ces études ont également mis en évidence des modifications histologiques de la glande mammaire à des doses plus faibles (10 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>). Chez différentes espèces de rats exposés en pré et/ou postnatal ou sur plusieurs générations, des études ont décrit des effets sur l'appareil reproducteur mâle à

<sup>18</sup> European chemicals agency / Agence européenne des produits chimiques.

partir de  $15 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  tels qu'une diminution du poids des testicules, de l'épididyme et de la prostate (poids absolu et/ou relatif), des altérations de la spermatogénèse avec un retentissement sur la production spermatique, une descente testiculaire précoce et une diminution de la testostérone sérique et des lésions de la prostate.

Identification des usages : Aucune information relative à l'emploi du 4-nonylphénol linéaire sous forme isolée n'est disponible dans la bibliographie. Les données disponibles indiquent que cet isomère entre dans la composition des mélanges de nonylphénols à chaînes linéaires (*a priori* moins utilisés que les mélanges ramifiés en industrie). Ces mélanges, désignés sous le terme générique de «nonylphénols » ne sont pas incorporés directement dans les formulations. Ils sont utilisés comme intermédiaires dans la synthèse de éthoxylates de nonylphénol (NPEs), de résines formo-phénoliques, de résines époxy et de phosphite de tris(nonylphényle) (TNPP), aux utilisations industrielles diverses.

Dans les produits fabriqués à partir des résines et du TNPP (colles, peintures, vernis, matières plastiques), il n'est pas exclu que du nonylphénol libre n'ayant pas réagi (et par conséquent du 4-NP linéaire) soit libéré au cours de leur utilisation. Cependant, les données relatives aux concentrations en 4-NP résiduel ne sont pas disponibles.

Concernant les produits synthétisés à partir de NPEs, ceux-ci peuvent également contenir de faibles quantités de nonylphénols n'ayant pas été polymérisés. Cependant, l'utilisation des nonylphénols et des NPEs est déjà très réglementée au niveau européen et a fait l'objet de mesures restrictives depuis 2005 (cf. tableau 1), limitant leur concentration à 0,1 % pour différentes utilisations. Par ailleurs, la recherche bibliographique, l'enquête de filières et l'extraction des bases de données n'ont pas permis d'identifier de produits synthétisés à partir de NPEs non couverts par cette restriction<sup>19</sup> (cf. contexte réglementaire), à l'exception des textiles (produits finis) dans lesquels des concentrations en NPEs ont été quantifiées. Des mesures de gestion permettant de couvrir cette voie d'exposition sont d'ores et déjà mises en œuvre, par l'intermédiaire d'un dossier de restriction dans le cadre de la réglementation REACH des nonylphénols et des NPEs dans les textiles.

Conclusion : Le manque d'informations relatives à l'emploi du 4-nonylphénol linéaire sous forme isolée et les niveaux de concentrations dans les produits synthétisés non disponibles, conduisent à ne pas réaliser d'ERS pour ces produits dans le cadre de la présente saisine.

Trois études de bonne qualité peuvent être retenues pour conduire une ERS. Deux portent sur le développement (Moon et coll., 2007 ; Woo et coll., 2007) fondées respectivement sur le développement des glandes mammaires et l'augmentation du poids absolu et relatif de la thyroïde chez les mâles et une faible augmentation de la LH sérique chez les femelles. La troisième étude porte sur les effets reprotoxiques (Nagao et coll., 2001) et montre une diminution de la LH sérique et sur une ouverture vaginale précoce chez le rat de la génération F1. Ces études ont été retenues pour établir des VTR sur le développement et l'effet reprotoxique à l'Agence.

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence au vu de l'analyse et des conclusions du Comité d'experts spécialisés «Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » relatives à la caractérisation des dangers et des expositions associée aux six substances, conclut comme suit :

<sup>19</sup> Les travaux ont permis d'identifier des usages couverts par la restriction : nettoyants industriels et domestiques, traitement des textiles et du cuir, industrie du papier et carton, cosmétiques et autres produits d'hygiène, formulants ou coformulants de pesticides et biocides, émulsifiants de produits agricoles, produits pour l'usinage des métaux.

**4-chloro-3-méthylphénol (p-chlorocrésol) (n° CAS 59-50-7)** : cette substance est en évaluation dans le cadre de la réglementation biocide. Par conséquent, il n'y a pas lieu de réaliser une ERS liée à la présence du chlorocrésol dans les produits de consommation.

**4-tert-octylphénol (n° CAS 140-66-9)**: Les seules données de concentration disponibles sont issues de la BNPC et concernent des produits cosmétiques, dont l'évaluation n'entre pas dans le champ de la saisine, et une colle pour laquelle il est uniquement fait mention d'octylphénol, sans précision supplémentaire sur l'isomère employé. De plus, le 4tOP a été inscrit sur la liste des substances candidate à l'annexe XIV du règlement REACH. Ce dispositif vise à ce que chaque utilisation de certaines substances parmi les plus préoccupantes pour la santé et l'environnement soit soumise à une autorisation afin de permettre son contrôle strict. A terme, une fois qu'une substance est incluse à l'annexe XIV, elle ne peut plus être fabriquée/importée/utilisée sans autorisation de la Commission européenne. Aucune ERS liée à la présence du 4-tert-octylphénol dans les produits de consommation ne sera conduite.

**4-nitrophénol (n° CAS 100-02-7)** : La réalisation d'une ERS liée à la présence du 4-nitrophénol dans des produits de consommation n'apparaît pas pertinente du fait de l'absence de données permettant de quantifier les expositions liées aux usages identifiés grand public.

**DEGME (n° CAS 111-77-3)** : Les données permettant de mener une ERS ne sont disponibles que pour les usages (cf. tableau 1) pour lesquels le DEGME est déjà réglementé et restreint à 0,1% massique en composition, aussi, pour ces usages, il n'y a pas lieu de réaliser une ERS. En revanche, si des données nouvelles permettant de quantifier les expositions à des usages non concernés par la restriction sont identifiées, l'Agence considérera alors l'éventualité de réaliser une ERS pour les expositions grand public et les usages professionnels concernés.

**4-tert-butylphénol (n° CAS 98-54-4)** : Le 4-tert-butylphénol est utilisé comme intermédiaire de synthèse dans la fabrication des résines phénoliques et époxydes et des polycarbonates. Parmi les usages identifiés, des données de composition sont disponibles pour seulement les colles et les textiles. Pour l'usage colle, il existe une évaluation de risque européenne (2008), qui conclut en l'absence de risque pour le consommateur. Pour l'usage textile, des travaux sont en cours à l'Agence en réponse à la saisine n°2014-SA-0237.

**4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5)** : Le 4-nonylphénol entre dans la composition des mélanges de nonylphénols pour lesquels une restriction d'usage à 0,1% massique appliquée depuis 2005, dans des articles grand public (nettoyants industriels et domestiques, traitement des textiles et du cuir, industrie du papier et carton, cosmétiques et autres produits d'hygiène, formulants ou coformulants de pesticides et biocides, émulsifiants de produits agricoles, produits pour l'usinage des métaux). Cette substance est inscrite également au Corap en 2014. Un nouveau dossier de restriction concernant la mise sur le marché de textiles contenant des nonylphénols ou des éthoxylates de nonylphénol est en cours). Pour les autres usages du 4-nonylphénol identifiés non concernés par la réglementation REACH (colles, peintures, vernis, matières plastiques), les données disponibles sont insuffisantes pour quantifier les expositions des consommateurs (absence de données de composition). L'Agence ne conduira pas d'ERS en lien avec une exposition dans des produits de consommation, du fait de l'absence de données permettant de quantifier ces expositions.

De plus, les nonylphénols ont été inscrits sur la liste des substances à inclure à l'annexe XIV pour les procédures d'autorisation. Ce dispositif vise à ce que chaque utilisation de certaines substances parmi les plus préoccupantes pour la santé et l'environnement soit soumise à une autorisation afin de permettre son contrôle strict. A terme, une fois qu'une substance est incluse à l'annexe XIV, elle ne peut plus être fabriquée/importée/utilisée sans autorisation de la commission européenne. Compte tenu de ces éléments, il n'y a pas lieu de réaliser une ERS pour ces produits.

A noter que cette substance est mesurée dans l'Etude de l'Alimentation Totale infantile (EATi) en cours de réalisation et fera donc l'objet d'une ERS dans les aliments.

Au total, les publications et autres sources d'informations disponibles ne rapportent pas de données suffisantes, sur les dangers ou/et les expositions pour les usages considérés dans la présente expertise, pour conduire une évaluation quantitative des risques sanitaires (ERS) pour les six substances.

De plus, trois substances, le 4-*tert*-octylphénol (n° CAS 140-66-9), le DEGME (n° CAS 111-77-3) et le 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5), font déjà l'objet d'un encadrement réglementaire au niveau européen, ce qui conduit *de facto* à limiter, voire à exclure, l'exposition des consommateurs. Dans ces conditions, l'Agence considère qu'il n'est pas pertinent de conduire une ERS pour ces trois substances.

Par ailleurs, l'Agence prend acte du fait qu'en l'état actuel des discussions au niveau européen sur les critères de perturbation endocrinienne, les experts ne peuvent pas se prononcer sur le caractère perturbateur endocrinien des 6 substances investiguées. Lorsque les critères de perturbation endocrinienne auront été précisés dans la réglementation européenne, les données relatives à ces substances pourront être ré-analysées et une conclusion quant au caractère perturbateur endocrinien éventuel de ces substances pourra être proposée.

Une demande de classification pour la toxicité sur la reproduction et le développement pourra être proposée pour 3 de ces substances dès lors que de nouvelles données permettant de confirmer un effet éventuel sur la reproduction et le développement auront pu être recueillis (par exemple : 4-*tert*-octylphénol, 4-nitrophénol et 4-chloro-3-méthylphénol ou *p*-chlorocrésol). Il convient dans ces conditions de procéder à une veille bibliographique pour les composés de la famille des phénols.

**Marc MORTUREUX**

## **MOTS-CLES**

*4-méthyl-3-chlorophénol ou chlorocrésol (n° cas 59-50-7), 4-nitrophénol (n° CAS 100-02-7), 4-tert-octylphénol (n° CAS 140-66-9), DEGME (ou 3-méthoxy éthoxy éthanol) (n° CAS 11-77-3), 4-ter-butylphénol (n° CAS 98-54-4), 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5), effets santé, reprotoxicité, développement, fertilité, valeurs toxicologiques de référence.*

## **BIBLIOGRAPHIE**

Anses (2014) Méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances perturbatrices endocriniennes et/ou reprotoxiques dans les produits de consommation. Rapport d'expertise collective, Maisons-Alfort.

Bian, Q.; Qian, J.; Xu, L.; Chen, J.; Song, L.; Wang, X. The toxic effects of 4-tert-octylphenol on the reproductive system of male rats. *Food and Chemical Toxicology* 2006, 44[8]; 1355-1361.

Blake, C. A. and Boockfor, F. R.: Chronic administration of the environmental pollutant 4-Tertoctylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, folliclestimulating hormone, prolactin, and testosterone. *Biology of Reproduction* 1997, 57[2]; 255-266.

Harazono, A. and Ema, M: Effects of 4-tert-octylphenol on initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats. *Toxicology Letters* 2001, 119[1]; 79-84.

Kim SK, Lee HJ, Yang H, Kim HS, Yoon YD (2004) Prepubertal exposure to 4-tert-octylphenol induces apoptosis of testicular germ cells in adult rat. *Arch Androl* 50, 427-441.

Koizumi M, Yamamoto Y, Ito Y, Takano M, Enami T, Kamata E, Hasegawa R (2001). Comparative study of toxicity of p-NTP and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol 26, No5, 299-311.

*Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. Toxicol Sci. 54(1):154-67.*

Moon HJ, Han SY, Shin JH, Kang IH, Kim TS, Hong JH, Kim SH, Fenton SE. (2007) Gestational exposure to nonylphenol causes precocious mammary gland development in female rat offspring, *Journal of reproduction and development*, 53(2):333-44.

Nagao T, Wada K, Marumo H, Yoshimura S, Ono H. (2001) Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study, *Reproductive Toxicol*, 15(3):293-315.

*OECD: PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-CAS N°: 140-66-9;SIDS Initial Assessment Report. National SIDS Contact Point in Sponsor Country:Mr Georg KARLAGANIS-MEYER. 1995, Switzerland, OECD.*

*Plasterer MR, Bradshaw WS, Booth GM, Carter MW (1985). Developmental toxicity of nine selected compounds following prenatal exposure in the mouse: naphthalene, p-nitrophenol,*

sodium selenite, dimethyl phthalate, ethylenethiourea, and four glycol ether derivatives. *Journal of toxicology and environmental health*, 15:25-38.

Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG (2003) Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol*. 37, 4543-4553.

Rudel RA, Dodson RE, Perovich LJ, Morello-Frosch R, Camann DE, Zuniga MM, Yau AY, Just AC, Brody JG (2010) Semivolatile endocrine-disrupting compounds in paired indoor and outdoor air in two northern California communities. *Environ Sci Technol*. 44, 6583-6590.

Schmidt, A., Walker, G., Hoffmann, W., Hostrup, O., et Butte, W. Chlorkresol (4-Chlor-3-methylphenol) im Hausstaub: Ergebnisse eines repräsentativen Monitorings Chlorocresol (4-chloro-3-methylphenol) in house dust: results of a representative monitoring. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft A*. 62[n° 3], 95-98. 2002.

Scortichini BH, John-Greene JA, Quast JF, Rao KS. Teratologic evaluation of dermally applied diethylene glycol monomethyl ether in rabbits. *Fundam Appl Toxicol*. 1986 Jul;7(1):68-75.

Tyl, R. W.; Myers, C. B.; Marr, M. C.; Brine, D. R.; Fail, P. A.; Seely, J. C.; Van Miller, J. P.: Two-generation reproduction study with para-tert-octylphenol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1999, 30[2 II]; 81-95. European Chemicals Agency. Information on chemicals - Registered substances - Chemical Substance Search (2011).  
<http://apps.echa.europa.eu/registered/registered-sub.aspx#search>.

UE. European Union Risk Assessment Report: p-tert-butylphenol. 2008.

Kavlock RJ (1990). Structure-activity relationships in the developmental toxicity of substituted phenols: In vivo effects. *Teratology*, 41:43-59.

Woo GH, Shibutani M, Ichiki T, Hamamura M, Lee KY, Inoue K, Hirose M. (2007) A repeated 28-day oral dose toxicity study of nonylphenol in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol*. 81(2):77-88.

Yoshida M, Katsuda S, Takenaka A, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicol Lett*. (2001) 121, 21-33.

Zhang HY, Xue WY, Li YY, Ma Y, Zhu YS, Huo WQ, Xu B, Xia W, Xu SQ. (2014). Perinatal exposure to 4-nonylphenol affects adipogenesis in first and second generation rats offspring. *Toxicol Lett*. 3 ; 225(2):325-32.

ANNEXES

Annexe 1 : Synthèse des doses et des effets critiques issues de données expérimentales.

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
4-chloro-3-méthylphénol ( <i>p</i> -chlorocrésol) (n° CAS 59-50-7)	Rats, voie cutanée, 13 semaines	Toxicité générale	NOAEL = 500 mg/kg de pc/j	Aucun effet	Bayer, 1991a
	Rats, in-utéro GD6-GD15	Développement in-utero	NOAEL maternel = 30 mg/kg de pc/j  NOAEL développement intra-utérin = 100 mg/kg de pc/j	- A 100 mg/kg de pc/j : Respiration difficile, baisse de consommation alimentaire et d'eau, du gain de poids, et polyurie.  - A 300 mg/kg/j : Baisse du poids moyen fœtal par portée, et légère augmentation significative du nombre de cas de microphtalmies et d'anophtalmies.	Bayer, 1991b
4-nitrophénol (n° CAS 100-02-7)	Voie orale, gavage, souris CD-1 gravides, traitées de GD1 à GD14, dose unique.	Développement in-utero	LOAEL 400mg/Kg/j	Survie des souris traitées abaissée de 19 % versus témoins. Pas de diminution du nombre moyen de petits vivants par portée, du poids à PND1 et PND3, et de l'indice de reproduction (nombre de femelles ayant eu des petits / nombre de	Plasterer <i>et al.</i> , 1985

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
				femelles gravides survivantes).	
	Voie orale, gavage, rates gravides, une seule administration, à GD 11. Doses : 0, 100, 333, 667, 1000 mg/kg	Développement in-utero	NOAEL : 333 mg/kg	- Pas de modification de la viabilité, du poids corporel à PND1 – PND 6 postnataux à 333 mg/kg. -Pas de malformations manifestes ni de malformation de la queue, et du système urogénital.	Kavlock <i>et al</i> , 1990
	Voie orale, gavage, rats nouveaux nés, PND 4 à PND 21 Doses : 0, 80, 110, 160 mg/kg	Période périnatale	NOAEL : 110 mg/kg/j	-Pas de modification de la séparation préputiale ou de l'ouverture vaginale. - Pas de modification du poids des organes (cerveau, glande pituitaire, foie, reins, testicules, épидидyme, ovaires, et utérus) - pas de modification biologique ou biochimique du sang.	Koizumi <i>et al</i> . 2001
	Voie orale, gavage pendant 28j, rats de 5-6 semaines, exposés pendant 28 j  Doses : 60, 160, 400,	Période post-natale tardive	NOAEL : 400 mg/kg/j	A 1000 mg/kg/j : 5/6ème des animaux morts (bradypnée, position prostrée ± convulsions)  -Pas de modification du	Koizumi <i>et al</i> . 2001

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
	1000 mg/kg/j			<p>poids corporel des organes ou de la consommation alimentaire</p> <p>-Pas de modification des paramètres hématologiques, biochimiques, et urinaires</p> <p>Seule modification pathologique significative = forte incidence de corps éosinophiles dans les cellules tubulaires proximales des reins. (Effet spécifique aux rats selon les auteurs)</p>	
	<p>Rats pré-pubères de 21j exposés pendant 14j par inj. s/c</p> <p>Doses : 0.01, 0.1, 1, et 10 mg/kg/j</p>	Période pré-pubère		Concentration de LH diminuée, et celle de prolactine augmentée dans tous les groupes de doses	Li <i>et al.</i> , 2009
		Période pré-pubère	LOAEL= 0.01 mg/kg/j	Baisse significative de la concentration de FSH, et augmentation significative de la corticostérone	Li <i>et al.</i> , 2009
		Période pré-pubère	LOAEL = 0.1 mg/kg/j	Baisse significative de la concentration de FSH, et augmentation significative de l'inhibine	Li <i>et al.</i> , 2009
		Période pré-pubère	LOAEL = 10 mg/kg/j	Augmentation significative	Li <i>et al.</i> , 2009

**Avis de l'Anses**  
Saisine n° «2009-SA-0331»

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
				de la concentration plasmatique de testostérone, et de prolactine.	
<b>4-tert-octylphénol (n° CAS 140-66-9)</b>	Voie orale (gavage), pendant 30 jours aux doses de 0, 50, 150, 450 mg/kg/j. rat SD mâles adultes.	Effets sur la fertilité et la reproduction	NOAEL (toxicité sur la reproduction) = 150 mg/mg/kg pc/j,	Diminution du poids brut des organes reproducteurs et des paramètres spermatiques (numération et production spermatique) à 450mg/kg pc/j.	Bian <i>et al.</i> (2006)
	Voie orale (gavage), pendant 60 jours aux doses de 0, 25, 50, 125 mg/kg/j.  Rats SD adultes.	Effets sur la fertilité et la reproduction	NOAEL (toxicité sur la reproduction) = 125 mg/kg/j.  NOAEL (toxicité systémique) = 50 mg/kg/j,	Aucun effet observé sur les organes reproducteurs, aucun anomalie histologique testiculaire ou épidydimaire.  Diminution du poids corporel statistiquement significative à la dose de 125 mg/kg/j.	Gregory <i>et al.</i> (2009)
	Voie orale (gavage) pendant 25 jours aux doses de 0, 20, 100, 200 mg/kg/j.  Rats femelles adultes Long Evans.	Effets sur la fertilité et la reproduction	NOEL (effets sur la reproduction) = 100 mg/kg/j,	Diminution du nombre de cycles de 4 à 5 jours et augmentation de la durée du dioestrus à 200 mg/kg/j.  Effets systémiques non étudiés.	Laws <i>et al.</i> (2000)
	Voie orale (via l'alimentation) sur deux générations aux doses	Effets sur la fertilité et la reproduction	NOAEL (pour les effets systémiques et postnataux) = 200	Baisse du poids corporel et du gain de poids corporel des parents (F0 et F1) et	Tyl <i>et al.</i> (1999)

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
	<p>de 0, 0.2, 20, 200, 2000 ppm.</p> <p>Rats femelles SD.</p>		<p>ppm (soit de 1,05 à 3,2 mg/kg/j).</p> <p>NOAEL (effet sur la reproduction) = 2000 ppm (soit de 111 à 369 mg/kg/j).</p>	<p>des adultes de la génération F2 à 2000 ppm. Diminution du poids corporel des femelles des générations F0 et F1 à 2000 ppm pendant la période de lactation. Baisse statistiquement significative du poids (relatif et absolu) de l'utérus chez les femelles F0 exposées à 2000 ppm.</p> <p>Retard de l'ouverture vaginale et de la séparation du prépuce chez les petits F1 et F2 (attribué selon les auteurs à la diminution du poids corporel) à 2000 ppm.</p> <p>Etude sur deux générations de type OCDE 416 et ligne directrice de l'US EPA (870.3800 OPPTS).</p>	
	<p>Voie orale (gavage) pendant 2 semaines avant l'accouplement, 2 semaines pendant la période d'accouplement, et 4</p>	<p>Effet sur le développement</p>	<p>NOAEL (effet sur la reproduction/ développement) = 250 mg/kg/j.</p>	<p>A la dose de 500 mg/kg/j : Diminution des performances sexuelles, baisse de la fertilité chez les mâles, diminution du taux d'implantation et</p>	<p>Rapport SIDS, OCDE (1995)</p>

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
	jours en post-partum aux doses de 0-125-250-500 mg/kg pc/j.			augmentation de la mortalité pré et postnatale, diminution de la taille des portées.  En présence d'une forte toxicité maternelle.  Conduit selon la ligne directrice OCDE 421.	
	Voie orale (intubation gastrique) pendant la gestation GD0-GD8 aux doses de 0-15,6-31,3-62,5-125-250-500 mg/kg pc/j.  Rats femelles wistar.	Effet sur le développement	NOAEL (effet sur le développement) = 15,6 mg/kg/j,	Augmentation statistiquement significative de l'incidence de pertes post-implantatoires par portée à la dose de 31,3 mg/kg/j.	Harazono <i>et al.</i> (2001)
	Voie orale (gavage) de PND1 à PND5 à des concentrations de 0-12,5-25-50-100 mg/kg/j (huile de maïs).  Rats adultes wistar.	Effet sur le développement	NOAEL (effets de toxicité systémique) = 12,5 mg/kg/j  NOAEL (effet sur le développement)=100 mg/kg/j.	Diminution statistiquement significative du poids corporel observé à partir de 25 mg/kg/j.  Aucun effet observé sur le développement de l'appareil reproducteur mâle et femelle. Aucun effet postnatal précoce sur la fonction de reproduction (accouplement et fertilité).	Nagao <i>et al.</i> (2001)

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
<b>DEGME (ou 2-(méthoxyéthoxy)éthanol) (n° CAS 11-77-3)</b>	Voie cutanée du 6ème jour au 18ème jour de gestation. Lapins NZ	Effet lié à une exposition prénatale	50 mg/kg/j	Retards d'ossification, Apparition d'ostéophytes cervicaux et des retards d'ossification de l'os hyoïde.  NOAEL <sub>tm</sub> : 250 mg/kg/j.	Scortichini <i>et coll</i> , 1996
<b>4-tert-butylphénol (n° cas 98-54-4)</b>	Voie orale (gavage). Rat Sprague Dawley	Développement pré et postnatal	NOAEL (toxicité systémique) = 60 mg/kg pc/j  NOAEL (toxicité sur la reproduction) = 200 mg/kg pc/j parental	Toxicité systémique observée chez les femelles (dyspnée) à 200 mg/kg pc/j et chez les mâles F0, (modifications biologiques) à partir de 60 mg/kg pc/j. Absence d'effet reprotoxique jusqu'à la dose maximale testée de 200 mg/kg pc/j. Étude de screening de type OCDE 422 avec une exposition de 4 semaines approximativement chez les mâles et exposition 14 jours avant l'accouplement chez les femelles jusqu'au 4ème jour de lactation	MHW, 1996 cité dans ECHA, 2011 et CE, 2008.
	Voie orale (nourriture) traitement sur 2-génération. Rat Sprague Dawley	Développement pré et postnatal	NOAEL (reprotoxicité)= 70 mg/kg pc/j NOAEL (toxicité systémique)= 70	Diminution du nombre d'implantations et du nombre de petits vivants par portée, de la taille de la portée et du poids de la	Clubb and Jardine 2006 cité dans CE, 2008.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
			mg/kg pc/j	<p>portée ainsi que du gain de poids de la portée à 600 mg/kg pc/j chez les F0 et les F1.</p> <p>Diminution Poids des petits et du poids de la portée à 600 mg/kg pc/j chez les F1 et à partir de 200 mg/kg pc/j chez les F0.</p> <p>Chez les F2, Diminution du poids des petits et du gain de poids des portées à partir de 200 mg/kg pc/j à PND 14 ainsi que de la taille des portées et du poids des portées à 600 mg/kg pc/j.</p> <p>Diminution pendant la lactation de PND1-4, du nombre de petits viables observée à 600 mg/kg pc/j (6 portées atteintes) chez les F0.</p> <p>Effets ovariens, atrophie vaginale observée à partir de 200 mg/kg pc/j.</p>	

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
				<p>Retard de l'âge à l'ouverture vaginale (retard de 3j) et de la séparation préputiale (retard de 4j) à 600 mg/kg pc/j chez les F1.</p> <p>Modification du cycle oestral chez les F0 avec une prépondérance de femelles en pré-oestrus.</p> <p>Diminution du poids des surrénales et des ovaires à partir de 200 mg/kg pc/j chez les femelles</p> <p>Etude OCDE de type 416</p>	
<b>4-nonylphénol</b> (n° CAS 104-40-5)	Nonylphénols ramifiés (n°CAS 90481-04-2 et 84852-15-3), Voie orale (gavage dans l'huile de maïs), du 15ème au 19ème jour de gestation, rat	Effet lié à une exposition prénatale.	LOAEL = 10 mg.kg pc-1.j-1	Développement précoce de la glande mammaire chez les F1.	Moon <i>et al.</i> , 2007
	Nonylphénols linéaires (n°CAS 104-40-5 et 25154-52-3), Voie orale (gavage dans l'huile de maïs), exposition sur 2	Effet lié à une exposition périnatale	NOAEL = 10 mg.kg pc-1.j-1	Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce, diminution du poids absolu et relatif des ovaires sans atteintes histologiques chez les femelles F1	Nagao <i>et al.</i> , 2001

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° «2009-SA-0331»**

Substances	Conditions d'exposition (substance, véhicule, voie, durée du traitement, période d'exposition, espèce)	Types d'effets	Doses critiques	Effets critiques	Références
	génération de manière continue de la première dose administrée aux F0 jusqu'à l'autopsie des F2 (PND21), rat			Diminution du nombre de petits par portée et du nombre de sites d'implantation dans la génération F2	
	Nonylphénols ramifiés (n°CAS 84852-15-3), voie orale (gavage dans l'huile d'olive), 28 jours, rat	Marqueurs de perturbation endocrinienne	NOAEL = 10 mg.kg pc-1.j-1	Augmentation du poids absolu et relatif de la thyroïde chez les mâles, faible Augmentation de la LH sérique chez les femelles	Woo <i>et al.</i> , 2007

---

**Profil toxicologique**  
**4-tert-octylphénol (n° CAS 140-66-9)**

---

**Saisine n°2009-SA-0331**

**RAPPORT**  
**d'expertise collective**

**Comité d'Experts Spécialisés «Caractérisation des dangers des substances et  
valeurs toxicologiques de référence »**

**Groupe de Travail «Perturbateurs endocriniens»**

**septembre 2015**

## Mots clés

---

4-tert-octylphénol, effets santé, reprotoxicité, développement, fertilité, valeurs toxicologiques de référence.

### Avis et limitations de ce profil toxicologique

L'organisation de ce profil toxicologique et sa structure ont été élaborées et discutées dans le groupe de travail des perturbateurs endocriniens. L'objectif poursuivi est d'établir des profils toxicologiques sur la base des derniers rapports publiés par des organismes nationaux et de la littérature récente afin d'identifier des études clés pouvant servir à l'évaluation du risque sanitaire. Ce profil n'a pas été rédigé dans l'intention d'être intégré dans un profil toxicologique plus général. Au final, l'usage de ce document est destiné prioritairement à évaluer les effets reprotoxiques et/ou PE du 4-ter-octylphénol. C'est pourquoi l'organisation des sections de profil est propre aux documents issus de ces travaux.

## Présentation des intervenants

**PRÉAMBULE :** Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, intuitu personae, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

### **GRUPE DE TRAVAIL « PERTURBATEURS ENDOCRINIENS »**

---

#### **Président**

M. Claude EMOND – Université de Montréal, Canada

#### **Vice-président**

M. Jean-Pierre CRAVEDI - Directeur de Recherche - INRA

#### **Membres**

M. Jean-Philippe ANTIGNAC - Ingénieur analyste - ONIRIS, LABERCA

Mme Martine APPLANAT-Directeur de Recherche – INSERM.

M. Brice APPENZELLER - Responsable de laboratoire de biomonitoring - Centre de Recherche Public en Santé, Luxembourg

M. Rémy BEAUDOUIN-Chargé de Recherche - INERIS.

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche – Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, INRA

Mme Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER-Chargé de Recherche -INRA.

M. Nicolas CHEVALIER-Médecin endocrinologue-Praticien hospitalier- CHU de Nice.

Mme Cécile CHEVRIER –Chargé de Recherche -INSERM.

Mme Martine CLAUW - Toxicologue-vétérinaire - INPT/ENVT, Université de Toulouse

Mme Elisabeth ELEFANT - Médecin spécialisé en tératologie humaine - Centre de référence sur les Agents tératogènes - AP-HP hôpital Armand Trousseau, Paris

Mme Florence EUSTACHE - Médecin - CECOS, AP-HP, Hôpital Jean Verdier, Paris

M. René HABERT - Professeur des universités - Université Paris Diderot

Mme Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI - Directeur de Recherche – INSERM

Mme Sakina MHAOUTY- KODJA - Directeur de Recherche – CNRS.

M. Christophe MINIER - Ecotoxicologue - Université du Havre

M. Luc MULTIGNER - Médecin épidémiologiste – INSERM

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340.

M. Patrick THONNEAU - Médecin - INSERM

Mme Catherine VIGUIE – Vétérinaire – Directrice de Recherche INRA

### **COMITE D'EXPERTS SPECIALISE**

---

CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence ».

#### **Président**

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue.

#### **Vice-président**

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, pilote de la thématique reproduction et travail à l'INRS – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

## Membres

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal – Chimiste toxicologue, VLEP

M. Sylvain BILLET – Enseignant chercheur / maître de conférence en toxicologie à l'Université du Littoral Côte d'Opale – Toxicologie respiratoire, nanomatériaux

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Pharmacien toxicologue, toxicologie générale - VTR

Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire

M. François CLINARD – Epidémiologiste à l'Institut de Veille Sanitaire – Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

Mme Fatiha EL-GHISSASSi – Scientifique, Section des Monographies de IARC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à l'Institut de Veille sanitaire – Docteur es science en biochimie, toxicologie, VLEP

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Guillaume GARCON – Professeur de toxicologie à l'Université de Lille 2 – Toxicologie générale, cancérologie, modèles expérimentaux, toxicologie respiratoire, pollution atmosphérique

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants - Anses – Laboratoire de Fougères- Toxicologie, génotoxicité, nanomatériaux

M. Karim MAGHNI – Professeur sous octroi agrégé à l'Université de Montréal – Toxicologie, immunologie, asthme, allergies, nanomatériaux

Mme Véronique MALARD – Ingénieur chercheur en toxicologie au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Centre de Marcoule. – Toxicologie « in vitro », biologie cellulaire, nanotoxicologie, protéomique.

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue au Service de santé des armées

M. Jean-Paul PAYAN – Chef du laboratoire Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme à l'INRS, Nancy – Pharmacien toxicologue, toxicocinétique

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine - Pharmacien biologiste - Neurotoxicité, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Alain SIMONNARD – Chef de département à l'INRS, Nancy - Pharmacien toxicologue, toxicologie générale et reprotoxicité, anatomopathologie

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève – Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

Mme Lydie SPARFEL – Professeur à l'Université de Rennes 1 / IRSET 'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail' UMR INSERM 1085– Pharmacien Toxicologue, immunotoxicologie, toxicogénomique, cancérologie, biologie cellulaire et moléculaire

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité.

## **PARTICIPATION ANSES**

---

### **Coordination scientifique**

M. François POUZAUD – Chef de projet scientifique – Anses

Mme Fatoumata SISSOKO – Chargée de projet scientifique – Anses

### **Contribution scientifique**

M. François POUZAUD – Chef de projet scientifique – Anses

Mme Fatoumata SISSOKO – Chargée de projet scientifique – Anses

### **Secrétariat administratif**

Mme Séverine BOIX-PETRE – Assistante – Anses

## SOMMAIRE

<b>3.1 Propriétés physico-chimiques du 4tOP</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2 Synthèse du 4tOP</b> .....	<b>13</b>
<b>7.1 Absorption</b> .....	<b>18</b>
<b>7.2 Distribution</b> .....	<b>18</b>
<b>7.3 Métabolisme</b> .....	<b>19</b>
<b>7.4 Elimination</b> .....	<b>19</b>
<b>7.5 Modèle PBPK</b> .....	<b>20</b>
<b>8.1 Toxicité sur la reproduction et le développement</b> .....	<b>21</b>
8.1.1 Données animales .....	21
8.1.1.1 Effets sur la fertilité et la reproduction .....	21
8.1.1.2 Effets sur le développement.....	35
8.1.2 Données humaines .....	50
<b>8.2 Activité oestrogénique, androgénique et thyroïdienne</b> .....	<b>50</b>
8.2.1 Données écotoxicologiques ou relatives aux effets observés sur la faune sauvage .....	56
<b>8.3 Toxicité par doses répétées : subaiguës ou subchroniques</b> .....	<b>57</b>
8.3.1 Données animales .....	57
8.3.2 Données humaines .....	58
<b>8.4 Cancérogénicité</b> .....	<b>58</b>
9.1.1 Hépatotoxicité .....	60
9.1.2 Sensibilisation .....	61
9.1.3 Génotoxicité .....	61

## Abréviations

BMD :	Benchmark dose
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DES :	Diéthylstilbestrol
EE2 :	Ethinylestradiol
E2 :	Oestradiol
IARC :	International Agency for Research on Cancer
FSH :	Hormone folliculo-stimulante (Follicle Stimulating Hormone)
GD :	Gestational day
GT :	Groupe de travail
LH :	Hormone lutéinisante (luteinizing hormone)
LOAEL :	Lowest observed adverse effect level
NOAEL :	No observed adverse effect level
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PND :	Postnatal Day (jour postnatal)
PRL :	Prolactine
RfD :	Dose de référence
UF :	Uncertainty factor (facteur d'incertitude)
U.S EPA :	United States Environmental Protection Agency
VTR :	Valeur Toxicologique de Référence

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Identité de la substance	11
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du 4tOP	12
Tableau 3 : Demi-vie d'élimination (SVHC, 2011)	19
Tableau 4 : Résultats de l'étude de Sharpe <i>et al.</i> 1995	39
Tableau 5 : Synthèse des tests utérotophiques et test d'Hershberger	53
Tableau 6 : Évaluation de l'activité œstrogénique du 4tOP : essais de prolifération sur cellules cancéreuses de glandes mammaires	54
Tableau 7 : Évaluation de l'activité œstrogénique du 4tOP : interactions avec les récepteurs aux œstrogènes	55
Tableau 8 : Évaluation de l'activité endocrinienne : interaction récepteurs AR et PR	55

## Liste des figures

Figure 1 Voies métaboliques du 4tOP chez le rat (Nomura et al., 2008)	19
---	----

# 1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

Afin d'évaluer la toxicité du 4tOP, notamment sur la fonction de reproduction et le système endocrinien, l'Anses a conduit une recherche bibliographique (cf. Annexe I, liste des sites consultés).

Les articles répertoriés ont été répartis de la manière suivante :

- articles rapportant les résultats d'études épidémiologiques ou des études de cas chez l'homme : « données humaines »
- articles rapportant les résultats d'études expérimentales réalisées sur l'animal de laboratoire et apportant des informations sur les effets potentiels de la substance sur la fonction de reproduction et la fonction endocrine (par exemple, études de reprotoxicité, de toxicité chronique ou subchronique, de cancérogenèse) : « étude *in vivo* »
- articles rapportant les résultats d'études *in vitro* (modèles cellulaires, organotypiques...) ou *in silico* (QSAR...) susceptibles d'apporter des informations sur le mécanisme d'action de la substance en lien avec les effets potentiels de la substance sur la fonction de reproduction et la fonction endocrine : « étude *in vitro* »

Par ailleurs, en plus des études publiées dans la littérature, l'Anses a pu avoir accès à certains rapports d'études soumis dans un cadre réglementaire (REACH, Biocides...). Ces études sont soumises à confidentialité ; elles sont citées et décrites dans cette fiche.

Les rapports d' « études *in vivo* » ont été analysés selon une grille de lecture commune préalablement établie et validée par le groupe de travail.

## 2 Présentation de la substance

L'élément de base d'un alkylphénol est un noyau phénolique sur lequel est fixé, généralement en position *para*, une chaîne aliphatique, un radical octyl, nonyl, ou dodécyl. Les alkylphénols dont le radical est à neuf atomes de carbone, c'est-à-dire les nonylphénols, constituent environ 80% des alkylphénols en usage et les octylphénols (8 atomes de carbone) constituent l'essentiel des 20% restants (Berryman\* *et al.*, 2011)<sup>1</sup>. Le 4-tert-octylphénol (4tOP), également appelé 1, 1, 3, 3-tétraméthyl-4-butylphénol, appartient à la famille des alkylphénols.

En fonction de la position du radical octyl sur le noyau phénolique, plusieurs isomères peuvent être distingués. Le mélange d'isomères est défini sous le terme générique d'octylphénols.

En conditions ambiantes, le 4tOP est un solide, peu soluble dans l'eau et non volatil.

Dans le cadre de la présente saisine, seul l'isomère 4tOP portant le numéro CAS n° 140-66-9 est étudié. Il s'agit de l'isomère le plus commercialisé et entrant majoritairement dans la composition des mélanges d'octylphénols (Ineris\*, 2006).

Le 4tOP entre dans le champ de la saisine de par sa classification en tant que perturbateur endocrinien potentiel de catégorie 1 (PE 1) selon les données européennes du BKH et du DHI (BKH, 2002 ; DHI, 2007).

L'Anses a été saisie par la Direction générale de la Santé en date du 9 juin 2009 afin de réaliser une évaluation des risques pour la santé du consommateur en contact avec une liste de substances dites perturbatrices endocriniennes ou reprotoxiques de catégorie 3. A cette date, la réglementation applicable, en termes de classification et d'étiquetage des substances dangereuses, était la directive européenne 67/548/CEE<sup>2</sup>.

En 2008, le règlement CLP <sup>3</sup>(règlement (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 (JOUE L 353 du 31 décembre 2008)) a introduit dans l'Union européenne le nouveau système général harmonisé de classification et d'étiquetage ou SGH. La classification et l'étiquetage des substances, harmonisés selon les deux systèmes (règlement et directive 67/548/CEE) figurent dans l'annexe VI dudit règlement CLP et coexistent jusqu'en 2015. Le règlement CLP remplace la classification préexistante des substances CMR par une nouvelle classification. Ainsi les anciennes catégories 1,2 ou 3, pour les CMR de la directive 67/548/CEE, sont remplacées par les catégories 1A, 1B ou 2.

De même, le terme « préparation » utilisé dans la directive 67/548/CEE est remplacé par le terme « mélange » dans le règlement CLP. Par conséquent la classification et les termes utilisés dans les différents documents, rapports, notes d'expertise collective et avis, sont ceux en vigueur dans le cadre du règlement CLP n° 1272/2008.

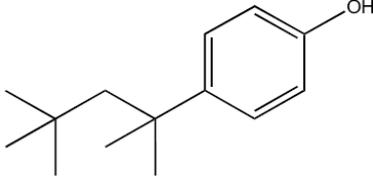
<sup>1</sup> Les références annotées du symbole « \* » sont extraites d'une étude réalisée pour le compte de l'Anses et dans le cadre strict de la saisine par le prestataire extérieur Néodyme

<sup>2</sup> Directive Européenne 67/548/CEE du 27 juin 1967 du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses

<sup>3</sup> Classification, Labelling and Packaging

### 3 Identité de la substance

Tableau 1 : Identité de la substance

<b>IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE</b>	
<b>Numéros CAS</b>	140-66-9
<b>Numéro CE (EINECS)</b>	205-426-2
<b>Nom</b>	4tOP
<b>Synonymes<sup>4</sup></b>	1,1,3,3-tétraméthyl-4- butylphénol p-(1,1,3,3-Tétraméthylbutyl)phénol 4-(1,1,3,3-Tétraméthylbutyl)phénol p-tert-octylphénol 4tOP
<b>Famille chimique</b>	Alkylphénols
<b>Formule brute</b>	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
<b>Formule semi développée</b>	

<sup>4</sup> La terminologie anglo-saxonne des synonymes a été utilisée

### 3.1 Propriétés physico-chimiques du 4tOP

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du 4tOP

Paramètre	Valeur	Valeur expérimentale ou modélisée	Référence <sup>5</sup>
Forme physique (à T° ambiante)	Solide Blanc	-	[2], [5], [7], [6], [9]
Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	206,33	Non Précisé	[1], [3], [5], [9], [10]
Point d'ébullition (°C)	Entre 280 et 283 à 1013 hPa	Valeurs expérimentales	[4], [8], [9], [10]
Point de fusion (°C)	Entre 79 et 82	Valeurs expérimentales	[1], [6], [8], [9], [10]
Point éclair coupelle ouverte (°C)	80	Valeurs expérimentales	[8]
Point éclair coupelle fermée (°C)	Compris entre 84 et 85	Valeurs expérimentales	[5]
Limite Inférieure d'Explosivité (LIE)	145	Non Précisé	[4], [6], [8]
Limite Supérieure d'Explosivité (LSE)	147	Non Précisé	[8]
Pression de vapeur saturante	0,0021 hPa à 20°C	Non Précisé	[8], [9]
	4,7 (Pa) à 74°C	Non Précisé	[3]
Concentration à saturation (mg.m <sup>-3</sup> )	0,18 à 20°C	Calculée	Calculée à partir de [8] [9]
Densité vapeur (air=1)	10,7 hPa à 150°C	Non Précisé	[6]
Densité liquide	0,95	Non Précisé	[8], [10]
Facteur de conversion	1 ppm = 8,44 mg.m <sup>-3</sup>	Non Précisé	[7]
Solubilité dans l'eau (g.L <sup>-1</sup> )	0,19 à 20°C	Valeur expérimentale	[4], [8], [9], [10], [11]
Log Kow	3,7-5,3	Non Précisé	[3], [4], [5], [9], [10], [11]

<sup>5</sup> [1] 4-tert-Octylphenol .Online Database of Chemicals from Around the World. Chemblink. Disponible sur : [www.chemblink.com/products/140-66-9.ht](http://www.chemblink.com/products/140-66-9.ht)

[2] : Fiche de Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. "Octylphenols". INERIS. 30 mars 2006 ; [3] : Portail des substances chimiques. 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol. INERIS. Date de mise à jour : 17 février 2004. <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/29>

[4] SIDS Initial Assessment Report. PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL). OECD SIDS. Février 1995

[5] : Etude de l'analyse des Alkylphénols. Rapport final. INERIS. Février 2005

[6] : Fiche de Données Sécurité du 4tOP. SIGMA-ALDRICH. Fiche mise à jour le 13 mars 2010

[7] : CSST - Service du répertoire toxicologique.p-tert octylphénol.[http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no\\_produit=141614&nom=p%2Dtert%2DOctylphenol](http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=141614&nom=p%2Dtert%2DOctylphenol)

[8] : UCLID Dataset, 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol. OECD SIDS, European chemicals bureau. 2000.

[9] : Screening-level hazard characterization, Alkylphenols Category. Hazard Characterization Document. U.S. Environmental Protection Agency September. 2009

[10] : Environmental Risk Evaluation Report: 4-tert-Octylphenol. Environment Agency (UK), D Brooke, I Johnson, R Mitchell and C Watts. Avril 2005 [11] : Prioritisation of Alkylphenols for Environmental Risk Assessment. D Brooke, M Crookes, I Johnson, R Mitchell & C Watts. Environment Agency (UK)

Paramètre	Valeur	Valeur expérimentale ou modélisée	Référence <sup>5</sup>
Koc (L.kg <sup>-1</sup> )	2740-19953	Non Précisé	[3]

### 3.2 Synthèse du 4tOP

En conditions de température et de pression ambiantes (à 20°C et 101,3 kPa), le 4tOP est un composé solide blanc, peu soluble dans l'eau (Ineris\*, 2006). Sa synthèse implique une réaction d'alkylation (Friedel-Crafts) entre le phénol et le diisobutène (Ashford\*, 2001 ; Kirk et Othmer\*, 2007).

## 4 Réglementation

Le 4tOP est concerné par :

- La directive 67/548/CEE et le règlement (CE) n°1272/2008 (CLP),
- Le règlement n° 1907/2006 (REACH),
- La directive 67/548/CEE du 27 juin 1997 et le Règlement (CE) n°1272/2008 ou CLP (Classification, Labelling, Packaging) du 16 décembre 2008 concernant la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances dangereuses.

Le 4tOP figurait dans l'annexe I de la directive 67/548/CEE qui regroupe les substances dangereuses dont la classification et l'étiquetage ont fait l'objet d'une décision européenne rendue obligatoire par un vote des Etats membres.

Dans le cadre de la mise en place du Système global harmonisé (SGH), le règlement (CE) n°1272/2008, ou CLP, définit au sein de l'Union européenne les obligations concernant la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges. Le classement des substances dangereuses qui figurait dans l'annexe I de la Directive 67/548/CEE figure désormais dans l'annexe VI du règlement CLP.

Dans le cadre du règlement CLP, les fabricants et importateurs doivent notifier les classifications et les étiquetages des substances qu'ils mettent sur le marché (articles 39 à 42 du règlement CLP). Toutes ces notifications sont regroupées dans une base de données qui constitue l'inventaire des classifications et étiquetages, tenue par l'ECHA<sup>6</sup>. Cette notification s'applique à toutes les substances mises sur le marché dans l'UE :

- si elles sont classées dangereuses, quelles que soient les quantités
- si elles ne sont pas classées « dangereuses » mais soumises à l'obligation d'enregistrement conformément au règlement REACH.

Bien qu'il ne s'agisse pas de la classification harmonisée, cet inventaire constitue une source centrale d'informations sur la classification et l'étiquetage des substances pour tous les utilisateurs de produits chimiques.

**Attention, tous les notifiants n'ont pas forcément classé cette substance avec l'ensemble de ces classes de danger. Il s'agit d'une compilation des différentes classifications proposées par un ou plusieurs déclarants dans cet inventaire.**

Inventaire des notifications des autotaxonomies pour le 4tOP :

- H312 : Nocif par contact cutané.
- H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
- H315 : Provoque une irritation cutanée.
- H318 : Provoque des lésions oculaires graves.
- H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
- H400 : Très toxique pour les organismes aquatiques
- H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

<sup>6</sup> <http://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/cl-inventory-database>

- Le Règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) (CE) n° 1907/2006 du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances.

Le 4tOP fait partie des substances enregistrées avant le 1<sup>er</sup> décembre 2010 dans le cadre du règlement REACH. Le ou les dossiers d'enregistrement traités pour le 4tOP sont disponibles sur le site de l'ECHA après suppression des renseignements confidentiels.

En tant que « substance of very high concern » (SVHC), le 4tOP est également inscrit sur la liste candidate des substances soumises à autorisation.

## 5 Valeurs toxicologiques de référence existantes

Aucune VTR ni DJT (Dose Journalière Tolérable) n'a été proposée ou n'est à notre connaissance en cours d'élaboration par un organisme reconnu.

## 6 Evaluations européennes ou internationales

Ce chapitre liste les rapports disponibles sur les évaluations de risque, la réglementation ou classification du 4-tert-octylphénol.

Cf rapport DHI 2007

- OECD (1995) : Phenol, 4-1,1,3,3-tetramethylbutyl (SIDS Initial Assessment Report)
- European Commission (2002) : Study on the scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupter priority list of actions
- Environmental Agency (UK, 2006) : Environmental risk assessment report
- ECHA (2011) : le Comité des Etats membres de l'ECHA a identifié le 4tOP comme substance extrêmement préoccupante. Il est donc inscrit sur la liste candidate des substances soumises à autorisation. Le 4tOP a été identifié comme SVHC en raison de ses propriétés de perturbateur endocrinien causant probablement des effets préoccupants pour l'environnement.

## 7 Toxicocinétique

Deux études conduites chez le rat (Certa *et al.*, 1996 et Upmeier *et al.*, 1995) ont été décrites dans le rapport de la Commission européenne publié en 2002. Depuis, d'autres données (notamment les études de Hamelin *et al.*, 2008 ; Hamelin *et al.*, 2009 et Hamelin *et al.*, 2010 ) complètent et approfondissent les connaissances sur la toxicocinétique du 4tOP.

### 7.1 Absorption

Les études chez le rat montrent que le 4tOP est absorbé rapidement après une administration par voie orale (Certa *et al.*, 1996 ; Upmeier *et al.*, 1999 ; Hamelin *et al.*, 2008). Pour les doses de 50 et 200 mg/kg, la biodisponibilité a été évaluée à 2% et 10%, respectivement, chez les rats mâles Wistar, dans l'étude de Certa *et al.* (1996), et à 12,3% et 8,4%, respectivement, chez les rats femelles DA/Han, dans l'étude de Upmeier *et al.* (1999). Pour des doses de 50, 125 et 250 mg/kg, Hamelin *et al.* (2009) ont trouvé des valeurs de biodisponibilité de 38, 28 et 26%, respectivement, chez les rats mâles Sprague-Dawley, et 46, 55 et 48%, respectivement, chez les femelles.

Les études par injection intraveineuse sur les souches de rat Wistar et DA/Han montrent que la concentration plasmatique du 4tOP décroît rapidement (Certa *et al.*, 1996 ; Upmeier *et al.* 1999). Pour une dose injectée de 5 mg/kg pc, la concentration peut atteindre 1600 ng/ml immédiatement après injection, 100 ng/ml après une heure et 1-2 ng/ml après 48 h.

Les différences de concentrations plasmatiques observées après une administration par voie orale de 4tOP entre la souche de rat DA/Han (Upmeier *et al.*, 1999) et la souche Wistar (Certa *et al.*, 1996) (estimées par les courbes de concentrations en fonction du temps) indiquent un cycle entéro-hépatique plus important chez cette dernière.

### 7.2 Distribution

Dans l'étude de Certa *et al.* (1996), des rats Wistar ont été exposés par gavage, pendant 14 jours aux doses de 50 et 200 mg/kg pc/j. Plusieurs organes et tissus ont été analysés (cerveau, foie, poumon, rein, testicules, muscle et graisses) (3 animaux sur 5). A 50 mg/kg pc/j, le 4tOP est distribué principalement dans les graisses (concentration moyenne : 10 ng/g de tissu) et dans le foie (concentration moyenne : 7 ng/g de tissu). A 200 mg/kg pc/j, le 4tOP est détecté dans l'ensemble des tissus analysés, excepté dans les testicules, selon le classement des concentrations tissulaires suivant : graisse > foie > rein > muscle > cerveau > poumon.

Dans l'étude de Hamelin *et al.*, (2009), la cinétique du 4tOP dans les tissus a été étudiée pour les voies orale et intraveineuse à dose unique et à doses répétées. Vingt-quatre heures après exposition à une dose unique de 4tOP (125 ou 250 mg/kg pc) par voie orale, les concentrations tissulaires les plus élevées sont mesurées dans le foie, les graisses, les reins et les ovaires. Les muscles présentaient les concentrations les plus faibles. Les concentrations tissulaires obtenues 24 h après la fin d'une exposition répétée par voie orale à 125 mg/kg pc/j sont similaires à celles observées 24 h après une exposition unique. La distribution tissulaire du 4tOP a également été évaluée après l'injection intraveineuse d'une dose unique (4 ou 8 mg/kg pc). Les concentrations les plus élevées sont observées dans les graisses, puis les ovaires et testicules alors que les concentrations les plus faibles sont mesurées dans les muscles et l'utérus.

## 7.3 Métabolisme

Le 4tOP est rapidement métabolisé principalement dans le foie mais également dans une moindre mesure dans l'intestin, le rein et les testicules (Nomura *et al.*, 2008).

La conjugaison du 4tOP par les UDP-glucuronyltransférases et les sulfotransférases en dérivés glucuronides et sulfates a été démontré *in vitro* sur fractions hépatiques de rat. Selon les auteurs, la conjugaison est la principale voie de détoxification (Certa *et al.* (1996)).

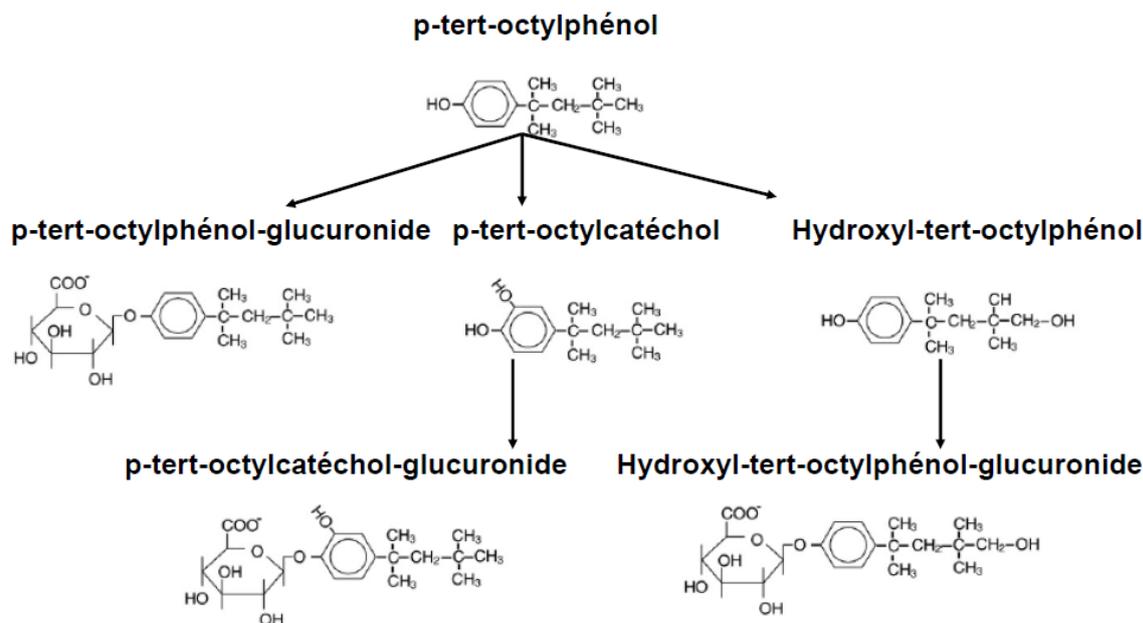


Figure 1 Voies métaboliques du 4tOP chez le rat (Nomura *et al.*, 2008)

## 7.4 Elimination

Le tableau ci-dessous présente une synthèse des demi-vies d'élimination du 4tOP retrouvée dans les publications. Ce tableau souligne les différences de toxicocinétique pouvant être observées dans les études en fonction des souches et du genre (mâle ou femelle) des rats utilisés.

Tableau 3 : Demi-vie d'élimination (SVHC, 2011)

Espèce	Dose	t <sub>1/2</sub>	Référence
Voie orale (gavage)			
Rat Da/Han femelle	Dose unique (50, 200 mg/kg pc)	90 min	Upmeier <i>et al.</i> , 1999
Rat Sprague Dawley mâle	Dose unique (50, 125 et 250 mg/kg pc)	5 h 8,5 h 16,6 h	Hamelin <i>et al.</i> , 2009
Rat Sprague Dawley femelle	Dose unique (50, 125 et 250 mg/kg pc)	8,3 h 10,6 h 37,9 h	Hamelin <i>et al.</i> , 2009

Injection intraveineuse			
Rat Wistar mâle	5 mg/kg pc	5,2 h	Certa <i>et al.</i> , 1996
Rate Da/Han femelle	5 mg/kg pc	36,1 h	Upmeier <i>et al.</i> , 1999
Rat Sprague Dawley mâle	2 mg/kg pc	2,1 h	Hamelin <i>et al.</i> , 2009
	4 mg/kg pc	1,1 h	
	8 mg/kg pc	1,2 h	
Rat Sprague Dawley femelle	2 mg/kg pc	2,4 h	Hamelin <i>et al.</i> , 2009
	4 mg/kg pc	1,7 h	
	8 mg/kg pc	1,6 h	

## 7.5 Modèle PBPK

Le modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) développé par **Hamelin *et al.* (2010)**, permet de décrire l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion du 4tOP suite à une exposition par voie orale, sous-cutanée et intraveineuse chez le rat Sprague-Dawley. Il comporte 6 compartiments : le foie, les tissus richement perfusés, les tissus faiblement perfusés, tissus adipeux, les testicules ou l'utérus et l'espace sous-cutanée.

Quatre heures après l'administration de 4tOP par voie orale à dose unique de 50, 125 ou 250 mg/kg pc, le modèle PBPK de Hamelin *et al.* (2010) prédit des concentrations sanguines de 53, 134 et 271 ng/ml chez le mâle et de 87, 221 et 449 ng/ml chez les femelles. Le modèle prédit également des concentrations sanguines de 4tOP d'environ 7, 14 et 28 ng/ml chez les mâles et de 7, 15 et 31 ng/ml chez les femelles 4 h après une injection intraveineuse d'une dose unique de 2, 4 ou 8 mg/kg pc, respectivement. Enfin, 4 h après l'administration d'une dose unique de 4tOP (125 mg/kg) par voie sous-cutanée, le modèle prédit des concentrations sanguines de 111,3 ng/ml chez les mâles et de 121,6 ng/ml chez les femelles. Des simulations ont également été faites pour prendre en compte l'exposition répétées au 4tOP. Le modèle prédit des concentrations sanguines de 59,8 et 150,6 ng/ml chez les mâles et de 98,2 et 248,5 chez les femelles 4 heures après 33 (femelle) et 57 (mâle) administrations orales de 50 et 125 mg/kg pc.

Des concentrations spécifiques à certains tissus ont également été prédites par le modèle. Ainsi, 4 h après l'administration par voie orale de 4tOP (dose unique : 125 et 250 mg/kg pc) les concentrations prédites par le modèle dans chaque organe sont :

- dans le foie : 937 et 1885 ng/mg de tissu chez les mâles ainsi que 1531 et 3108 ng/mg de tissu chez les femelles
- dans les tissus adipeux : 1360 et 2761 ng/mg de tissu chez les mâles ainsi que 2420 et 4949 ng/mg de tissu chez les femelles
- dans les testicules : 369 et 744 ng/mg de tissu.
- dans l'utérus : 163 et 331 ng/mg d'utérus.

Les concentrations sanguines et tissulaires de 4tOP prédites dans le modèle de Hamelin *et al.* (2010), varient de manière importante entre les deux sexes. Selon les auteurs, ceci se traduit dans le modèle par une valeur de la  $V_{max}$  pour le métabolisme environ 2 fois plus élevée chez les mâles par rapport aux femelles.

La comparaison des données issues de l'expérimentation animale et celles issues du modèle (Hamelin *et al.*, 2009) montre des différences variant de 7 à 40%. Le modèle semble surestimer les données issues de l'expérimentation animale.

## 8 Effets sur la toxicité de la reproduction et/ou effets de perturbation endocrinienne

### 8.1 Toxicité sur la reproduction et le développement

#### 8.1.1 Données animales

De nombreuses études ont investigué les effets du 4tOP sur la reproduction et le développement. Ces études se différencient par les protocoles utilisés (voies d'exposition, souche, âge au stade de développement, nombre d'animaux par groupe, etc.) ainsi que par les effets analysés (paramètres spermatiques, hormones, cycle œstral, poids et histologie des organes reproducteurs etc.). A noter qu'un nombre important d'études ne suit pas de protocole standardisé.

##### 8.1.1.1 Effets sur la fertilité et la reproduction

##### Etudes chez le mâle adulte ou prépubère : (appareil reproducteur mâle)

##### **Exposition par voie orale**

**Bian et al. (2006)** ont investigué les effets testiculaires du 4tOP chez des rats Sprague-Dawley mâles adultes (12 animaux /groupe de dose) exposés par gavage à des doses de 0, 50, 150 et 450 mg/kg pc/j pendant 30 jours (alimentation sans soja).

Les rats ont été pesés à la fin de chaque semaine. Les poids des organes reproducteurs (testicules, épидидyme, prostate) ont également été mesurés à la fin de l'exposition. Un examen histologique des testicules a été réalisé (sur 8 rats/groupe) ainsi que le dosage enzymatique de marqueurs testiculaires (phosphatase acide (ACP), phosphatase alcaline (ALP), lactate déshydrogénase (LDH),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT), glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et sorbitol déshydrogénase (SDH). La production spermatique journalière (exprimée en nombre de spermatozoïdes par gramme de tissu) et l'analyse des paramètres du mouvement des spermatozoïdes à l'aide d'un système CASA ont été évaluées.

Aucun effet statistiquement significatif sur le poids corporel moyen des animaux n'a été observé chez les groupes exposés au 4tOP. Une diminution statistiquement significative du poids absolu des testicules a été observée à 450 mg/kg pc/j (2,73 g  $\pm$  0,3 vs 2,90 g  $\pm$  2,90 pour le groupe contrôle, soit une diminution d'environ 6%). A 450 mg/kg pc/j, une diminution statistiquement significative du poids absolu (pas de poids relatif donné) de l'épididyme et de la prostate par rapport au groupe contrôle a également été relevée (diminution de 17% pour épидидyme et de 40% pour la prostate).

L'examen histopathologique a révélé des altérations au niveau du testicule, telles qu'une diminution de la taille des tubules séminifères, des perturbations de l'organisation des cellules avec une diminution du nombre de cellules germinales, chez les rats exposés à la dose de 450 mg/kg pc/j. Selon les auteurs, ces atteintes morphologiques sont dose-dépendantes. L'analyse en microscopie électronique révèle la présence de vacuoles intracellulaires, des anomalies de l'hétérochromatine et une expansion du réticulum endoplasmique (notamment au sein des cellules de Sertoli).

A 450 mg/kg/j, une diminution statistiquement significative de la réserve spermatique testiculaire ( $100 \cdot 10^6$  versus  $150 \cdot 10^6$  (contrôle) spermatozoïdes/g de testicule) ainsi qu'une réduction significative de la production spermatique journalière ( $16 \cdot 10^6 \text{ j}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  versus  $25 \cdot 10^6 \text{ j}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  (contrôle)) ont été observées (le nombre de rats/groupe de dose n'est pas précisé). Les mouvements des

spermatozoïdes (VSL et LIN<sup>7</sup>) sont aussi significativement diminués pour le groupe 450 mg/kg/j. Des modifications de certains paramètres du mouvement des spermatozoïdes ont été rapportées à savoir :

- une diminution significative de la linéarité de la trajectoire (LIN) à la dose de 450 mg/kg pc/j
- une diminution significative de la vitesse de progression linéaire aux doses de 150 et 450 mg/kg pc/j).

Les dosages des marqueurs testiculaires a montré une diminution significative de l'activité de l'ALP à 450 mg/kg pc/j (moyennes  $\pm$  SD :  $3,23 \pm 0,99$  vs  $4,00 \pm 0,73$  pour le groupe contrôle).

**Les auteurs indiquent que, d'après la publication de Bian *et al.* (1995), le dénombrement des têtes des spermatozoïdes et la réserve spermatique sont des indicateurs pour mesurer de manière quantitative les effets sur la spermatogenèse. Sur cette base, les auteurs concluent que l'exposition à 450 mg/kg pc/j de 4tOP perturbe la spermatogenèse. A noter que l'article est peu précis. Par exemple, les auteurs ne fournissent pas le nombre de rats sur lesquels ils évaluent certains paramètres.**

**Dans le rapport SVHC de l'ECHA, un NOAEL pour la reprotoxicité de 150 mg/kg pc/j est proposé sur la base des effets sur la diminution du poids brut des organes reproducteurs et de la modification des paramètres spermatiques (numération et production spermatique, déplacements) observées à 450 mg/kg/j.**

**Hossaini *et al.* (2003)** ont conduit une étude dont l'objectif est de comparer chez deux souches de rats mâles, Fischer et Wistar, les effets induits par des expositions orales au 4tOP sur le poids corporel, le poids des organes, la numération spermatique, les concentrations sériques de plusieurs hormones (LH, FSH, testostérone, prolactine et inhibine B) et l'histologie des testicules.

**40 rats** mâles Fischer et **40 rats** mâles Wistar, âgés de 8 semaines, ont été répartis entre les 3 groupes de doses suivants (la substance est administrée tous les lundis, mercredis et vendredis pendant 1 mois) : véhicule seul (huile d'arachide), 400 mg/kg pc de 4tOP (pureté 99,5%) administré par gavage et 40  $\mu$ g/kg pc de benzoate d'œstradiol administré par voie sous-cutanée (contrôle positif).

A la fin de l'exposition, plusieurs organes ont été prélevés puis pesés (foie, les reins, glandes surrénales, testicules, épидидyme gauche, prostate ventrale, vésicules séminales et muscle releveur de l'anus/bulbo-caverneux). Un test TUNEL<sup>8</sup> a été utilisé comme indicateur de la fragmentation de l'ADN des cellules germinales testiculaires.

Aucun effet sur le poids corporel<sup>9</sup> des rats exposés au 4tOP n'a été observé chez les deux souches. En revanche, l'exposition des rats au benzoate d'œstradiol induit une diminution statistiquement significative du poids corporel chez les animaux des deux souches (rats Fischer : 250 g versus 200 g chez les témoins négatifs ; rats Wistar : 340 g versus 400 g chez les témoins).

Concernant le poids relatif des organes, une augmentation significative des poids relatifs du foie et des reins a été observée chez les deux souches de rats exposés par voie orale au 4tOP et au benzoate d'œstradiol. De plus, l'exposition au 4tOP induit une augmentation statistiquement significative du poids relatif des glandes surrénales uniquement chez le rat Fischer (+43%). Une diminution statistiquement significative du poids relatifs du muscle élévateur de l'anus/bulbo-caverneux a été observée dans les deux souches de rats (-10%). En revanche, une diminution du

<sup>7</sup> LIN=VSL/VCL, LIN étant l'indice de linéarité, VSL la vitesse de propagation en ligne droite et VCL la vitesse de propagation curviligne

<sup>8</sup> TUNEL = marquage des brins d'ADN avec la terminale déoxynucléotidyl transférase pour incorporer des nucléotides modifiés à l'extrémité 3'-OH des fragments d'ADN. Cette technique permet la détection de la fragmentation de l'ADN lors des processus apoptotiques.

<sup>9</sup> A noter que les données individuelles des poids corporels des animaux ne sont pas rapportées (histogramme)

poids relatif des vésicules séminales a été mise en évidence seulement chez le rat Fischer (-20%). Aucune modification du poids relatif des testicules, de l'épididyme et de la prostate n'a été observée suite à l'exposition au 4tOP, contrairement au benzoate d'œstradiol qui induit une diminution du poids des testicules (-73% chez les rats Wistar et -31% chez les rats Fischer), de l'épididyme gauche (-57% chez les rats Wistar et -78% chez les rats Fischer), et de la prostate ventrale (-14% chez les rats Wistar et -12% chez les rats Fischer).

Aucun effet sur la réserve spermatique épидидymaire n'a été noté chez les rats (Fischer et Wistar) exposés au 4tOP. A noter que les données ne sont pas présentées dans l'article.

L'exposition des deux souches de rats au 4tOP n'induit aucune modification significative des concentrations sériques en testostérone, FSH, de LH et de l'inhibine contrairement à celle du benzoate d'œstradiol qui provoque une diminution des concentrations de ces hormones. Une augmentation significative du niveau de la prolactine<sup>10</sup> a été observée chez les rats Wistar exposés au 4tOP (42% par rapport au témoin négatif) et Fischer (59% par rapport au témoin négatif). Les auteurs précisent que les valeurs physiologiques correspondent à une gamme de concentrations comprises entre 40 et 140 ng/ml chez le rat mâle (âgé de 63 - 70 jours). Ils ajoutent que ces valeurs sont en accord avec celles mesurées chez les témoins négatifs.

L'observation histologique des testicules issus de rats exposés au 4tOP ne montre pas de modifications histopathologiques pour les deux souches de rats étudiées. Une diminution statistiquement significative du nombre de cellules germinales positives au test TUNEL<sup>11</sup> dans les tubules séminifères était observée chez les animaux exposés au 4tOP (rats Wistar : 0,16 versus 0,59 chez les témoins négatif ; rats Fischer : 0,21 versus 0,45 chez les témoins négatifs).

**L'exposition des rats adultes pendant 1 mois à une dose de 4tOP de 400 mg/kg induit une augmentation des niveaux plasmatiques de prolactine, une diminution du poids du muscle élévateur de l'anus/bulbo-caverneux (dans les deux souches de rats) et une diminution du poids des vésicules séminales uniquement chez les rats Fischer. En revanche, l'administration de 4tOP n'affecte pas le poids relatif des autres organes reproducteurs, la concentration spermatique et les niveaux sériques de la testostérone, la FSH, la LH et l'inhibine. Selon les auteurs, les effets progressifs sur le poids et histologie des testicules et les effets sur le poids des vésicules séminales induits par l'exposition au benzoate d'œstradiol indiquent que la souche Fischer semble être la plus sensible aux effets induits par l'œstradiol.**

**Gregory *et al.*, 2009** ont conduit une étude chez le rat Sprague-Dawley adulte, (n=10/groupe) dans laquelle des rats Sprague-Dawley adultes ont été exposés oralement par gavage au 4tOP à 0, 25, 50 et 125 mg/kg/j (véhicule, propylène glycol). Dans cette étude, deux groupes témoins ont été inclus : l'un a reçu une solution saline (contrôle) et l'autre du propylène glycol (véhicule). Aucuns effets sur le poids brut (n=5/groupe) des organes reproducteurs (testicules, épидидyme,

<sup>10</sup> De plus, les auteurs indiquent que le stress peut dans certains cas influencer les niveaux de prolactine. Or, les animaux ont été sacrifiés suite à une anesthésie/asphyxie avec du dioxyde de carbone. Cette procédure est susceptible d'induire un stress chez les animaux. Cependant, dans ce cas on s'attend à ce que les effets sur les niveaux de prolactine soient similaires chez les animaux traités et témoins négatifs.

<sup>11</sup> Le nombre de cellules positives pour la technique TUNEL a été déterminé à partir de 70 tubules choisis de manière aléatoire sur une section représentative par rat (n=8 rats)

vésicules séminales et prostate ventrale) et aucune anomalie histologique testiculaire et épидидymaire<sup>12</sup> n'ont été mises en évidence après une exposition pendant 60 jours.

A la fin de la période d'exposition, une diminution statistiquement significative du poids corporel (n=10/groupe) est observée seulement à la plus forte dose (125 mg/kg/j). Aucun effet sur la réserve spermatique épидидymaire n'a été observé après l'exposition au 4tOP. Toutefois, à la dose de 50 mg/kg/j, une diminution significative non dose-dépendante (-13%) du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de spermatozoïdes progressifs a été relevée (pourcentage de spermatozoïdes immobiles : 28% versus 15,7 % chez les témoins).

**Ainsi, selon les résultats de cette étude, l'exposition chronique du rat adulte au 4tOP n'induirait pas d'altérations majeures sur l'appareil reproducteur mâle. Un NOAEL pour la reprotoxicité de 125 mg/kg/j et un NOAEL pour la toxicité systémique de 50 mg/kg/j (pour la diminution du poids corporel observée à 125 mg/kg/j) peuvent être dérivés de cette étude.**

**Blake et al. (2004)** ont recherché les effets du 4tOP sur le système reproducteur mâle chez le rat Fischer 344 adulte âgé de 2 mois (n=12 rats/groupe). Les rats adultes ont été traités pendant 4 mois via l'eau de boisson à 0,  $1.10^{-9}$ ,  $1.10^{-7}$  et  $1.10^{-5}$  M (soit 0,02-0,035 ; 2-3,5 et 200-350 µg/kg pc/j, doses calculées sur la base de la prise d'eau des animaux). Deux études ont été conduites. Dans la première, il s'agit de rats intacts (n=6/groupe) alors que dans la seconde, les rats ont été castrés à la fin de la période d'exposition.

La consommation d'eau et de nourriture a été évaluée (pendant les périodes de 3 jours suivantes : J0 à J3, J14 à J17, J77 à J80). Le poids corporel des animaux et l'hématocrite ont été mesurés.

Les paramètres suivants ont été rapportés :

- poids des organes (hypophyse, rein gauche, rate, testicules (droit et gauche), épидидyme gauche, vésicules séminales, prostate ventrale, glande coagulante).
- Concentrations sériques en LH, FSH et PRL.
- numération spermatique (testicules et épидидyme) et analyse de la morphologie des spermatozoïdes.
- analyse par cytométrie en flux de la ploïdie des cellules germinales.

Les effets observés sur les animaux intacts sont :

- Une diminution statistiquement significative de la réserve spermatique épидидymaire à la concentration de  $1.10^{-5}$  M, sans modification de la réserve spermatique testiculaire.
- Aux trois concentrations testées de  $1.10^{-9}$ ,  $1.10^{-7}$  et  $1.10^{-5}$  M, une augmentation statistiquement significative du nombre, par gramme de tissus, de spermatozoïdes épидидymaires anormaux (anomalies du flagelle).

**A noter qu'aucun effet n'a été observé sur le poids des organes reproducteurs, les concentrations sériques en LH, FSH et testostérone ainsi que sur la ploïdie des cellules germinales.**

**Hejmej et al. (2011)**, ont étudié les effets d'une exposition par voie orale au 4tOP sur le système reproducteur mâle des campagnols roussâtres. D'après les auteurs, cette espèce présentant un cycle de reproduction saisonnier, il s'agit d'un bon modèle pour l'étude du système reproducteur mâle (régulation physiologique de l'intensité de la spermatogenèse). Par ailleurs, plusieurs paramètres de la reproduction peuvent varier en fonction de la durée d'éclaircissement quotidienne.

Des campagnols mâles adultes (*Clethrionomys glareolus*) ont été exposés par gavage à 0 (véhicule seul, n= 12) ou 200 mg/kg de 4tOP (administré dans huile de sésame) les lundis,

<sup>12</sup> A noter que n=5 pour l'évaluation du poids des organes, les examens histologiques sur les testicules et l'épididyme ainsi que l'évaluation des paramètres spermatiques.

mercredis et vendredis pendant 30 (n=12) ou 60 jours (n=12). Ces animaux étaient issus d'une colonie exposée à des cycles photopériodiques courts (6 h d'éclairage et 18 h d'obscurité par jour) ou longs (18 h d'éclairage et 6 h d'obscurité par jour) pendant 10 générations.

L'exposition des campagnols au 4tOP pendant 30 jours n'induit pas d'effet perceptible sur les paramètres investigués dans cette étude à l'exception d'une diminution du poids relatif de la vésicule séminale<sup>13</sup> (34-40%) comparativement aux témoins. L'exposition de 60 jours une diminution du poids relatif de la vésicule séminale (64-79%) et des testicules (25%, photopériode longue).

Au niveau histologique, une désorganisation de l'épithélium séminifère et des agglomérations de spermatozoïdes/spermatides ont été observées ponctuellement dans les testicules de campagnols exposés pendant 60 jours au 4tOP ainsi que des modifications histologiques des vésicules séminales (diminution ou absence de sécrétion dans la lumière, et altération de l'organisation de l'épithélium). De plus, chez ces animaux, le nombre de cellules germinales apoptotiques dans les testicules identifiées par la technique TUNEL était deux fois plus important que chez les témoins.

Dans cette étude, les auteurs se sont également intéressés à l'expression de la 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase) et de l'aromatase, deux enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, à l'expression des récepteurs des androgènes (AR) et des œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ) et à la production de testostérone et d'œstradiol dans les testicules et les vésicules séminales. Suite à une exposition de 60 jours au 4tOP, les effets suivants ont été notés :

- une diminution de l'expression de la 3 $\beta$ -HSD (dans les cellules de Leydig) et une augmentation de l'expression de l'aromatase dans les tubes séminifères et dans les cellules épithéliales de la vésicule séminale
- une diminution de l'expression du récepteur AR dans les cellules de Sertoli et dans les cellules épithéliales et stromales de la vésicule séminale
- une augmentation de l'expression du récepteur ER $\alpha$  dans les cellules de Leydig et les cellules de la vésicule séminale.
- une diminution de la concentration en testostérone dans les testicules, (1,27 ou 0,65 ng /100 mg de tissu selon le cycle photopériodique versus 3,06 ou 1,52 ng /100 mg de tissu chez les témoins) et vésicules séminales (0,10 ou 0,04 ng /100 mg de tissu selon le cycle photopériodique versus 0,22 ou 0,15 ng/100 mg de tissu chez les témoins)
- une augmentation de la concentration en œstradiol dans les testicules (60,122 ou 14,49 pg /100 mg de tissu selon le cycle photopériodique versus 37,77 ou 4,22 pg /100 mg de tissu chez les témoins) et vésicules séminales (31,08 ou 7,03 pg /100 mg de tissu selon le cycle photopériodique versus 12,53 ou 3,70 pg/100mg de tissu chez les témoins)

Les auteurs rapportent que l'intensité des effets mentionnés ci-dessous était généralement plus importante lorsque les animaux étaient exposés à des cycles d'éclairage longs.

**Les auteurs concluent qu'une exposition chronique au 4tOP induit des altérations de l'appareil reproducteur mâle (testicules, vésicules séminales) chez le campagnol. Ces altérations comprennent : une réduction du poids relatif des testicules et des vésicules séminales associée à des modifications structurales de ces tissus, une diminution de la synthèse de testostérone concomitante à une augmentation de la production d'œstrogène endogène, une expression plus importante des récepteurs ER $\alpha$  et une expression plus faible des récepteurs AR. D'après les auteurs, ces effets seraient attribuables à une dérégulation de l'équilibre androgènes/œstrogènes. Cependant, le mécanisme sous-jacent n'est pas connu. Les auteurs suggèrent qu'une action directe du 4tOP notamment en favorisant l'apoptose des cellules germinales ou en agissant sur la morphologie des spermatozoïdes ne peut être exclue.**

Limites de l'étude : **dose unique**, alimentation « standard » (pas dépourvue de phytoestrogènes),

<sup>13</sup> D'après les auteurs, cet organe est particulièrement sensible aux substances à activité oestrogénique.

### Exposition par voie sous-cutanée

**Kim et al., (2004)** ont exposé par injection sous-cutanée des rats mâles Fischer 344 pré-pubères âgés de 4 semaines (n=5 /groupe de dose) à des doses de 0, 20, 40 et 80 mg de 4tOP (soit environ 0, 571, 1142 et 2250 mg/kg pc) dans de l'huile d'olive, 3 fois par semaine pendant 1 mois. Le valérate d'œstradiol (0,8 µg soit 22 µg/kg pc) a été utilisé comme témoin positif.

Les paramètres évalués à l'âge adulte concernaient le poids corporel, le poids des organes reproducteurs (testicule, épидидyme et vésicules séminales), le volume testiculaire, l'index gonadosomatique<sup>14</sup> ainsi que les concentrations sériques en testostérone et LH. Un examen histologique des testicules comprenant une évaluation de l'induction de l'apoptose par la détection de la fragmentation de l'ADN<sup>15</sup>, une analyse de l'expression des gènes bcl-2, bcl-x et bax (par RT-PCR). A noter que les protéines bcl-2, bcl-x et bax sont impliqués dans la régulation de l'apoptose.

Une diminution statistiquement significative du poids corporel (40%), des poids absolu (72-89%) et relatif et du volume (70-80%) des testicules (dose-dépendante), du poids de l'épididyme (66-85%) et des vésicules séminales (86-93%) est observée chez les animaux exposés aux 3 doses de 4tOP testées (n=5 rats/groupe). Les auteurs rapportent que le poids relatif des vésicules séminales chez les rats exposés au valérate d'œstradiol ne représente que 35% de celui des vésicules des animaux témoins (véhicule seul). Ces effets sont aussi associés à une réduction de la taille des organes reproducteurs et sont également notés dans le groupe exposé au valérate d'œstradiol. Les concentrations sériques de la testostérone sont diminuées dans les 3 groupes exposés au 4tOP (800-900 pg/ml versus 1400 pg/ml chez les témoins) et sans relation dose-réponse apparente, et dans le groupe exposé au valérate d'œstradiol. Concernant les concentrations sériques en LH, une augmentation est observée à 20 et 40 mg de 4tOP par rapport au témoin. En revanche les niveaux de LH chez les animaux exposés à la plus forte dose (80 mg) sont comparables à ceux des témoins négatifs et abaissés faiblement chez les animaux exposés au valérate d'œstradiol.

L'exposition au 4tOP induit des atteintes histologiques au niveau du testicule (réduction de la taille des tubes séminifères et une désorganisation des cellules de la spermatogenèse avec une diminution importante du nombre total de cellules germinales par tube associée à une absence de spermatozoïdes matures ou de spermatides au dernier stade de développement, et une présence de corps multi-nucléés et de cellules à noyaux pycnotiques).

Par ailleurs, une augmentation du nombre de cellules germinales apoptotiques a été observée dans les 3 groupes de doses ainsi que dans le groupe exposé au valérate d'œstradiol. L'apoptose concerne principalement les spermatocytes et les spermatides rondes situées à proximité de la lumière des tubes séminifères.

L'analyse PCR indique une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour la protéine bcl-xL alors que celle des ARNm codant pour les protéines bax et bcl-2 ne change pas significativement dans les groupes d'animaux soumis au 4tOP.

**Les auteurs concluent que l'exposition de rats mâle Fisher 344 (F344) prépubères (âgés de 3 semaines, poids 35.57±8.3g) à de fortes doses de 4tOP induit des altérations de la taille et/ou de la fonction des organes reproducteurs (observée à partir de 20 mg de 4tOP dilué dans 0.2 ml d'huile d'olive par rat, soit 571 mg/kg pc) 20 mg de 4tOP par individu, soit 571 mg/kg pc) associées à une augmentation de l'apoptose au niveau des cellules germinales et d'une diminution des concentrations de testostérone. A noter que les effets sur les organes reproducteurs sont observés en présence d'une toxicité systémique (diminution poids corporel).**

**Blake et Boockfor (1997)**, ont étudié la toxicité chronique du 4tOP chez des rats Fischer 344 âgés de 8 semaines (poids des rats environ 200g au début de l'exposition). Le rats ont été

<sup>14</sup> Indice gonadique = (poids du testicule/poids corporel) × 100

<sup>15</sup> Utilisation de la Technique Tunel (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling*)

exposés par injections sous-cutanée<sup>16</sup>, à des doses 0, 20 ou 80 mg/rat<sup>17</sup>, approximativement 39 mg et 167 mg/kg p.c./jour, calculé avec une masse moyennes 219 et 205 respectivement sur la base de 3 injections par semaine (lundi, mercredi et vendredi), pendant 1 mois (n=12 rats/groupe de dose). Un autre groupe fut exposé pendant 2 mois ou encore exposé pendant 2 mois aussi 20 et 80 mg/rat soit approximativement 38 mg et 171 mg/kg p.c./jour calculé avec une masse moyennes 225 et 200 respectivement, aussi calculé sur la base de 3 injections par semaine (lundi, mercredi et vendredi) dilué dans l'huile de maïs (pureté 98,1% ; véhicule : huile de maïs) Un groupe contrôle positif est inclus par administrations de valérate d'œstradiol à raison de 0,8 et 8 µg/rat (soit 2,6 et 26 µg/kg pc). Deux groupes de témoins négatifs ont également été inclus dans cette étude : rats non traités ou traités au véhicule seul.

Six ou cinq rats/groupe ont été sacrifiés 1 à 3 jours après l'injection de la dernière dose alors que l'autre moitié (également 5-6 rats/groupe) a subi une orchidectomie. Ces derniers n'ont reçu aucun traitement pendant 3 semaines suivant l'orchidectomie puis ont été sacrifiés. Les paramètres suivants ont été évalués :

- Poids corporel (intervalle de 3 jours)
- Prise de nourriture (par cage ; intervalle de 3 jours)
- Poids des organes suivants : rate, reins, hypophyse.
- Concentrations sériques : LH, FSH, PRL (prolactine) et testostérone.
- Concentrations dans la glande pituitaire antérieure : LH, FSH et PRL
- Hématocrite
- Poids et examens histologiques des organes reproducteurs : testicule gauche, épидидyme gauche, vésicule séminale et prostate ventrale
- Numération spermatique et analyse de la morphologie des spermatozoïdes.

<sup>16</sup> Plusieurs sites d'injection au niveau de la nuque ou de la région inguinale

<sup>17</sup> Selon EU, 2002 ces valeurs correspondent respectivement à 30 et 160 mg/kg/j

Les résultats suivants ont été observés :

Espèce/sexe /n	Durée de l'exposition	Doses	Résultats	Références
Rat mâle Fischer (11 semaines) n=5-6/groupe	25-28 jours (1 mois) 54-61 jours (2 mois) avec 3 administrations par semaine.  Contrôle positif : 0.8 µg valérate de 17 β - estradiol.	20, 80 mg/kg p.c., soit 30 mg/kg/j et 160 mg/kg/j.	<p><b><u>A 20 mg/ kg p.c. (30 mg/kg/j) :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution du poids corporel des animaux (2 mois).</li> <li>- Diminution du nombre de spermatozoïdes par gramme de testicule (2 mois).</li> <li>- Augmentation significative des anomalies de la tête et du flagelle des spermatozoïdes.</li> </ul> <p><b><u>A 80 mg/kg p.c. (160 mg/kg/j) :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution statistiquement significative du poids corporel final (12-18% chez les animaux exposés pendant 1 mois, et 24-28 % chez les animaux exposés pendant 2 mois).</li> <li>- Augmentation du poids relatif de la rate qui atteint 65% chez les rats exposés pendant 2 mois.</li> <li>- Diminution du taux d'hématocrite (exposition pendant 1 mois : 45,3 versus 48,6% pour le groupe véhicule seul ; exposition de 2 mois 43,5 versus 46,7% pour le groupe véhicule seul).</li> <li>- Diminution statistiquement significative du poids relatif des testicules, de l'épididyme, des vésicules séminales (pleines ou vides) et de la prostate ventrale (après une exposition de 1 et 2 mois).</li> <li>- Diminution statistiquement significative des concentrations sériques en LH et FSH et des concentrations hypophysaires en LH et FSH.</li> <li>- Augmentation statistiquement significative des concentrations sériques en PRL et hypophysaires en PRL</li> <li>- Diminution statistiquement significative de la concentration sérique en testostérone.</li> <li>- Diminution du nombre de spermatozoïdes par gramme de testicule.</li> <li>- Diminution significative du nombre de spermatozoïdes par gramme d'épididyme chez les animaux exposés pendant 1 mois.</li> </ul>	Blake and Boockfor, 1997, Boockfor and Blake, 1997

Selon les auteurs, les effets observés suite à l'exposition des rats mâles à 160 mg/kg pc/j (soit 80 mg de 4tOP par rat) ou à 8 µg de valérate d'œstradiol (le contrôle positif) sont comparables.

**Les auteurs concluent que l'exposition chronique du rat au 4tOP peut induire des effets néfastes sur le système reproducteur mâle. Ils suggèrent une perturbation endocrinienne via un mécanisme œstrogénomimétique.**

**Un LOAEL pour la reprotoxicité 20 mg/rat soit environ 30 mg/kg pc/j (avec 3 administrations par semaine) peut être dérivé de cette étude sur la base d'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans le testicule et de l'atteinte morphologique des spermatozoïdes.**

**Herath *et al.*, (2004) ont étudié les effets du 4tOP sur différents événements de la reproduction après une exposition post-pubertaire (52 jours après la naissance) chez le rat mâle Wistar par injection sous-cutanée. Après 5 semaines de traitement (3 mg/kg/j), les taux de testostérone plasmatique et le nombre de spermatozoïdes épидидymaires étaient significativement réduits avec le 4tOP. Les animaux exposés avaient des taux élevés de progestérone. La mobilité des spermatozoïdes n'était pas modifiée. Une augmentation du poids de la prostate ventrale et des taux élevés de l'IGF-I a été observée chez les animaux exposés.**

**Les auteurs concluent que l'exposition du jeune adulte au 4tOP altère la production de spermatozoïdes.**

### **Voie intrapéritonéale**

**Kim *et al.*, (2007) ont étudié les effets du 4tOP sur la production de testostérone et la stéroïdogenèse dans le testicule en ciblant deux périodes : juvénile et adulte. Des souris ICR mâles juvéniles âgées de 15 jours ont été exposées à 2 et 20 mg/kg pc/j par injection intrapéritonéale dans de l'huile de maïs pendant 5 jours. Des souris mâle adultes âgées de 8 semaines ont été exposées selon le même protocole à la dose de 2, 20 et 200 mg/kg pc/j. Le valérate d'œstradiol a été utilisé comme témoin positif (2 µg/kg pc/j).**

Chez les souris juvéniles exposées (5 souris/groupe), une diminution statistiquement significative du poids corporel est observée à 20 mg/kg pc/j, de même, qu'une diminution statistiquement significative du poids absolu des testicules est observée à 2 et 20 mg/kg pc/j, respectivement. Des modifications histologiques du testicule sont rapportées : réduction de la lumière des tubes séminifères, diminution du nombre de cellules germinales, présence de corps multi-nucléés et de cellules à noyau pycnotique à l'intérieur des tubes. Une diminution de 30% de la concentration de testostérone sérique est observée chez les souris juvéniles exposées à 20 mg/kg pc/j. (pas d'effet à la dose 2 mg) et une chute de l'expression des gènes de plusieurs enzymes (P450<sub>SCC</sub>, P450<sub>17α</sub> et StAR<sup>18</sup>) impliquées dans la stéroïdogenèse testiculaire est observée dans tous les groupes exposés au 4tOP avec une diminution de la StAR à 20 mg/kg pc/j, de la P450<sub>17α</sub> à 2 et 20 mg/kg pc/j et de la P450<sub>SCC</sub> qu'à 2 mg/kg/ pc/j. A noter que selon les auteurs, l'exposition au 4tOP n'altère pas l'expression de l'aromatase dans les testicules. Une diminution de la taille et du nombre de vacuoles lipidiques au sein des cellules de Leydig est rapportée chez les animaux juvéniles exposés à 20 mg/kg pc/j. En revanche, aucun des effets rapportés ci-dessus n'est observé chez les animaux adultes.

**Les auteurs montrent que le 4tOP induit une diminution de la testostérone sérique chez les animaux juvéniles et suggèrent un mécanisme d'action impliquant une altération du métabolisme et/ou du transport du cholestérol.**

<sup>18</sup> P450<sub>SCC</sub> : cholesterol side-chain cleavage enzyme ; P450<sub>17α</sub> : 17-α-hydroxylase /C<sub>17-20</sub> lyase; StAR : steroidogenic acute regulatory protein

### Exposition prénatale

**Sainath et al. (2011)** ont étudié l'hypothèse d'un effet du 4tOP, lors d'une exposition prénatale, sur la reproduction de l'animal adulte. Des rates Wistar gravides (n=8/groupe) ont été exposées par injection intrapéritonéale à la dose de 50 mg/kg pc/j (administrée dans de l'huile de maïs) à GD1, GD7 et GD14. La fertilité des progénitures mâles a été étudiée à PND100 (n=10/groupe) ainsi qu'un certain nombre de paramètres de la reproduction après la période d'accouplement (analyse de sperme, histologie des testicules, enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse testiculaire, niveaux sérique de LH, FSH et testostérone).

**Les auteurs concluent à l'absence de mortalité et de signe visible de toxicité chez les femelles gravides. Les effets rapportés chez les rats adultes exposés *in utero* sont : une diminution des performances de la reproduction, une diminution du poids relatif des testicules, de l'épididyme et des vésicules séminales (pas d'effet sur le poids corporel, le poids relatif du foie, des reins et du cerveau), des atteintes histologiques au niveau des testicules, une diminution de la réserve spermatique épидидymaire, une diminution de la viabilité et de la mobilité des spermatozoïdes une diminution de la concentration sérique en testostérone et de l'hydroxystéroïde déshydrogénase, une augmentation des concentrations sériques en LH et FSH, une chute de l'expression des gènes de plusieurs enzymes (StAR, 3 $\beta$ -HSD et 17 $\beta$ -HSD) impliquées dans la stéroïdogénèse testiculaire (mesurée par RT-PCR).**

Limites de l'étude : la voie d'administration de la substance n'est pas pertinente au regard de l'exposition humaine, dose unique.

### Etudes chez les femelles adultes (appareil reproducteur femelle)

#### Exposition par voie orale

**Laws et al. (2000)** ont étudié les effets du 4tOP sur le cycle œstral de rates adultes Long Evans (7-14/groupe) exposées pendant 25 jours :

- par gavage au 4tOP (doses : 50, 100 et 200 mg/kg/j) ou à l'éthinylestradiol (0,01 et 0,1 mg/kg/j),
- par injection sous-cutanée au 17- $\beta$ -œstradiol (5  $\mu$ g/kg/j).

Seules les femelles présentant des cycles œstraux réguliers de 4-5 jours ont été utilisées dans cette expérimentation. Des frottis vaginaux ont été réalisés quotidiennement afin de détecter toute modification des cellules épithéliales vaginales. Lorsque chez une femelle, le frottis permettait de mettre en évidence la présence d'un dioestrus prolongé de 7 jours ou plus, une analyse de progestérone dans le sang a également été réalisée afin de vérifier l'état de l'ovaire.

L'exposition orale des rates au 4tOP à la dose de 200 mg/kg/j induit une diminution du nombre de cycles de 4-5 jours (2,2 cycles de 4-5 jours versus 4,8 cycles de 4-5 jours chez les témoins) et une augmentation de la durée du dioestrus (15,6 jours versus 12,2 chez les contrôles négatifs). Des concentrations élevées en progestérone (50,89 ng/ml versus 3,73 ng/ml mesurée lors du 1<sup>er</sup> jour du dioestrus chez les témoins) ont été rapportées chez les animaux présentant un dioestrus prolongé de 7-10 jours. Des effets similaires sur le cycle œstral ont été observés dans les groupes exposés au 17- $\beta$ -œstradiol et à l'éthinylestradiol.

**Dans la mesure où cette étude est focalisée sur l'évaluation du cycle œstral, les effets systémiques ne sont pas rapportés. Partant de ce constat, les auteurs considèrent qu'un NOEL de 100 mg/kg/j peut-être dérivé de cette étude sur la base de la diminution du nombre de cycles de 4-5 jours et d'une augmentation de la durée du dioestrus observées à 200 mg/kg/j.**

**Sahambi et al. (2010)** ont investigué les effets d'une exposition subchronique au 4tOP sur le système reproducteur femelle. Les auteurs ont exposé des rates Sprague-Dawley (âgées de 35 jours ; 7 animaux par groupe de dose) au 4tOP par gavage (pureté 97%, véhicule propylène glycol (PG)) à des doses de 0, 25, 50 et 125 mg/kg pc/j ou à une solution saline (témoin négatif) ou du

PG seul une fois par jour entre 8h00 et 10h00 pendant 35-41 jours (correspondant approximativement à 7 cycles œstraux). Les femelles ont été pesées périodiquement. Le cycle œstral a été évalué (des frottis vaginaux ont été effectués tous les jours entre 7h00 et 9h00 du 14<sup>ème</sup> jour de traitement au sacrifice des animaux). Les rates ont été sacrifiées 24 h après l'administration de la dernière dose (correspond au 2<sup>ème</sup> jour du dioestrus). Le foie, les reins et les organes reproducteurs (utérus et ovaires) ont été pesés. Un examen histologique a également été effectué sur l'utérus (mesure de l'épaisseur de l'utérus et de l'endomètre, numération des glandes endométriales et mesure de l'épaisseur de l'épithélium) et les ovaires (numération des follicules ovariens). Les concentrations sériques en œstradiol ont été mesurées.

Aucun effet significatif n'a été observé sur les paramètres suivants :

- poids corporel, poids reins et foie.
- poids des organes reproducteurs (utérus et ovaires)
- concentrations sériques en œstradiol
- histologie des ovaires (morphologie et nombre de follicules ovariens)

Une diminution statistiquement significative du nombre de cycles œstraux a été observée entre le 14<sup>ème</sup> et le 36<sup>ème</sup> jour après l'exposition des rates à des doses de 25 et 125 mg/kg/j de 4tOP (par rapport aux deux groupes témoins : solution saline et propylène glycol). Aux doses de 25 et 125 mg/kg/j, il est rapporté une diminution significative de la durée de l'œstrus (en nombre de jours) par rapport aux femelles traitées au PG seul. Aucun effet significatif n'a été observé sur la durée des autres phases du cycle œstral (proestrus, metestrus et diestrus). L'examen histopathologique de l'utérus et des ovaires n'a révélé aucune modification. L'exposition subchronique des rates adultes provoque des modifications du cycle œstral. Toutefois ces altérations du cycle ne sont pas dose-dépendantes (non observées à 50 mg/kg/j). Aucun effet sur l'histopathologie et l'expression des gènes de l'utérus n'a été mis en évidence. D'après les auteurs, plusieurs études utilisant la voie sous-cutanée pour l'administration du 4tOP mettent en évidence des effets œstrogéniques à des doses inférieures ou égales à celles de cette étude. Certains paramètres physiologiques et toxicocinétique (par exemple la demi-vie du 4tOP) seraient à l'origine des différences observées selon la voie d'exposition considérée.

**Les auteurs concluent que cette étude montre une faible activité œstrogénique et de faibles effets toxiques induits par le 4tOP après une exposition par voie orale chez la rate prépubère aux fortes doses. Par ailleurs, ils notent que l'exposition des rates adultes ou sevrés à des doses de 4tOP non toxiques (ou inférieures aux doses toxiques) n'induit pas d'action œstrogénique.**

### ***Exposition par voie sous-cutanée***

**Yoshida et al., 2000** ont réalisé une étude préliminaire de toxicité répétée chez des rates Fischer 344 et Donryu exposées par gavage ou par injection sous-cutanée à 100 ou 200 mg/kg pc/j pendant 14 jours. Aucun effet sur le cycle œstral et le poids de l'utérus n'a été observée suite à l'exposition par voie orale contrairement à l'injection sous-cutanée (œstrus persistant observé pendant plusieurs jours chez les animaux des deux souches).

Dans l'étude principale, les auteurs ont investigué les effets d'une exposition de 28 jours au 4tOP sur le tractus génital de rates Fischer 344 et Donryu<sup>19</sup> (âgées de 11 semaines au début de l'exposition). Seules les femelles qui présentaient un cycle régulier ont été incluses dans l'étude et exposées par voie sous-cutanée à des doses de 0 - 12,5 – 25 – 50 – 100 mg/kg/j (dilué dans le DMSO ; n=10/groupe de dose à l'exception du groupe témoin où pour lequel n=12). Pendant la période d'exposition, les signes cliniques de toxicité et le cycle œstral ont été évalués

---

<sup>19</sup> Rat Donryu : souche de rats domestiques dont la durée du cycle oestral est de 4 jours ; de plus, il s'agit d'un bon modèle animal pour l'étude du développement des adénocarcinomes de l'endomètre dus aux œstrogènes endogènes chez l'homme.

quotidiennement. Le poids corporel des animaux a fait l'objet d'une évaluation une fois par semaine pendant la période d'exposition.

Les auteurs rapportent la présence d'abcès et/ou de croûtes au niveau des sites d'injection dans tous les groupes exposés au 4tOP, la sévérité étant dose-dépendante.

Une baisse significative du poids corporel des animaux a été rapportée dans le groupe exposé à 100 mg/kg/j. Une augmentation dose-dépendante du poids relatif de la rate a été observée à partir de 12,5 mg/kg/j en raison de l'hématopoïèse extra médullaire. Malgré l'augmentation dose-dépendante du poids relatif du foie et des reins (à partir 12,5 mg/kg/j et 25 mg/kg/j respectivement) chez les rats Fischer, aucune modification n'a été relevée lors de l'examen histopathologique de ces organes. Aucune modification histologique ou de poids n'a été notée au niveau des poumons, des glandes surrénales et de l'hypophyse. Les principaux effets rapportés sont des troubles du cycle œstral à partir de la dose de 50 mg/kg/j, chez les rates des deux souches et l'apparition d'un œstrus persistant à la dose de 100 mg/kg/j, confirmé par l'analyse des frottis vaginaux. Ces effets sur le cycle œstral dépendent à la fois de la dose et de la durée de l'exposition. Chez les rates présentant un œstrus persistant, des altérations histologiques de l'utérus sont associées à une prolifération de l'endomètre. Les données concernant le poids de l'utérus, la hauteur et/ou le nombre de cellules épithéliales de l'endomètre montrent des altérations équivoques. A partir de 50 mg/kg/j, une diminution de la concentration sérique en 17- $\beta$  œstradiol est observée chez les animaux des deux souches.

**Les auteurs concluent que l'administration de doses de 4tOP supérieures ou égales à 50 mg/kg/j par voie sous-cutanée induit des effets sur l'appareil reproducteur femelle via son activité oestrogénique. Ils suggèrent également que la cytologie vaginale est un marqueur sensible pour détecter l'activité oestrogénique de perturbateurs endocriniens chez l'adulte.**

**Blake et Ashiru (1997)** ont recherché les effets d'une exposition de l'adulte sur le cycle œstral et l'ovulation. Des rates adultes ont été exposées par injection sous-cutanée à 0, 20 et 40 mg de 4tOP 3 fois par semaines pendant deux semaines. Trois jours après le début de l'exposition puis jusqu'à la fin de l'exposition, 16 rates sur 21 exposées à 40 mg de 4tOP (statistiquement significatif) présentaient un œstrus persistant ainsi que 2 rates sur 4 exposées à 20 mg. Parmi les 16 rates montrant cet effet, 5 ont été exposées à 40 mg de 4tOP pendant 3 semaines supplémentaires. Une persistance de l'effet a été observée. En revanche, les 11 rates restantes ne montraient plus d'œstrus persistant entre 5 et 7 jours après l'injection de la dernière dose. En revanche, aucun effet du 4tOP n'est observé sur l'ovulation.

**Les auteurs concluent que le 4tOP exerce *in vivo* une activité oestrogénique chez la femelle adulte qui se traduit par des troubles du cycle œstral.**

### **Etude multigénérationnelle**

**Tyl et al. (1999)** ont recherché les effets potentiels du 4tOP sur la reproduction en effectuant une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations réalisée selon les lignes directrices de l'US EPA (870.3800 OPPTS) (correspond à la ligne directrice OCDE 416).

Dans une étude préliminaire, deux groupes de rates Sprague-Dawley, l'un composé de 22 femelles âgées de 6-7 semaines non gravides et le second de 24 femelles gravides âgées de 16-17 semaines ont été exposés au 4tOP (pureté 90,2%, dilué dans l'acétone) via l'alimentation (incorporation dans la nourriture) pendant 21 jours aux doses de 0, 500, 1000 et 2000 ppm (soit 0, 44, 92 et 203 mg/kg pc/j) (5-6 femelles par groupe). L'exposition des rates à 1000 ppm ne semble pas augmenter la mortalité prénatale (résorptions ou morts fœtales). A la dose de 2000 ppm, 2 femelles sur 6 (soit 33,3%) présentaient des portées totalement résorbées après leur sacrifice (au 21<sup>ème</sup> jour de gestation) alors que toutes les autres mères présentaient des portées viables à la fin de l'expérimentation. Les données issues des témoins historiques provenant d'études récentes de toxicité sur le développement indiquent que parmi plus de 350 femelles en gestation, aucune ne présentait de portée totalement résorbée. Selon les auteurs, l'imputabilité de cet effet à l'exposition au 4tOP n'est pas évidente.

A partir des résultats de l'étude préliminaire, les auteurs ont sélectionné les doses suivantes pour l'étude principale : 0 - 0,2 - 20 - 200 - 2000 ppm. Ces doses ont également été choisies dans le but de reproduire les effets à faibles doses observés dans l'étude de Sharpe et al. (1995).

Dans l'étude principale de toxicité pour la reproduction sur deux générations, des rats Sprague-Dawley CD sevrés constituant les parents des générations F0 et F1 ainsi que les adultes de la génération F2 (30 animaux/sexe/niveau de dose) ont été exposés via l'alimentation (incorporation dans la nourriture) à des doses de 0 ; 0,2 ; 20 ; 200 et 2000 ppm (correspondant respectivement aux doses suivantes 0 ; 0,01-0,034 ; 1,05-3,2 ; 10,9-32,6 et 111-369 mg/kg pc/j) de 4tOP. Les niveaux de doses exprimées en mg/kg pc/j varient en fonction de l'âge et du sexe des animaux ainsi que la phase de l'étude considérée. L'exposition débute 10 semaines avant l'accouplement pour les parents F0 et F1 et s'étend au-delà de la période de sevrage des F2. Le poids corporel, la prise de nourriture et les signes cliniques de toxicité ont été évalués tout au long de l'étude. Des frottis vaginaux ont été effectués durant les trois dernières semaines précédant l'accouplement. Après le sacrifice des animaux sevrés, les paramètres suivants ont été évalués :

- Poids des organes suivants : cerveau, foie, rein, thymus, glandes surrénales, ovaires, utérus, vagin, testicules, épидидyme, prostate, vésicules séminales et glandes coagulantes.
- Analyse du sperme : réserve spermatique, production spermatique journalière, nombre, mobilité et morphologie des spermatozoïdes.
- Examen histopathologique des organes reproducteurs : ovaires, oviductes, testicules, vagin, épидидyme utérus (dont le col), vésicules séminales et prostate (dont la prostate dorsale).

A 2000 ppm, les auteurs ont rapporté une baisse statistiquement significative du poids corporel et du gain de poids corporel des parents (F0 et F1) et des adultes de la génération F2. Pendant la gestation, aucun effet sur le poids corporel des femelles n'a été observé. En revanche, pendant la période de lactation, une diminution du poids corporel des femelles des générations F0 et F1 à 2000 ppm a été rapportée. L'autopsie des parents F0 et F1 et des mâles adultes de la génération F2 n'a montré aucun effet sur le poids absolu de plusieurs organes (foie, reins, glandes surrénales, rate et cerveau). Une diminution statistiquement significative du poids relatif de l'épидидyme et de l'utérus chez les parents de la génération F0 exposés à 2000 ppm a été rapportée, toutefois ces effets ne persistent pas d'une génération à l'autre. Aucun effet n'a été révélé par l'examen histologique.

Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les femelles des générations F0 et F1 exposés ou non au 4tOP pour les paramètres suivants : l'accouplement, la fertilité, les indices gestationnels, le nombre d'implantations, de petits vivants ou morts par portée, le pourcentage de pertes post-implantatoires et la durée de la gestation. Aucun effet sur le cycle œstral n'a été observé chez les femelles (adultes) des générations F0 et F1. De même, aucun effet sur l'accouplement et les indices de fertilité n'a été rapporté chez les mâles des générations F0 et F1.

Une baisse statistiquement significative (par rapport au groupe contrôle) du poids (relatif et absolu) de l'utérus a été observée chez les femelles F0 exposées à 2000 ppm. Cet effet n'a pas été retrouvé chez les F1. Aucun effet sur le poids des ovaires n'a été observé chez les femelles F0 et F1.

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le groupe contrôle et les groupes exposés chez les mâles (parents F0, F1 et adultes F2) pour les paramètres suivants :

- Poids (absolu et relatif) et histologie des organes reproducteurs : testicules, épидидyme, prostate, prostate dorsale, vésicule séminale et glandes coagulantes
- Numération spermatique (tête), production spermatique journalière, nombre, mobilité et morphologie des spermatozoïdes.

Aucun effet statistiquement significatif n'a été observé sur les paramètres fœtaux (ou petits) suivants (petits F1 et F2) :

- Pourcentage de pertes post-implantatoires par portée.

- Indice de naissances vivantes à PND0.
- Taux de survie à 4, 7, 14 et 21 jours

Une augmentation statistiquement significative du nombre de sites d'implantation par portée a été observée chez les petits F2 à 0,2 et 20 ppm.

Une baisse statistiquement significative du poids des petits par portée (comprise entre 7 et 16%) des générations F1 et F2 exposés à 2000 ppm a été observée à PND 14 et PND21 (fin de la période de lactation). Une réduction statistiquement significative du poids par portée des petits F2 a été observée uniquement chez les femelles F1 à PND21. Les auteurs de l'étude rapportent que chez les rats de cette souche, les petits commencent à s'alimenter seuls à la fin de la deuxième semaine de vie. Par conséquent, ces petits sont exposés à de fortes doses de 4tOP via l'ingestion de nourriture solide.

A 2000 ppm, des retards statistiquement significatifs (moins de 2 jours) de l'âge auquel sont survenus l'ouverture vaginale et la séparation du prépuce ont été rapportés chez les jeunes F1 et F2 (pas d'effet sur le poids corporel par portée à la naissance). Ces retards (séparation du prépuce et ouverture vaginale) seraient liés au fait que les animaux exposés à cette dose présentaient des poids corporels inférieurs (à partir de la fin de lactation) à ceux des animaux du groupe contrôle.

Les auteurs ont mesuré la distance ano-génitale des petits F2 à la naissance (recommandée par la ligne directrice lorsque des effets sur la maturation sexuelle sont observés chez les petits F1). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée chez les mâles F2. Chez les femelles F2, des différences statistiquement significatives (par rapport au groupe contrôle) ont été observées dans tous les groupes traités. A 0 ; 0,2 ; 20 ; 200 et 2000 ppm la distance ano-génitale était respectivement égale à 0,76 ; 0,79 ; 0,81 ; 0,85 et 0,79 mm. D'après les auteurs, cet effet (variations comprise entre 0,03 et 0,09 mm) n'est pas pertinent d'un point de vue biologique car les variations observées sont faibles.

**En résumé les effets rapportés dans cette étude de toxicité pour la reproduction sur 2 générations sont :**

- **une baisse du poids corporel et du gain de poids corporel des parents (F0 et F1) et des adultes de la génération F2 à 2000 ppm,**
- **une diminution du poids corporel des femelles des générations F0 et F1 à 2000 ppm pendant la période de lactation,**
- **une baisse statistiquement significative du poids (relatif et absolu) de l'utérus chez les femelles F0 exposées à 2000 ppm,**
- **un retard de l'ouverture vaginale et de la séparation du prépuce chez les petits F1 et F2 (attribué selon les auteurs à la diminution du poids corporel) à 2000 ppm.**

**Les auteurs concluent que 200 ppm est la NOAEL pour les effets systémiques et post-nataux et la NOAEL pour la reprotoxicité est supérieure à 2000 ppm.**

**Bogh et al (2001)** ont étudié les effets du 4tOP sur les paramètres de la reproduction dans une étude sur 3 générations (P0, F1 et F2) en utilisant le porc comme modèle animal. Trente truies gravides ont été exposées par injection sous-cutanée dans le cou à 0, 10, 1000 µg/kg pc/j de 4tOP de GD23 à GD85 (4 animaux/groupe de dose). Le DES a été utilisé comme témoin positif (1 µg/kg pc/j administré par injection sous-cutanée chez un animal).

A GD55, une truie dans chacun des groupes traités au 4tOP a subi une césarienne. Les truies restantes ont mis bas naturellement. Plusieurs paramètres de la reproduction ont été évalués chez les F1 pendant la croissance et la puberté. Lorsque ceux-ci ont atteint l'âge adulte, ils ont été accouplés (entre animaux de mêmes groupes de dose mais également entre animaux de groupes de dose différents).

Une femelle gravide est morte suite à une torsion d'un lobe hépatique tel que rapporté par les auteurs.

- Durée de la gestation : prolongation de la gestation statistiquement significative chez les truies de la génération F0 exposées au 4tOP (à 10 µg/kg pc/j : 116,7j versus 114,7j chez les témoins négatifs ; à 1mg/kg pc/j : 117,7j versus 114,7j chez les témoins négatifs. Elle également observée chez les truies gravides accouplées avec des mâles F1 issus de mères traitées à 10 µg/kg pc/j.
- Taille des portées : pas d'effet statistiquement significatif chez les femelles F0, mais diminution significative chez les femelles F1 à la plus forte dose (4tOP).

#### 8.1.1.2 Effets sur le développement

##### **Exposition par voie orale**

Dans un essai de d'évaluation de la toxicité sur la reproduction et le développement (SIDS de OCDE, 1995, conduit selon la ligne directrice 421), des rats (souche non précisée) ont été exposés par gavage à des doses de 4tOP de 0, 125, 250 et 500 mg/kg pc/j (12 animaux/sexe/dose). Les animaux ont été exposés 2 semaines avant l'accouplement, pendant la période d'accouplement (deux semaines) et jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour post-partum.

**L'exposition des rats à 500 mg/kg pc/j** a entraîné la mort de 13/24 animaux adultes (9 mâles et 4 femelles) pendant l'expérience.

Les signes de toxicité suivants ont également été rapportés :

- salivation, fourrure humide, taches brunes au niveau de la région urogénitale, selles molles, posture voutée, émaciation, léthargie et altération de la locomotion.
- diminution du gain de poids corporel et de la prise de nourriture, augmentation importante de la prise d'eau,
- augmentation du nombre de globules blanc et de plaquettes, des niveaux de l'azote uréique plasmatique, de la créatinine, de la bilirubine et de la GPT. Les niveaux d'électrolyte et d'albumine circulante étaient plus faibles,
- augmentation du poids<sup>20</sup> du foie, du rein et de la glande surrénale,
- diminution du poids plusieurs organes reproducteurs (testicules, épидидymes, ovaires, et prostate/vésicules séminales/glandes coagulantes,
- modifications mineures des testicules et de l'épididyme (observation microscopique).

##### **Les effets observés sur la reproduction étaient les suivants :**

- diminution des performances sexuelles : seuls 4 couples sur un total de 8 ont pu concevoir. Parmi les femelles qui avaient pu concevoir, les performances sexuelles n'ont pas été affectées cependant la durée de gestation était plus longue que prévue. Chez les mâles, pas d'effet sur la libido mais baisse de la fertilité, diminution du taux d'implantation et augmentation de la mortalité pré et postnatale conduisant à une diminution de la taille des portées, diminution du poids de la portée suggérant des effets sur la prise de poids des descendants au 4<sup>ème</sup> jour, pas d'anomalies majeures chez les descendants.

A 250 mg kg pc/j, les effets observés étaient les suivants :

- salivation, fourrure humide, selles molles,
- diminution du gain de poids corporel de tous les animaux (des effets sur le gain de poids corporel des mères ont également été observés à la fin de la gestation et au début de la période de lactation), augmentation de la prise d'eau, pas de modification significative sur les paramètres hématologiques et biochimiques évalués mais une augmentation du poids du foie et une légère augmentation du poids des reins. L'examen microscopique des testicules de l'épididyme et des testicules n'a mis en évidence aucune anomalie.

<sup>20</sup> A la lecture du rapport OCDE, il n'est pas possible de déterminer si les auteurs ont mesuré les poids absolus ou relatifs des organes

A cette dose, aucun effet sur les performances sexuelles et le développement des petits n'a été relevé.

A 125 mg/kg pc/j, les seuls effets rapportés sont la salivation et une légère augmentation de la prise d'eau chez les animaux.

**Les experts proposent un NOAEL pour la reprotoxicité développementale de 250 mg/kg pc/j sur la base des effets observés à 500 mg/kg pc/j en présence d'une toxicité maternelle importante. Il faut préciser que les auteurs n'ont noté aucun changement dans la capacité d'accouplement ou encore sur le développement des portées à la dose de 250 mg/kg.**

**Harazono et al. (2001)** ont recherché les effets du 4tOP sur l'initiation et le maintien de la gestation. Des rates Wistar âgées de 12 à 15 semaines ont été exposées par voie orale (intubation gastrique) durant la gestation de GD0 à GD8<sup>21</sup> aux doses de 0 - 15,6 - 31,3 - 62,5 – 125 – 250 et 500 mg/kg pc/j (16 femelles par groupe de dose) de 4tOP (pureté non renseignée ; administration dans huile d'olive). Les rates ont été examinées et pesées quotidiennement ; la prise de nourriture a également été évaluée chaque jour. Les femelles ont été sacrifiées au 20<sup>ème</sup> jour de gestation. La cavité péritonéale et l'utérus ont été disséqués en examinant, pour l'utérus, le nombre de sites d'implantation et de corps jaunes, le nombre et le pourcentage de pertes pré et post-implantatoires par portée, le nombre de fœtus vivants, morts ou résorbés par portée, le sexe et le poids corporel des fœtus viables ainsi que les malformations (externes/cavité orale).

L'exposition des rates à 250 mg/kg pc a entraîné la mort de 2 animaux sur 16 (et la mort des 7 rates exposées à la dose de 500 mg/kg/j). En revanche, l'exposition des mères à des doses comprises entre 15,6 et 125 mg/kg pc/j n'induit pas de mortalité. À partir de 31,3 mg/kg pc/j, une diminution statistiquement significative du gain de poids corporel moyen des mères a été rapportée entre GD0 et GD9 (9,6 g vs 23 g chez les témoins). Entre GD0 et GD20, une diminution du gain de poids corporel moyen des mères a été observée à 31,3 et 125 mg/kg pc/j (92 g et 84 g vs 112 g chez les témoins, respectivement). Aucun effet sur le gain de poids corporel ajusté<sup>22</sup> des mères n'a été rapporté. La prise de nourriture (valeur moyenne) des mères a montré une diminution statistiquement significative dans tous les groupes traités au 4tOP (de GD0 à GD9 : 111, 94, 81 et 72 g respectivement à 15,6 ; 31,3 ; 62,5 et 125 mg/kg pc vs 130 g chez les témoins).

Concernant la reproduction, aucune différence significative par rapport aux témoins n'a été mise en évidence sur le taux de gestation (pregnancy rate) et le nombre de corps jaunes. Dès 31,3 mg/kg pc/j, une augmentation statistiquement significative du pourcentage de pertes post-implantatoires par portée a été relevée (12,2 ; 11,4 et 21,7 % respectivement à 31,3 ; 62,5 et 125 mg/kg pc versus 3,3% chez les témoins). Une diminution du nombre de fœtus vivants par portée a été relevée à des doses de 31,3 et 125 mg/kg (12,8 et 11,47 vs 15,1 fœtus vivants chez les témoins).

Aucun effet sur le sexe ratio et le poids corporel des fœtus vivants n'a été observé dans cette étude. De plus, le 4tOP n'induit pas d'augmentation de l'incidence des malformations externes chez les fœtus.

**Les résultats de cette étude semblent indiquer que l'exposition prénatale précoce des rats au 4tOP à des doses induisant une toxicité maternelle provoque des pertes post-implantatoires. Les auteurs proposent un NOAEL pour la toxicité sur le développement de 15,6 mg/kg/j sur la base de l'augmentation de l'incidence de pertes post-implantatoires par portée observée à partir de 31,3 mg/kg pc/j.**

<sup>21</sup> A noter que selon les auteurs, la fenêtre d'exposition (GD0-GD8) inclut la période qui suit de près l'implantation.

<sup>22</sup> Il s'agit du poids corporel des mères sans inclure l'utérus

**Veeramachaneni (2006)** a investigué la possibilité d'une relation entre le développement de cellules germinales atypiques et la localisation abdominale des testicules. Des lapines gravides (Dutch Belted ; 4 à 6 animaux/groupe d'exposition) ont été exposées un jour sur deux par voie orale entre GD15 et GD30<sup>23</sup> à l'une des 3 substances suivantes : le p,p',1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophényl) éthylène (DDE à 100 mg/kg pc dans du sirop de maïs), le flutamide (à 50 mg/kg pc, sous-cutanée) et le 4tOP (dose 150 mg/kg administrée dans du sirop de maïs). Parallèlement, un groupe de 6 femelles gravides n'a pas été exposées. Parmi les progénitures mâles de ces lapines, 3 groupes composés de 4 petits mâles ont été exposés par voie sous-cutanée (implantation de pastilles d'œstradiol, 0,5 mg, « 60-day-release) à PND7 ou ont été soumis à une cryptorchidie chirurgicale à PND21, les animaux restants constituant le groupe témoin.

Les animaux sevrés (âgés de 6 semaines) ont été placés individuellement dans une cage et la migration des testicules en position scrotale a été contrôlée en effectuant chaque semaine une palpation. Les lapins âgés entre 24 et 26 semaines ont été sacrifiés et les testicules, l'épididyme et les glandes sexuelles accessoires ont été pesés et examinés afin d'étudier la présence d'anomalies macroscopiques. Un examen microscopique a également été réalisé sur les testicules. Une attention particulière a été prêtée à la différenciation des cellules germinales et la présence de cellules germinales atypiques ressemblant aux CIS (carcinome in situ du testicule).

Suite à l'exposition prénatale au 4tOP, un lapin (sur un total de 4 animaux) présentait une cryptorchidie unilatérale. A noter que la migration des testicules était normale chez les 4 animaux témoins alors que les 4 lapins des groupes exposés après la naissance (par voie sous cutanée à des œstrogènes ou suite à l'intervention chirurgicale) présentaient une cryptorchidie bilatérale. Des cellules germinales atypiques ressemblant à des gonocytes ou pré-spermatogonies ont été observées chez les lapins présentant des cryptorchidies issus de mères traitées et des lapins exposés à la naissance par voie sous cutanée à l'œstradiol. En revanche cette observation n'est pas relevée dans les testicules cryptorchides des animaux ayant subi une intervention chirurgicale. Des différences histologiques entre les cellules germinales issues de lapins exposés pendant la gestation au 4tOP et les lapins non traités sont observées. Ainsi les cellules germinales atypiques issues des lapins exposés présentaient des modifications morphologiques caractéristiques des CIS telles que de gros noyaux aux contours irréguliers, des mitochondries gonflées, des amas de chromatine, des inclusions cytoplasmiques inhabituelles (incluant des granules de glycogène et gouttelettes lipidiques caractéristiques des cellules germinales néoplasiques). Les auteurs concluent que le développement anormal des cellules germinales résulte de l'action directe des substances (telles que le 4tOP) pendant les périodes d'exposition critiques pour la différenciation des gonades et non de la localisation abdominale des testicules.

**En d'autres termes, les auteurs soulignent qu'une variété de facteurs peut interférer avec la descente normale des testicules et altérer la spermatogénèse. Ainsi, tous les facteurs étiologiques causant le cryptorchidisme ne cause pas nécessairement une transformation des cellules germinales conduisant à un carcinome in situ du testicule et au développement de tumeurs.**

**Sharpe et al. (1995)**, ont étudié les effets d'une exposition prénatale et postnatale au 4tOP sur la taille des testicules et la spermatogénèse à l'âge adulte chez des rats mâles Wistar. Selon les auteurs, chez l'adulte, la taille des testicules et la production spermatique sont déterminées par le nombre de cellules de Sertoli. Chez le rat mâle, la prolifération des cellules de Sertoli débute peu après la différenciation des testicules (GD15) et s'étend jusqu'à environ PND15, avec éventuellement une faible prolifération jusqu'à PND21.

Dans cette publication, 3 études sont décrites. Les études diffèrent selon la période d'exposition considérée :

- étude 1 : exposition postnatale de PND1 à PND22 (couvre la période postnatale de la prolifération des cellules de Sertoli).

<sup>23</sup> Le choix de la fenêtre d'exposition est justifié par les auteurs. Cette fenêtre d'exposition englobe la différenciation sexuelle chez le lapin comprenant la différenciation des cellules de Leydig et de Sertoli (durée de gestation lapin : 30 jours).

- études 2 et 3 : exposition des mères deux semaines avant l'accouplement, pendant la l'accouplement et la gestation et jusqu'à à PND22 (ces deux études couvrent entièrement la période de prolifération des cellules de Sertoli).

Dans les études 1 et 2, les portées ont été réduites à 8 animaux le jour de naissance en sacrifiant les femelles.

Dans l'étude 3, tous les animaux de chaque portée ont été maintenus en vie de PND1 à PND22. Aucune évaluation n'a été conduite sur les femelles traitées. Les mêmes mères ont été utilisées pour l'accouplement dans les études 2 et 3 (lorsque les descendants issus de ces mères ont été sevrés à la fin de l'étude 2, les mères ont reçu un traitement identique pendant 2 semaines avant d'être accouplées et exposées jusqu'au sevrage des descendants dans l'étude 3).

Les animaux ont été exposés au 4tOP via l'eau de boisson à des concentrations de 100 et 1000 µg/l pour les 3 études. La concentration de 10 µg/l a été testée uniquement dans l'étude 1. Le DES a été utilisé comme témoin positif (à 10 et 100 µg/l dans l'étude 1 et uniquement à 100 µg/l dans les études 2 et 3). La dose de 4tOP ingérée quotidiennement a été évaluée dans le groupe exposé à 1000 µg/l dans l'étude 3 en pesant les bouteilles d'eau toutes les 48 h. Elle varie de 129 µg/kg pc/j deux jours après la naissance à 367 µg/kg pc/j juste avant le sevrage des animaux.

Dans les trois études, le poids corporel des rats a été évalué à PND22 et entre PND90 et PND95. Les paramètres suivants ont également fait l'objet d'une évaluation à l'âge adulte (PND90-95) : poids des testicules et des reins, ratio du poids des testicules sur celui des reins ainsi que le poids relatif des testicules et des reins. Dans les études 2 et 3, où l'exposition débute pendant la gestation, la taille de la portée, la proportion de mâles à la naissance et le poids (absolu et relatif) de la prostate ventrale ont également été considérés. La surface des tubules séminifères et de l'épithélium séminifère ainsi que la production spermatique journalière ont été évaluées uniquement dans l'étude 3.

Résultats :

Tableau 4 : Résultats de l'étude de Sharpe et al. 1995

Paramètre évalué	Pourcentages de variation par rapport aux contrôles négatifs (entre parenthèse, probabilité p du test statistique réalisé)						
	Etude 1			Etude 2		Etude 3	
	10 µg/l	100 µg/l	1000 µg/l	100 µg/l	1000 µg/l	100 µg/l	1000 µg/l
Taille de la portée	Non évalué			↗ 8% (NS)	↗ 20% (NS)	↘ 6% (NS)	↘ 12% (NS)
% de mâles à la naissance				↘ 13% (NS)	↘ 25% (NS)	↗ 4% (NS)	↗ 16% (NS)
Poids corporel à PND22	↗ 8% (p<0,01)	↗ 8% (p<0,001)	0% (NS)	↗ 25% (p<0,001)	↗ 15% (p<0,001)	↗ 8% (p<0,05)	↗ 4% (NS)
Poids corporel entre PND90-95	↗ 1% (NS)	↗ 10% (p<0,001)	↗ 3% (NS)	↗ 9% (p<0,001)	↗ 8% (p<0,001)	↘ 4% (p<0,05)	↘ 1% (NS)
Ratio poids testicule/poids rein	↘ 3% (NS)	↘ 12% (p<0,001)	↘ 12% (p<0,001)	↘ 1% (NS)	↘ 10% (p<0,001)	↘ 3% (NS)	↘ 7% (p<0,01)
Poids relatif testicule à PND90-95	↘ 1% (NS)	↘ 6% (p<0,01)	↘ 4% (p<0,01)	↘ 7% (p<0,01)	↘ 12% (p<0,001)	↘ 2% (NS)	↘ 13% (p<0,001)
Poids relatif rein à PND90-95	↗ 3% (NS)	↗ 4% (p<0,05)	↗ 7% (p<0,01)	↘ 6% (p<0,01)	↘ 3% (p<0,01)	↗ 1% (NS)	↘ 7% (p<0,001)
Poids relatif de la prostate ventrale à PND90-95	Non évalué			↘ 12% (p<0,05)	↘ 15% (p<0,01)	↘ 5% (p<0,01)	↘ 9% (p<0,001)

L'exposition prénatale et postnatale au 4tOP n'induit pas d'effet sur la taille des portées et leur composition (mâles ou femelles). Une augmentation statistiquement significative comprise entre 8 et 25% du poids corporel des petits à PND22 par rapport aux témoins négatifs est observée à toutes les concentrations testées dans les 3 études à l'exception de l'exposition à 1000 µg/l de 4tOP dans l'étude 3. Cette augmentation est confirmée à PND90-95 chez les petits de l'étude 1 et 2. En revanche dans l'étude 3, une faible diminution (comprise entre 1 et 4%) du poids corporel des animaux à PND90-95 est observée aux deux concentrations mais elle est statistiquement significative uniquement à 1000 µg/l.

**A 1000 µg/l, le 4tOP induit une diminution statistiquement significative (comprise entre 4 et 13%) du poids relatif des testicules à PND90-95 dans les 3 études. A 100 µg/l, cette diminution est statistiquement significative dans les études 1 et 2 (correspondant respectivement à 6 et 7%). Concernant le poids de la prostate ventrale évalué à PND90-95, une diminution statistiquement significative comprise entre 5 à 15% est observée à 100 et 1000 µg/l dans les études 2 et 3 (ce paramètre n'a pas été évalué dans l'étude 1). L'analyse**

**histologique des testicules n'a montré aucune différence entre les testicules des rats non exposés (témoins) et ceux exposés au 4tOP. L'exposition prénatale et/ou néonatale à 1000 µg/l de 4tOP conduit à une diminution statistiquement significative de la production journalière spermatique de 10-21%.**

Dans un article de Sharpe *et al.* (1998), les auteurs rapportent qu'ils ont relevé, entre 1995 et 1998, des variations du poids des testicules et du poids corporel chez les animaux témoins (non traités ou véhicule seul) utilisés dans leur première étude (Sharpe *et al.*, 1995).

Date de l'étude	Poids moyen des testicules ( $\pm$ Écart type) en mg chez les témoins de l'étude de Sharpe et al 1995
1995 – Étude 1	1968 $\pm$ 163
1995 - Étude 2	2014 $\pm$ 155
1995 - Étude 3	1954 $\pm$ 118
1996	1828 $\pm$ 121
1998	1956 $\pm$ 124

De plus, ils indiquent que pendant la période où le poids des testicules des témoins était faible, ils n'ont pas été en mesure de reproduire les effets mis en évidence suite à l'exposition prénatale au 4tOP en utilisant le même protocole que celui de l'étude 3 de Sharpe *et al.* (1995). Ainsi l'exposition *in utero* des mâles au 4tOP à 1000 µg/l n'induit pas de diminution du poids moyen des testicules. Les auteurs indiquent qu'ils ne sont pas en mesure d'expliquer les variations (diminution puis retour à la valeur initiale) du poids moyen des testicules chez les animaux témoins ainsi que leur incapacité à reproduire les effets sur le poids des testicules après l'exposition des animaux au 4tOP. Les auteurs justifient leur incapacité à reproduire les résultats de leur première étude en suggérant l'existence de paramètres biologiques qu'ils n'auraient pas pris en compte.

Selon Sharpe *et al.* (1998), dans une autre étude conduite par la même équipe, l'exposition des rats au DES (50 µg/l) induit un effet statistiquement significatif sur le poids absolu des testicules (1903 vs 2050 mg chez les témoins). Toutefois, il n'y a pas d'effet lorsque l'on considère le poids relatif des testicules. Ces résultats diffèrent également de ceux de Sharpe *et al.* (1995) où l'effet du DES sur le poids des testicules est constant.

**Nagao *et al.*, 2001**, ont conduit une étude pour évaluer les effets d'une exposition postnatale précoce au 4tOP sur la fonction de reproduction chez des rats Sprague-Dawley mâles et femelles exposés par gavage à 0 – 12,5 – 25 – 50 et 100 mg/kg/j de 4tOP (dose administrée dans de l'huile de maïs) de PND1 à PND5. De nombreux paramètres ont été investigués dans cette étude : maturation sexuelle (âge de la séparation du prépuce et de l'ouverture vaginale), fertilité, cycle œstral, réserve spermatique, concentration sérique en testostérone, histologie et poids (uniquement chez les mâles) des organes reproducteurs.

Le nombre d'animaux attribué à chaque groupe de dose est résumé dans le tableau suivant :

	Véhicule seul	12,5 mg/kg/j	25 mg/kg/j	50 mg/kg/j	100 mg/kg/j
Nombre de mâles	28	28	28	30	30
Nombre de femelles	30	28	28	28	30
Nombre de portées dont les rats sont issus	8	7	7	8	8

Les animaux ont été pesés tous les jours entre PND1-PND5, à PND6, PND14 et lorsqu'ils étaient âgés de 3, 5 et 7 semaines. L'étude préliminaire conduite chez 10 mâles/groupe exposés par voie orale à 0, 50, 100 et 200 mg/kg/j de PND1 à PND5 a mis en évidence une augmentation de la mortalité des nouveau-nés à la dose de 200 mg/kg/j. Une diminution significative du poids corporel des nouveau-nés à PND6, PND14 et PND21 a également été rapportée aux doses de 100 et 200 mg/kg/j. Ces observations justifient le choix de la gamme de dose (comprise entre 12,5 et 100 mg/kg/j) de l'étude principale.

Aucun signe manifeste de toxicité n'a été observé pendant la période postnatale. L'exposition des nouveau-nés aux doses  $\leq 50$  mg/kg/j n'induit aucun effet sur leur viabilité en revanche à la dose de 100 mg/kg/j, une augmentation significative de la mortalité a été observée à PND6 et PND2. A noter que les auteurs rapportent la mort de 2 femelles exposées à 50 mg/kg/j, de 6 mâles et 5 femelles exposés à 100 mg/kg/j entre PND1 et PND6. Une diminution significative du poids corporel des rats par rapport aux témoins a été observée tout au long de l'étude (de PND6 à l'âge de 9 semaines) aux doses de 50 et 100 mg/kg/j. Elle est également observée chez les mâles et les femelles exposés à 25 mg/kg/j à l'âge de 7 semaines et dès 12,5 mg/kg/j chez les femelles âgées de 9 semaines. Un retard de l'âge de l'ouverture vaginale (PND 34,88 et PND 35,40 vs PND 32,67 chez les témoins) et de la séparation du prépuce (PND 44,03 et PND 44,65 vs PND 43,28 chez les témoins) accompagné d'une diminution du poids corporel a été noté aux doses de 50 et 100 mg/kg/j. Toutefois aucune modification du cycle œstral (durée du cycle et durée de chaque phase du cycle) n'a été relevée suite à l'exposition au 4tOP. De plus, aucun effet sur les performances de reproduction<sup>24</sup> chez les mâles et les femelles n'a été observé dans cette étude. Par ailleurs, la réserve spermatique épидидymaire et la concentration sérique en testostérone étaient similaires entre les groupes exposés au 4tOP et les témoins. Concernant les organes reproducteurs, une augmentation du poids relatif des testicules (à 100 mg/kg/j) et des vésicules séminales (à 50 et 100 mg/kg/j) a été observée chez les mâles adultes. Ces différences sont probablement attribuables à la diminution du poids corporel relevé à ces doses d'exposition. Une diminution du poids absolu et relatif de la prostate ventrale a été observée dans tous les groupes exposés au 4tOP (le mécanisme sous-jacent n'a pas été identifié par les auteurs). L'examen histologique pratiqué chez certains rats à PND21 ne montre pas de modification macroscopique au niveau des organes reproducteurs ou d'altération histologique des testicules ou de l'épididyme suite à une exposition au 4tOP. En revanche, 2 femelles sur 5 exposées à 25, 50 et 100 mg/kg/j ont présenté des follicules polyovulaires (contenant 2 ovocytes ; à noter que cet effet n'a pas été observé chez l'adulte). L'examen histopathologique des organes reproducteurs mâles (testicules, épидидyme, vésicules séminales et prostate ventrale) de rats âgés de 18 semaines et exposés au 4tOP n'a révélée aucune altération. Une hyperplasie de l'utérus par prolifération de cellules épithéliales au niveau de la lumière utérine et une invagination de l'épithélium utérin ont été observées chez une

<sup>24</sup> Performance de reproduction évaluée à travers différents paramètres : indice d'accouplement, indice de fertilité, nombre d'implants par portée. Animaux âgés de 12 semaines.

femelle infertile exposée à 50 mg/kg/j. Dans la mesure où cette observation n'a pas été rapportée dans le groupe exposé à 100 mg/kg/j, elle est difficilement attribuable à l'exposition au 4tOP.

**L'exposition post-natale précoce au 4tOP par gavage n'altère pas la fonction de reproduction post-pubertaire (accouplement et fertilité) et ne perturbe pas le développement de l'appareil reproducteur chez les mâles et les femelles.**

**Les auteurs proposent un NOAEL pour la toxicité systémique de 12,5 mg/kg/j sur la base d'une diminution du poids corporel observée aux doses supérieures et un NOAEL pour la toxicité sur la reproduction de 100 mg/kg/j.**

### **Voie sous-cutanée**

#### **Exposition prénatale**

**Haavisto et al. (2003)** ont évalué le pic de testostérone testiculaire *ex vivo*, chez le rat Sprague-Dawley après traitement *in utero* par injection sous-cutanée de 0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 mg/kg de 4tOP à GD 13,5, 15,5 et 17,5 et *in vitro*. Un groupe contrôle positif traité avec du DES (Diéthylstilbestrol) a été inclus dans cette étude.

Dans l'étude *in vivo/ex vivo*, les femelles gravides ont été sacrifiées à GD 19,5 (date correspondant à un pic de sécrétion de la testostérone chez le rat Sprague-Dawley). Le nombre, le poids et le sexe des fœtus ont été évalués. Dans l'étude *in vivo*, les testicules sont prélevés sur 73 fœtus préalablement exposés *in utero* (testicules cultivés *ex vivo* pendant 3 h) pour mesurer les niveaux d'hormones. Dans l'étude *ex-vivo*, les testicules de 140 fœtus issus de mères non traitées ont été utilisés pour évaluer la production basale de testostérone, de progestérone, d'AMPc et les niveaux de testostérone après une stimulation par l'hCG (hormone gonadotrophine chorionique) (pendant et après 3 h de culture).

L'expérimentation réalisée *in vivo* ne montre pas d'effet du 4tOP sur la prise de poids corporel fœtal par rapport au contrôle négatif. En revanche, le poids corporel des fœtus exposés *in utero* au DES est significativement plus faible que celui du groupe contrôle négatif (véhicule seul). A 100 mg/kg, l'exposition prénatale au 4tOP a tendance à réduire de manière non statistiquement significative la concentration de testostérone testiculaire chez les fœtus issus de mères traitées. A noter que l'exposition *in utero* des rats à 0,1 et 0,2 mg/kg de DES provoque une réduction statistiquement significative de la concentration en testostérone testiculaire. Aucune modification de la sécrétion de testostérone *ex vivo* par les testicules de fœtus préalablement exposés *in utero* à 1 ou 100 mg/kg de 4tOP (par rapport au groupe contrôle négatif) n'a été relevée dans cette étude contrairement à ceux exposés au DES (importante chute de la sécrétion de testostérone).

L'exposition réalisée *ex vivo* sur des testicules fœtaux (prélevés à GD 19,5) issus de mère non traitées a montré les résultats suivants. L'ajout de 0,01 ; 0,1 ou 1 mg/l de 4tOP au milieu de culture ne modifie pas la sécrétion basale de testostérone ou de progestérone par rapport au groupe contrôle négatif. A 10 mg/l, une faible augmentation d'un facteur 1,6 de la sécrétion de testostérone ( $1,6 \pm 0,6$  ng/ml  $p < 0,001$  versus  $1,0 \pm 0,3$  ng/ml chez les témoins) a été observée ainsi qu'une faible augmentation statistiquement non significative de 1,2 de la sécrétion de progestérone ( $0,14 \pm 0,02$  ng/ml versus  $0,11 \pm 0,02$  ng/ml chez les témoins).

A 100 et 500 mg/l, une augmentation statistiquement significative d'un facteur 4 de la sécrétion de testostérone (à 100 mg/l :  $4,5 \pm 1,2$  ng/ml versus  $1,0 \pm 0,3$  ng/ml chez les témoins et à 500 mg/l :  $4,3 \pm 1,2$  ng/ml versus  $1,0 \pm 0,3$  ng/ml chez les témoins) a été observée ainsi qu'une augmentation d'un facteur 3 de la sécrétion de progestérone (à 100 mg/l :  $0,36 \pm 0,01$  ng/ml versus  $0,11 \pm 0,02$  ng/ml chez les témoins et à 500 mg/l  $0,38 \pm 0,14$  ng/ml versus  $0,11 \pm 0,02$  ng/ml chez les témoins).

Après stimulation avec de l'hCG, une augmentation statistiquement significative de la sécrétion de testostérone a été observée à la dose de 100 mg/l de 4tOP. Une augmentation statistiquement significative de la production d'AMPc a été observée après l'exposition au 4tOP à 100 mg/l. En revanche aucune modification statistiquement significative de la production d'AMPc n'a été révélée après une exposition au DES.

De légères altérations histologiques au niveau des testicules ont été observées à 100 mg/l de 4tOP en microscopie électronique avec la présence d'anneaux bruns autour des gouttelettes lipidiques. De plus, l'exposition au 4tOP a induit une condensation de la chromatine dans de nombreuses cellules.

**Aydogan et al. (2006)** ont étudié les effets d'un traitement prénatal du 4tOP sur le système reproducteur mâle à l'âge adulte. Des rates Wistar gravides âgées de 22 semaines ont été exposées de GD1 à GD20 par injection sous-cutanée journalière aux doses de 0, 100 et 250 mg/kg/j de 4tOP (pureté 97%, dans huile de maïs) (4 femelles par niveau de dose). Les rates ont été examinées et pesées quotidiennement ; la prise de nourriture a également été évaluée chaque jour.

Un mois après la parturition, les mâles ont été séparés de leur mère et regroupés à raison de 4 animaux mâles par cage. Les mâles ont été sacrifiés à l'âge adulte (2,5 mois). Le poids des animaux a été relevé juste avant le sacrifice. Les paramètres suivants sur la reproduction ont été examinés : les poids absolus et relatifs des testicules, des épидидymes et de la prostate, l'analyse histologique des mêmes organes avec notamment la mesure de l'épaisseur de l'épithélium séminifère et épидидymaire, et du diamètre de la lumière des tubes séminifères, la mesure de la réserve spermatique épидидymaire et l'analyse morphologique des spermatozoïdes épидидymaires.

Chez les descendants mâles, une augmentation statistiquement significative de 12% du poids corporel a été observée à la dose de 250 mg/kg/j. A noter que le nombre total de mâles issus de mères traitées/groupe de dose rapporté était de 16 dans le groupe témoin, de 14 dans le groupe exposé à 100 mg/kg/j et de 11 dans le groupe exposé à 250 mg/kg/j. A cette dernière dose, une augmentation du poids absolu de l'épидидyme droit et de la prostate a été relevée. En revanche, aucun effet sur le poids relatif de ces organes n'a été mis en évidence. Aucune variation des poids absolus et relatifs du testicule droit et de l'épидидyme gauche n'a été observée par rapport aux animaux témoins.

D'un point de vue histologique, la présence de spermatogonies dans la lumière des tubes séminifères (à la dose de 250 mg/kg/j), une vacuolisation des cellules de Sertoli (aux doses de 100 et 250 mg/kg/j) et une atrophie des tubules alvéolaires de la prostate ont été rapportés. Des modifications histologiques au niveau de l'épидидyme ont également été observées notamment une diminution de la taille de l'épithélium aux doses de 100 et 250 mg/kg/j.

Une augmentation statistiquement significative du pourcentage de spermatozoïdes anormaux à la dose de 250 mg/kg/j a été mise en évidence par l'analyse du sperme (24% versus 16% chez les témoins).

Aucun effet sur le poids des testicules et le nombre de spermatozoïdes n'a été observé.

**Les auteurs de l'étude concluent que l'exposition prénatale des rats mâles à des doses fortes de 4tOP provoque des effets néfastes sur le système reproducteur mâle à l'âge adulte chez des animaux exposés *in utero*.**

**Göktekin et Barlas (2007, 2008)** ont étudié les effets d'une exposition prénatale au 4tOP sur l'histologie de l'hypophyse, des glandes surrénales, du pancréas, de la thyroïde et de la parathyroïde chez les adultes mâles et femelles. Des rates Wistar gravides (4 ou 5 animaux par groupe de dose) ont été exposées par injection sous-cutanée à 0, 100 ou 250 mg/kg pc/j de 4tOP (administré dans de l'huile de maïs) pendant 21 jours. Le poids corporel des mères et les signes cliniques de toxicité ont été évalués quotidiennement pendant la durée de la gestation. Un mois après leur naissance, les petits ont été séparés de leurs mères. La prise de nourriture et d'eau des petits a été évaluée jusqu'au sacrifice à l'âge adulte (2,5 mois). Des investigations morphologiques et histopathologiques ont été réalisées sur les tissus/organes suivants : glande surrénale, hypophyse, thyroïde et parathyroïde. Les auteurs précisent que la thyroïde et la parathyroïde ont été prélevées en même temps. Il est à noter par ailleurs que l'hypophyse a été prélevée mais n'a pas été pesée en raison de sa petite taille.

Résultats de l'examen morphologique :

Aucune différence n'a été relevée entre les animaux exposés et les témoins concernant la date de gestation. L'exposition des rates gravides au 4tOP n'induit aucun effet sur le poids corporel évalué au début et à la fin de la gestation. En revanche, une diminution statistiquement significative du gain de poids corporel a été observée uniquement à la plus forte dose, cette diminution était de 19,34 % pour les animaux traités et de 30,83 % pour le groupe contrôle. Selon les auteurs, aucune modification de la prise de nourriture et d'eau n'a été relevée pendant la période de gestation (données non présentées).

Chez les descendants des deux sexes exposés *in utero* à 250 mg/kg pc/j, les auteurs ont noté une augmentation statistiquement significative du poids corporel (relevé le jour du sacrifice) par rapport aux rats exposés *in utero* à 100 mg/kg pc/j et au groupe contrôle (environ 30% chez les femelles et 40% chez les mâles).

L'exposition prénatale des rates au 4tOP n'induit aucun effet sur le poids relatif et absolu de la glande surrénale, du pancréas et de l'unité thyroïde + parathyroïde. Chez les mâles exposés *in utero*, une diminution statistiquement significative des poids relatifs de la glande surrénale (de 37,5% par rapport au groupe témoin) et de l'unité thyroïde + parathyroïde (36,5% par rapport au groupe témoin) a été relevée. Selon les auteurs, la prise d'eau et de nourriture était similaire entre les groupes pendant toute la durée de l'expérience.

#### Résultats de l'évaluation histopathologique :

Les effets observés suite à une exposition *in utero* au 4tOP sont :

- sur la glande surrénale : dégénérescence cellulaire, épaississement de la capsule et présence d'œdème.
- sur le pancréas : dégénérescence des îlots de Langerhans.
- sur la thyroïde : présence de follicules endommagés ou élargis, augmentation du tissu adipeux entre les follicules et l'infiltration de cellules mononucléaires.
- sur parathyroïde : augmentation du tissu conjonctif.
- sur l'hypophyse : dégénérescence cellulaire et congestion.

Une augmentation de l'incidence de ces effets histopathologiques est notée à la plus forte dose testée (250 mg/kg pc/j).

**Selon les auteurs, les résultats de cette étude montrent que l'exposition prénatale des rats au 4tOP (qui mimerait l'action des œstrogènes) induit des effets adverses sur le système endocrinien chez les mâles et les femelles pendant la période fœtale puis lors de phases ultérieures de la vie.**

**Barlas et Aydogan (2009)** ont étudié les effets du 4tOP sur le foie, les reins et la rate de rats adultes exposés *in utero* à de fortes doses de 4tOP. Des rates Wistar gravides (n=8/groupe) ont été exposées par injection sous cutanée au 4tOP (administré dans l'huile de maïs) aux doses de 0, 100 et 250 mg/kg/j pendant la gestation, de GD1 à GD20.

Les principaux effets observés à l'âge adulte consistent en des lésions histologiques au niveau du foie (congestion, dégénérescence du parenchyme hépatique), des reins (hémorragies, dégénérescence tubulaire) et de la rate (destruction du tissu splénique, œdèmes, dépôt d'hémosidérine). De nombreux paramètres hématologiques ont été évalués dans cette étude. Une diminution du nombre d'érythrocytes, de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine a été observée dans les groupes exposés au 4tOP (statistiquement significatif à la dose de 250 mg/kg/j) traduisant une légère anémie. Il s'agit d'une anémie microcytaire normochrome. A noter que les organes reproducteurs n'ont pas fait l'objet d'examen histologique.

**Les auteurs concluent qu'un traitement à de fortes doses de 4tOP pendant la vie intra-utérine peut induire des effets néfastes sur le foie et les reins à l'âge adulte. Il provoque**

notamment une diminution du nombre d'érythrocytes mis en évidence par une augmentation de leur destruction dans la rate.

**Sonne Hanne-Hansen et al. (2003)** ont investigué les effets potentiels d'une exposition prénatale au 4tOP et au DES sur le nombre d'ovocytes chez des nouveaux-nés de souris. L'exposition *in utero* au 4tOP aux doses de 1 et 250 mg/kg/j est réalisée entre GD11,5 et GD19,5 par injection sous-cutanée) ou au DES (100 µg/kg). **Les résultats montrent que l'exposition *in utero* à ces deux substances n'altère pas le nombre d'ovocytes ni la proportion des ovocytes primaires, des follicules primaires, primordiaux et antraux au sein des ovaires chez des nouveau-nés souris NMRI.**

### Exposition périnatale / néonatale

**Mikkila et al., (2006)** ont investigué les effets potentiels d'une exposition néonatale au flutamide (anti-androgène non stéroïdien), au DES ou au 4tOP sur la synthèse de testostérone dans le testicule de rats nouveau-nés. L'étude visait à évaluer la sensibilité des cellules de Leydig fœtales à une perturbation endocrinienne pendant la période néonatale en mesurant les niveaux circulants en testostérone et gonadotrophines, la production de testostérone et de progestérone dans le testicule et le niveau d'expression des protéines StAR<sup>25</sup> et 3β-HSD<sup>26</sup> (deux protéines clés de la stéroïdogénèse) chez des rats âgés de 14 jours.

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été exposés par injection sous-cutanée du jour de la naissance à PND4 soit au 4tOP (doses : 10, 50 et 100 mg/kg/j administrées dans du DMSO ; n = 11-20 rats/groupe), soit au flutamide (doses : 2, 10 et 25 mg/kg/j, administrées dans de l'huile de maïs ; n = 22-30/groupe), soit au DES (doses : 0,1 – 0,5 et 1 mg/kg/j, administrées dans le DMSO ; n = 12-18/groupe). Le groupe témoin (administration du véhicule seul) était composé de 30 animaux. Aucun effet n'a été observé à PND14 sur le poids corporel des rats suite à l'exposition néonatale aux 3 substances. De même, aucun effet sur le poids des testicules n'a été relevé dans les groupes exposés au 4tOP contrairement à ceux exposés au DES (diminution de 40%) et à 25 mg/kg/j de flutamide (diminution de 15%).

Les observations histologiques des testicules de rats exposés au 4tOP n'ont révélé aucun changement notable au niveau des cellules de Leydig et des cordons séminifères (contrairement au flutamide qui induit une hyperplasie par prolifération des cellules de Leydig). De même, les concentrations plasmatiques en testostérone, LH et FSH n'étaient pas modifiées chez les rats exposés au 4tOP à PND14. En revanche, une diminution de 82-91% des concentrations plasmatiques en testostérone était observée chez les animaux exposés au DES ainsi qu'une diminution de la concentration en FSH (uniquement à la dose de 1 mg/kg/j). Une augmentation des concentrations plasmatiques en LH était relevée chez les rats exposés à 25 mg/kg/j de flutamide ou à 0,5 mg/kg/j de DES.

Cette étude s'est également intéressée à la production de testostérone et de progestérone intratesticulaire. Les testicules de rats âgés de 14 jours ont été mis en culture pendant 3 h. La sécrétion basale de testostérone ou stimulée par l'hCG n'était pas modifiée dans les testicules de rats exposés au 4tOP. En revanche, une augmentation de la production de progestérone stimulée par l'hCG était observée dans les testicules prélevés chez des rats exposés à 100 mg/kg/j. Il est à noter une diminution de la production basale de progestérone et de la production de testostérone stimulée par l'hCG dans les testicules de rats exposés au DES. Les testicules issus de rats exposés à 25 mg/kg/j de flutamide présentaient une augmentation de la sécrétion de testostérone stimulée par l'hCG. Enfin l'expression des protéines StAR et 3β-HSD n'étaient pas altérée suite à une exposition au 4tOP contrairement au DES (suppression de 41-44% de l'expression de la protéine StAR).

<sup>25</sup> La protéine StAR permet le transport du cholestérol

<sup>26</sup> La 3β-HSD convertit la prégnénolone en progestérone

Les résultats de cette étude confirment l'existence de périodes critiques de sensibilité (notamment la période néonatale) du testicule aux œstrogènes et antiandrogènes. Les auteurs concluent que le DES et le flutamide modulent de façon spécifique différentes étapes de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig en développement (le DES inhibe l'expression de la protéine StAR et favorise la production de testostérone stimulée par l'hCG, des effets opposés ont été observés dans les testicules de rats exposés au flutamide). Le 4tOP induit des effets marginaux sur le testicule de rat nouveau-né. Seule une augmentation de la production de progestérone stimulée par l'hCG a été observée dans les testicules de rats exposés à 100 mg/kg.

**Atanassova et al. (2000)**, ont investigué les effets de plusieurs xœstrogènes (DES, BPA, 4tOP) sur la spermatogénèse chez le rat pubère (en ciblant le développement des tubes et cordons séminifères) et les éventuels effets à long terme sur le poids des testicules, l'accouplement et la fertilité à l'âge adulte.

Des rats Wistar ont été exposés quotidiennement par injection sous cutanée deux jours après la naissance jusqu'à 12 jours après à 2 mg/rat de 4tOP (soit environ 150 mg/kg/j selon Williams et al. 2001), et au DES (doses allant de 0,01 à 10 µg ; 1 jour sur 2).

Plusieurs paramètres ont été évalués à J1 et J25 : poids des testicules, formation de la lumière des tubes séminifères, index apoptotique des cellules germinales<sup>27</sup>, initiation de la spermatogénèse à la puberté (en mesurant le volume nucléaire du spermatocyte par unité de volume nucléaire des cellules de Sertoli), concentrations plasmatiques en FSH et inhibine B. La morphologie des testicules, leur poids ainsi que la fertilité ont été évalués à l'âge adulte (PND90-100).

Au 18<sup>ème</sup> jour, chez les rats exposés au 4tOP, une augmentation du poids des testicules et du volume nucléaire des cellules de Sertoli, une accélération de la formation de la lumière des tubes séminifères, une baisse de l'apoptose des cellules germinales, une augmentation du ratio volume nucléaire de spermatocytes sur volume nucléaire des cellules de Sertoli et des concentrations plasmatiques d'inhibine B ont été observées. Les auteurs soulignent que dans une précédente étude, des effets opposés indiquaient un retard de la spermatogénèse à la puberté observé chez les rats exposés à 10 µg de DES. Les effets consistant en une stimulation de la spermatogénèse relevés au 18<sup>ème</sup> jour chez les rats pubères exposés au 4tOP (ou à de faibles doses de DES) qui ne persistent pas ; ils ne sont plus constatés au 25<sup>ème</sup> jour. Par ailleurs, l'exposition néonatale des rats au 4tOP n'induit aucun changement notable sur la morphologie et le poids des testicules ainsi que sur la fertilité.

**Les auteurs concluent que l'exposition néonatale des rats au 4tOP n'induit pas d'effets néfastes sur le développement du système reproducteur mâle.**

Limites de cette étude :

- Dose unique élevée (le niveau d'exposition de l'Homme au 4tOP est très inférieure à celle-ci).
- Il est difficile d'identifier quel est le groupe témoin (avec ou sans phytoestrogènes dans l'alimentation).

**William et al., (2001)** ont montré que le traitement de rat mâle Wistar par injection sous-cutanée de 2 mg/j (soit environ 150 mg/kg/j) de 4tOP dans de l'huile de maïs entre PND2-PND12 pendant la période néonatale n'a aucun effet sur l'expression des récepteurs des stéroïdes sexuels (récepteurs des androgènes, des œstrogènes et de la progestérone) dans les vésicules séminales (tissu cible de l'appareil reproducteur en développement) chez le rat mâle nouveau-né.

<sup>27</sup> Index apoptotique des cellules germinales correspond au ratio du volume nucléaire des cellules germinales apoptotiques sur le volume nucléaire des cellules germinales viables par testicules

**Sharpe et al., (2003)** ont conduit une étude qui visait à évaluer les effets d'une exposition néonatale à des substances œstrogéniques (DES et 4tOP) et à un antagoniste de la GnRH sur le développement et la fonction des cellules de Leydig, de la puberté jusqu'à l'âge adulte. L'exposition des rats mâles Wistar par injection sous-cutanée de 2 mg/j (soit environ 150 mg/kg/j selon Williams et al., 2001) de 4tOP dans de l'huile de maïs entre PND2-PND12 n'induit pas d'effet significatif sur le développement et la fonction des cellules de Leydig (évalués par la mesure du volume nucléaire des cellules de Leydig/testicule, le nombre de cellules de Leydig/testicule et les concentrations plasmatiques en testostérone). Seule une augmentation précoce et transitoire de la concentration plasmatique en testostérone comparativement aux témoins négatifs a été relevée à PND18. **Les auteurs suggèrent que cette augmentation est liée à des niveaux anormalement élevés de FSH conduisant à une action plus importante de la LH endogène.**

**Yoshida et al., (2001)** ont étudié les effets d'un traitement néonatal au 4-tert-octylphénol sur l'appareil reproducteur mâle à l'âge adulte. De nombreux paramètres ont été investigués (spermatogenèse, gonadotrophines, capacité de reproduction, taille du SDN-POA). Des rats Donryu ont été exposés par injection sous-cutanée à 100 mg/kg pc à PND1 – 3 – 5 – 7 – 9- 11 – 13 -15. L'exposition au 4tOP altère les niveaux en FSH et testostérone, le poids des organes reproducteurs et la réserve spermatique épididymaire.

**Bicknell et al., 1995** ont étudié l'effet du 4tOP sur l'hypothalamus. Des rates Wistar, ont été exposées au 4tOP par injection sous-cutanée en période prépubertaire (100 µL par injection à 10 mg de 4tOP pendant 3 jours consécutifs). Il est observé une augmentation du poids de l'utérus (de 100%) sans modification du poids corporel des animaux. En revanche dans cette étude, l'exposition périnatale (4 jours avant la naissance et 4 jours après la naissance, dose de 40 mg par injection sous-cutanée) n'induit aucune modification de la taille du noyau sexuellement dimorphique de l'aire hypothalamique préoptique (région impliquée dans le comportement sexuel, différente sur le plan neuroanatomique entre mâles et femelles) à PND60, contrairement au DES (augmentation de 46% de l'aire de ce noyau chez les femelles). Cette étude présente toutefois des limites méthodologiques ; le protocole expérimental est peu décrit, le nombre d'animaux est limité, pas de précision sur l'injection sous-cutanée, dose unique, pas d'indication sur alimentation.

**Katsuda et al., (2000)** ont investigué les effets d'une exposition néonatale au 4tOP sur le tractus reproducteur femelle chez le rat Donryu. Des rates nouveau-nées (n compris entre 3 et 8 par groupe) ont reçu tous les deux jours une injection sous-cutanée de 12,5 – 25 – 50 et 100 mg/kg 4tOP (administrée dans du DMSO) entre PND1 et PND15. Des frottis vaginaux ont été réalisés jusqu'à la 10<sup>ème</sup> semaine de vie des rats afin d'étudier le cycle œstral. L'incidence d'œstrus persistant a été relevée après 1 (PND1), 3 (PND1, PND3 et PND5) ou 8 injections (PND1, PND3, PND5, PND7, PND9, PND11, PND13 et PND15) chez des rates nouveau-nées exposées par injections sous cutanées à 100 mg/kg (n compris entre 6 et 24).

Les observations n'ont montré à l'âge adulte aucun effet d'œstrus persistant dans les groupes exposés pendant la période néonatale à 12,5 – 25 et 50 mg/kg. En revanche, toutes les rates exposées à 100 mg/kg ont montré cet effet. Par ailleurs, l'exposition des rates à la naissance 3 fois ou 8 fois conduit à un effet d'œstrus persistant avec une incidence de 14% et 100%, respectivement.

Dans l'étude principale, des rates nouveau-nées issues de plusieurs portées ont été exposées au 4tOP par injection sous-cutanée de 100 mg/kg tous les deux jours entre PND1 et PND15 (8 expositions). Après le sevrage, les animaux ont été examinés quotidiennement pour identifier l'âge de l'ouverture vaginale. Les phases du cycle œstral ont pu être déterminées à l'aide de frottis vaginaux. Les oviductes de plusieurs rates exposées au 4tOP présentant un effet d'œstrus persistant ont été prélevés pour confirmer ou non l'ovulation (dénombrement des ovocytes). Des échantillons de sang ont été prélevés à différents stade du développement des rates (PND6, PND10, PND14, PND21 (jour de sevrage), PND28, PND56 et PND77) pour mesurer les

concentrations sériques en LH, FSH, inhibine,  $17\beta$ -œstradiol et progestérone. Des groupes rates ont été sacrifiés à PND6, PND10, PND14, PND21 (jour de sevrage), PND28, PND56 et PND77 lors de la phase d'œstrus. Le poids de plusieurs organes a été évalué (ovaires, utérus, vagin, foie, rate, rein, cœur, thymus, glandes surrénales) et certains ont fait l'objet d'un examen histopathologique (utérus). Un avancement de l'âge à l'ouverture vaginale (de 4 jours comparativement aux témoins a été observée chez les rates (n=21) après une exposition néonatale à 100 mg/kg de 4tOP tous les 2 jours entre PND1 et PND15. Les auteurs rapportent que, contrairement aux rates témoins, aucune des rates exposées au 4tOP ne présentaient de cycles œstraux réguliers tout au long de l'étude. Finalement, les frottis vaginaux des rates exposées présentaient des cellules épithéliales nucléées et/ou cornées témoins d'un effet d'œstrus persistant. L'examen de certains animaux (témoins et exposées avec un effet d'œstrus persistant) âgés de 10 semaines, montre l'absence d'ovocytes dans les oviductes des rates traitées au 4tOP contrairement aux témoins qui possédaient en moyenne 13 ovocytes.

Une légère diminution du poids corporel des rates exposées au 4tOP (100 mg/kg) a été observée (statistiquement significative uniquement à PND6 et PND14) par rapport aux témoins. Les effets rapportés sur le poids des organes reproducteurs sont : une augmentation du poids de l'utérus à PND10, une diminution du poids relatif des ovaires à PND21, 56 et 77 ainsi qu'une diminution du poids relatif de l'hypophyse uniquement à PND77. Aucun effet sur le poids des autres organes évalués n'a été rapporté.

Les auteurs rapportent que l'observation macroscopique lors de l'ouverture vaginale a révélé la présence d'une fente élargie et d'un feuillet muqueux du clitoris chez les rates traitées. L'examen histologique chez les rates exposées au 4tOP montre une modification de la morphologie ovarienne (présence de kystes et de corps jaunes dégénérés) et une réduction du nombre de glandes utérines, une modification des cellules épithéliales et des glandes de l'endomètre traduisant une hyperplasie de l'endomètre. De plus, une augmentation de la prolifération cellulaire au sein des glandes de l'endomètre et la présence de quelques cellules apoptotiques ont également été observées. Enfin dans l'endomètre, une forte expression de l'ARNm du récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  a été mise en évidence dans l'épithélium de revêtement de l'utérus.

Pendant la période pré-pubertaire, les concentrations sériques de LH et FSH chez les rates exposées au 4tOP sont plus faibles que chez les témoins, et en particulier, les concentrations sériques en FSH restent uniformément faibles jusqu'à PND21 chez les animaux traités contrairement aux témoins (augmentation entre PND14-21 puis chute de la concentration en FSH). Après le sevrage, et ce jusqu'à la fin de l'étude, les concentrations de LH sont plus élevées chez les rates traitées au 4tOP que chez les témoins. En revanche le profil et les concentrations sériques en œstradiol sont comparables chez les exposées et les témoins (pendant toute la durée de l'observation). De même, les profils hormonaux (progestérone et inhibine) sont également comparables entre animaux traités et témoins. En revanche, à partir de PND28, les concentrations en progestérone sont deux fois plus faibles chez les rates exposées alors que pour l'inhibine elles sont plus élevées que chez les témoins.

**Les auteurs concluent que l'exposition à doses relativement élevées de 4tOP pendant la période néonatale altère la sécrétion hormonale pendant le développement. Cela est probablement dû à une altération de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope, induisant un avancement de l'âge à l'ouverture vaginale, un effet d'œstrus persistant et une hyperplasie de l'endomètre.**

Limites de l'étude : dose unique.

**Herath *et al.*, (2001) ont étudié les effets du 4tOP sur l'âge de l'ouverture vaginal et la durée de l'œstrus.** Des rates Wistar (n=14-20/groupe) nouveau-nées ont été exposées par injection sous-cutanée à 100 mg/kg de 4tOP pendant 8 expositions (PND1 – 3 – 5 – 7- 9 - 11- 13 – 15). Un groupe contrôle (véhicule seul, DMSO) et un groupe témoins positif ( $17\beta$ -œstradioloestradiol à 500  $\mu$ g/g) ont également été inclus. L'âge à l'ouverture vaginale était significativement avancé dans les groupes exposés au 4tOP et au  $17\beta$ -œstradioloestradiol (17 jours vs 32,9 jours chez les témoins). Par ailleurs, les rates exposées au 4tOP et au  $17\beta$ -œstradioloestradiol présentaient un œstrus

persistant<sup>28</sup> (à partir de PND65 et PND38 respectivement) contrairement au groupe contrôle. De plus, le pic de LH spontané évalué entre PND78-81 (n=4/groupe) a été observé uniquement dans le groupe contrôle (DMSO). **Les auteurs concluent que l'exposition à forte doses de 4tOP chez les rates nouveau-nées altère le cycle de sécrétion de LH, FSH et PRL et interfère avec le comportement sexuel du rat à l'âge adulte.**

**Willoughby et al., (2005)** ont investigué les effets d'une exposition néonatale sur le développement de la fonction de reproduction pendant les périodes prépubertaire et pubertaire chez la femelle. Des rates Sprague-Dawley (n=6-8/groupe) ont été exposées par voie sous-cutanée à 0, 5 et 50 mg/kg/j de 4tOP (administré dans de l'huile de maïs) de PND1 à PND10. Le DES a été utilisé comme témoin positif (administration de 0,5 mg/kg/j selon le même protocole).

Aucune différence du poids corporel des animaux traités et témoins n'a été mise en évidence dans cette étude. Un avancement de l'âge à l'ouverture vaginale<sup>29</sup> a été observé chez les rates exposées à 50 mg/kg/j de 4tOP et celles exposées à 0,5 mg/kg/j de DES.

L'altération de la fonction de reproduction au moment de la puberté a été évaluée par le pourcentage de rates présentant un état anovulatoire (absence de corps jaune lors de l'ouverture vaginale). Ainsi 36% et 80% des rates exposées respectivement à 5 et 50 mg/kg/j de 4tOP ont présenté une altération de la fonction de reproduction au moment de la puberté (100% pour les rates exposées au DES). Une diminution du poids des ovaires et une augmentation du poids de l'utérus ont été observées chez les rates exposées à 50 mg/kg/j de 4tOP ou au DES. Ces résultats montreraient l'activité œstrogénique du 4tOP. La mesure de la concentration plasmatique de LH un jour avant l'ouverture vaginale, montre l'absence de pic préovulatoire de LH chez les rates exposées à la dose de 50 mg/kg/j (selon les auteurs, l'altération de la fonction de reproduction suite à une exposition au DES est due à l'absence de pic préovulatoire de LH).

Il a été montré qu'une exposition post-natale précoce à l'œstradiol induit une perte du rétrocontrôle positif des hormones stéroïdiennes sur la libération de LH. L'implantation sous-cutanée d'une capsule contenant de l'œstradiol (dose non indiquée) chez des rates juvéniles exposées à 50 mg/kg/j de 4tOP ne stimule pas la sécrétion de LH contrairement aux témoins (véhicule seul). L'observation des frottis vaginaux entre 40 et 60 jours après la naissance montre que 100% des rates exposées au 4tOP (n=14) et au DES (n=5) présentent un œstrus persistant après l'ouverture vaginale contrairement aux témoins qui présentent des cycles réguliers de 4-5 jours après la puberté.

Par ailleurs, les ovaires prélevés chez les rates exposées au 4tOP et au DES contiennent significativement plus de follicules préantraux et de follicules à antrum atrétique que les témoins. En revanche, une réduction du nombre de corps jaunes a été observée chez les animaux exposés au 4tOP et au DES par rapport aux témoins (pas de différence concernant le nombre de follicules antraux).

**Les auteurs concluent que l'exposition au 4tOP durant la période critique de différenciation sexuelle cérébrale affecte l'initiation de la puberté et la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope.**

**Blake et Ashiru (1997)** ont recherché les effets d'une exposition néonatale au 4tOP sur l'âge à l'ouverture vaginale et sur la cyclicité œstrale à l'âge adulte chez des rats Sprague-Dawley. Les effets d'une exposition de l'adulte sur le cycle œstral et l'ovulation ont également été investigués dans cette étude. Un jour après la naissance, des ratons femelles<sup>30</sup> ont reçu une injection sous-

<sup>28</sup> présence de cellules cornées lors de l'examen cytologique du vagin

<sup>29</sup> L'ouverture vaginale signe le début de la puberté chez le rat

<sup>30</sup> Ratons issus de 12 femelles répartis de manière aléatoire afin de constituer 12 nouvelles portées. Ces dernières sont composées chacune de 10 ratons : 4 à 7 femelles et 3 à 6 mâles. Trois portées ont été affectées dans chacun des 4 groupes d'exposition (véhicule seul, 4tOP, méthoxychloré et chlorophénol).

cutanée de 4tOP (1 mg soit environ 170 mg/kg<sup>31</sup>), de méthoxychlore (1,7 mg, possède une faible activité œstrogénique), de chlorophénol (1 mg, témoin négatif) ou de véhicule seul (huile de maïs). Afin de mesurer l'âge de l'ouverture vaginale, les rates sevrées ont été examinées quotidiennement. Entre 9 et 11 rates âgées de 40 jours ont été sélectionnées de manière aléatoire dans chaque groupe afin d'évaluer la régularité des cycles œstraux débutant 3 mois après la naissance. Ainsi, des frottis vaginaux ont été effectués quotidiennement pendant 3 semaines.

Aucun effet sur l'âge à l'ouverture vaginale n'a été observé dans les groupes exposés au 4tOP, méthoxychlore et chlorophénol. En revanche, l'exposition néonatale des rates au 4tOP (comme au méthoxychlore) induit la survenue d'un œstrus persistant (incidence : 9/11 chez les rates exposées au 4tOP) révélée par la présence de cellules épithéliales et/ou cornées durant les 3 semaines d'observation.

**Les auteurs concluent que le 4tOP exerce *in vivo* une activité œstrogénique chez les rates pendant la période néonatale qui se traduit chez l'adulte par des troubles du cycle œstral.**

Limites de l'étude : les auteurs se sont intéressés uniquement à l'étude du cycle œstral (pas d'autres paramètres investigués notamment aucun examen histologique des organes reproducteurs n'est fourni), les doses d'exposition ne sont pas pertinentes au regard de l'exposition humaine, étude par voie sous-cutanée sans préciser le mode opératoire, injections sur plusieurs sites,...).

### 8.1.2 Données humaines

Pas de données pertinentes identifiées.

## 8.2 Activité œstrogénique, androgénique et thyroïdienne

### Données animales

Dans l'étude de **Blake et al. (2004)** l'objectif était d'évaluer les effets du 4tOP sur l'augmentation de la concentration des gonadotrophines habituellement observée suite à la castration. Des rats Fischer ont été traités via l'eau de boisson à 0,  $1.10^{-9}$ ,  $1.10^{-7}$  et  $1.10^{-5}$  M (soit 0,02-0,035 ; 2-3,5 et 200-350 µg/kg pc/j) pendant 4 mois. Puis les animaux (n=6/groupe) ont été castrés à la fin de cette période et l'exposition via l'eau de boisson a été maintenue pendant 3 semaines supplémentaires. Plusieurs paramètres ont été évalués : poids des testicules et de l'épididyme, les réserves spermatiques testiculaires et épididymaires, la morphologie des spermatozoïdes épididymaires. Après le sacrifice des rats (3 semaines après la castration), d'autres paramètres ont été analysés (concentrations sanguines en LH et FSH, poids des reins, de la rate et de l'hypophyse). Aucun effet n'a été observé sur le poids corporel et le poids des testicules, de l'épididyme, de la rate, des reins et de l'hypophyse. Une diminution de la réserve spermatique épididymaire a été notée à la dose la plus élevée ( $1.10^{-5}$  M soit 200-350 µg/kg pc/j), contrairement à la réserve spermatique testiculaire qui n'a pas été modifiée suite à l'exposition. L'exposition au 4tOP ne modifie pas l'incidence des anomalies au niveau de la tête des spermatozoïdes, en revanche, une augmentation des anomalies du flagelle a été rapportée dès la dose de  $1.10^{-9}$  M (soit 0,02-0,035 µg/kg pc/j). Enfin, les concentrations sériques en LH et FSH mesurées chez les rats castrés étaient plus importantes que chez les rats non castrés. Toutefois l'exposition au 4tOP n'induit pas d'effet significatif sur les concentrations sériques des gonadotrophines.

**Katsuda et al., (2001)** ont examiné la relation entre l'activité œstrogénique du 4tOP, les concentrations sériques en 4tOP et la durée de l'exposition. Des rates Donryu adultes

---

<sup>31</sup> En considérant que le poids d'un rat Sprague-Dawley à la naissance est de 6 g (Katsuda 2000, cité par SVHC, 2011).

ovariectomisées (n=5/groupe)<sup>32</sup> ont été traitées par injections sous-cutanées à 0 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 et 200 mg/kg/j de 4tOP administré dans du DMSO pendant 2 ou 14 jours successifs (uniquement pendant 2 jours pour les rates exposées à la dose de 200 mg/kg/j). Parallèlement dans deux autres groupes, des rates ont été exposées à 5 µg/kg/j de 17β-œstradiol (E2, témoin positif) pendant 2 ou 4 jours. A noter que l'ovariectomie a été conduite afin de s'affranchir du niveau de base en estrogènes et les auteurs ont utilisé la voie sous-cutanée pour s'affranchir de l'effet de premier passage hépatique. Les rates ont été sacrifiées 24 h après la dernière exposition. Plusieurs paramètres ont été évalués dont les concentrations sériques en 4tOP et E2, la cytologie vaginale (frottis vaginaux), poids de l'utérus, hauteur des cellules de la lumière de l'utérus, prolifération cellulaire dans l'utérus et le vagin.

Une augmentation dose-dépendante des concentrations sériques en 4tOP a été relevée suite à l'exposition de 2 jours ainsi que celle de 14 jours (concentrations : de 70 à 190 ng/ml et de 60 à 190 ng/l respectivement). Le 4tOP est détecté dans le sang à partir de la dose de 25 mg/kg/j pour une exposition de 2 jours et dès 12,5 mg/kg/j pour celle de 14 jours. Concernant l'E2, la concentration sérique était similaire après 14 et 2 jours d'exposition (24 pg/ml).

L'exposition répétée au 4tOP pendant 2 et 14 jours induit une augmentation dose-dépendante du poids de l'utérus (significative à partir de 50 et 25 mg/kg/j pour des expositions de 2 et 14 jours respectivement) et de la hauteur des cellules épithéliales de la lumière utérine (significative à partir de 100 et 50 mg/kg/j pour des expositions de 2 et 14 jours respectivement). Des effets plus marqués ont été observés chez les témoins positifs exposés à l'E2. En revanche aucune modification n'a été rapportée sur le poids corporel des rates et sur le poids d'autres organes (sans plus détails) à l'exception d'une diminution du poids du thymus à la dose de 100 mg/kg/j après une exposition de 14 jours.

Après 14 jours d'exposition au 4tOP, l'analyse cytologique des frottis vaginaux a révélé la présence de cellules cornées et nucléées ainsi qu'un faible nombre de leucocytes au niveau de l'épithélium vaginal (aucune modification de la cytologie vaginale n'a été observée après une exposition de 2 jours au 4tOP). Ainsi, les effets observés sur ce paramètre suite à une exposition à 100 mg/kg/j de 4tOP pendant 14 jours sont similaires à ceux observés avec l'E2.

L'exposition au 4tOP pendant 2 jours induit une augmentation (significative à partir de 100 mg/kg/j) de la prolifération de différents types cellulaires de l'utérus (cellules épithéliales de la lumière utérine, cellules stromales et cellules glandulaires) et des cellules de l'épithélium vaginal, toutefois elle est moins prononcée que celle observée après une exposition à l'E2. En revanche, après une exposition de 14 jours, la prolifération des cellules dépend du type cellulaire considéré dans l'utérus et le vagin (prolifération transitoire élevée des cellules de l'épithélium glandulaire dans les utérus de rates exposées à la dose de 50 mg/kg/j qui n'est pas retrouvée à la dose de 100 mg/kg/j ; à partir de 50 mg/kg/j, légère prolifération des cellules stromales de l'utérus).

L'aspect histologique de l'utérus est modifié après une exposition au 4tOP (avec notamment la dilatation de la lumière utérine, la présence de figures mitotiques au niveau des cellules de la lumière utérine).

**D'après les auteurs, après une exposition de 14 jours, la concentration minimale à partir de laquelle l'activité œstrogénique du 4tOP est observée est de 25 mg/kg/j ce qui correspond à une concentration sérique de 80 ng/ml. Les auteurs concluent que le 4tOP exerce une activité œstrogénique sur l'appareil reproducteur de rates ovariectomisées uniquement à des doses élevées. Les effets observés sont essentiellement liés aux concentrations sériques en 4tOP.**

**Herath et al., (2001)** ont étudié les effets du 4tOP sur le comportement sexuel des rates (étude précédemment décrite). Des rates Wistar exposées à 100 mg/kg de 4tOP (8 expositions entre PND1-PND15 ; injection sous-cutanée) ont été ovariectomisées à PND115 et 8 jours plus tard une

<sup>32</sup> 13 jours après l'ovariectomie et avant l'exposition au 4tOP et à l'E2, les rates ont reçu 3 fois 15 ng/j d'E2 (J13 – J14 et J15 après l'ovariectomie).

capsule en Silastic contenant du  $17\beta$  œstradiol a été implantée sous la peau. Les pics de LH, FSH et prolactine ont été observés pendant deux jours consécutifs uniquement chez les rates du groupe contrôle (DMSO).

Afin de tester le comportement de lordose, des rates exposées au 4tOP et au DMSO ont été ovariectomisées à PND186 et 6 jours plus tard, elles ont été exposées à une injection sous-cutanée de benzoate d'œstradiol (15 µg/kg pc) et à une injection sous-cutanée de progestérone (2 mg/kg pc). En réponse au traitement hormonal et aux montées des mâles, les rates exposées au 4tOP étaient moins réceptives que celles du groupe contrôle (DMSO). L'analyse de l'aire préoptique hypothalamique montre une augmentation de l'aire du noyau sexuellement dimorphique (SDN) chez les rates exposées au 4tOP comparativement aux animaux du groupe contrôle.

**Les auteurs concluent que l'exposition néonatale des rates à une dose élevée de 4tOP perturbe la libération cyclique de LH, FSH et prolactine et interfère avec l'expression du comportement sexuel femelle à l'âge adulte (effets masculinisants du traitement en raison de la diminution de la réceptivité et de l'augmentation de la taille du noyau sexuellement dimorphique de l'aire préoptique).**

- Test utéro-trophique

**Sahambi et al., 2010** ont évalué l'action hormonale du 4tOP dans une étude mettant en œuvre un test utéro-trophique. Des rates Sprague-Dawley prépubères (n=6-/groupe de dose) ont reçu par gavage du 4tOP (pureté 97%, véhicule propylène glycol (PG)) à des doses de 0, 125 et 250 mg/kg pc/j ou une solution saline (témoin négatif) pendant 3 jours (du 21<sup>ème</sup> au 23<sup>ème</sup> jour postnatal). Le 17- $\alpha$ -éthynyl œstradiol (EE2) a été utilisé comme témoin positif (10 µg/kg/j par injection intrapéritonéale pendant 3 jours).

Une augmentation significative du poids corporel des femelles est observée entre le 1<sup>er</sup> jour d'exposition et le sacrifice dans les groupes témoins (solution saline, PG et EE2) et le groupe exposé à la dose de 125 mg/kg/j de 4tOP. En revanche, une diminution du poids corporel a été relevée entre le 1<sup>er</sup> jour d'exposition et le jour du sacrifice chez les femelles prépubères exposées à la dose de 250 mg/kg/j. Une diminution statistiquement significative du poids corporel est observée à la dose de 250 mg/kg/j par rapport aux témoins (environ 33 g vs 53 g chez les témoins solution saline, 63 g chez les témoins PG seul, et 60 g chez les rates exposées à EE2) au moment du sacrifice. De la même manière une diminution significative du poids corporel est relevée dans le groupe exposé à la dose de 125 mg/kg/j par rapport au groupe contrôle PG seul (50 g vs 53 g) lors du sacrifice.

Une augmentation significative du poids des reins ( $820 \pm 43$  vs  $685 \pm 7$  mg (contrôle solution saline) ;  $655 \pm 21$  (contrôle PG) et  $647 \pm 11$  mg (exposées à EE2) et une diminution du poids de la rate ( $104 \pm 12$  vs  $216 \pm 7$  mg (contrôle solution saline) ;  $231 \pm 6$  (contrôle PG) et  $223 \pm 9$  mg (exposées à EE2) est observées chez les femelles exposées à la dose 250 mg/kg/j.

Le poids de l'utérus (exprimé en mg) est augmenté chez les femelles prépubères exposées à l'EE2 (125 mg vs environ 40 mg pour les autres groupes). Aucun effet sur le poids de l'utérus dans les groupes traités au 4tOP n'est mis en évidence.

- Test d'Hershberger

**Yamasaki et al. (2003)** ont étudié l'activité androgénique/antiandrogénique du 4tOP par un test d'Hershberger. Dans cette étude, des rats Brl Han: WIST Jcl (GALAS) mâles castrés âgés de 7 semaines ont été traités par voie orale à 50, 200 et 600 mg/kg/j de 4tOP pendant 10 jours consécutifs. Tous les rats exposés à 600 mg/kg/j sont morts et une diminution de la locomotion spontanée a été observée chez les rats exposés à 200 et 600 mg/kg/j. Une diminution significative du poids corporel est également rapportée à la dose de 200 mg/kg/j. Aucun effet androgénique n'a été observé aux doses de 50 et 200 mg/kg/j.

**Tableau 5 : Synthèse des tests utérotophiques et test d'Hershberger**

Références	Protocole	Résultats
Laws <i>et al.</i> , 2000	Rates Long Evans prépubères ou adultes ovariectomisées Injection sous cutanée ou gavage : 0, 50, 100, 200, 400 mg/kg (1 injection/j pendant 3 jours) Témoin positif : 17β-œstradiol, éthinyl œstradiol	<u>Test utérotophique</u> <u>Rates prépubères :</u> - ↗ significative de poids humide de l'utérus (exprimé en % par rapport à la valeur du contrôle) à 200 et 400 mg/kg de 4tOP au bout de 6 h (non observé après 24 h) - ↗ plus importante du poids humide de l'utérus suite à exposition sous-cutanée de 4tOP (100, 200 et 400 mg/kg) / exposition voie orale <u>Rates ovariectomisées :</u> - ↗ significative de poids humide de l'utérus (exprimé en % par rapport à la valeur du contrôle) à 100 et 200 mg/kg de 4tOP (voie orale)
Diel <i>et al</i> 2000	Rates DA/HAN juvéniles (pas d'autres précisions sur l'âge) ovariectomisées ; n=6 Exposition par voie orale (gavage) : 0, 5, 50, 200 mg/kg/j pendant 3 jours Témoin positif : éthinyl œstradiol	<u>Test utérotophique</u> ↗ significative de poids relatif humide de l'utérus à 200 mg/kg de 4tOP
Sahambi <i>et al.</i> 2010	Rates Sprague-Dawley prépubères Exposition par voie orale (gavage) : 0, 125 et 250 mg/kg pc/j pendant 3 jours Témoin positif : 17α-éthinyl œstradiol	<u>Test utérotophique</u> <u>Aucun effet sur le poids de l'utérus</u>
Bicknell <i>et al.</i> 1995	Rates Wistar prépubères Exposition par injection sous-cutanée : 10 mg par injection pendant 3 jours consécutifs Témoin positif : diéthylstilbestrol (DES)	<u>Test utérotophique</u> ↗ significative du poids de l'utérus (exprimé en mg) sans modification du poids corporel des animaux
Katsuda <i>et al</i> 2000	Rates adultes ovariectomisées Exposition par injection sous-cutanée (2 jours ou 14 jours): 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/kg/j Témoin positif : 17β-œstradiol	<u>Test utérotophique</u> ↗ significative du poids de l'utérus 50, 100 et 200 mg/kg/j (2 jours) ↗ significative du poids de l'utérus 25, 50, 100 et 200 mg/kg/j (14 jours)
Kwack <i>et al.</i> , 2002	Rates Sprague-Dawley ovariectomisées Injection sous-cutanée : 0, 10, 50, 200 et 400 mg/kg/j de 4-TOP. 3 jours Témoin positif : 17β-œstradiol	<u>Test utérotophique</u> - ↗ dose-dépendante poids humide utérus dès 50 mg/kg/j de 4-TOP - pas d'effet significatif sur poids du vagin
Yamasaki <i>et al.</i> 2003	Rates Crj:CD (SD) prépubères (âgées de 19 jours) Exposition par injection sous-cutanée : 0, 2, 20, 200 mg/kg/j pendant 3 jours Témoin positif (T+) : éthinyl œstradiol	<u>Test utérotophique</u> ↗ significative du poids de l'utérus à 200 mg/kg/j
Yamasaki <i>et al.</i> 2003	Rats Brl Han: WIST Jcl (GALAS) castrés Exposition par voie orale à 50, 200 et 600 mg/kg/j	<u>Test d'Hershberger</u> Tous les rats exposés à 600 mg/kg/j sont morts et une diminution significative du poids observée dans le groupe exposé à 200 mg/kg/j. Aucun effet androgénique (agoniste ou antagoniste) n'a été mis en évidence à 50 et 200 mg/kg/j

**Données *in vitro***

De nombreuses études *in vitro* (Tableau 6, Tableau 7, Tableau 8) ont été réalisées notamment pour estimer l'activité œstrogénique du 4tOP.

Un test de liaison compétitive aux récepteurs aux œstrogènes (alpha et beta) humains (*in vitro*) (4tOP, 17β œstradiol (E<sub>2</sub>) et DES ; vecteur DMSO) a été réalisé dans l'étude de Sahambi *et al.*, 2010. Les IC<sub>50</sub><sup>33</sup> du 4tOP vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes sont supérieures à celles de l'E<sub>2</sub> et du DES (les concentrations nécessaires pour déplacer le ligand des récepteurs alpha et bêta aux œstrogènes sont respectivement 400 et 700 fois supérieures). Le potentiel de liaison du 4tOP aux récepteurs aux œstrogènes est plus faible que celui du DES et de l'E<sub>2</sub>.

Les résultats d'un test E-Screen réalisé par Sahambi *et al.* 2010 montrent que l'exposition des cellules MCF7 au 4tOP, à l'E<sub>2</sub> et au DES provoque une augmentation de la prolifération cellulaire (« concentration-dépendante ») (EC<sub>50</sub> : E<sub>2</sub>, DES et 4tOP respectivement 1,2 pM ; 9,4 pM et 205 nM).

**Tableau 6 : Évaluation de l'activité œstrogénique du 4tOP : essais de prolifération sur cellules cancéreuses de glandes mammaires**

Référence	Type de cellules / Ligands utilisés	Résultats
Dodge <i>et al.</i> 1996	Cellules MCF-7 Témoin : 17β-estradiol	NOEC = 1.10 <sup>-8</sup> M LOEC = 1.10 <sup>-7</sup> M « relative potency » : <1.10 <sup>-5</sup>
Kwack <i>et al.</i> 2002	Cellules MCF-7 Témoin : 17β-estradiol Doses : 1.10 <sup>-8</sup> – 1.10 <sup>-3</sup> M	Augmentation de la prolifération des cellules MCF-7 à partir de 1.10 <sup>-7</sup> M Cytotoxique dès 1.10 <sup>-5</sup> M
Isidori <i>et al.</i> 2010	Cellules MCF-7 Témoin : 17β-estradiol	NOEC = 1.10 <sup>-9</sup> M LOEC = 1.10 <sup>-8</sup> M « relative potency » : 0,0003
Sahambi <i>et al.</i> 2010	Cellules MCF-7 Témoin : 17β-estradiol et DES	EC50 = 205.10 <sup>-9</sup> M vs 1,2.10 <sup>-12</sup> M (17β-estradiol)

<sup>33</sup> IC<sub>50</sub> : concentration en agent compétitif qui inhibe 50% de la liaison spécifique

Tableau 7 : Évaluation de l'activité œstrogénique du 4tOP : interactions avec les récepteurs aux œstrogènes

Référence	Tests utilisés	Type de cellules / Ligands utilisés	Résultats
Laws <i>et al.</i> 2000	Evaluation de la capacité de fixation aux récepteurs ER avec un ligand (essai standardisé)	ER d'utérus de rate ovariectomisée	IC50 = 2,1 µM (ER) « relative potency » : 0,0007
Strunck <i>et al.</i> 2000	Evaluation de la capacité de fixation aux récepteurs ER	Cellules adénocarcinomes de l'endomètre ligand (RUCA): 17β-estradiol	« relative potency » : 0,013%
Yoon <i>et al.</i> 2000	Evaluation de la capacité de fixation aux récepteurs ER avec un ligand	ER d'utérus de souris ligand : 17β-estradiol	EC50 = 0,16 µM
Laws <i>et al.</i> 2006	Evaluation de la capacité de fixation aux récepteurs ER avec un ligand (essai standardisé)	ER d'utérus de rate ligand : 17β-estradiol	IC50 = 12 µM « relative potency » : 0,0004
Routledge <i>et al.</i> 2000	GST pull down assay	Bactéries exprimant hERα/β	« relative potency » : 0,0001(ERα) et 0,0025 (ERβ)
Sahambi <i>et al.</i> 2010	Test de compétition sur les récepteurs ER avec un ligand fluorescent (Rhodamine)	Bactéries exprimant hERα/β	IC50 = 2,08 µM (ERα) et 3,52 µM (ERβ)

D'autres études *in vitro* utilisant des tests cellulaires basés sur des gènes rapporteurs sont décrites dans le document SVHC (2011).

**En résumé, les tests *in vitro* montrent un faible potentiel œstrogénique du 4tOP.**

Tableau 8 : Évaluation de l'activité endocrinienne : interaction récepteurs AR et PR

Référence	Tests utilisés	Type de cellules / Ligands utilisés	Résultats
Paris <i>et al.</i> 2002	Evaluation de la capacité de fixation aux récepteurs AR	PALM (lignée cellulaire exprimant les récepteurs aux androgènes)	IC50 = 3 µM
Li <i>et al.</i> 2010	Evaluation de la capacité de fixation aux récepteurs AR et PR	Cellules de levure exprimant hAR et hPR	IC50 = 1,6 µM (AR) et 1,2 µM (PR)

Les tests (*in vivo* et *in vitro*) montrent une faible activité œstrogénique du 4tOP. Cela suggère qu'un des principaux mécanismes d'action de perturbation endocrinienne du 4tOP est lié à son activité œstrogénique. Le test de Hershberger s'est révélé négatif, suggérant que l'interaction du 4tOP avec les récepteurs aux androgènes observée *in vitro* n'est pas transposable *in vivo*.

## 8.2.1 Données écotoxicologiques ou relatives aux effets observés sur la faune sauvage

Les gastéropodes apparaissent comme les espèces particulièrement sensibles aux estrogènes. Des études controversées montrent des effets (augmentation de la fertilité, malformation d'organes sexuels dont diminution de la taille du pénis) à des doses d'octyl-phénols (OP) de moins de 1 µg/L (Oehlmann *et al.*, 2000, 2006; Schulte-Oehlmann *et al.*, 2004). Cependant ces études sont les résultats d'une équipe ou d'équipes associées et n'ont pas pu être reproduites dans une expérimentation associant les industriels (Forbes *et al.*, 2007).

**Bannister *et al.* (2013)** (comprenant des auteurs associés aux publications ayant rapporté des effets, et à partir de la même souche « sensible ») ont étudié la possibilité que l'OP ou l'E2 puisse interagir avec les orthologues des ER et EER. Deux études ont été réalisées : (1) une exposition des individus pendant 12 jours à 5 et 25 µg/L de 4tOP (ou 10, 100, 1000 ng/L E2) et (2) des tests *in vitro* avec un système rapporteur impliquant les récepteurs d'intérêt. Les résultats montrent respectivement (1) aucune modification significative du niveau d'expression génique (ER ou EER) suite aux expositions et (2) aucune transduction du système rapporteur.

Les résultats de cette étude confirment ceux d'autres études montrant que les récepteurs aux estrogènes des mollusques ne lient pas les composés œstrogéniques comme cela a été montré chez les vertébrés.

L'étude de **Dong *et al.* (2014)** montre que les silures sont féminisés par leur alimentation à base d'annélides *Limnodilus spp* pêchés dans des rivières particulièrement contaminées par plusieurs substances dont 4tOP, BPA, DES et 4-NP à environ 4-15 ng/g. A noter qu'une autre source d'alimentation résout le problème.

En conclusion, cette étude semble solide. Elle est originale car elle est la première montrant une féminisation totale uniquement par l'alimentation. Cependant, il est impossible de calculer d'après les données quelle est la dose journalière de 4tOP produisant les effets, si tant est que les effets sont induits par le 4tOP.

L'étude de **Petersen *et al.* (2013)** vise à étudier l'intérêt du test embryon poisson (poisson zèbre tg(cyp19a1b-GFP)) pour la détermination d'effets combinés. La réponse œstrogénique a été caractérisée pour des mélanges comportant du 17β-estradiol, 17α-ethinylestradiol, estrone, bisphénol A et 4tOP et des expositions de 1 à 5 jours post-fertilisation (début d'exposition à 1 jpf). La LC50 du 4tOP est de 2,2.10<sup>-6</sup> M (450 µg/L) et une NOEC de l'ordre de 2 mg/L. Le 4tOP induit une réponse dose-dépendante sur le test avec une EC50 est de 622 nM (130 µg/L) et un NOEL de l'ordre de 20 µg/L. Les mélanges contenant du 4tOP sont bien prédits par les modèles de concentrations additives ou d'action indépendantes indiquant un effet additif médié par le récepteur ERα. Cependant, les mélanges contenant BPA, 4tOP, EE2 and EI suggèrent une action inférieure à la simple addition.

En conclusion, cette étude est de bonne qualité et montre un effet ERα-dépendant chez les poissons. Le NOEL de l'ordre de 20 µg/L est en accord avec d'autres études sur les poissons.

L'étude de **Petersen *et al.* (2014)** vise à étudier les effets combinés de deux herbicides, deux anti-bactériens, deux produits de soin, 3 médicaments, un HAP et un alkylphénols (4tOP) en utilisant un test de croissance de microalgue (*Skeletonema pseudocostatum*). Les composés induisent tous une réponse dose-dépendante sur le test avec, pour 4tOP, une EC50 de 5,6 µM (1,1 mg/L) et un NOEL de l'ordre de 4 mg/L (le 10<sup>ème</sup> sur les 11 composés testés les plus toxiques). Les mélanges contenant 4tOP (ou non) sont bien prédits par les modèles de concentrations additives.

En conclusion, cette étude est de bonne qualité. Cependant le mode d'action du 4tOP est incertain mais les doses effectives sont très fortes et les micro-algues ne semblent pas des espèces particulièrement à risque pour ce composé.

**Traversi et al. (2014)** ont conduit une étude sur la toxicité hépatique d'alkylphenols, dont le 4tOP, sur la daurade royale *Sparus aurata*. Les doses de 4tOP utilisées étaient de 0, 5, 50 et 100 mg/kg/j, avec 20 individus testés par dose. Le sexe ratio, l'âge des individus, la pureté et l'origine de 4tOP n'ont pas été précisés. Le 4tOP a été administré pendant 21 jours dans la nourriture à raison d'une quantité de nourriture par individu correspondant à 1% du poids corporel. A 21 jours, les individus juvéniles ont été sacrifiés pour être analysés. Une mortalité de 50% a été observée à la plus forte dose. Au niveau histologique, il a pu être observé dans le foie, une accumulation lipidique hépatocytaire sévère à 5 et 50 mg/kg/j, une perte de la structure en cordons à 5 mg/kg/j (11.23%) et 50 mg/kg/j (85.71%), la présence de dégénérescence céroïde à 50 mg/kg/j seulement (pas dans témoin et 5 mg/kg/j), des hémorragies (10.08%) et une dégénérescence hydropique (57.66%) à 5 mg/kg/j seulement, une dégénération tissulaire (100% des animaux) à 50 mg/kg/j, des foyers de nécrose du tissu hépatique avec destruction de la structure en cordes et, dans la plupart des cas, absence de structures cellulaires à 50 mg/kg/j mais pas chez les témoins et à 5 mg/kg/j, pas de différence entre témoin et exposés pour la présence de mélanomacrophages. D'une manière général, le score d'altération histologique (Richardson et al., 2010) est de 1.85 pour le témoin, 2.56 pour NP1, 3.46 pour NP2, 3.06 TOP1 (5 mg/kg/j) et 5 TOP2 (50 mg/kg/j). Le 4tOP n'altère pas l'activité de la catalase hépatique et la glutathion-S-transférase mais induit une augmentation de l'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) à 5 et 50 mg/kg/j. Le 4tOP augmente, dans le foie, l'expression du gène de la cathepsine D (3.67X) et de la hsp70 (2.37X) à 50 mg/kg/j.

Le 4tOP induit des modifications de l'expression de protéines plasmatique chez les poissons mâles avec une modification du profil d'expression des différentes formes de vitellogénine (VG) : La forme 45 kDa n'est pas détectée à toute les doses et la forme la forme 60 kDa est augmentée à 50 mg/kg/j. La ZRP (zona radiata protein) n'est pas exprimée chez les témoins mais est exprimée à 5 mg/kg/j (essentiellement la forme de faible MM) et très fortement à 50 mg/kg/j (les deux formes).

Au niveau plasmatique, le 4tOP n'a pas d'effet sur la concentration en E2. Il induit une très forte diminution de la testostérone (env. 90%) à 5 et 50 mg/kg/j et une très forte augmentation du rapport E2/testostérone à 5 et 50 mg/kg/j (effet fortement féminisant – sexe non précisé). En conclusion, les doses sont fortes et l'action sur la production de testostérone est intrigante.

## 8.3 Toxicité par doses répétées : subaiguës ou subchroniques

### 8.3.1 Données animales

Dans une étude de toxicité subchronique de 28 jours décrite dans le rapport OCDE SDIS et le rapport SVHC, des rats Sprague-Dawley (n=6 animaux/sexe/groupe) ont été exposés par gavage à 0, 15, 150 et 300 mg/kg/j. Les effets observés sont une salivation (deux sexes confondus) à partir de 150 mg/kg/j, une diminution de la prise de poids chez les mâles et une augmentation de la prise d'eau (deux sexes confondus) à la plus forte dose. En revanche aucun effet significatif sur la prise de nourriture et les paramètres hématologiques n'a été observé dans cette étude. A la dose de 300 mg/kg/j une augmentation du volume des urines et des modifications au niveau de sa composition ont été observées (diminution de la concentration en Na, Cl et K). Une augmentation du poids des reins et du foie a également été notée à la dose de 300 mg/kg/j. L'examen histopathologique a révélé la présence de tâches grisâtres sur les reins et une régénération des tubules rénaux. Néanmoins l'ensemble des effets observés est réversible (disparaissent après l'arrêt de l'exposition). **Dans le rapport OCDE SDIS, un NOEL de 15 mg/kg/j est proposé.**

Dans une seconde étude de toxicité subchronique décrite dans le rapport OCDE SDIS des rats Sprague-Dawley (n=5 animaux/sexe/groupe) ont été exposés par gavage à 0, 15, 150 et 250 mg/kg/j de 4tOP (administré dans l'huile de maïs) pendant 29 jours. L'exposition des rats à la dose la plus élevée (250 mg/kg/j) induit :

- une légère augmentation de la prise de nourriture (chez les mâles et les femelles)
- une augmentation importante de la prise d'eau (chez les mâles et les femelles)
- une diminution des niveaux de cholestérol chez les femelles
- une augmentation du poids relatif du foie et des reins chez les femelles
- un élargissement des hépatocyte centrolobulaires chez les femelles
- une inflammation interstitielle des reins chez les mâles
- un épithélium basophile avec la présence occasionnelle de figures mitotiques au niveau des tubes contournés proximaux (chez les mâles et les femelles).

Les effets rapportés dans le groupe exposé à 150 mg/kg/j sont :

- une légère augmentation de la prise de nourriture, une augmentation de la prise d'eau et une diminution des niveaux de cholestérol chez les femelles.
- un épithélium basophile avec la présence occasionnelle de figures mitotiques au niveau des tubes contournés proximaux chez les mâles.

**Dans le rapport OCDE SDIS un NOEL de 15 mg/kg/j est proposé (LOAEL = 150 mg/kg/j).**

Dans une étude de toxicité subchronique, des rats BOR/WISW (20 animaux/sexe/dose) ont été exposés via l'alimentation à 30, 300 ou 3000 ppm de 4tOP (soit environ 2,3 ; 23 et 230 mg/kg pc/j) (pureté : 93,1%) pendant 3 mois (Suberg *et al.*, 1982). Aucun signe clinique n'a été rapporté ni aucun effet sur la prise de nourriture. Une diminution importante de la prise de poids a été observée dans le groupe exposé à 3000 ppm (une légère diminution de la prise de poids a été rapportée à 300 ppm). Les examens histopathologiques n'ont révélé aucune modification. Des modifications de certains paramètres hématologiques ont été rapportées seulement chez les femelles exposées à 3000 ppm (diminution de l'hémoglobine et de l'hématocrite). Toutefois ces valeurs restent dans l'intervalle des valeurs physiologiques chez les femelles à cet âge. Une augmentation transitoire de la concentration plasmatique en T4 a été observée lors de l'observation effectuée 1 mois après le début de l'exposition dans le groupe exposé à 3000 ppm (non observée après 3 mois d'exposition). Dans la mesure où cette augmentation n'est attribuable qu'à 2 femelles et qu'aucune modification n'a été notée lors de l'examen histopathologique de la thyroïde, elle ne peut pas être reliée à un effet sanitaire (d'après SVHC, 2011 ; étude en allemand).

### 8.3.2 Données humaines

Aucune étude n'a été identifiée dans la littérature.

## 8.4 Cancérogénicité

**Kohno *et al.* (2004)** ont étudié les effets cancérigènes du 4tOP sur la prostate. Des rats Fischer 344 âgés de 4 semaines sont prétraités par injection sous cutanée de solvant (8 animaux par groupe) ou d'une substance cancérigène, le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) (16-17 animaux par groupes) pendant 20 semaines. Puis, ils sont exposés via l'alimentation (incorporation dans la nourriture) à des doses de 0, 10 et 100 ppm (soit 0, 0,15 et 1,5 mg/rat/j et environ 0 - 0,06

et 0,6 mg/kg pc/j) de 4tOP pendant 40 semaines. Un groupe témoin négatif traité ni par le DMBA ni par le 4tOP comprend 8 rats.

A la fin du traitement, le poids corporel est augmenté dans le groupe DMBA + 4tOP. Les poids des organes reproducteurs (testicules, prostate) et du foie ne sont pas modifiés.

Dans tous les groupes, la prostate latérale et la prostate dorsale ne présentent aucune lésion. Ces lésions sont localisées dans la prostate ventrale. Chez les animaux non prétraités par le DMBA, le 4tOP n'augmente pas significativement le nombre d'animaux présentant des lésions précancéreuses (néoplasies intra-épithéliales prostatiques (PIN)) (3 animaux/8 chez les témoins et 48 chez les traités par le 4tOP) ou des adénocarcinomes prostatiques (0/8 chez les témoins et 0/8 chez les traités).

Comme attendu, le DMBA augmente le nombre d'animaux présentant des PIN (3/8 chez les témoins et 13/17 dans le groupe DMBA) et des adénocarcinomes prostatiques (0/8 chez les témoins et 7/17 dans le groupe DMBA). L'exposition au 4tOP des animaux traités au DMBA n'augmente pas l'incidence des PIN et des adénocarcinomes.

Les auteurs concluent qu'une exposition à faibles doses de 4tOP n'a pas d'effet cancérigène sur la prostate. Cependant, cette étude présente des faiblesses. Les auteurs ne réalisent que 2 coupes histologiques sagittales de la prostate ventrale (positions non précisées) et des lésions peuvent ne pas avoir été détectées. Une inspection histologique plus complète de tous les individus de chaque groupe aurait été utile pour tirer des conclusions. De plus, un petit adénocarcinome a été détecté chez un rat exposé à 100 ppm de 4tOP sans prétraitement par le DMBA alors qu'aucun adénocarcinome n'a été observé dans le groupe non exposé au 4tOP. Enfin, il n'y a pas de témoin positif.

En raison de ces faiblesses, cette étude ne permet pas de conclure quant à l'effet cancérigène du 4tOP dans la prostate.

## 9 Autres données

### 9.1.1 Hépatotoxicité

**Saggu et al. (2014)** ont conduit une étude sur les effets de la chicorée sur l'hépatotoxicité induite par le 4tOP chez le rat Sprague-Dawley adulte. L'objectif étant de tester l'action protectrice des extraits végétaux vis-à-vis des effets de certains facteurs de stress. Les rats ont été exposés oralement par gavage pendant 8 semaines au 4tOP à 100 mg/kg/j combinés ou non à un extrait de chicorée à 100 mg/kg/j. Les témoins ont été traités au tampon salin. Douze rats ont été utilisés par modalité de traitement, sans indication du sexe ratio dans les groupes. Les individus ont été élevés dans des cages en fil d'acier. Aucune indication n'est fournie sur les matériaux utilisés pour les biberons et sur la qualité de l'alimentation.

Le 4tOP induit une couleur jaunâtre des poils, une baisse du poids corporel, baisse de l'activité, état de faiblesse (données non chiffrées). Il est observé une augmentation des enzymes sériques avec une très forte augmentation de ALAT (> 10x), ASAT (14.5x), ALP (1.8x), GGTP (2,2x), une augmentation de la bilirubine sérique (7.9x). Ces effets sont fortement réduits par le CFR (chicory fruit extract).

Le 4tOP induit une diminution des capacités anti-oxydantes hépatiques avec une baisse importante de la SOD, CAT, GPx et GST, une augmentation du malondialdéhyde (3.12x) et une diminution de 46% du glutathion réduit hépatique. Ces effets sont réduits par le CFR.

Au niveau histologique, il est observé un état cirrhotique avancé, une apparition de structures macronodulaire entourée de tissu fibreux, une apparition d'une matrice collagénique contenant un grand nombre de cellules de type fibroblastique et des fibroblastes, la présence de nombreuses vacuolisations hépatocellulaires dans la région centrolobulaire, des niveaux variés de dilatation et de nécrose d'interface, une augmentation de l'immuno-réactivité à la PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen (cyclin)) et une augmentation de la fragmentation du DNA, signe d'une apoptose, confirmée par la très forte augmentation de la caspase-3 (atténuée par le CFR). Les effets sont réduits par le CFR.

**Un LOAEL de 100 mg/kg/j peut être dérivé par le groupe de travail pour la toxicité hépatique.**

**Yildiz et al. (2012)** ont conduit une étude pour explorer les effets du 4tOP sur les fonctions rénales et hépatique chez des rats mâles Wistar. Des rats mâles âgés de 4-5 semaines ont été exposés par voie orale, pendant 13 semaines, au 4tOP aux doses de 0, 125 et 250 mg/kg/j. Les observations ont porté sur des paramètres histopathologiques, l'histomorphométrie glomérulaire rénale, une exploration immuno-histochimique de l'apoptose (test TUNEL) et des paramètres biochimiques sériques (protéines, cholestérol total, glucose, triglycérides, calcium, LDH, albumine, GGT, ASAT, ALAT, rapport ASAT/ALAT, CK-MB (créatine kinase, bande du myocarde), bilirubine, phosphore, urée, créatine). Il a été observé une baisse du poids relatif du rein à 125 mg/kg/j mais pas d'effet sur le poids du foie (absolu et relatif) à 250 mg/kg/j et sur le poids du rein et de la rate aux deux doses.

Au niveau de la biochimie sérique, le 4tOP a induit une diminution de la glycémie et une forte diminution de la phosphatase alcaline.

L'examen histopathologique du foie a révélé l'induction d'un œdème, d'une hyperémie<sup>34</sup> et une dégénération du parenchyme aux deux doses. Au niveau du rein, il a été observé, l'induction d'une dégénération tubulaire, et au niveau de la rate, une absence de fibrose bien que l'incidence soit de 0/5 chez les témoins et de 3/5 et 2/4 aux doses de 125 et 250 mg/kg/j, respectivement.

<sup>34</sup> L'hyperémie désigne l'accroissement du flux sanguin vers un organe ou un tissu de l'organisme

Aucun signe d'apoptose n'a été mis en évidence par le test TUNEL et aucun effet sur la morphométrie glomérulaire rénale n'a été observé.

**Un LOAEL de 125 mg/kg/j peut être dérivé sur la base de la toxicité hépatique et rénale.**

### **9.1.2 Sensibilisation**

Il y a peu de données disponibles concernant des effets sensibilisants du 4tOP.

Une étude citée dans le rapport SIDS OCDE (selon les lignes directrices OCDE 406) ne montre pas d'effets sensibilisant du 4tOP sur le cobaye.

### **9.1.3 Génotoxicité**

Plusieurs études de génotoxicité *in vitro* ont été réalisées. Les études de génotoxicité *in vitro* telles que les tests de mutagénicité sur *Salmonella typhimurium* ou sur cellules de hamster chinois n'ont pas mis en évidence d'effets mutagènes avec ou sans activation métabolique.

## 10 Mécanisme d'action

Les effets systémiques observés suite à une exposition au 4tOP ne semblent pas impliquer un mécanisme de perturbation endocrinienne. Cependant, certains effets tels que la modification du cycle œstral chez les femelles ne semblent pas nécessairement consécutifs à une toxicité systémique ou à un stress. Ainsi pour les effets sur le cycle œstral, les observations suggèrent un mécanisme de perturbation endocrinienne. Les effets adverses observés sur les organes reproducteurs et sur le développement après une exposition par injection sous-cutanée sont potentiellement attribuables à un mécanisme de perturbation endocrinienne. Les mécanismes d'action sont à ce jour non complètement élucidés.

## 11 Résumé des effets observés

Les études chez le rat montrent que le 4tOP est absorbé rapidement après une administration par voie orale (Certa et al., 1996 ; Upmeier et al., 1999 ; Hamelin et al., 2008). Pour les doses de 50 et 200 mg/kg, la biodisponibilité a été évaluée à 2% et 10%, respectivement, chez les rats mâles Wistar, dans l'étude de Certa et al. (1996), et à 12,3% et 8,4%, respectivement, chez les rats femelles DA/Han, dans l'étude de Upmeier et al. (1999). Pour des doses de 50, 125 et 250 mg/kg, Hamelin et al. (2009) ont trouvé des valeurs de biodisponibilité de 38, 28 et 26%, respectivement, chez les rats mâles Sprague-Dawley, et 46, 55 et 48%, respectivement, chez les femelles.

Les études par injection intraveineuse sur les souches de rat Wistar et DA/Han montrent que la concentration plasmatique du 4tOP décroît rapidement (Certa et al., 1996 ; Upmeier et al. 1999). Pour une dose injectée de 5 mg/kg pc, la concentration peut atteindre 1600 ng/ml immédiatement après injection, 100 ng/ml après une heure et 1-2 ng/ml après 48 h.

Les différences de concentrations plasmatiques observées après une administration par voie orale de 4tOP entre la souche de rat DA/Han (Upmeier et al., 1999) et la souche Wistar (Certa et al., 1996) (estimées par les courbes de concentrations en fonction du temps) indiquent un cycle entéro-hépatique plus important chez cette dernière.

Le 4tOP est rapidement métabolisé en métabolites de phase I ou de phase II. Le métabolisme a lieu principalement dans le foie mais également dans une moindre mesure dans l'intestin, le rein et les testicules (Nomura *et al.*, 2008).

Les études de génotoxicité *in vitro* n'ont pas mis en évidence d'effets mutagènes avec ou sans activation métabolique.

Tableau récapitulatif des doses critiques issues de données expérimentales.

Type d'effet	Conditions d'exposition (voie, durée du traitement, période d'exposition)	NOAEL ou LOAEL /espèce	Nature des effets, type d'étude	Références
Effet sur la fertilité et la reproduction	Voie orale (gavage), pendant 60 jours aux doses de 0, 25, 50, 125 mg/kg/j.	NOAEL (toxicité systémique) = 50 mg/kg/j, rats SD adultes.  NOAEL (toxicité sur la reproduction) = 125 mg/kg/j, rats SD mâle adultes.	Diminution du poids corporel statistiquement significative à la dose de 125 mg/kg/j.  Aucun effet observé sur les organes reproducteurs, aucun anomalie histologique testiculaire ou épidydimaire à la plus forte dose.	Gregory <i>et al.</i> (2009)
	Voie orale (gavage), pendant 30 jours aux doses de 0, 50, 150, 450 mg/kg/j.	NOAEL (toxicité sur la reproduction) = 150 mg/mg/kg pc/j, rat SD mâles adultes.	Diminution du poids brut des organes reproducteurs et des paramètres spermatiques (numération et production spermatique) à 450mg/kg pc/j.	Bian <i>et al.</i> (2006)
	Voie orale (eau de boisson) pendant 4 mois aux doses de $0,1 \cdot 10^{-9}$ ; $1 \cdot 10^{-7}$ et $1 \cdot 10^{-5}$ M (soit 0,02-0,035 ; 2-3,5 ; 200-350 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{j}$ )	NOEL (toxicité pour la reproduction) = 200-350 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ pc/j, rat mâle Fischer 344.	Absence d'effet sur les organes reproducteurs.	Blake et al (2004)

	Voie orale (gavage) pendant 25 jours aux doses de 0, 20, 100, 200 mg/kg/j.	NOEL (effets sur la reproduction) = 100 mg/kg/j, rats femelles adultes Long Evans.	Diminution du nombre de cycles de 4 à 5 jours et augmentation de la durée du dioestrus à 200 mg/kg/j.  Effets systémiques non étudiés.	Laws <i>et al.</i> (2000)
	Voie orale (via l'alimentation) sur deux générations aux doses de 0, 0.2, 20, 200, 2000 ppm.	NOAEL (pour les effets systémiques et post-nataux) = 200 ppm (soit de 1,05 à 3,2 mg/kg/j)  NOAEL (effet sur la reproduction) = 2000 ppm (soit de 111 à 369 mg/kg/j).  Rats femelles SD.	Baisse du poids corporel et du gain de poids corporel des parents (F0 et F1) et des adultes de la génération F2 à 2000 ppm.  Diminution du poids corporel des femelles des générations F0 et F1 à 2000 ppm pendant la période de lactation.  Baisse statistiquement significative du poids (relatif et absolu) de l'utérus chez les femelles F0 exposées à 2000 ppm.  Retard de l'ouverture vaginale et de la séparation du prépuce chez les petits F1 et F2 (attribué selon les auteurs à la diminution du poids corporel) à 2000 ppm.  Etude sur deux générations de type OCDE 416 et ligne directrice de l'US EPA (870.3800 OPPTS).	Tyl <i>et al.</i> (1999)
	Voie sous-cutanée pendant 1 mois (3 fois par semaine) aux doses de 0, 571, 1142, 2250 mg/kg pc.	LOAEL (effet sur la reproduction) = 571 mg/kg/j, rats mâles Fischer 344 pré-pubères.	Atteintes histologiques au niveau du testicule réduction de la taille des tubes séminifères, désorganisation des cellules de la spermatogénèse avec diminution importante de nombre totale de cellules germinales par tube, absence de spermatozoïdes matures ou de spermatides à un stade de différenciation tardif, présence de corps multi-nucléés et de cellules à noyaux pycnotiques.	Kim <i>et al.</i> (2004)
	Voie sous-cutanée pendant 2 mois (3 fois	LOAEL (effet sur la reproduction) =	Diminution du nombre de spermatozoïdes par gramme de testicules et augmentation significative des anomalies de la tête et du flagelle des	Blake et Boockfor (1997)

	par semaine) aux doses de 0, 66, 264 mg/kg pc.	66 mg/kg/j, rats mâles Fischer 344 pré- pubères.	spermatozoïdes.	
	Voie sous- cutanée pendant 28 jours aux doses de 0, 12.5, 25, 50, 100 mg/kg/j.	NOAEL (effets sur la reproduction = 25 mg/kg/j.  LOAEL (effets sur la reproduction) = 50 mg/kg/j, rats femelles Fischer 344 et Donryu.	Troubles du cycle oestral chez les rates des deux souches à 50 mg/kg/j, apparition d'un oestrus persistant à 100 mg/kg/j.	Yoshida <i>et al.</i> (2000)
<b>Effet sur le développement</b>	Voie orale (gavage) pendant 2 semaines avant l'accouplement, 2 semaines pendant la période d'accouplement, et 4 jours en post-partum aux doses de 0-125- 250-500 mg/kg pc/j.	NOAEL (effet sur la reproduction/ développement ) = 250 mg/kg/j.	A la dose de 500 mg/kg/j : Diminution des performances sexuelles, baisse de la fertilité chez les mâles, diminution du taux d'implantation et augmentation de la mortalité pré et postnatale, diminution de la taille des portées.  En présence d'une forte toxicité maternelle.  Conduit selon la ligne directrice OCDE 421.	Rapport SIDS, OCDE (1995)
	Voie orale (intubation gastrique) pendant la gestation GD0- GD8 aux doses de 0-15,6-31,3-	NOAEL (effet sur le développement ) = 15,6 mg/kg/j, rats femelles wistar.	Augmentation statistiquement significative de l'incidence de pertes post-implantatoires par portée à la dose de 31,3 mg/kg/j.	Harazono <i>et al.</i> (2001)

62,5-125-250-500 mg/kg pc/j.	<p>NOAEL (effets de toxicité systémique) = 12,5 mg/kg/j</p> <p>NOAEL (effet sur le développement) = 100 mg/kg/j.</p> <p>Rats adultes mâles et femelles wistar.</p>	<p>Diminution statistiquement significative du poids corporel observé à partir de 25 mg/kg/j.</p> <p>Aucun effet observé sur le développement de l'appareil reproducteur mâle et femelle. Aucun effet postnatal précoce sur la fonction de reproduction (accouplement et fertilité).</p>	Nagao <i>et al.</i> (2001)
Voie sous-cutanée de GD1 à GD20 à des concentrations de 0, 100, 250 mg/Kg/j (huile de maïs)	<p>LOAEL (effet sur le développement) = 100 mg/Kg/j</p> <p>Rates wistar gravides (22 semaines).</p>	<p>Présence de spermatogonies dans la lumière des tubes séminifères 250 mg/kg/j), Vacuolisation des cellules de Sertoli à 100 et 250 mg/kg/j</p> <p>Diminution de la taille de l'épithélium de l'épididyme à 100 et 250 mg/kg/j.</p> <p>Atrophie des tubules alvéolaires de la prostate à 100 et 250 mg/kg/j</p>	Aydogan, <i>et al.</i> (2006)

## 12 Conclusion des études sur les effets reprotoxiques du 4tOP

La base des données relatives à la toxicité du 4tOP sur le développement est très hétérogène. La plupart des études n'a pas été conduite selon un protocole standardisé. Par ailleurs, ces études publiées dans la littérature ont été conduites selon un protocole visant à identifier un effet ou un mécanisme particulier. La plupart des études sont d'ailleurs conduites à des doses de 4tOP relativement fortes. De même, de nombreux auteurs ont privilégié la voie sous-cutanée comme mode d'administration de la substance dans le but de maximiser les effets observés et de contourner les effets systémiques et métaboliques (effet de premier passage) qui prévalent lors d'une exposition par voie orale. De ce fait, les effets observés sont hétérogènes et parfois contradictoires. De plus, au regard de l'absence de données permettant de quantifier les expositions liés aux usages identifiés, il ne pourra être conduit d'évaluation de risque pour cette substance en l'état actuel des données disponibles.

Les effets sur la reproduction et le développement chez le rat de laboratoire montrent principalement une diminution du poids brut des organes reproducteurs et des paramètres spermatiques (NOAEL = 150 mg/mg/kg pc/j, voie orale chez le rat adulte), des atteintes histologiques au niveau du testicule avec une réduction de la taille des tubes séminifères, une désorganisation des cellules de la spermatogénèse (LOAEL = 571 mg/kg/j, par voie sous-cutanée, chez les rats prépubères de 4 semaines), une diminution du nombre de spermatozoïdes et une augmentation significative des anomalies de la tête et du flagelle des spermatozoïdes (LOAEL = 66 mg/kg/j, voie sous-cutanée, chez les rats âgés de 8 semaines). Chez les femelles, il est observé une diminution du nombre de cycles ovariens de 4 à 5 jours, une augmentation de la durée du dioestrus (NOEL = 100 mg/kg/j, voie orale, chez les rates âgées de 25 jours), des troubles du cycle oestral, l'apparition d'un oestrus persistant (NOAEL = 25 mg/kg/j, voie sous-cutanée, chez les rates âgées de 11 semaines), une baisse statistiquement significative du poids (relatif et absolu) de l'utérus chez les rates femelles (NOAEL = 2000 ppm (soit de 111 à 369 mg/kg/j, chez les rates âgées de 6-17 semaines), voie orale, une diminution des performances sexuelles, une baisse de la fertilité chez les mâles, une diminution du taux d'implantation et une augmentation de la mortalité pré et postnatale, une diminution de la taille des portées (NOAEL = 250 mg/kg/j, voie orale), une augmentation statistiquement significative de l'incidence de pertes post-implantatoires par portée (NOAEL = 15,6 mg/kg/j, voie orale, chez les rates âgées de 12-15 semaines).

Tableau de synthèse des études expérimentales par voies orales.

Type d'effet	Conditions d'exposition (voie, durée du traitement, période d'exposition)	NOAEL ou LOAEL /espèce	Nature des effets, type d'étude	Références
<b>Effets sur la fertilité et la reproduction</b>	Voie orale (gavage), pendant 30 jours aux doses de 0, 50, 150, 450 mg/kg/j.	NOAEL (toxicité sur la reproduction) = 150 mg/mg/kg pc/j, rat SD mâles adultes.	Diminution du poids brut des organes reproducteurs et des paramètres spermatiques (numération et production spermatique) à 450mg/kg pc/j.	Bian <i>et al.</i> (2006)
	Voie orale (gavage), pendant 60 jours aux doses de 0, 25, 50, 125 mg/kg/j.	NOAEL (toxicité sur la reproduction) = 125 mg/kg/j, rats SD adultes.  NOAEL (toxicité systémique) = 50 mg/kg/j, rats SD adultes.	Aucun effet observé sur les organes reproducteurs, aucun anomalie histologique testiculaire ou épidydimaire.  Diminution du poids corporel statistiquement significative à la dose de 125 mg/kg/j.	Gregory <i>et al.</i> (2009)
	Voie orale (gavage) pendant 25 jours aux doses de 0, 20, 100, 200 mg/kg/j.	NOEL (effets sur la reproduction) = 100 mg/kg/j, rats femelles adultes Long Evans.	Diminution du nombre de cycles de 4 à 5 jours et augmentation de la durée du dioestrus à 200 mg/kg/j.  Effets systémiques non étudiés.	Laws <i>et al.</i> (2000)
	Voie orale (via l'alimentation) sur deux générations aux	NOAEL (pour les effets systémiques et post-nataux) =	Baisse du poids corporel et du gain de poids corporel des parents (F0 et F1) et des adultes de la génération F2 à 2000 ppm. Diminution du poids corporel des femelles des	Tyl <i>et al.</i> (1999)

	doses de 0, 0.2, 20, 200, 2000 ppm.	200 ppm (soit de 1,05 à 3,2 mg/kg/j).  NOAEL (effet sur la reproduction) = 2000 ppm (soit de 111 à 369 mg/kg/j).  Rats femelles SD.	générations F0 et F1 à 2000 ppm pendant la période de lactation.  Baisse statistiquement significative du poids (relatif et absolu) de l'utérus chez les femelles F0 exposées à 2000 ppm.  Retard de l'ouverture vaginale et de la séparation du prépuce chez les petits F1 et F2 (attribué selon les auteurs à la diminution du poids corporel) à 2000 ppm.  Etude sur deux générations de type OCDE 416 et ligne directrice de l'US EPA (870.3800 OPPTS).	
--	-------------------------------------	---	---	--

Effet sur le développement	Voie orale (gavage) pendant 2 semaines avant l'accouplement, 2 semaines pendant la période d'accouplement, et 4 jours en post-partum aux doses de 0-125-250-500 mg/kg pc/j.	NOAEL (effet sur la reproduction/ développement ) = 250 mg/kg/j.	<p>A la dose de 500 mg/kg/j : Diminution des performances sexuelles, baisse de la fertilité chez les mâles, diminution du taux d'implantation et augmentation de la mortalité pré et postnatale, diminution de la taille des portées.</p> <p>En présence d'une forte toxicité maternelle.</p> <p>Conduit selon la ligne directrice OCDE 421.</p>	Rapport SIDS, OCDE (1995)
	Voie orale (intubation gastrique) pendant la gestation GD0-GD8 aux doses de 0-15,6-31,3-62,5-125-250-500 mg/kg pc/j.	NOAEL (effet sur le développement ) = 15,6 mg/kg/j, rats femelles wistar.	Augmentation statistiquement significative de l'incidence de pertes post-implantatoires par portée à la dose de 31,3 mg/kg/j.	Harazono <i>et al.</i> (2001)
	Voie orale (gavage) de PND1 à PND5 à des concentrations de 0-12,5-25-50-100 mg/kg/j (huile de maïs).	<p>NOAEL (effets de toxicité systémique) = 12,5 mg/kg/j</p> <p>NOAEL (effet sur le développement =100 mg/kg/j. Rats adultes wistar.</p>	<p>Diminution statistiquement significative du poids corporel observé à partir de 25 mg/kg/j.</p> <p>Aucun effet observé sur le développement de l'appareil reproducteur mâle et femelle. Aucun effet postnatal précoce sur la fonction de reproduction (accouplement et fertilité).</p>	Nagao <i>et al.</i> (2001)

**Date de validation du rapport d'expertise collective par :**

- **le groupe de travail : Perturbateurs endocriniens**
- **le comité d'experts spécialisé : 10 septembre 2015**

**Signatures :**

Maisons-Alfort, le,

Au nom des experts du GT  
« Perturbateurs endocriniens »,

**C. EMOND**  
**Le président du GT**

Maisons-Alfort, le,

Au nom des experts du CES  
« Caractérisation des dangers des substances et  
valeurs toxicologiques de référence »,

**M Guerbet**  
**Le président du CES**

## 13 Bibliographie

Atanassova N, McKinnell C, Turner KJ, Walker M, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM (2000). Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141, 3898-3907.

Aydogan, M. and Barlas, N. Effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on the reproductive tract of male rats at adulthood. *Reproductive Toxicology* 2006, 22[3]; 455-460.

Bannister, R., Beresford, N., Granger, D. W., Pounds, N. A., Rand-Weaver, M., White, R., Jobling, S. & Routledge, E. J. No substantial changes in estrogen receptor and estrogen-related receptor orthologue gene transcription in *Marisa cornuarietis* exposed to estrogenic chemicals. *Aquatic Toxicology*. ( 2013), 140, 19-26.

Barlas, N. and Aydogan, M: Histopathologic effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on liver, kidney and spleen of rats at adulthood. *Archives of Toxicology* 2009, 83[4]; 341-349.

Bian, Q.; Qian, J.; Xu, L.; Chen, J.; Song, L.; Wang, X. The toxic effects of 4-tert-octylphenol on the reproductive system of male rats. *Food and Chemical Toxicology* 2006, 44[8]; 1355-1361.

Bicknell RJ, Herbison AE, Sumpter JP. (1995) Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract but not the brain of rodents. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 54, 7-9.

Blake, C. A. and Ashiru, O. A.: Disruption of Rat Estrous Cyclicity by the Environmental Estrogen 4-tert-Octylphenol. *Experimental Biology and Medicine* 1997, 216[3]; 446-451.

Blake, C. A. and Boockfor, F. R.: Chronic administration of the environmental pollutant 4-Tertoctylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, folliclestimulating hormone, prolactin, and testosterone. *Biology of Reproduction* 1997, 57[2]; 255-266.

Blake, C. A.; Boockfor, F. R.; Nair-Menon, J. U.; Millette, C. F.; Raychoudhury, S. S.; McCoy, G. L. : Effects of 4-tert-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats. *Reproductive Toxicology* 2004, 18[1]; 43-51.

Bogh IB, Christensen P, Dantzer V, Groot M, Thøfner ICN, Rasmussen RK, Schmidt M, Greve T (2001) Endocrine disrupting compounds: effect of octylphenol on reproduction over three generations. *Theriogenology* 55, 131-150.

Boockfor, F. R. and Blake, C. A.: Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts

spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biology of Reproduction* 1997, 57[2]; 267-277.

Certa, H.; Fedtke, N.; Wiegand, H. J.; Müller, A. M. F.; Bolt, H. M.: Toxicokinetics of p tert octylphenol in male Wistar rate. *Archives of Toxicology* 1996, 71[1-2]; 112-122

Commission Europeenne: Study on the scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupter priority action list . 2002.

Dong, R.-R., Yang, S.-J., Feng, R.-J., Fang, L.-L., Sun, Y.-L., Zhang, Y.-G., Xie, X.-J. & Wang, D.-S. Complete feminization of catfish by feeding *Limnodilus*, an annelid worm collected in contaminated streams. *Environmental Research*. (2014), 133, 371-379.

ECHA Member state committee support document for identification of 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)PHENOL, 4-TERT-OCTYLPHENOL as a substance of very high concern because its endocrine properties cause probable serious effects to the environment which gives rise to an equivalent level of concern. 2011

Göktekin, E. and Barlas, N.: Histopathological effects of 4-tert-octylphenol treatment through the pregnancy period, on the pituitary, adrenal, pancreas, thyroid and parathyroid glands of offspring rats at adulthood. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008, 26[2]; 199-205.

Haavisto, T. E.; Adamsson, N. A.; Myllymäki, S. A.; Toppari, J.; Paranko, J.: Effects of 4-tertoctylphenol, 4-tert-butylphenol, and diethylstilbestrol on prenatal testosterone surge in the rat. *Reproductive Toxicology* 2003, 17[5]; 593-605.

Hamelin, G.; Charest-Tardif, G.; Krishnan, K.; Cyr, D. G.; Charbonneau, M.; Devine, P. J.; Haddad, S.; Cooke, G. M.; Schrader, T.; Tardif, R.: Determination of p-tert-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2008, 32[4]; 303-307.

Hamelin, G.; Charest-Tardif, G.; Krishnan, K.; Cyr, D.; Charbonneau, M.; Devine, P. J.; Haddad, S.; Cooke, G. M.; Schrader, T.; Tardif, R.: Toxicokinetics of p-tert-octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral, or subcutaneous exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 2009, 72[8]; 541-550.

Hamelin, G.; Haddad, S.; Krishnan, K.; Tardif, R.: Physiologically based modeling of p-tertoctylphenol kinetics following intravenous, oral or subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats. *J Appl Toxicol* 2010, 30[5]; 437-449.

Harazono, A. and Ema, M.: Effects of 4-tert-octylphenol on initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats. *Toxicology Letters* 2001, 119[1]; 79-84.

Hejmej A, Kotula-Balak M, Galas J, Bilinska B (2011) Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. *Reprod Toxicol* 31, 95-105.

Herath CB, Watanabe G, Katsuda Si, Yoshida M, Suzuki AK, Taya K (2001) Exposure of Neonatal Female Rats to p-tert-Octylphenol Disrupts Afternoon Surges of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Prolactin Secretion, and Interferes with Sexual Receptive Behavior in Adulthood. *Biology of Reproduction* 64, 1216-1224.

Herath CB, Watanabe G, Suzuki AK, Taya K (2004). Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine*. 2004 Nov;25(2):163-72.

Hossaini, A.; Dalgaard, M.; Vinggaard, A. M.; Pakarinen, P.; Larsen, J. J.: Male reproductive effects of octylphenol and estradiol in Fischer and Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 2003, 17[5]; 607-615.

Katsuda S, Yoshida M, Isagawa S, Asagawa Y, Kuroda H, Watanabe T, Ando J, Takahashi M, Maekawa A (2000) Dose- and treatment duration-related effects of p-tert-octylphenol on female rats. *Reprod Toxicol* 14, 119-126.

Katsuda S, Yoshida M, Watanabe G, Taya K, Maekawa A (2000) Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 165, 217-226.

Kim SK, Lee HJ, Yang H, Kim HS, Yoon YD (2004) Prepubertal exposure to 4-tert-octylphenol induces apoptosis of testicular germ cells in adult rat. *Arch Androl* 50, 427-441.

Kim SK, Kim JH, Lee HJ, Yoon YD (2007) Octylphenol reduces the expressions of steroidogenic enzymes and testosterone production in mouse testis. *Environ Toxicol* 22, 449-458.

Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H. & Tanaka, T. (2004). Lack of modifying effects of 4-tert-octylphenol and benzyl butyl phthalate on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Cancer Science*. 95, 300-305.

Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci*. 54(1):154-67.

Mikkila TF, Toppari J, Paranko J (2006) Effects of neonatal exposure to 4-tert-octylphenol, diethylstilbestrol, and flutamide on steroidogenesis in infantile rat testis. *Toxicol Sci* 91, 456-466.

Nomura S., Daidoji T., Inoue H., Yokota H. Differential metabolism of 4-n- and 4-tert-octylphenol in perfused rat liver, *Life Sciences*, 2008, 83, 223–228.

OECD: PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-CAS N°: 140-66-9; SIDS Initial Assessment Report. National SIDS Contact Point in Sponsor Country: Mr Georg KARLAGANIS-MEYER. 1995, Switzerland, OECD.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*. 2000 Dec;9(6):383-97.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environ Health Perspect.* 2006 Apr;114 Suppl 1:127-33.

Petersen, K., Fetter, E., Kah, O., Brion, F., Scholz, S. & Tollefsen, K. E. Transgenic (*cyp19a1b*-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. *Aquatic Toxicology.* (2013), 138, 88-97.

Petersen, K., Heiaas, H. H. & Tollefsen, K. E. 2014. Combined effects of pharmaceuticals, personal care products, biocides and organic contaminants on the growth of *Skeletonema pseudocostatum*. *Aquatic Toxicology*, 150, 45-54.

Pocock, V. J.; Sales, G. D.; Wilson, C. A.; Milligan, S. R.: Effects of perinatal octylphenol on ultrasound vocalization, behavior and reproductive physiology in rats. *Physiology & Behavior* 2002, 76[4-5]; 645-653.

Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP (2000) Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem* 275, 35986-35993.

Sahambi, S. K.; Pelland, A.; Cooke, G. M.; Schrader, T.; Tardif, R.; Charbonneau, M.; Krishnan, K.; Haddad, S.; Cyr, D. G.; Devine, P. J.: Oral p-Tert-Octylphenol Exposures Induce Minimal Toxic or Estrogenic Effects in Adult Female Sprague-Dawley Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues* 2010, 73[9]; 607-622. Taylor & Francis.

Sainath SB, Meena R, Venkata Suneel Kumar CH, Kalapana P, Swetha KN, Syamala Devi N, Sreenivasula Reddy P (2011) Embryonic exposure to octylphenol induces changes in testosterone levels and disrupts reproductive efficiency in rats at their adulthood. *Food and Chemical Toxicology* 49, 983-990.

Sonne-Hansen K, Nielsen M, Byskov AG (2003) Oocyte number in newborn mice after prenatal octylphenol exposure. *Reprod Toxicol* 17, 59-66.

Sharpe, R. M.; Fisher, J. S.; Millar, M. M.; Jobling, S.; Sumpter, J. P.: Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect.* 1995, Dec. 1995, 103[12]; 1136-1143.

Sharpe, R. M.: *Endocrine Disruptors and Testis Development.* *Environmental Health Perspectives* 1998, 106.

Upmeier, A.; Degen, G. H.; Schuhmacher, U. S.; Certa, H.; Bolt, H. M.: Toxicokinetics of p-tert-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. *Archives of Toxicology* 1999, 73[4-5]; 217-222.

Traversi, I., Gioacchini, G., Scorolli, A., Mita, D. G., Carnevali, O. & Mandich, A.. Alkylphenolic contaminants in the diet: Sparus aurata juveniles hepatic response. General and Comparative Endocrinology. (2014), 205, 185-196.

Tyl, R. W.; Myers, C. B.; Marr, M. C.; Brine, D. R.; Fail, P. A.; Seely, J. C.; Van Miller, J. P.: Two-generation reproduction study with para-tert-octylphenol in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology 1999, 30[2 II]; 81-95.

Veeramachaneni, D. N.: Germ cell atypia in undescended testes hinges on the aetiology of cryptorchidism but not the abdominal location per se. Int J Androl 2006, 29[1]; 235-240.

Willoughby KN1, Sarkar AJ, Boyadjieva NI, Sarkar DK. Neonatally administered tert-octylphenol affects onset of puberty and reproductive development in female rats. Endocrine. 2005 Mar;26(2):161-8.

Yidiz and Barlas. Hepatic and renal functions in growing male rats after bisphenol A and Octylphenol exposure. Hum Exp Toxicol. 2012;32, 675-686.

Yoshida M, Katsuda S, Takenaka A, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. Toxicol Lett. (2001) 121, 21-33.

---

## ANNEXES

---

## Annexe :

---

### Annexe I : Bases de données consultées lors de l'élaboration de cette synthèse

Mots clefs utilisés :

4-tert-octylphénol, CAS N° 140-66-9

Date de dernière recherche : Février 2015

Bases de données consultées :

- TOXNET
- ChemIDplus
- Toxline
- INCHEM :
- European Chemicals Bureau: EURAR /ESIS
- Fiches du CSST (français) : [www.reptox.csst.qc.ca/](http://www.reptox.csst.qc.ca/)
- OCDE-SIDS initial assessment profile :  
<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSIDS/sidspub.html> et  
<http://webnet3.oecd.org/echempportal/et>
- EPA
- IARC
- NTP
- DART
- CDC Chemical Emergency Response and
- ATSDR Agency for toxic substances and diseases registry.
- CDC - Chemical Emergency Response, Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH) and Criteria documents

- CCHST Canadian Center for Occupational Health and Safety <http://ccinfoweb.cchst.ca/> (French);
  - INRS Institut national de recherche et de sécurité. Fiches toxicologiques
  - NICNAS Australian government - National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, chemical assessment reports
  - PUBMED
  - NIEHS [http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp\\_tox/index.cfm](http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm)
  - Toxicity Profiles of the American Risk Assessment Information System (RAIS) - Programme d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire de Santé Canada :
  - Chemfinder
  - EPA - Integrated Risk Information System (IRIS) Toxicological reviews
  - ATSDR Agency for toxic substances and diseases registry. Toxicological Profiles
  - OEHHA
  - Santé Canada
  - RIVM
  - JECFA (ADI/ TDI)
  - OMS
  - FURETOX.
  - TERA-ITER (International Toxicity Estimates for Risk Assessment).
  - JMPR (Joint Meeting on Pesticides Residues)
  - EPA Pesticide reregistration status (fact sheets)
  - AGRITOX (AFSSA, DIVE)
  - SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety).
-



## Notes

---



---

**Filières, usages et expositions liées à la présence de  
substances PE et/ou R2 dans les produits de  
consommation**

**4-tert-octylphénol**

**(n° CAS : 140-66-9)**

---

**Saisine « n° 2009-SA-0331 »**

**RAPPORT  
d'expertise collective**

**Comité d'experts spécialisés  
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »**

**Groupe de travail**

**« Perturbateurs endocriniens et reprotoxiques de  
catégorie 3 »**

**Octobre 2014**

## Mots clés

---

4-tert-octylphénol, substances reprotoxiques, perturbateur endocrinien, produits de consommation, exposition.

## Présentation des intervenants

**PRÉAMBULE** : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

### **GRUPE DE TRAVAIL « PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET REPROTOXIQUES DE CATEGORIE 3 »**

#### **Président**

M. Claude EMOND – Université de Montréal, Canada

#### **Vice-président**

M. Luc Belzunces – Directeur de recherche – Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, INRA

#### **Membres**

M. Jean-Philippe ANTIGNAC - Ingénieur analyste - ONIRIS, LABERCA

M. Brice APPENZELLER - Responsable de laboratoire de biomonitoring - Centre de Recherche

Public en Santé, Luxembourg

M. Mohammed BENHAMED - Médecin - endocrinologue - toxicologue - INSERM. *Démission le 16 février 2013*

M. Nicolas BERTRAND - Ingénieur - INRS

M. Olivier BLANCHARD - Expologue - EHESP

Mme Martine CLAUW - Toxicologue-vétérinaire - INPT/ENVT, Université de Toulouse

M. Jean-Pierre CRAVEDI - Directeur de Recherche - INRA

Mme Elisabeth ELEFANT - Médecin spécialisé en tératologie humaine - Centre de référence sur les Agents tératogènes - AP-HP hôpital Armand Trousseau, Paris

Mme Florence EUSTACHE - Médecin - CECOS, AP-HP, Hôpital Jean Verdier, Paris

Mme Véronique EZRATTY - EDF, Médecin de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif) et d'un service de prévention et de dépistage des tumeurs de la ville de Paris

Mme Joëlle FEVOTTE - Chercheur - UMRESTTE UCB Lyon 1. *Démission le 16 octobre 2013.*

M. René HABERT - Professeur des universités - Université Paris Diderot

Mme. Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI - Directeur de Recherche - INSERM

M. Frédéric LEMARCHAND - Analyse sociologique - Université de Caen. *Démission le 22 janvier 2013*

Mme Laura MAXIM - Chargée de recherche - CNRS

Mme Corinne MANDIN - Ingénieur expologue - CSTB

M. Christophe MINIER - Ecotoxicologue - Université du Havre

M. Luc MULTIGNER - Médecin épidémiologiste - INSERM

M. Alexandre PERY - Responsable d'unité - INERIS

M. Wilfried SANCHEZ - Ecotoxicologue - INERIS

Mme Anne STEENHOUT - Exposition agrégée - Université libre de Bruxelles, Belgique

Mme Larissa TAKSER - Médecin épidémiologiste - Université de Sherbrooke, Canada

M. Patrick THONNEAU - Médecin - INSERM

Mme Catherine VIGUIE – Vétérinaire – Directrice de Recherche INRA

### COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

---

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

#### Président

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue

#### Vice-Président

Mme Béatrice LAUBY-SECRETAN – Docteur en toxicologie, Scientifique pour monographies du CIRC – groupe IMO, CIRC/ OMS

#### Membres

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche - Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, INRA

M. Damien BOURGEOIS – Chargé de Recherche – Institut de Chimie Séparative de Marcoule - CNRS

Mme Corinne CASSIER-CHAUVAT – Directrice de Recherche DR2 CNRS – iBiTecS/SBIGeM/LBI, unité mixte CEA-CNRS URA 2096

Mme Anne CHEVALIER – épidémiologiste retraitée - InVS

M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET - Médecin, responsable de l'unité « Populations, Risques, Territoires » - Département Santé Environnement, InVS

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Enseignant chercheur (Pr) Pharmacie – toxicologie / Responsable de la pharmacie centrale – Unité de Pharmacie Toxicologie, ENVA

Mme Dominique GUENOT – Chargée de recherche - CNRS

M. Cong Khanh HUYNH – Docteur es Sciences - Ingénieur chimiste – Institut universitaire Roman de Santé au Travail

M. Kannan KRISHNAN – Professeur, enseignant chercheur - Santé publique et Toxicologie - Département de Santé environnementale et de santé au travail, Université de Montréal – démission décembre 2012

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, pilote de la thématique reproduction et travail– INRS

Mme Dominique LAGADIC-GOSSMANN – Directrice de Recherche CNRS – EA 4427 SeRAIC / IRSET, Université Rennes 1

Mme Annie LAUDET - Pharmacien toxicologue retraitée – INRS

Mme Florence MÉNÉTRIER – Responsable de l'unité Prositon / Pharmacien – DSV/Prositon, CEA

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail, toxicologue – Service de santé des armées

Mme Odette PRAT - Chercheur Biologiste Toxicologue / Responsable Toxicogénomique - Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie / DSV/ CEA

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur / Pharmacien biologiste – URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Nancy université

---

**PARTICIPATION ANSES**

---

**Coordination scientifique**

Mme Claire BEAUSOLEIL – Chef de projet scientifique - Anses

M. François POUZAUD – Chef de projet scientifique - Anses

**Contribution scientifique**

Mme Emmanuelle DURAND – Chargée de projet scientifique – Anses

Mme Carole LEROUX – Chargée de projet scientifique - Anses

Mme Céline DUBOIS - Chef de projet scientifique - Anses

M Stéphane LECOMTE- Chargé de projet scientifique – Anses

Mme Audrey MALRAT DOMENGE - Chef de projet scientifique – Anses

Mme Valérie PERNELET-JOLY – Chef d'unité - Anses

M. Guillaume PÉROUEL – Chargé de projet scientifique – Anses

Mme Fatoumata SISSOKO – Chargée de projet scientifique – Anses

Mme Lauranne VERINES-JOIN – Chargée de projet scientifique – Anses

Mme Anita VIGOUROUX-VILARD – Chargée de projet scientifique – Anses

**Secrétariat administratif**

Mme Séverine BOIX-PETRE – Assistante – Anses

Mme Véronique QUESNEL – Assistante – Anses

## SOMMAIRE

Présentation des intervenants.....	3
Sigles et abréviations .....	8
Liste des tableaux.....	9
1 Présentation de la substance.....	10
<b>1.1 Identité de la substance .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Propriétés physico-chimiques du 4tOP .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Synthèse du 4tOP .....</b>	<b>13</b>
2 Réglementation.....	14
3 Résultats de l'enquête de filières.....	16
<b>3.1 Production, distribution et importation du 4tOP .....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Informations issues de la bibliographie .....	16
3.1.2 Tonnages de la substance : résultats issus de l'enquête de filières .....	16
<b>3.2 Identification des usages et des secteurs d'activités .....</b>	<b>17</b>
3.2.1 Usages identifiés dans la bibliographie .....	20
3.2.1.1 Production de résines phénoliques .....	20
3.2.1.2 Production d'éthoxylates d'octylphénol (OPE) .....	22
3.2.2 Usages identifiés via les industriels.....	24
<b>3.3 Contact auprès des fédérations .....</b>	<b>24</b>
4 Résultats de l'extraction des bases de données .....	25
<b>4.1 Extraction de la Base nationale des produits et compositions (BNPC).....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Extraction de la base de données Sepia.....</b>	<b>25</b>
5 Synthèse des mélanges et articles identifiés .....	26
6 Identification de données d'exposition relatives aux environnements domestiques et/ou extérieurs.....	27
<b>6.1 Données sur l'air intérieur des logements et l'air extérieur.....</b>	<b>27</b>
6.1.1 Concentrations dans l'air intérieur de logements .....	29
6.1.2 Concentrations dans l'air extérieur .....	31
<b>6.2 Données sur les poussières sédimentées .....</b>	<b>35</b>
<b>6.3 Discussion et choix des données d'exposition.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7 Discussions et conclusions .....	37
8 Références bibliographiques .....	38

ANNEXES..... 41

## Sigles et abréviations

4tOP : 4-tert-octylphénol

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

BNPC : Base nationale des produits et compositions

CAS : Chemical Abstract Service

CLP : Classification, Labelling, Packaging

CMR : Cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques

CSST : Commission de la santé et de la sécurité au travail

DEFRA : Department for Environment, Food and Rural Affairs

ECHA : European chemicals agency / Agence européenne des produits chimiques

EINECS : European INventory of Existing commercial Chemical Substances

ESIS : European chemical Substances Information System

ERS : Evaluation des risques sanitaires

ETRMA : European Tyre & rubber Manufacturers ' Association

HPV : High production Volume

Ineris : Institut national de l'environnement industriel et des risques

INRS : Institut National de Recherche et Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

Insee : Institut national de la statistique et des études économiques

IUCLID : International Uniform Chemical Information Database

Koc : Coefficient d'adsorption du sol

Kow : Coefficient de partage octanol-eau

LIE : Limite inférieure d'explosivité

LSE : Limite supérieure d'explosivité

NAF : Nomenclature des activités françaises

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OPE : OctylPhénols Ethoxylates / éthoxylates d'octylphénol

OSPAR : Administrator of the Oslo and Paris Conventions for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic

PE : Perturbateur endocrinien

PVC : Polychlorure de vinyl

REACH : Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals - Enregistrement, Evaluation, Autorisation et Restriction applicables aux substances chimiques

SGH : Système global harmonisé

UE : Union Européenne

US EPA : U.S Environmental Protection Agency

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Identité de la substance .....	11
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du 4tOP .....	12
Tableau 3 : Classification, étiquetage et limites de concentrations du 4tOP (n°CAS : 140-66-9) selon la directive 67/548/CEE et le règlement n°1272/2008 .....	14
Tableau 4: Production, importation et exportation européenne de 4tOP .....	16
Tableau 5 : Comparaison des secteurs d'activité identifiés dans la bibliographie ainsi que par l'enquête de filières.....	18
Tableau 6 : Principales utilisations du 4tOP en Europe, en 2001 .....	20
Tableau 7: Tableau récapitulatif de l'utilisation des résines phénol-formol fabriquées à partir du 4tOP en Europe, en 2001 .....	21
Tableau 8: Utilisation de sulfates d'éthers d'octylphénols en Europe en 2001 .....	22
Tableau 9: Utilisation d'éthoxylates d'octylphénol en Europe en 2001 .....	23
Tableau 10 : Récapitulatif : Répartition des différents types de produits contenant du 4tOP répertoriés dans la BNPC – Mélanges utilisés par la population générale.....	25
Tableau 11 : Résultats de l'extraction de la BNPC (août 2010) – Mélanges utilisés par la population générale .....	25
Tableau 12 : Synthèse des usages répertoriés.....	26
Tableau 13 : Concentrations en 4tOP relevées dans l'air intérieur.....	30
Tableau 14 : Concentrations en 4tOP ou tert-octylphénol relevées dans l'air extérieur.....	32
Tableau 15 : Concentrations en tert-octylphénol relevées dans les poussières.....	36

# 1 Présentation de la substance

Le 4-tert-octylphénol (4tOP), également appelé 1,1,3,3-tétraméthyl-4-butylphénol, appartient à la famille des alkylphénols. En conditions ambiantes, le 4-tert-octylphénol est un solide, peu soluble dans l'eau et non volatil.

L'élément de base d'un alkylphénol est un noyau phénolique sur lequel est substitué, généralement en position para, un radical octyl, nonyl, ou dodécyl. Les alkylphénols dont le radical est à neuf atomes de carbone, c'est-à-dire les nonylphénols, constituent environ 80 % des alkylphénols en usage et les octylphénols (8 atomes de carbone) constituent l'essentiel des 20 % restant (Berryman\* *et al.*, 2011)<sup>1</sup>.

En fonction de la position du radical octyl sur le noyau phénolique, plusieurs isomères peuvent être distingués. Le mélange d'isomères est défini sous le terme générique d'octylphénols.

Dans le cadre de la présente saisine, seul l'isomère 4-tert-octylphénol (substitution en position para) portant le numéro CAS n° 140-66-9 est étudié. Il s'agit de l'isomère le plus commercialisé et entrant majoritairement dans la composition des mélanges d'octylphénols (Ineris\*, 2006).

Le 4tOP entre dans le champ de la saisine de par sa classification en tant que perturbateur endocrinien potentiel. En effet le 4tOP est étiqueté perturbateur endocrinien de catégorie 1 (PE 1) selon les données européennes du BKH et du DHI (BKH, 2002 ; DHI, 2007).

L'Anses a été saisie par la Direction générale de la Santé en date du 9 juin 2009 afin de réaliser une évaluation des risques pour la santé du consommateur en contact avec une liste de substances dites perturbatrices endocriniennes ou reprotoxiques de catégorie 3. A cette date, la réglementation applicable en termes de classification et étiquetage des substances dangereuses était la directive européenne 67/548/CEE<sup>2</sup>.

En 2008, le règlement CLP <sup>3</sup>(règlement (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 (JOUE L 353 du 31 décembre 2008)) a introduit dans l'Union européenne le nouveau système général harmonisé de classification et d'étiquetage ou SGH. La classification et l'étiquetage des substances, harmonisés selon les deux systèmes (règlement et directive 67/548/CEE) figurent dans l'annexe VI dudit règlement CLP et coexistent jusqu'en 2015. Le règlement CLP remplace la classification préexistante des substances CMR par une nouvelle classification. Ainsi les anciennes catégories 1,2 ou 3 pour les CMR de la directive 67/548/CEE sont remplacées par les catégories 1A, 1B ou 2.

De même, le terme « préparation » utilisé dans la directive 67/548/CEE est remplacé par le terme « mélange » dans le règlement CLP. Par conséquent la classification et les termes utilisés dans les différents documents, rapports, notes d'expertise collective et avis, sont ceux en vigueur dans le cadre du règlement CLP n° 1272/2008.

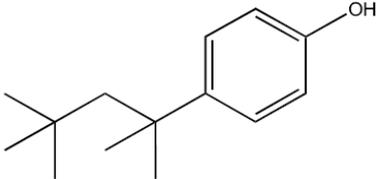
<sup>1</sup> Les références annotées du symbole « \* » sont extraites d'une étude réalisée pour le compte de l'Anses et dans le cadre strict de la saisine par le prestataire extérieur Néodyme

<sup>2</sup> Directive Européenne 67/548/CEE du 27 juin 1967 du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses

<sup>3</sup> Classification, Labelling and Packaging

## 1.1 Identité de la substance

Tableau 1 : Identité de la substance

IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE	
Numéros CAS	140-66-9
Numéro CE (EINECS)	205-426-2
Nom	4-tert-octylphénol
Synonymes <sup>4</sup>	1,1,3,3-tetraméthyl-4- butylphénol 4-(1,1,3,3-Tetraméthylbutyl)phénol p-tert-octylphénol 4tOP
Famille chimique	Alkylphénols
Formule brute	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
Formule semi développée	

<sup>4</sup> La terminologie anglo-saxonne des synonymes a été utilisée

## 1.2 Propriétés physico-chimiques du 4tOP

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du 4tOP

Paramètre	Valeur	Valeur expérimentale ou modélisée	Source <sup>5</sup>
Forme physique (à T° ambiante)	Solide Blanc	Non Précisé	[2], [5], [7], [6], [9]
Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	206,33	Non Précisé	[1], [3], [5], [9], [10]
Point d'ébullition (°C)	Entre 280 et 283 à 1013hPa	Valeurs expérimentales	[4], [8], [9], [10]
Point de fusion (°C)	Entre 79 et 82	Valeurs expérimentales	[1], [6], [8], [9], [10]
Point éclair coupelle ouverte (°C)	80	Valeurs expérimentales	[8]
Point éclair coupelle fermée (°C)	Compris entre 84 et 85	Valeurs expérimentales	[5]
Limite Inférieure d'Explosivité (LIE)	145	Non Précisé	[4], [6], [8]
Limite Supérieure d'Explosivité (LSE)	147	Non Précisé	[8]
Pression de vapeur saturante (Pa)	0,0021 à 20°C	Non Précisé	[8], [9]
	4,7 à 74°C	Non Précisé	[3]
Concentration à saturation (mg.m <sup>-3</sup> )	0,18 à 20°C	Calculée	Calculée à partir de [8] [9]
Densité vapeur (air=1)	10,7 hPa à 150°C	Non Précisé	[6]
Densité liquide	0,95	Non Précisé	[8], [10]
Facteur de conversion	8,44	Non Précisé	[7]
Solubilité dans l'eau (g.L <sup>-1</sup> )	0,19 à 20°C	Valeurs expérimentales	[4], [8], [9], [10],

<sup>5</sup> [1] 4-tert-Octylphenol .Online Database of Chemicals from Around the World. Chemblink. Disponible sur : [www.chemblink.com/products/140-66-9.ht](http://www.chemblink.com/products/140-66-9.ht)

[2] : Fiche de Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. "Octylphenols". INERIS. 30 mars 2006 ;

[3] : Portail des substances chimiques. 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol. INERIS. Date de mise à jour : 17 février 2004. <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/29>

[4] SIDS Initial Assessment Report. PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL). OECD SIDS. Février 1995

[5] : Etude de l'analyse des Alkylphénols. Rapport final. INERIS. Février 2005

[6] : Fiche de Données Sécurité du 4-tert-octylphénol. SIGMA-ALDRICH. Fiche mise à jour le 13 mars 2010

[7] : CSST - Service du répertoire toxicologique.p-tert octylphénol.[http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no\\_produit=141614&nom=p%2Dtert%2DOctylphenol](http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=141614&nom=p%2Dtert%2DOctylphenol)

[8] : UCLID Dataset, 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol. OECD SIDS, European chemicals bureau. 2000.

[9] : Screening-level hazard characterization, Alkylphenols Category. Hazard Characterization Document. U.S. Environmental Protection Agency September. 2009

[10] : Environmental Risk Evaluation Report: 4-tert-Octylphenol. Environment Agency (UK), D Brooke, I Johnson, R Mitchell and C Watts. Avril 2005 [11] : Prioritisation of Alkylphenols for Environmental Risk Assessment. D Brooke, M Crookes, I Johnson, R Mitchell & C Watts. Environment Agency (UK)

Paramètre	Valeur	Valeur expérimentale ou modélisée	Source <sup>5</sup>
			[11]
Log Kow	3,7-5,3	Non Précisé	[3], [4], [5], [9], [10], [11]
Koc (L.kg <sup>-1</sup> )	2740-19953	Non Précisé	[3]

### 1.3 Synthèse du 4tOP

En conditions ambiantes (à 20°C et 101,3 kPa), le 4tOP est un composé solide blanc peu soluble dans l'eau (Ineris\*, 2006). Sa synthèse implique une réaction d'alkylation (Friedel-Crafts) entre le phénol et le diisobutène (Ashford\*, 2001 ; Kirk et Othmer\*, 2007).

Selon le procédé employé, la réaction se déroule en présence :

- d'une résine échangeuse d'ions ou un complexe de trifluorure de bore dans un réacteur batch<sup>6</sup> (DEFRA\*, 2008 ; Environment Agency\*, 2005) ;
- d'une résine échangeuse d'ions à lit fixe dans un processus continu (IUCLID\*, 2000 ; DEFRA\*, 2008).

---

<sup>6</sup> Il s'agit d'un procédé discontinu, les concentrations des réactifs et des produits varient au cours du temps.

## 2 Réglementation

Le 4tOP est concerné par :

- La directive 67/548/CEE et le règlement (CE) n°1272/2008 (CLP),
  - Le règlement n° 1907/2006 (REACH),
- La directive 67/548/CEE du 27 juin 1997 et le Règlement (CE) n° 1272/2008 ou CLP (Classification, Labelling, Packaging) du 16 décembre 2008 concernant la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances dangereuses.

Le 4tOP figurait dans l'annexe I de la directive 67/548/CEE qui regroupe les substances dangereuses dont la classification et l'étiquetage ont fait l'objet d'une décision européenne rendue obligatoire par un vote des Etats membres.

Dans le cadre de la mise en place du Système global harmonisé (SGH), le règlement (CE) n° 1272/2008 ou CLP définit au sein de l'Union européenne les obligations concernant la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges. Le classement des substances dangereuses qui figurait dans l'annexe I de la Directive 67/548/CEE figure désormais dans l'annexe VI du règlement CLP.

**Tableau 3 : Classification, étiquetage et limites de concentrations du 4tOP (n°CAS : 140-66-9) selon la directive 67/548/CEE et le règlement n°1272/2008**

	Classification	Limites de concentration spécifiques	Symboles de danger
<b>Règlement (CE) n°1907/2006</b>	Skin Irrit 2. H315 Eye Dam 1. H318 Aquatic Acute 1 H400 Aquatic Chronic 1 H410	M = 10	
<b>Directive 67/548/CEE</b>	Xi; R38-41 N; R50/53	N; R50-53 C ≥ 2,5 % N; R51-53 0,25 % ≤ C < 2,5 % R52-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %	

Dans le cadre du règlement CLP, les fabricants et importateurs doivent notifier les classifications et étiquetages des substances qu'ils mettent sur le marché (articles 39 à 42 du règlement CLP). Toutes ces notifications sont regroupées dans une base de données qui est l'inventaire des classifications et étiquetages, tenu par l'ECHA<sup>7</sup>. Cette notification s'applique à toutes les substances mises sur le marché dans l'UE :

- si elles sont classées dangereuses, quelles que soient les quantités
- si elles ne sont pas classées « dangereuses » mais soumises à l'obligation d'enregistrement conformément au règlement REACH.

<sup>7</sup> <http://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/cl-inventory-database>

Bien qu'il ne s'agisse pas de la classification harmonisée, cet inventaire constitue une source centrale d'informations sur la classification et l'étiquetage des substances pour tous les utilisateurs de produits chimiques.

**Attention, tous les notifiants n'ont pas forcément classé cette substance avec l'ensemble de ces classes de danger. Il s'agit d'une compilation des différentes classifications proposées par un ou plusieurs déclarants dans cet inventaire.**

#### Inventaire des notifications des autoclassifications pour le 4tOP :

- H312 : Nocif par contact cutané.
  - H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
  - H315 : Provoque une irritation cutanée.
  - H318 : Provoque des lésions oculaires graves.
  - H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
  - H400 : très toxique pour les organismes aquatiques
  - H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
- Le Règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) (CE) n° 1907/2006 du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances.

Le 4tOP fait partie des substances enregistrées avant le 1<sup>er</sup> décembre 2010 dans le cadre du règlement REACH. Le ou les dossiers d'enregistrement traités pour le 4tOP sont disponibles sur le site de l'ECHA après suppression des renseignements confidentiels.

En tant que « substance of very high concern » (SVHC), le 4tOP est également inscrit sur la liste candidate des substances soumises à autorisation.

## 3 Résultats de l'enquête de filières

Cette partie synthétise l'ensemble des informations recueillies à la fois par les recherches bibliographiques (identification des secteurs d'activité potentiellement concernés par le 4tOP et les usages) et par l'enquête de filières réalisée à l'aide d'un questionnaire électronique adressé aux industriels présents sur le territoire français.

### 3.1 Production, distribution et importation du 4tOP

#### 3.1.1 Informations issues de la bibliographie

Le 4tOP est classé HPV (High Production Level) par l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) : il est donc fabriqué ou importé à raison d'au moins 1000 tonnes par an dans l'Union européenne, et ce par au moins un Etat membre (OCDE, 2009).

Les quantités de 4tOP produites en Europe (ainsi que les quantités importées et exportées) sont présentées dans le Tableau 4 (Ineris\*, 2006) :

**Tableau 4: Production, importation et exportation européenne de 4tOP**  
(en tonnes par an)

	1997	1998	1999	2000	2001
Volume de production	17 520	18 259	19 626	22 215	22 633
Exportation	234	104	6	0	150
Importation	1035	1337	1240	1308	375
Tonnage utilisé	18 051	19 492	20 928	23 523	22 858
Tonnage transformé sur site	14 969	16 074	17 592	19 910	20 060

Les quantités de 4tOP fabriquées dans l'Union européenne, étaient d'environ 23 000 t/an en 2001. Cette fabrication est quasi-entièrement utilisée au sein de l'Union européenne (Ineris\*, 2006).

En France, environ 8 000 tonnes de 4tOP sont produites chaque année (Ineris\*, 2006).

Deux producteurs/distributeurs de 4tOP ont été identifiés dans la bibliographie. Ces industriels ont été interrogés par téléphone afin de confirmer ou non leur importation/production ou distribution du 4tOP. Les informations suivantes ressortent de ces entretiens :

- un des industriels identifiés a cessé son activité en lien avec le 4tOP,
- le deuxième industriel continue la production de 4tOP sur le sol français à hauteur de plusieurs milliers de tonnes par an.

#### 3.1.2 Tonnages de la substance : résultats issus de l'enquête de filières

L'enquête de filières, menée auprès des industriels, a permis d'obtenir une liste non exhaustive d'entreprises concernées par le 4tOP.

Ainsi 2 entreprises<sup>8</sup> ont répondu, via le questionnaire en ligne, être concernées par le 4tOP. Elles n'ont pas fourni de données précises sur le tonnage du 4tOP mis en œuvre. Elles ont simplement indiqué une tendance d'utilisation à hauteur de plusieurs centaines de kilos par an.

Les résultats obtenus par l'enquête ne sont pas exhaustifs et ne sont pas représentatifs des tonnages réels, présentés ci-dessus dans la bibliographie.

### **3.2 Identification des usages et des secteurs d'activités**

Trente-et un secteurs d'activités ont été recensés comme étant potentiellement concernés par le 4tOP en France. Le tableau 5 liste ces secteurs d'activité identifiés dans la bibliographie et dans l'enquête réalisée auprès des industriels.

---

<sup>8</sup> Les entreprises ayant répondu au questionnaire ne sont pas obligatoirement celles ayant été contactées pour vérifier les informations issues de la bibliographie

Tableau 5 : Comparaison des secteurs d'activité identifiés dans la bibliographie ainsi que par l'enquête de filières

	Secteurs d'activité recensés dans la bibliographie	Secteurs d'activité déclarés lors de l'enquête en ligne	Nombre d'entreprises s'étant déclarées concernées par le 4-tert-octylphénol	Fabricant	Utilisateur aval	Distributeur	Importateur	« Autres »
13.30Z : Ennoblement textile	X							
13.92Z : Fabrication d'articles textiles, sauf habillement	X							
14.11Z : Fabrication de vêtements en cuir	X							
14.12Z : Fabrication de vêtements de travail	X							
14.13Z : Fabrication de vêtements de dessus	X							
14.14Z : Fabrication de vêtements de dessous	X							
14.19Z : Fabrication d'autres vêtements et accessoires	X							
15.11Z : Apprêt et tannage des cuirs ; préparation et teinture des fourrures	X							
15.12Z : Fabrication d'articles de voyage, de maroquinerie et de sellerie	X							
15.20Z Fabrication de chaussures	X							
17.11Z : Fabrication de pâte à papier	X							
17.12Z : Fabrication de papier et de carton	X							
17.21C : Fabrication d'emballages en papier	X							
17.23Z : Fabrication d'articles de papeterie	X							
20.16Z : Fabrication de matières plastiques de base	X							
20.20Z : Fabrication de pesticides et d'autres produits agrochimiques	X							
20.30Z : Fabrication de peintures,	X							

	Secteurs d'activité recensés dans la bibliographie	Secteurs d'activité déclarés lors de l'enquête en ligne	Nombre d'entreprises s'étant déclarées concernées par le 4-tert-octylphénol	Fabricant	Utilisateur aval	Distributeur	Importateur	« Autres »
vernis, encres et mastics								
20.41Z : Fabrication de savons, détergents et produits d'entretien	X							
20.42Z : Fabrication de parfums et de produits pour la toilette	X							
20.52Z : Fabrication de colles	X	X	1		1			
22.11Z : Fabrication et rechapage de pneumatiques	X							
22.19Z : Fabrication d'autres articles en caoutchouc	X							
22.22Z : Fabrication d'emballages en matières plastiques	X							
22.23Z : Fabrication d'éléments en matières plastiques pour la construction	X							
22.29A : Fabrication de pièces techniques à base de matières plastiques	X							
22.29B Fabrication de produits de consommation courante en matières plastiques	X							
27.11Z : Fabrication de moteurs, génératrices et transformateurs électriques	X							
27.90Z : Fabrication d'autres matériels électriques	X							
29.10Z : Construction de véhicules automobiles	X							
46.12B : Autres intermédiaires du commerce en combustibles, métaux, minéraux et produits chimiques	X							
46.75Z : Commerce de gros (commerce interentreprises) de produits chimiques	X	X	1			1		

### 3.2.1 Usages identifiés dans la bibliographie

Le 4tOP est principalement utilisé comme intermédiaire dans la fabrication des résines phénol-formaldéhyde (de 80 à 98 % du volume total produit) et des éthoxylates octylphénoliques (approximativement 2 % du volume total produit) (ETRMA\*, 2007 ; Ineris\*, 2006). Ces résultats sont présentés dans le Tableau 6 :

**Tableau 6 : Principales utilisations du 4tOP en Europe, en 2001**

Utilisations du 4-tert-octylphénol	Volume	
	en tonne	En %
Production de résines phénoliques/formaldéhydes	22 458	98%
Production d'éthoxylates d'octylphénol	400	2%
TOTAL utilisé en Europe	22 858	100%

Les applications finales des résines et éthoxylates produites à partir du 4tOP sont variées et présentées dans les paragraphes suivants.

Le 4tOP peut également être retrouvé sous forme d'impuretés lors de la production commerciale de nonylphénol (Ineris\*, 2006). Les proportions de 4tOP présentes dans le nonylphénol commercial dépendent des impuretés de l'octène utilisé lors de la fabrication du nonylphénol. Ces proportions sont, en moyenne, de l'ordre de 3 à 5 %. Selon l'Ineris, cette production « accidentelle » de 4tOP représentait, en 1997, de 2200 à 3600 tonnes (pour 73000 tonnes de nonylphénol produit), soit une quantité non négligeable par rapport aux utilisations intentionnelles (Ineris\*, 2006).

Les différents usages du 4tOP identifiés dans la bibliographie sont détaillés ci-dessous.

#### 3.2.1.1 Production de résines phénoliques

C'est la principale utilisation du 4tOP (Ineris\*, 2006).

Les résines phénol-formaldéhydes peuvent être fabriquées à partir du 4tOP seul ou en mélange avec d'autres phénols, selon les propriétés souhaitées de la résine finale (Environment Agency\*, 2005).

Bien que la plupart des molécules de 4tOP soient chimiquement liées dans ces résines, elles peuvent contenir une faible proportion (3-4 %) de 4tOP qui n'a pas réagi (Environment Agency\*, 2005).

Les résines phénoliques sont ensuite utilisées dans les domaines suivants :

##### 3.2.1.1.1 Industrie du caoutchouc

Les résines phénoliques sont utilisées comme agent d'adhérence dans le caoutchouc et notamment le caoutchouc des pneumatiques (Ineris\*, 2006 ; IUCLID\*, 2000 ; OSPAR\*, 2004 ; Kirk et Othmer\*, 2007). Ces résines tackifiantes<sup>9</sup> sont notamment produites en France (Environment Agency\*, 2005 ; OSPAR\*, 2004) et sont majoritairement utilisées pour la fabrication de pneumatiques (Environment Agency\*, 2005). La consommation européenne de 4tOP pour cette application spécifique représentait 18 458 tonnes en 2001 (Ineris\*, 2006).

<sup>9</sup> Utilisées pour augmenter l'adhérence d'une surface

Elles sont ajoutées au caoutchouc à hauteur de 1,5 %<sup>10</sup> afin d'augmenter sa viscosité et d'améliorer l'adhérence des différentes couches lors de la vulcanisation (Ineris\*, 2006). La concentration massique maximale de 4tOP dans des pneus ainsi fabriqués est estimée à 0,3 % (OSPAR\*, 2004).

### 3.2.1.1.2 Industrie chimique

Les résines phénoliques sont utilisées dans les encres d'impression (Ineris\*, 2006 ; Environment Agency\*, 2005 ; OSPAR\*, 2004 ; Agence de l'eau Seine Normandie\*, 2009 ; OCDE\*, 1995 ; Ineris\*, 2008) et permettent en particulier de remplacer les solvants aromatiques par des solvants aliphatiques, moins toxiques (OSPAR\*, 2004). Ce type d'encres est utilisé dans la plupart des procédés d'impression modernes et peut être appliqué sur de nombreuses surfaces (papier, plastique, métal...) de manière rapide et précise, offrant ainsi un temps de séchage accéléré par rapport aux méthodes classiques.

Les encres sont fabriquées selon un procédé à haute température où les résines phénoliques réagissent avec d'autres résines, des huiles, etc. et sont alors diluées dans des solvants d'encres pigmentées (OSPAR\*, 2004).

Les résines phénoliques représentent 7 à 8 % de la formulation de ces encres. Cet usage nécessite environ 1 000 t/an de 4tOP (évalué en 2001) (Ineris\*, 2006)

Les résines phénoliques sont également introduites dans des peintures spéciales utilisées dans des applications nautiques car elles procurent une forte résistance à l'eau salée (OSPAR\*, 2004).

Enfin, ces résines peuvent être utilisées dans les vernis pour l'isolation électrique (Ineris\*, 2006). Ce type de vernis est utilisé pour l'isolation secondaire des enroulements électriques, par exemple dans les moteurs et les transformateurs, pour lier l'ensemble et améliorer l'isolation (Ineris\*, 2006 ; Environment Agency\*, 2005 ; OSPAR\*, 2004).

Cette utilisation a requis, en 2001, 2 000 tonnes de 4tOP dans l'Union Européenne (Ineris\*, 2006).

### 3.2.1.1.3 Industrie du papier

Les résines phénoliques sont utilisées comme enduit pour le revêtement de rouleaux de papiers dans l'industrie papetière (Ineris\*, 2006 ; OSPAR\*, 2004). Cependant, aucune information précise sur cette utilisation n'a pu être obtenue.

Un récapitulatif des utilisations des résines phénoliques en Europe est présenté dans le Tableau 7 :

**Tableau 7: Tableau récapitulatif de l'utilisation des résines phénol-formol fabriquées à partir du 4tOP en Europe, en 2001**

Utilisation des résines phénoliques/formaldéhyde	Quantité de 4tOP consommée par usage		Quantité de résines présente dans la formulation du produit final
	En tonne	En %	
Fabrication de pneumatiques	18 458	83	1,5 % ou 10 % dans le caoutchouc du pneu
Vernis d'isolation électrique	2 000	9	non déterminé
Encres d'impression	1 000	4	7-8 % dans l'encre d'impression
Autres usages (peintures, papier, ...)	800	4	Non déterminé

<sup>10</sup> Pourcentage massique ou volumique non précisé

Utilisation des résines phénoliques/formaldéhyde	Quantité de 4tOP consommée par usage		Quantité de résines présente dans la formulation du produit final
	En tonne	En %	
<b>TOTAL</b>	<b>22 258</b>	<b>100</b>	-

### 3.2.1.2 Production d'éthoxylates d'octylphénol (OPE)

La production d'OPE représente une faible part de l'utilisation du 4tOP (environ 400 t en Europe en 2001, soit 2 % du volume total d'utilisation) (OSPAR\*, 2004).

Les OPE sont synthétisés pour leurs propriétés tensioactives qui permettent une meilleure dispersion des liquides et la miscibilité de certaines substances telles que l'huile et l'eau. Ils font en effet de très bons surfactants non-ioniques (Ineris\*, 2006). Ils sont fabriqués, sous pression, par addition d'oxydes d'éthylène au 4tOP (Environment Agency\*, 2005). Il faut environ 40 t de 4tOP pour fabriquer 100 tonnes d'OPE (OSPAR\*, 2004). Dans l'Union Européenne, 1 050 tonnes d'OPE ont été produites en 2001, dont 850 tonnes servent directement comme OPE et 200 tonnes sont transformées en sulfate d'éther (Ineris\*, 2006 ; OSPAR\*, 2004).

La quantité résiduelle de 4tOP n'ayant pas réagi diminue avec l'augmentation du nombre d'éthoxylation. Ainsi, l'OP<sub>3</sub>EO (3 groupements éthoxyles) contient 1 % de 4tOP et l'OP<sub>10</sub>EO, environ 0,01 % (la majorité des éthoxylates possède au moins 10 groupements éthoxyles (OSPAR\*, 2004).

#### 3.2.1.2.1 Industrie chimique

Les OPE sont principalement utilisés comme émulsifiants dans la production de polymères (Ineris\*, 2006 ; OSPAR\*, 2004). Ils sont également utilisés dans les adhésifs (IUCRID\*, 2000 ; Kirk et Othmer\*, 2007), les vernis et les peintures (Ineris\*, 2006 ; Kirk et Othmer\*, 2007), notamment celles se présentant sous forme d'émulsion ou en dispersion.

Dans le cas des peintures, les OPE agissent comme agents émulsifiants et aident à la dispersion du produit.

Les OPE sont également utilisés pour synthétiser des sulfates d'éthers octylphénols, principalement utilisés dans la fabrication de peintures à base aqueuse et d'agents émulsifiant pour la formulation de pesticides ou d'herbicides (Environment Agency\*, 2005 ; OSPAR\*, 2004). Les quantités de 4tOP utilisées en 2001 dans ces mélanges sont présentées dans le Tableau 8.

**Tableau 8: Utilisation de sulfates d'éthers d'octylphénols en Europe en 2001**

Utilisation de sulfates d'éthers d'octylphénols	Consommation de 4-tert-octylphénol par usage (en tonnes)
Peintures à base aqueuse	64 - 80
Pesticides	16 - 20

#### 3.2.1.2.2 Industrie du textile et du cuir

Les OPE sont utilisés comme matières adjuvantes dans l'industrie du textile et du cuir (Ineris\*, 2006 ; OSPAR\*, 2004).

Ils sont utilisés dans les textiles pour rendre les matériaux résistants à l'eau, à la lumière et à la poussière (ESIS\*, 2010 ; OCDE\*, 1995 ; Ineris\*, 2008). Ils confèrent également un aspect brillant au cuir (Environment Agency\*, 2005).(2005a)(2005a)(2005a)

### 3.2.1.2.3 Industrie plastique

Les OPE sont utilisés comme stabilisant pour plastique (notamment le PVC) (OSPAR\*, 2004 ; DEFRA\*, 2008 ; Environment Agency\*, 2011).

### 3.2.1.2.4 Industrie des produits ménagers

Les OPE sont utilisés dans certains produits nettoyants domestiques (Ineris\*, 2006 ; Environment Agency\*, 2011). Ils servent d'ingrédients tensioactifs dans les détergents industriels et les produits ménagers de surfaces (Ineris\*, 2006 ; ESIS\*, 2010 ; OCDE\*, 1995 ; Ineris\*, 2008 ; Environment Agency\*, 2011).

### 3.2.1.2.5 Industrie phytosanitaire

Utilisés dans la formulation des pesticides, les OPE agissent comme agent émulsifiant et aident à la dispersion du produit (Ineris\*, 2006 ; Environment Agency\*, 2005 ; OSPAR\*, 2004 ; Environment Agency\*, 2011).

### 3.2.1.2.6 Industrie cosmétique

Les OPE sont utilisés dans les produits cosmétiques et dans les shampooings (ESIS\*, 2010 ; Environment Agency\*, 2011).

Les principaux usages de ces éthoxylates d'octylphénol sont résumés dans le Tableau 9 (Ineris\*, 2006 ; Environment Agency\*, 2005 ; OSPAR\*, 2004).

**Tableau 9: Utilisation d'éthoxylates d'octylphénol en Europe en 2001**

Utilisation d'éthoxylates d'octylphénol	Tonnage annuel d'éthoxylates d'octylphénol utilisé pour l'application	Tonnage annuel de 4-tert-octylphénol utilisé pour la synthèse d'éthoxylates d'octylphénol utilisée pour l'application
Agent émulsifiant dans l'émulsion de polymères (par exemple, polymères styrène-butadiène)	550 t	220 t
Agent émulsifiant pour la fabrication de textile et de cuir	150 t	60 t
Agent émulsifiant dans la fabrication de peintures à base aqueuse	50 t	20 t

### 3.2.1.3 Autres utilisations

Aux Etats-Unis, Dodson *et al.*, ont mesuré le 4tOP dans 50 types de produits de consommation, en ciblant particulièrement les produits d'entretien et des produits cosmétiques (Dodson *et al.*, 2012). Les produits testés sont des produits en vente aux Etats-Unis. Pour chaque type de produit testé, les auteurs en ont identifié plusieurs, dits « conventionnels » et un, dit « alternatif ». Un produit « alternatif » est défini, selon les auteurs, comme un produit ne devant pas avoir dans sa composition donnée sur l'étiquette, l'un des termes suivants : parabens, éthanolamines, 1,4-dichlorobenzène, surfactants non ioniques, parfums, triclosan, triclocarban, antibactérien, vinyle, résistant aux tâches, huile d'arbre à thé, lavande, à base de pétrole.

La limite de détection est établie à 1 µg.g<sup>-1</sup>.

Le 4tOP n'a été quantifié que dans le produit « pâte à dentifrice », à une concentration comprise entre 1 et 100  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Le 4tOP n'a été détecté dans aucun des autres produits testés.

Plus récemment, Liao et Kannan (2014) ont mesuré le 4tOP dans 231 produits cosmétiques achetés aux USA et en Chine. Les produits testés sont des dentifrices, des produits pour les cheveux, des produits maquillant, des produits pour la peau, des savons et des nettoyants corporels. La limite de quantification est de 0,5  $\text{ng.g}^{-1}$ . Le 4tOP a été détecté dans 36 % des échantillons, à des concentrations variant de la limite de quantification à 10 100  $\text{ng.g}^{-1}$  (soit 0,001 % massique).

L'annexe 1 présente un récapitulatif des articles et mélanges susceptibles de contenir du 4-NP selon l'étude bibliographique. Pour rappel, l'utilisation de nonylphénols dans les cosmétiques est interdite en Europe.

L'**Annexe 11** présente un récapitulatif des articles et mélanges susceptibles de contenir du 4tOP selon l'étude bibliographique.

### 3.2.2 Usages identifiés via les industriels

Suite à l'enquête de filières, les secteurs d'activité identifiés ci-dessus ont été interrogés selon la méthodologie décrite dans le chapitre 3.4 du rapport « Méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation » (Anses, 2014). Deux entreprises se sont déclarées, via l'enquête en ligne, comme étant concernées par le 4tOP, qu'elles soient productrices ou utilisatrices de la substance, d'un sous ensemble d'articles ou de mélanges contenant du 4tOP ou bien d'un article ou d'un mélange. **À ce jour, aucun mélange ou article contenant du 4tOP n'a été identifié via les industriels.**

### 3.3 Contact auprès des fédérations

Par ailleurs, des fédérations professionnelles ont également été contactées, la liste complète est disponible en annexe 2.

- Le Centre Technique du Cuir (CTC) indique que le 4tOP peut entrer dans la composition de certains produits utilisés en tannerie.
- Le Centre Technique de la Teinture et du Nettoyage (CTTN) indique que, les dérivés du phénol (hormis le chlorocrésol) ne devraient plus être utilisés dans les formulations des lessives grand public.
- Le Centre Technique des Industries de la Fonderie (CTIF) indique que la fonderie n'utilise pas de dérivés du phénol. Compte tenu des procédés thermiques, des produits de dégradation des liants sont susceptibles de se former (phénol ou dérivés, toluène éventuellement) mais ils sont aspirés dans les fumées.
- L'Organisation professionnelle des fabricants d'emballages en carton ondulé de France (ONDEF) indique que les dérivés du phénol n'entrent pas dans la fabrication des emballages en carton ondulé.
- La Fédération de l'Horlogerie indique que les dérivés du phénol que l'on trouve dans les résines et les colorants pourraient potentiellement se retrouver dans des composants de montres.

## 4 Résultats de l'extraction des bases de données

L'identification des produits de consommation a été complétée par l'extraction de bases de données.

### 4.1 Extraction de la Base nationale des produits et compositions (BNPC)

La base nationale des produits et compositions a été consultée en août 2010. Elle liste les mélanges chimiques pour lesquels une déclaration a été faite auprès des centres antipoison entre 2000 et 2010 : sur cette période les mélanges contenant du 4tOP ont été recensés. Ils sont synthétisés dans le tableau 10 et détaillés dans le tableau 11.

**Tableau 10 : Récapitulatif : Répartition des différents types de produits contenant du 4tOP répertoriés dans la BNPC – Mélanges utilisés par la population générale**

Type de produit	Nombre de référence
Colles et adhésifs	1
Produit cosmétique / Hygiène corporelle - Protecteur Solaire	3

**Tableau 11 : Résultats de l'extraction de la BNPC (août 2010) – Mélanges utilisés par la population générale**

Date composition	Nombre de produits	Concentration (% massique)	Type de produit	Forme
<b>Colles et adhésifs</b>				
2005	1	0,1	Adhésif	Liquide
<b>Produit Cosmétique / Hygiène Corporelle &gt;&gt; Protecteur Solaire</b>				
De 2007 à 2009	3	De 3 à 5,4	Crème/lait solaire	Liquide

Les informations de la BNPC ont été complétées par une recherche des fiches de données de sécurité (FDS) pour chaque mélange.

Les données issues de la BNPC pour la colle indiquent uniquement que ce produit contient de l'octylphénol, sans préciser de quel isomère il s'agit. La fiche de données sécurité de ce produit n'indique pas la présence d'octylphénol dans le mélange (FDS, 2009).

### 4.2 Extraction de la base de données Sepia

La base de données Sepia de l'INRS concerne les mélanges chimiques mis sur le marché français. Elle est alimentée par les déclarations obligatoires des mélanges classés très toxiques, toxiques, corrosifs ou biocides, par les informations fournies suite à une demande de l'INRS, et dans une moindre mesure, par des renseignements envoyés spontanément par les industriels.

L'extraction de la base de données Sepia (INRS) a été réalisée en août 2010. Elle intègre les données disponibles entre le 01/01/2000 et le 28/02/2010. Un seul mélange correspondant à une résine d'utilisation inconnue a été recensé dans Sepia. La concentration en 4tOP dans ce mélange est inférieure à 1 %.

## 5 Synthèse des mélanges et articles identifiés

Les articles et mélanges recensés et leurs sources ont été regroupés dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Synthèse des usages répertoriés**

Catégorie de mélanges ou articles	Présence dans la BNPC	Présence dans Sepia	Informations extraites de l'enquête de filières	Informations issues de la bibliographie
<b>À partir de résines phénoliques</b>				
Résine et colorants		<b>X</b>	<b>X</b> (fédération) <sup>11</sup>	
Colle / adhésif				<b>X</b>
Papier				<b>X</b>
Vernis et peinture				<b>X</b>
Fabrication de caoutchouc				<b>X</b>
Encre				<b>X</b>
<b>À partir de d'éthoxylates d'octylphénol</b>				
Colle / adhésif	<b>X</b>			<b>X</b>
Fabrication des Textiles, du cuir et des peaux				<b>X</b>
Vernis et peinture				<b>X</b>
Nettoyant ménager				<b>X</b>
Produits cosmétiques	<b>X</b>			<b>X</b>
Produits phytosanitaires				<b>X</b>
Fabrication de matières plastiques				<b>X</b>

<sup>11</sup> Dérivés du phénol (constituant de montre)

## 6 Identification de données d'exposition relatives aux environnements domestiques et/ou extérieurs

La méthode employée pour la recherche bibliographique est explicitée dans le chapitre 3.7 du rapport « Méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation » (Anses, 2014).

### 6.1 Données sur l'air intérieur des logements et l'air extérieur

Un nombre limité d'études relatives à des mesures de 4tOP réalisées dans les environnements domestiques et/ou extérieur ont été identifiées dans la littérature.

Trois publications scientifiques pertinentes ont été sélectionnées :

- une étude japonaise présente les résultats de mesures de 4tOP réalisées dans l'air extérieur et intérieur (Saito *et al.*, 2004) ;
- une étude japonaise rapporte les résultats de mesures de 4tOP dans l'air intérieur (Inoue *et al.*, 2006) ;
- une étude grecque présente des concentrations de 4tOP dans l'air extérieur (particules PM<sub>10</sub>) (Salapavidou *et al.*, 2011).

Saito *et al.* ont mené une étude à Tokyo (Japon) entre juillet 2001 et mars 2002 (Saito *et al.*, 2004). L'objectif de cette étude était de développer une méthode analytique pour l'étude des alkylphénols dans l'air et d'investiguer la pollution de l'air par ces substances (alkylphénols de C4 à C9) dans les logements, bureaux et l'air extérieur. Plusieurs alkylphénols, dont le 4tOP ont été mesurés dans l'air intérieur de 45 logements (individuels et collectifs) et 19 bâtiments à usage professionnel. Par ailleurs, 33 points extérieurs situés à proximité des logements et des bâtiments à usage professionnel ont également été investigués. En complément, des mesures de taux de migration à partir des surfaces (plafond, sol et murs) ont été effectuées dans des maisons neuves, ainsi que des mesures dans des matériaux de revêtement en PVC. En conclusion de cette étude, des doses d'exposition ont été calculées pour des travailleurs et des femmes au foyer. Les échantillons ont été collectés sur des filtres en fibres de quartz (étape 1) et des disques SPE (Solid Phase Extraction) (étape 2) par prélèvement actif (débit ; 10 L.min<sup>-1</sup> pendant 24 heures), extraits par ultrasonication puis analysés par GC-MS (précédée d'une étape de dérivation au BSTFA<sup>12</sup>).

Afin de développer une méthode d'analyse pour déterminer les concentrations en Bisphénol A, 4tOP, 4-nonylphénol, tetrabromobisphénol A et pentachlorophénol dans l'air intérieur, Inoue *et al.*, ont conduit une étude entre mars et mai 2003 à Kankawa et Tokyo (Japon) (Inoue *et al.*, 2006). Les auteurs ont investigué 26 points de prélèvement dans l'air intérieur d'une maison et du centre de recherche à Kanakawa ainsi qu'un appartement et l'université situés à Tokyo. Les prélèvements d'air ont été effectués à l'aide d'une pompe (de débit 7L.min<sup>-1</sup> pendant 24 heures) puis analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

Salapavidou *et al.* 2011 ont étudié la présence de différents composés perturbateurs endocriniens dont le 4tOP dans l'air ambiant de la ville de Thessaloniki (ville située au nord

---

<sup>12</sup> BSTFA : N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide. La dérivation est une technique qui permet l'analyse de composés qui ne peuvent pas être directement analysés en chromatographie gazeuse.

de la Grèce, densément peuplée > 1 000 000 habitants). Les auteurs ont prélevé des particules (PM<sub>10</sub>) sur un site de trafic urbain et sur un site industriel, de janvier à février 2007. Ces prélèvements ont été réalisés à l'aide d'un échantillonneur d'air à faible débit pendant 24 heures (selon la norme EN 12341). Les particules ont été collectées sur un filtre de quartz puis analysées par GC-MS. Les auteurs ont également estimé la répartition de chaque composé étudié entre la phase gazeuse et la phase particulaire à partir de modèles basés sur leurs propriétés physico-chimiques.

Par ailleurs, la recherche bibliographique a également permis d'identifier des études relatives aux mélanges commerciaux de tert-octylphénol (incluant les isomères 2, 3 ou 4tOP). Comme indiqué précédemment, le 4tOP est l'isomère le plus commercialisé et entrant majoritairement dans la composition des mélanges commerciaux (Ineris\*, 2006). Par conséquent, dans une première intention, ces études n'ont pas été écartées par le groupe de travail (GT).

Trois publications scientifiques complémentaires relatives au tert-octylphénol ont aussi été sélectionnées :

- une étude nord-américaine rapporte les résultats de mesures de tert-octylphénol dans l'air extérieur (Van Ry *et al.*, 2000) ;
- deux études allemandes présentent des concentrations de tert-octylphénol dans l'air extérieur (Berkner *et al.*, 2004 ; Xie *et al.*, 2006).

Ces études sont détaillées ci-dessous et les résultats des mesures de tert-octylphénol ou de 4tOP dans l'air intérieur et/ou extérieur ainsi que dans les poussières intérieures sont présentés dans le Tableau 13, le 14 et le 15.

Van Ry *et al.* ont évalué l'occurrence du tert-octylphénol et de plusieurs nonylphénols dans l'atmosphère de l'estuaire de la rivière Hudson aux Etats-Unis entre juin et décembre 1998 (Van Ry *et al.*, 2000. L'estuaire de la rivière Hudson est situé entre New York et le New Jersey (zone métropolitaine densément peuplée). Des prélèvements d'air (phases gazeuse et particulaire) ont été réalisés sur 3 sites (New Brunswick, Liberty Science Center et Sandy Hook) à l'aide d'un échantillonneur à haut débit (~ 0,3 - 0,5 m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>) puis analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Berkner *et al.* ont développé et validé une méthode pour évaluer l'occurrence des alkylphénols (dont le tert-octylphénol) et le bisphénol A à l'état de trace dans l'atmosphère (Berkner *et al.*, 2004). L'étude a été conduite au Nord-Est de la Bavière en Allemagne sur 3 sites (l'un des sites est situé à proximité de la ville de Bayreuth) entre mai et novembre 2001. Les échantillons d'air dans la phase gazeuse ont été adsorbés sur des résines XAD2 (débit : 2 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> pendant 2 semaines). Les particules (dont la fraction granulométrique n'est pas précisée) ont été prélevés sur des filtres en fibre de verre (débit : 60 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>). Les échantillons collectés ont ensuite été analysés par GC/MS précédée d'une étape de dérivatisation au BSTFA (N,O-bis-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide).

Enfin, Xie *et al.* ont développé une méthode d'analyse par GC-MS pour déterminer simultanément la présence d'alkylphénols et de phtalates à l'état de trace dans l'atmosphère (Xie *et al.*, 2006). Afin de tester cette méthode, les auteurs ont mesuré les concentrations en tert-octylphénol dans l'air ambiant sur un site terrestre (centre de recherche) et sur un site maritime (à bord d'un navire sur la Mer du Nord) en Allemagne. Les échantillons d'air dans les phases gazeuse et particulaire ont été prélevés à l'aide d'un échantillonneur d'air haut débit (200 L.min<sup>-1</sup>) puis analysé par GC-MS (précédée d'une étape de dérivatisation).

### **6.1.1 Concentrations dans l'air intérieur de logements**

Le Tableau 13 synthétise les concentrations en 4tOP relevées dans la littérature dans l'air intérieur des logements à partir des 2 études résumées ci-dessus.

Tableau 13 : Concentrations en 4tOP relevées dans l'air intérieur

Références	Méthode analytique	LD (ng.m <sup>-3</sup> )	% > LD	Min (ng.m <sup>-3</sup> )	Max (ng.m <sup>-3</sup> )	Médiane (ng.m <sup>-3</sup> )	Autres données (ng.m <sup>-3</sup> )
Saito <i>et al.</i> , 2004 Tokyo (Japon) N = 90 (2 mesures dans 45 logements)	Prélèvement actif, désorption chimique, analyse GC-MS	3,1 (volume de 14,4 m <sup>3</sup> )	52	< LD	45,7	3,2	Moy = 7,6 Ecart type : 9,6
Inoue <i>et al.</i> , 2006 Japon 26 (points de prélèvement)	Prélèvement actif sur 24h LC-MS	NR	81	< 0,1	48,5	2,8	Moyenne = 6,3 Ecart type = 11,2

NR : non renseigné ; ND : non détecté

Les résultats de ces deux études indiquent que les concentrations en 4tOP mesurées dans l'air intérieur des logements japonais sont du même ordre de grandeur.

Dans l'étude de Saito *et al.* (2004), les concentrations mesurées et la fréquence de détection en 4tOP étaient plus élevées dans l'air intérieur que dans l'air extérieur.

Inoue Les résultats de l'étude ne permettent pas de distinguer les microenvironnements (concentrations poolées : logements, centre de recherche, université).

### 6.1.2 Concentrations dans l'air extérieur

Le tableau 14 synthétise les concentrations en tert-octylphénol et 4tOP relevées dans la littérature dans l'air extérieur à partir des études résumées ci-dessus.

Tableau 14 : Concentrations en 4tOP ou tert-octylphénol relevées dans l'air extérieur

Références	Isomère	Méthode analytique	MDL <sup>13</sup> /LD	% > LD	Min (ng.m <sup>-3</sup> )	Max (ng.m <sup>-3</sup> )	Médiane (ng.m <sup>-3</sup> )	Autres données (ng.m <sup>-3</sup> )
Van Ry <i>et al.</i> , 2000 3 sites : - site 1 : N = 22 - site 2 : N = 10 - Site 3 : N = 26	tOP	Prélèvement actif, désorption chimique, analyse GC-MS	Phase gazeuse = 1 ng <sup>14</sup> Phase particulaire = 4 ng <sup>15</sup>	100	<b>Site 1 :</b> Phase gazeuse : < LD Phase particulaire : < LD <b>Site 2 :</b> Phase gazeuse : 0,012 Phase particulaire : <LD <b>Site 3 :</b> Phase gazeuse : 0,0091 Phase particulaire : 0,0011	<b>Site 1 :</b> Phase gazeuse : 1 Phase particulaire : 0,63 <b>Site 2 :</b> Phase gazeuse : 0,74 Phase particulaire : 0,073 <b>Site 3 :</b> Phase gazeuse : 2,5 Phase particulaire : 0,18	<b>Site 1 : NR</b> <b>Site 2 : NR</b> <b>Site 3 : NR</b>	<b>Moyenne Site 1 :</b> Phase gazeuse : 0,21 Phase particulaire : 0,038 <b>Site 2 :</b> Phase gazeuse : 0,10 Phase particulaire : 0,034 <b>Site 3 :</b> Phase gazeuse : 0,4 Phase particulaire : 0,022

<sup>13</sup> La MDL est la concentration minimale d'une substance qui, dans une matrice donnée et selon une méthode d'analyse spécifique, puisse être mesurée avec une confiance de 99% comme étant supérieure à 0 (Corl *et al.*, 2002 ; Jones et Clarke, 2005).

**Saito *et al.*, 2004** : la MDL est calculée à partir de la limite de quantification analytique et le volume d'air prélevé.

<sup>14</sup> Volume prélevé non précisé dans l'article

<sup>15</sup> Volume prélevé non précisé dans l'article

Références	Isomère	Méthode analytique	MDL <sup>13</sup> /LD	% > LD	Min (ng.m <sup>-3</sup> )	Max (ng.m <sup>-3</sup> )	Médiane (ng.m <sup>-3</sup> )	Autres données (ng.m <sup>-3</sup> )
Berkner <i>et al.</i> , 2004 3 sites : - clairière N = 3 - forêt : N = 3 - à proximité de la ville de Bayreuth : N = 2	-tOP <sup>16</sup> (~90% CAS 104-66-9)	Prélèvement actif, désorption chimique, analyse GC-MS	8 pg <sup>17</sup>	NR	Phase gazeuse : 0,02 Phase particulaire : 0,0003	Phase gazeuse : 0,16 Phase particulaire : 0,0042	NR	NR
Saito <i>et al.</i> , 2004 Tokyo (Japon) N = 33	4tOP	Prélèvement actif sur 24h, Filtres en fibres de quartz SPE GC-MS	3,1 ng.m <sup>-3</sup>	42	< LD	5,3	< LD	Moy < LD
Xie <i>et al.</i> , 2006 2 sites : -site 1 : centre de recherche N = 6 -site 2 : mer du Nord N = 10	tOP	phase gazeuse : échantillonneur d'air à haut débit phase particulaire : un GF/F8 GC-MS	Phase gazeuse : 0,002 ng.m <sup>-3</sup> Phase particulaire : 0,0006 ng.m <sup>-3</sup>	NR	Site 1 : Phase gazeuse : 0,038 Phase particulaire : 0,002 Site 2 : Phase gazeuse : <MDL Phase particulaire : <MDL	Site 1 : Phase gazeuse : 0,36 Phase particulaire : 0,017 Site 2 : Phase gazeuse : 0,039 Phase particulaire : 0,002	Site 1 : NR Site 2 : NR	Moyenne Site 1 : Phase gazeuse : 0,14 Phase particulaire : 0,007 Site 2 : Phase gazeuse : 0,01 Phase particulaire : 0,001

<sup>16</sup> Cette étude concerne 90% du CAS 104-66-9. Il a été interprété dans le cadre de cette étude comme 140-66-9 (qui correspond au N° CAS du 4-tert-octylphénol).

<sup>17</sup> Volume prélevé non précisé dans l'article

Références	Isomère	Méthode analytique	MDL <sup>13</sup> /LD	% > LD	Min (ng.m <sup>-3</sup> )	Max (ng.m <sup>-3</sup> )	Médiane (ng.m <sup>-3</sup> )	Autres données (ng.m <sup>-3</sup> )
Salapasidou <i>et al.</i> , 2011 2 sites : -site 1 (trafic urbain) N = 10 -site 2 : industriel N = 10	4tOP	Prélèvement actif (PM 10), désorption chimique, analyse GC-MS	NR	Site 1 : 100 Site 2 : 60	Site 1 : 0,01 Site 2 : < LD	Site 1 : 0,12 Site 2 : 0,02	Site 1 : 0,04 Site 2 : 0,012	Moyenne Site 1 : 0,04 (écart type : 0,03) Site 2 : 0,01 (écart type 0,05)

LOD<sub>g</sub> : limite de détection pour les échantillons en phase gazeuse (volume de l'échantillon 0,5 ml et volume d'injection : 1µl)

LOD<sub>a</sub> : limite de détection pour les échantillons en phase particulaire (volume de l'échantillon 150 µl et volume d'injection : 1µl) ; NR : non renseigné ; ND : non détecté ; MDL : method detection limit (limite de détection de la méthode) ; PUF : polyurethane foam

NR : non renseigné ; ND : non détecté

Les résultats des études de Van Ry *et al.*, Berkner *et al.* et Xie *et al.* montrent que le tert-octylphénol est majoritairement mesuré dans la phase gazeuse. De même selon l'étude de Salapasidou *et al.*, 18 % du 4tOP est présent en phase particulaire et 82 % en phase gazeuse.

Les concentrations atmosphériques en tert-octylphénol (dans la phase gazeuse) mesurées au niveau des sites suivants sont comparables :

- Liberty Science Center : zone urbaine/industrielle à New-York (Van Ry *et al.*, 2000)
- 3 sites en Bavière (forêt, clairière et à proximité de la ville de Bayreuth) en Allemagne (Berkner *et al.*, 2004)
- Centre de recherche GSSK : Geesthacht en Allemagne (Xie *et al.*, 2006)

Dans l'étude de Van Ry *et al.*, selon les auteurs la volatilisation du tert-octylphénol à partir des eaux semble être une source importante à l'échelle locale. Par ailleurs les mesures ont mis en évidence des variations saisonnières. Les auteurs suggèrent que les températures élevées en été pourraient provoquer la volatilisation des alkylphénols suite à leur application sur les surfaces terrestres.

Dans l'étude de Salapasidou *et al.*, les concentrations en 4tOP mesurées sont significativement ( $p < 0,05$ ) plus importantes sur le site de trafic urbain. Selon les auteurs, la présence de concentrations élevées en alkylphénols dans les particules aéroportées dans la ville Thessaloniki sont probablement dues aux rejets d'eaux usées.

## 6.2 Données sur les poussières sédimentées

Seule une étude allemande de Butte *et al.*, 2001 présente **les résultats de mesures de tert-octylphénol dans les poussières domestiques.**

Les auteurs ont évalué la contamination des poussières domestiques par plusieurs substances dites perturbatrices du système endocrinien : biocides, phtalates, alkylphénols dont le tert-octylphénol (Butte *et al.*, 2001). Les échantillons de poussières domestiques ont été prélevés dans le cadre d'une étude sur la leucémie et le lymphome dans le Nord de l'Allemagne en 1998 et 1999. L'échantillonnage concernait 286 logements situés dans des zones rurales, moyennement ou faiblement peuplées. Les prélèvements ont été réalisés par les participants à l'aide d'aspirateurs ménagers disponibles dans leur logement sur une période d'au moins quatre semaines. Les caractéristiques des logements ont été détaillées par les participants. L'intégralité du contenu d'un sac d'aspirateur a été filtrée au travers d'un tamis à mailles de 2 mm. Un aliquote de la "fraction  $\leq 2\text{-mm}$ " de la poussière a ensuite été filtré au travers d'un tamis à mailles de 63  $\mu\text{m}$ . Cinq extraits de poussières ont été préparés. L'échantillon utilisé pour mesurer les concentrations des alkylphénols dans les poussières a été analysé par chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire et détecteur à capture d'électrons (CPG/ECD).

Le tableau 15 présente les concentrations en tert-octylphénol relevées dans les poussières.

Tableau 15 : Concentrations en tert-octylphénol relevées dans les poussières

Références	Méthode analytique	N	Concentrations (mg/kg)
Butte <i>et al.</i> , 2001	GC-ECD	286	95ème percentile (intervalle de confiance) 0,86 (0,72-1,1)

Le 95<sup>ème</sup> percentile de la concentration en tert-octylphénol mesurée dans les poussières (seul percentile rapporté par les auteurs) est égal à 0,86 mg.kg<sup>-1</sup> (soit µg.g<sup>-1</sup>) et son intervalle de confiance à 95 % varie entre 0,72 et 1,1 mg.kg<sup>-1</sup>.

Les données de la littérature ont été mises à jour sur la période 2010 – 2014. Deux études présentant des données dans l'air extérieur et les poussières ont été identifiées. Ces deux études ont été réalisées dans le cadre de développement ou d'optimisation de méthodes analytiques.

Lu *et al.*, 2013 ont réalisés des mesures de phénols dans les poussières de logements en Chine dans le cadre du développement d'une méthode analytique par UHPLC-MS/MS (chromatographie liquide ultra haute performance) permettant de quantifier simultanément 5 phénols (BPA, triclosan, 4-tert-octylphénol, 4-n-octylphénol, 4-n-nonylphénol) dans les poussières. Cette méthode a été testée sur 47 échantillons de poussières prélevés dans des logements en zone urbaine, à l'aide d'un aspirateur dédié. Les poussières ont ensuite été tamisée à 150 µm et les phénols ont été extraits à l'aide d'acétone. L'extrait a ensuite été analysé par UHPLC-MS/MS. La fréquence de détection du 4-tert-octylphénol dans les logements était de 85 %. La concentration médiane est égale à 80 ng.g<sup>-1</sup> (Min < LD ; max = 530), ce qui est du même ordre de grandeur que les concentrations en tert-octylphénol rapportées dans l'étude de Butte *et al.*, 2001 (P95 = 860 ng.g<sup>-1</sup>).

Salgueiro-Gonzalez *et al.*, (2013) ont mesuré 13 substances suspectées perturbatrices endocriniennes dans la phase particulaire de l'atmosphère en Espagne. Ces mesures ont été réalisées dans le cadre de l'optimisation d'une méthode d'extraction par solvant pressurisée et analyse par LC-MS/MS. Huit échantillons d'air (fraction particulaire PM<sub>2,5</sub> uniquement) ont été prélevés à l'aide d'un échantillonneur à haut débit (30 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>) pendant 24h dans des zones industrielles, urbaines et suburbaines (supposées non polluées). Le 4-tert-octylphénol a été détecté dans tous les échantillons mais toutes les mesures sont inférieures à la limite de quantification (< 63 pg.m<sup>-3</sup>).

## 7 Discussions et conclusions

Le 4tOP n'entre pas directement dans la formulation de produits finis. Il est utilisé comme intermédiaire dans la synthèse de résines phénoliques et d'éthoxylates d'octylphénol, aux utilisations industrielles diverses.

En ce qui concerne les produits fabriqués à partir des résines (colles, peintures, vernis, matières plastiques), il n'est pas exclu que du 4tOP libre n'ayant pas réagi soit libéré au cours de leur utilisation. Les produits synthétisés à partir d'OPEs peuvent également contenir de faibles quantités de 4tOP n'ayant pas réagi. Les seules données de concentration disponibles sont issues de la BNPC et concernent des produits cosmétiques, dont l'évaluation n'entre pas dans le champ de la saisine, et une colle pour laquelle il est uniquement fait mention d'octylphénol, sans précision supplémentaire sur l'isomère employé. L'extraction de la base de données Sepia confirme uniquement la présence de 4-tert-octylphénol dans les résines mais ne donne pas d'informations sur son usage précis.

A noter également que le 4tOP a été inscrit sur la liste des substances à inclure à l'annexe XIV pour les procédures d'autorisation. Ce dispositif vise à ce que chaque utilisation de certaines substances parmi les plus préoccupantes pour la santé et l'environnement soit soumise à une autorisation afin de permettre son contrôle strict. A terme, une fois qu'une substance est incluse à l'annexe XIV, elle ne peut plus être fabriquée/importée/utilisée sans autorisation de la commission européenne.

**Au vu de ces éléments, il ne sera pas réalisé d'évaluation quantitative de l'exposition du grand public liée à l'utilisation de produits de consommation contenant du 4tOP selon l'approche décrite dans le rapport « méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation » (Anses, 2014).**

**Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail: 16 juin 2012.**

## 8 Références bibliographiques

Agence de l'eau Seine Normandie\*. Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SDAGE). Substances dangereuses, tableau d'objectifs de réductions de flux [page web]. En ligne : <http://www.eau-seine-normandie.fr> . 2009.

Anses (2014) Méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances perturbatrices endocriniennes et/ou reprotoxiques dans les produits de consommation. Rapport d'expertise collective, Maisons-Alfort.

Ashford\* (2001) Ashford's Dictionary of Industrial Chemicals - 2nd edition. p 815.

Berkner S, Streck G, Herrmann R (2004) Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere* **54**, 575-584.

Berryman\* D, Houde F, Deblois C (2011) Suivi des nonylphénols éthoxylés dans l'eau brute et l'eau traitée de onze stations de traitement d'eau potable au Québec. Direction du suivi de l'état de l'environnement, ministère de l'Environnement, Québec, envirodoq n°ENV/20003/0001, 32 pages.

BKH (2002). Endocrine Disruptors : study on gathering information on 435 substances with insufficient data ». (BKH,DHI,Kiwa, Delft, The Netherlands). 279 p. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/bkh\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/bkh_report.pdf)

Butte W, Hoffmann W, Hostrup O, Schmidt A, Walker G (2001) Endokrin wirksame Substanzen im Hausstaub: Ergebnisse eines repräsentativen Monitorings: Herrn Prof. Dr. P. Köll zum 60. Geburtstag gewidmet. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* **61**, 19-23.

DEFRA\* (2008) Department for Environment, Food and Rural Affairs. 4-tert-octylphenol. Risk reduction strategy and analysis of advantages and drawbacks. Final report.

DHI (2007) « Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals ». (DHI, Hørsholm, Danmark, 2007). 252 p. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final\\_report\\_2007.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final_report_2007.pdf)

Directive 67/548/CEE du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (JOCE L196 du 16 août 1967).

Dodson RE, Nishioka M, Standley LJ, Perovich LJ, Green Brody J, Rudel RA (2012) Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environmental Health perspectives* 1-41.

Environment Agency\* (2005) Environmental Risk Evaluation report : 4-tert-Octylphenol.

Environment Agency\* (2011) Priorisation of alkylphenols for environmental risk assessment.

ESIS\*. European Chemical Substances Information System. European Commission [page web]. En ligne : <http://ecb.jrc.ec.europa.eu> . 2010.

ETRMA\*. European Tyre & rubber Manufacturers ' Association. EU risk reduction strategy proposed for Octylphenol [page web]. En ligne : <http://www.etrma.org> . 2007

FDS (2009). Fiche de données sécurité. Bostik. Sader colle sol moquettes et plastiques.

Ineris\*. Institut National de l'Environnement industriel et des risques. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. Octylphénols. 2006.

Ineris\*. Institut National de l'Environnement Industriel et des risques. Les substances dangereuses pour le milieu aquatique dans les rejets industriels et urbains. Bilan de l'action nationale de recherche et de réduction des rejets de substances dangereuses dans l'eau par les installations classées et autres installations [rapport en ligne]. En ligne : <http://rsde.ineris.fr> . 2008.

Inoue K, Yoshida S, Nakayama S, Ito R, Okanouchi N, Nakazawa H (2006) Development of stable isotope dilution quantification liquid chromatography-mass spectrometry method for estimation of exposure levels of bisphenol A, 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol, tetrabromobisphenol A, and pentachlorophenol in indoor air. *Arch Environ Contam Toxicol*. **51**, 503-508.

IUCLID\*. International Uniform Chemical Information Database : 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol [base de données]. En ligne : <http://ecb.jrc.ec.europa.eu> . 2000.

Kirk et Othmer\* (2007) Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. n° 2. 5th edition. Wiley-Interscience. pp. 226-228.

Liao C, Kannan K (2014) A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States. *Arch Environ Contam Toxicol* **67**, 50-59.

Lu X, Chen M, Zhang X, Sun Y, Zhu D, Zhang Q, Wang B, Zhang Z (2013) Simultaneous quantification of five phenols in settled house dust using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **5**, 5339-5344.

OCDE\*. Organisation de Coopération et de Développement Economique : SIDS Initial Assessment Report for phenol,4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) [rapport en ligne]. En ligne : <http://www.inchem.org> . 1995.

OCDE (2009) The 2007 OECD list of High Production Volume chemicals [rapport en ligne]. En ligne : <http://www.oecd.org> . 2009.

OSPAR\*. Administrator of the Oslo and Paris Conventions for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic. Hazardous Substances Series. Background document on octylphenol [rapport en ligne]. En ligne : <http://www.ospar.org> . 2004.

Règlement (CE) n°1272/2008 ou règlement CLP du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006 (JOUE L353 du 31 décembre 2008).

Règlement REACH (CE) n° 1907/2006 du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) no 793/93 du Conseil et le règlement (CE) no 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission (JOUE L396 du 30 décembre 2006).

Saito I, Onuki A, Seto H (2004) Indoor air pollution by alkylphenols in Tokyo. *Indoor Air*. **14**, 325-332.

Salapasidou M, Samara C, Voutsas D (2011) Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment* **45**, 3720-3729.

Salgueiro-Gonzalez N, Lopez de Alda M, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodriguez D, Barcelo D (2013) Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 8913-8923.

Van Ry DA, Dachs J, Gigliotti CL, Brunciak PA, Nelson ED, Eisenreich SJ (2000) Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the Lower Hudson River estuary. *Environmental science & technology* **34**, 2410-2417.

Xie Z, Selzer J, Ebinghaus R, Caba A, Ruck W (2006) Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. *Analytica Chimica Acta* **565**, 198-207.

---

## ANNEXES

---

## Annexe 1 : Récapitulatif des usages et des articles et mélanges susceptibles de contenir du 4tOP

Les catégories d'article et de mélange, citées ci-dessous, sont établies selon des nomenclatures existantes. Elles peuvent couvrir une liste de produits plus large que ceux concernés par le 4tOP.

Utilisation	Catégorie d'article ou de mélange susceptible de contenir du 4tOP
<b>Utilisation des résines phénoliques fabriquées à partir du 4tOP</b>	
Encres d'impression	Encre imprimante personnelle Encre professionnelle
Colles ou adhésifs	Colle / adhésif
Papiers enduits	Papier
Vernis d'isolation électrique	Bandes transporteuses et courroies de transmission en caoutchouc vulcanisé Parties de moteurs et génératrices électriques Fabrication de moteurs, génératrices et transformateurs électriques Isolateurs électriques ; pièces isolantes pour machines ou équipements électriques ; tubes isolateurs
Peintures	Peintures spéciales
Matières en caoutchouc	Pneumatiques neufs et rechapés Voitures particulières Autobus et autocars Véhicules utilitaires pour le transport de marchandises Véhicules utilitaires spécifiques Fabrication d'autres articles en caoutchouc
<b>Utilisation des éthoxylates d'octylphénol fabriqués à partir du 4tOP</b>	
Colles ou adhésifs	Colle / adhésif
Textiles dont la fabrication a nécessité un agent émulsifiant	Textile
Cuir dont la fabrication a nécessité un surfactant non ionique	Cuir et peau
Vernis et peintures	Vernis et peintures
Produits ménagers	Nettoyant ménager
Matières plastiques	Emballages en matières plastiques Vêtements et accessoires de l'habillement (y compris gants) en matières plastiques Autres produits en matières plastiques n.c.a.
Produits phytosanitaires	Produits phytosanitaires
Cosmétiques	Produits cosmétiques et shampoings

## Annexe 2 : Liste des fédérations contactées pour l'enquête sur les perturbateurs endocriniens

AIMCC : Association des industries de produits de construction  
ALUTEC : Association lunetière technologique  
APST-BTP-RP Santé au travail  
Association syndicale professionnelle minéraux industriels  
ATILH : Association technique de l'industrie les liants hydrauliques  
Centre technique du cuir  
Chambre syndicale des fabricants de sacs en papier  
CICF : Confédération des industries céramiques et France  
Cimbéton  
COMIDENT : Comité de coordination des activités dentaires  
COPACEL : Confédération française de fabricants de papiers, cartons  
CTICM : Centre technique industriel de la construction  
CTIF : Centre technique des industries de la fonderie  
CTP : Centre technique du papier  
CTTN-IREN : Centre technique de la teinture et du nettoyage – Institut de recherche sur l'entretien et le nettoyage  
Elipso : Les entreprises de l'emballage plastique et souple  
FCBA : Institut technologique bois  
Fédération de l'horlogerie  
Fédération de la plasturgie  
Fédération des chambres syndicales de l'industrie du verre  
Fédération française des industries du jouet et de la puériculture  
Fédération française du bâtiment  
Fédération française du cartonnage  
FFC : Fédération française de la chaussure  
FICG : Fédération de l'imprimerie et de la communication graphique  
FIEEC : Fédération des industries électriques, électroniques et communication  
FIEV : Fédération des industries des équipements pour véhicules  
FIF : Fédération des industries ferroviaires  
FIPEC : Fédération des peintures, encres, couleurs, colles et adhésifs  
GESIM : Groupement des entreprises sidérurgiques et métallurgiques  
GIFAS : Groupement des industries françaises aéronautiques et spatiales  
GIFO : Groupement des industriels et fabricants de l'optique  
IFTH : Institut français du textile et de l'habillement  
Institut du verre  
ONDEF : Organisation professionnelle des fabricants d'emballage en carton ondulé de France  
PlasticsEurope  
PROCELPAC - Association club MCAS « Matériaux pour contact alimentaire et santé » :  
Filière papier- carton  
SCMF : Syndicat de la construction métallique de France  
SFIC : Syndicat français de l'industrie cimentière  
SFP : Société française des parfumeurs  
SFTAS : Syndicat français des textiles artificiels et synthétiques  
SNFBM : Syndicat national des fabricants de boîtes, emballages et bouchages métalliques  
SNFORES : Syndicat national des formulateurs de résines synthétiques  
SNITEM : Syndicat national de l'industrie des technologies médicales  
Syndicat national du caoutchouc et des polymères  
UCAPLAST : Union des syndicats des PME du caoutchouc et de la plasturgie  
UFIP : Union française des industries pétrolières  
UIB : Union des industries du bois

UIC : Union des industries chimiques

UIMM : Union des industries et métiers de la métallurgie

UIPP : Union des industries des panneaux de process

UIT : Union des industries textiles

UNFEA : Union nationale des fabricants d'étiquettes adhésives

UNIFA : Union nationale des industries françaises de l'ameublement

UNIPAS : Union des industries papetières pour les affaires sociales





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

14 rue Pierre et Marie Curie  
94701 Maisons-Alfort Cedex  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr)

[www.anses.fr](http://www.anses.fr) / [@Anses\\_fr](https://twitter.com/Anses_fr)