

**Evaluation du risque lié à l'utilisation du
4-methylbenzylidene camphor dans les
produits cosmétiques**

Synthèse

CONTEXTE

Par lettre du 21 janvier 2009, Madame la Ministre de la Santé, de la Jeunesse et des Sports et de la Vie Associative a saisi l'Afssaps sur la part du risque attribuable aux ingrédients cosmétiques reprotoxiques et/ou perturbateurs endocriniens. Cette saisine s'inscrit dans le cadre du plan d'action « fertilité » du gouvernement. Les autres agences ont aussi été saisies, chacune dans son domaine de compétence. Dans ce contexte, l'Afssaps a identifié plusieurs substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes, dont le 4-méthylbenzylidène camphor (CAS : 36861-47-9 / 38102-62-4).

Le 4-méthylbenzylidène camphor (4-MBC) est un filtre ultraviolet (UV) absorbant les rayonnements UVB. Il est inscrit à l'entrée 18, partie 1, de l'annexe VII de la directive cosmétique 76/768/CEE fixant la liste des filtres UV que peuvent contenir les produits cosmétiques. Ainsi, il peut être utilisé en tant que filtre UV dans les produits cosmétiques à une concentration maximale de 4 %.

Plusieurs avis du Comité scientifique européen pour la sécurité des consommateurs (CSSC) ont été rendus entre 1996 et 2008. De plus, suite à la publication de Schlumpf *et al.* (2001) incriminant le 4-MBC en tant que perturbateur endocrinien en raison d'effets oestrogéniques observés dans des tests *in vitro* et *in vivo* (test utéro-trophique), le CSSC a rendu un avis en 2001 indiquant qu'au vu des connaissances scientifiques actuelles, ce filtre UV ne présentait pas d'effet oestrogénique pouvant altérer la santé humaine.

Toutefois dans son avis adopté le 25 mai 2004 (SCCNFP/0779/04), le CSSC a conclu que l'utilisation du 4-MBC dans les produits de protection solaire était préoccupante indépendamment des effets oestrogéniques précités. En effet, des changements ont été observés dans des études de toxicité à dose répétée chez le rat, notamment au niveau du profil hormonal thyroïdien et de la morphologie de la thyroïde. Or, ces ont été difficiles à interpréter en se fondant sur les études disponibles.

L'évaluation par le CSSC des nouvelles données fournies en 2005 a permis de conclure que l'utilisation sans risque du 4-MBC à la concentration maximale de 4 % ne pouvait être établie (SCCP/1042/06). Des informations complémentaires ont été par la suite fournies par l'industrie.

L'objet du dernier avis du CSSC adopté le 24 juin 2008 (SCCP/1184/08) a donc été de déterminer s'il pouvait être établi que l'utilisation du 4-MBC en tant que filtre UV dans les produits cosmétiques à la concentration maximale de 4 % ne présentait pas de risque pour le consommateur.

Dans le présent rapport l'Afssaps a procédé à l'analyse critique de tous les avis du CSSC ainsi que celle des études disponibles dans la littérature relatives au 4-MBC.

DONNEES DU CSSC (SCCP/1184/08)

Le CSSC a retenu pour l'évaluation du risque, une NOAEL de 25 mg/kg pc./j. Cette NOAEL est basée sur des effets thyroïdiens observés dans une étude de toxicité répétée sur 90 jours par voie orale chez le rat.

La valeur de l'absorption cutanée retenue par le CSSC est de 1,96 µg/cm² (établie dans une étude *in vitro*).

Ainsi, le CSSC a calculé une marge de sécurité (MoS) de la façon suivante :

- absorption cutanée : 1,96 µg/cm² ;
- surface de la peau d'un adulte (1,8 m²) : 18 000 cm² ;
- poids moyen d'un homme : 60 kg ;
- NOAEL (90 j-voie orale-rat) : 25 mg/kg pc./j. ;
- exposition systémique (SED) : ((1,96.10⁻³ x 18 000) / 60 kg) = 0,588 mg/kg pc./j.

→ **MoS = NOAEL / SED = 25 / 0,588 = 42,5**

La MoS étant inférieure à 100, l'utilisation du 4-MBC dans les produits de protection solaire ne peut être considérée comme sûre pour la santé des consommateurs.

Toutefois, l'Industrie cosmétique a fourni un argumentaire au CSSC afin de réduire le facteur de sécurité de 100. En effet, ce dernier correspond au produit de deux composantes, un facteur de sécurité de 10 correspondant à la variation inter-espèce et un facteur de sécurité de 10 relatif à la variation intra-espèce. Chaque facteur de sécurité correspond, lui-même, au produit de la toxicodynamie (2,5) et de la toxicocinétique (4) ou au produit de la toxicodynamie (3,16) et de la toxicocinétique (3,16) et ceci, en fonction des données de la littérature.

Dans le cas du 4-MBC, l'Industrie avance l'idée selon laquelle les deux composantes du facteur inter-espèce (soit 4 et 2,5) peuvent être réduites à 1 et 1, en se fondant sur les données de la toxicocinétique et de la toxicodynamie qui semblent être similaires entre l'Homme et l'animal, ce qui permettrait de considérer comme suffisante une marge de sécurité de 10 au lieu de celle de 100 habituellement exigée pour assurer la sécurité sanitaire d'utilisation d'une substance dans les produits cosmétiques.

Dans son avis, le CSSC n'a pas retenu les arguments de l'Industrie pour plusieurs raisons. En effet, pour réduire la composante toxicocinétique du facteur inter-espèce de 4 à 1, les niveaux de 4-MBC plasmatique et de ses métabolites doivent être disponibles après administration cutanée répétée chez le rat aux doses proches de la NOAEL ainsi qu'après administration cutanée répétée chez des volontaires, de préférence dans des conditions correspondant au pire-cas (*worst case*). Ces valeurs de concentrations plasmatiques n'étant pas disponibles, le CSSC n'a pas jugé recevable l'argument de l'Industrie. Par ailleurs, il a été demandé à l'Industrie d'apporter la preuve qu'il n'existe pas une accumulation chez l'Homme du 4-MBC et de ses métabolites. Par ailleurs, la réduction du facteur toxicodynamique de 2,5 à 1 n'a pas non plus été acceptée, dans la mesure où les effets thyroïdiens ont été observés chez des volontaires et qu'aucune information dans le dossier ne permet de déduire que le 4-MBC parental ou l'un de ses métabolites est impliqué dans les effets rapportés.

Le CSSC a proposé d'estimer les niveaux de concentrations plasmatiques du 4-MBC et de ses métabolites après administration répétée par voie cutanée ainsi que les quantités présentes après 24 heures. Ainsi, en comparant cette concentration aux niveaux plasmatiques du 4-MBC et de ses métabolites chez le rat à la dose retenue comme la NOEL au lieu de la NOAEL, il a été montré que les valeurs pour l'Homme sont systématiquement plus faibles que celles retrouvées chez le rat, ce qui est donc en accord avec une réduction du facteur de toxicocinétique de 4 à 1, aboutissant ainsi à une marge de sécurité de 25 au lieu de 100. En effet, le CSSC a considéré d'une part, une dose sans effet (NOEL) de 100 mg/kg pc./j. provenant d'une étude par administration répétée cutanée pendant 90 jours chez le rat, et d'autre part, que l'application de 2 mg/cm² de produits solaires était un scénario pire-cas.

▪ Conclusion du CSSC

En se fondant sur la similitude des profils toxicocinétiques du 4-MBC entre le rat et l'Homme, le facteur de sécurité de la variation inter-espèce relatif à la toxicocinétique, peut être réduit de 4 à 1, amenant ainsi la marge de sécurité à 25. Le CSSC a conclu que, considérant la MoS calculée pour le 4-MBC de 42,5 et par conséquent, supérieure à 25, l'utilisation du 4-MBC jusqu'à la concentration de 4 % dans les produits cosmétiques peut être considérée comme ne présentant pas de risque pour la santé humaine.

Par ailleurs, le CSSC précise que l'utilisation est restreinte à des applications topiques. En effet, les scénarii d'exposition concernant la voie respiratoire (par exemple, dans le cas des produits aérosols et « sprays », etc.) ou la voie orale (rouges à lèvres et produits d'hygiène buccale) ne sont pas inclus dans le cadre de cette évaluation des risques et par conséquent, dans ces deux derniers cas, le risque ne peut être exclu.

COMMENTAIRES DE L'AFSSAPS

L'AFSSAPS a procédé à une analyse critique de l'avis du CSSC (SCCP/1184/08) et a émis les commentaires présentés ci-dessous. Ces derniers ont été transmis le 7 juillet 2009 à la Commission européenne *via* les autorités françaises. Toutefois, aucune réponse n'a été apportée.

▪ **Concernant l'étude de tératogenèse**

Dans cette étude, des rats sont traités par gavage à des doses de 0, 10, 30 et 100 mg/kg pc./j. A la forte dose, le poids des fœtus est significativement plus faible que dans les autres groupes. Le degré d'ossification du sternum est plus faible à la dose intermédiaire et à la forte dose ; l'ossification des extrémités est retardée chez les males à la forte dose.

En raison d'effets sur le développement aux doses de 30 et 100 mg/kg pc./j., le directeur de l'étude a retenu une NOAEL fondée sur les effets observés sur le développement égale à 10 mg/kg pc./j. Il est à noter que cette valeur a été confirmée par l'expert auprès du CSSC dans l'avis de 2006 (SCCP/1042/06).

Cependant, dans l'avis du CSSC du 24 juin 2008 (SCCP/1184/08) et plus spécifiquement pour l'évaluation du risque, cette NOAEL n'a pas été considérée. En effet, pour le calcul de la MoS, une NOAEL de 25 mg/kg pc./j. a été retenue.

▪ **Concernant l'étude de toxicocinétique chez l'Homme après une administration unique cutanée d'un produit solaire contenant du 4-MBC**

Afin de considérer acceptable l'utilisation de cette étude dans l'évaluation du risque, il convient qu'elle comporte un nombre suffisant de volontaires d'âges différents. En effet, l'étude fournie par l'Industrie inclut uniquement 6 personnes (3 femmes et 3 hommes), âgées entre 20 et 34 ans. La comparaison des profils toxicocinétiques rat *versus* Homme a conduit le CSSC à réduire le facteur de sécurité relatif à la toxicocinétique de 4 à 1, permettant de considérer une MoS de 25 suffisante pour assurer la sécurité sanitaire d'utilisation.

L'Afssaps considère que les données fournies ne permettent pas de conclure sur la réduction du facteur de sécurité et suggère de maintenir la MoS conventionnelle. De plus, il existe une différence quantitative du métabolite MET 1 et MET 2 entre le rat et l'Homme. Ne sachant pas lequel de ces deux métabolites se révèle le plus toxique chez le rat (aucune donnée fournie), il semble nécessaire de disposer de données suffisamment robustes afin de s'assurer de l'absence du risque pour le consommateur.

▪ **Concernant l'étude de toxicocinétique chez l'Homme après une administration répétée cutanée d'un produit contenant du 4-MBC**

Aucune information n'est fournie sur le nombre de participants à l'étude ni sur le dosage des hormones. Il n'est indiqué qu'une liste des hormones mais aucune donnée quantitative n'est précisée. Il est à noter que dans cette étude, l'expert nommé par le CSSC rapporte des modifications des hormones thyroïdiennes mais sans préciser la nature de ces dernières ni de valeur quantitative.

▪ **Concernant l'étude d'absorption cutanée retenue pour calculer l'exposition systémique**

Le CSSC a utilisé dans le calcul de la SED (dose d'exposition systémique) une valeur d'absorption cutanée de 1,96 µg/cm². Néanmoins, des biais notamment méthodologiques ont été notés par le CSSC dans cette étude :

- seul le résumé des huit expériences a été fourni par l'Industrie, les descriptions de ces études sont insuffisantes ;
- les informations fournies quant à la solubilité de la substance testée dans le fluide récepteur sont insuffisantes puisqu'aucune donnée permettant d'attester de cette solubilité n'a été précisée ;
- pour les valeurs faibles, les écarts-types sont très élevés.

Or, d'après les dernières recommandations du CSSC (2010)¹ relatives à l'absorption cutanée pour le calcul des MoS, lorsque l'étude comporte des biais méthodologiques, les quantités devraient au moins être augmentées d'un écart-type, soit 3,02 µg/cm², voire de deux écarts-types soit 4,08 µg/cm².

Le calcul de la MoS de 42,5 a été effectué pour une surface corporelle de 18 000 cm² et une NOAEL de 25 mg/kg/pc./j. ; cependant avec l'utilisation de respectivement 3,02 µg/cm² ou 4,08 µg/cm² comme absorption cutanée, la marge de sécurité n'est plus que de 27,6 ou 20,4. Cette dernière MoS est inférieure à 25 même si l'approche de réduction de facteur de sécurité relatif à la toxicocinétique retenue par le CSSC est considérée.

¹ SCCS. Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 22 juin 2010.

Cette étude de pénétration cutanée fait suite à la demande du CSSC. Bien que les résultats fournis et la description de la méthodologie soient très succincts, l'avis du CSSC considère une absorption cutanée égale à la somme des moyennes des quantités de 4-MBC calculées dans l'épiderme et le derme, soit 1,96 µg/cm².

En absence d'informations sur les données fournies par l'investigateur concernant cette étude et conformément aux recommandations du CSSC précitées, l'Afssaps estime nécessaire de retenir la valeur de 4,08 µg/cm² (cas prenant en compte 2 écarts-types).

▪ Concernant l'analyse critique de la littérature effectuée par l'Afssaps

Il est recensé 13 publications portant sur le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC depuis 2001. Dans la plupart des publications, le protocole expérimental utilisé n'est pas détaillé et ne permet donc pas de juger de la qualité scientifique et par là même de la validité pour une utilisation dans l'évaluation du risque. Néanmoins, d'une manière générale les études semblent acceptables pour se forger une opinion sur le profil toxicologique.

Parmi l'ensemble de ces études, 11 sont issues du même laboratoire (Institut de Pharmacologie et de Toxicologie, Suisse). La difficulté est d'évaluer le nombre d'études *in vivo* réellement réalisées par cette équipe. En effet, les auteurs ajoutent et mêlent des données entre les articles sans préciser si le travail présenté dans chaque publication est issu d'une nouvelle étude *in vivo* ou non. Quant aux deux autres études issues d'une autre équipe de recherche, elles n'ont pas permis d'aboutir à l'établissement d'une NOAEL.

Néanmoins, au regard des informations décrites dans ces études sur les mécanismes impliqués dans la toxicité du 4-MBC et en utilisant une approche maximaliste, il est possible de retenir une NOAEL de 0,7 mg/kg pc./j. en ce qui concerne le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC sans pour autant avoir une confiance acceptable dans le choix de cette NOAEL.

Dans ce dernier cas, la MoS serait inacceptable et ceci quel que soit le facteur de sécurité retenu.

CONCLUSION GENERALE

L'Afssaps estime en se fondant sur la dernière évaluation du CSSC (SCCP/1184/08) que :

- le choix de la NOAEL de 25 mg/kg pc./j. au lieu de celle de 10 mg/kg pc./j. retenue dans la première évaluation n'a pas été justifié et ne semble pas pertinent ;
- le taux d'absorption cutanée retenu pourrait être augmenté de 2 écarts-types, soit 4,08 µg/cm², étant donné le manque d'informations constaté dans cette étude.

L'Afssaps estime aussi que la réduction (de 4 à 1) de la composante toxicocinétique du facteur de sécurité relatif à la variation inter-espèce n'est pas acceptable sur la base des données disponibles, en raison :

- des limites des données de toxicocinétique chez l'Homme fournies dans le dossier (nombre insuffisant des volontaires, âges des participants non représentatifs de la population générale...) ;
- de l'absence d'information sur la toxicité de chaque métabolite retrouvé. En effet, les données disponibles montrent que la proportion du MET 1 et MET 2 est différente chez l'Homme par rapport aux rats. Ne sachant pas la part des effets toxiques de chacun des métabolites observés chez le rat, il semble plus judicieux de ne pas réduire ce facteur de sécurité inter-espèce.

Dans ces conditions, l'Afssaps estime qu'une marge de sécurité de 100 est nécessaire pour s'assurer de l'innocuité du 4-MBC utilisé dans les produits cosmétiques en tant que filtre UV.

Par ailleurs, l'analyse critique des études de la littérature, bien que ces dernières ne soient pas conformes aux lignes directrices OCDE, permet de montrer un effet de perturbation endocrinienne à des doses inférieures à la NOAEL retenue par le CSSC. Il convient qu'une nouvelle étude de multigénération menée selon les lignes directrices de l'OCDE soit réalisée afin de s'assurer de l'absence du risque pour le consommateur dans les conditions d'utilisation.

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX.....	6
1. CONTEXTE	7
2. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	8
3. ANALYSE CRITIQUE DES AVIS DU CSSC.....	8
3.1. AVIS DU CSSC DE 1998 (REF. XXIV/1377/96, REV. 1/98)	8
3.2. AVIS DU CSSC DE 2001 (17 ^{ÈME} SESSION PLÉNIÈRE DU 12 JUIN 2001).....	9
3.2.1. Conclusions du CSSC relatives à l'article de Schlumpf et al. (2001).....	9
3.2.2. Analyse des données expérimentales issues de l'Industrie	10
3.2.3. Evaluation du risque.....	10
3.3. AVIS DU CSSC DE 2004 (SCCNFP/0779/04).....	10
3.3.1. Toxicité sub-aigüe et subchronique	10
3.3.2. Etudes subchroniques	14
3.3.3. Etudes d'embryotoxicité/tératogénèse	17
3.3.4. Etudes de reprotoxicité	17
3.3.5. Effets thyroïdiens et hypophysaires chez l'Homme après application topique	18
3.3.6. Conclusion de l'avis du CSSC	19
3.4. AVIS DU CSSC DE 2006 (SCCP/1042/06).....	22
3.4.1. Toxicité aigüe après application topique.....	22
3.4.2. Toxicocinétique après application topique chez l'Homme	22
3.4.3. Toxicocinétique chez le rat après administration d'une dose unique par voie orale.....	22
3.4.4. Etude de toxicité répétée sur 90 jours après application topique.....	22
3.4.5. Toxicocinétique et marge de sécurité.....	23
1.4. AVIS DU CSSC DE 2008 (SCCP/1184/08).....	24
4. ANALYSE DES ÉTUDES ISSUES DE LA LITTÉRATURE SCIENTIFIQUE.....	27
5. CONCLUSION GÉNÉRALE	38
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	40

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du 4-MBC	8
Tableau 2 : Résumé des résultats rapportés dans une étude sur 17 jours chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04).....	11
Tableau 3 : Résumé des résultats rapportés dans une étude sur 4 semaines chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04).....	12
Tableau 4 : Résumé des résultats rapportés dans une étude sur 14 jours chez le chien (d'après SCCNFP/0779/04).....	13
Tableau 5 : Résultats rapportés dans une étude de 3 semaines chez le chien (d'après SCCNFP/0779/04).....	14
Tableau 6 : Résumé des résultats rapportés dans la première partie d'une étude sur 13 semaines chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04).....	15
Tableau 7 : Résumé des résultats rapportés dans la deuxième partie d'une étude sur 13 semaines chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04).....	16
Tableau 8 : Résumé des résultats des études investiguant les effets thyroïdiens chez l'animal	20
Tableau 9 : Résumé des résultats des études investiguant les effets embryotoxiques et tératogènes chez l'animal.....	21
Tableau 10 : Résumé des résultats des études explorant les effets thyroïdiens et hypophysaires chez l'Homme (d'après, SCCNFP/0779/04)	21
Tableau 11 : Résumé des études soumises par l'Industrie dans l'avis du CSSC de 2006 (d'après SCCP/1042/06)	24
Tableau 12 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf <i>et al.</i> (2001) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utérotoxicologiques (OCDE 440).....	28
Tableau 13 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Tinwell <i>et al.</i> (2001) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utérotoxicologiques (OCDE 440).....	29
Tableau 14 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf <i>et al.</i> (2004a) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utérotoxicologiques (OCDE 440).....	30
Tableau 15 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf <i>et al.</i> (2004b) et celui recommandé par l'OCDE 415	31
Tableau 16 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Maerkel <i>et al.</i> (2007) et celui recommandé par l'OCDE 415	33
Tableau 17 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Durrer <i>et al.</i> (2007) et celui recommandé par l'OCDE 415	34
Tableau 18 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Hofkamp <i>et al.</i> (2008) et celui recommandé par l'OCDE 415	35
Tableau 19 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Faass <i>et al.</i> (2009) et celui recommandé par l'OCDE 415	36
Tableau 20 : Récapitulatif des études majeures réalisées avec du 4-MBC et présentées dans l'analyse des études issues de la littérature scientifique.....	37

1. Contexte

Par lettre du 21 janvier 2009, Madame la Ministre de la Santé, de la Jeunesse et des Sports et de la Vie Associative a saisi l'Afssaps sur la part du risque attribuable aux ingrédients cosmétiques reprotoxiques et/ou perturbateurs endocriniens. Cette saisine s'inscrit dans le cadre du plan d'action « fertilité » du gouvernement. Les autres agences ont aussi été saisies, chacune dans son domaine de compétence. Dans ce contexte, l'Afssaps a identifié plusieurs substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes, dont le 4-methylbenzylidene camphor (CAS : 36861-47-9 / 38102-62-4).

Le 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) est un filtre ultraviolet (UV) absorbant les rayonnements UVB. Il est inscrit à l'entrée 18, partie 1, de l'annexe VII de la directive cosmétique 76/768/CEE fixant la liste des filtres UV que peuvent contenir les produits cosmétiques. Ainsi, il peut être utilisé en tant que filtre UV dans les produits cosmétiques à une concentration maximale de 4 %.

Plusieurs avis du Comité scientifique européen pour la sécurité des consommateurs (CSSC) ont été rendus entre 1996 et 2008. De plus, suite à la publication de Schlumpf *et al.* (2001) incriminant le 4-MBC en tant que perturbateur endocrinien en raison d'effets oestrogéniques observés dans des tests *in vitro* et *in vivo* (test utéro-trophique), le CSSC a rendu un avis en 2001 indiquant qu'au vu des connaissances scientifiques actuelles, ce filtre UV ne présentait pas d'effet oestrogénique pouvant altérer la santé humaine.

Toutefois dans son avis adopté le 25 mai 2004 (SCCNFP/0779/04), le CSSC a conclu que l'utilisation du 4-MBC dans les produits de protection solaire était préoccupante indépendamment des effets oestrogéniques précités. En effet, des changements ont été observés dans les études de toxicité à dose répétée chez le rat, notamment au niveau du profil hormonal thyroïdien et de la morphologie de la thyroïde. Or, ces effets ont été difficiles à interpréter en se fondant sur les études disponibles.

L'évaluation par le CSSC des nouvelles données fournies en 2005 ont permis de conclure que l'utilisation sans risque du 4-MBC à la concentration maximale de 4 % ne pouvait être établie (SCCP/1042/06). Des informations complémentaires ont été par la suite fournies par l'industrie.

L'objet du dernier avis du CSSC adopté le 24 juin 2008 (SCCP/1184/08) a donc été de déterminer s'il pouvait être établi que l'utilisation du 4-MBC en tant que filtre UV dans les produits cosmétiques à la concentration maximale de 4 % ne présentait pas de risque pour le consommateur.

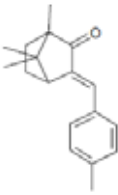
Dans le présent rapport l'Afssaps a procédé à l'analyse critique de tous les avis du CSSC ainsi que celle des études disponibles dans la littérature relatives au 4-MBC.

Le présent rapport a été approuvé par les membres de la commission de cosmétologie auprès de l'Afssaps lors de la séance du 7 juin 2011.

2. Caractéristiques physico-chimiques

Le tableau 1 présente les caractéristiques physico-chimiques du 4-MBC.

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du 4-MBC

Nom INCI	4-methylbenzylidene camphor
Numéro CAS	36861-47-9 38102-62-4
Numéro EINECS/ELINCS	253-242-6
Nom chimique/IUPAC ou autre	4-Methylbenzylidene Camphor (INCI) Enzacamene (USAN) 3-(4-Methylbenzylidene)-camphor 3-(4-Methylbenzylidene) bornane-2-one
Fonctions	Filtre UV utilisé à une concentration maximale de 4 %
Structure	

Point de fusion : 66 - 69 °C ;

Log P_{ow} : 5,14 (méthode EC A.8) ;

Spectre d'absorption : 300 nm ;

Solubilité : peu soluble dans l'eau (0,00013 g/100 ml; 20°C), légèrement soluble dans l'éthanol et les huiles végétales, très légèrement soluble dans le chloroforme.

3. Analyse critique des avis du CSSC

3.1. Avis du CSSC de 1998 (ref. XXIV/1377/96, rev. 1/98)

Cet avis présente plusieurs études dont seule l'étude de toxicité subchronique (90 jours) sera rapportée avec détails dans le présent rapport. En effet, il s'agit précisément de l'étude à partir de laquelle le CSSC a retenu une NOAEL pour le calcul de la MoS dans son dernier avis de 2008 (SCCP/1184/08).

Cette étude, réalisée chez le rat (souche non précisée), est d'après le CSSC, conforme aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Elle a été en réalité divisée en deux parties. La première partie (composée de 20 rats mâles et 20 rats femelles par groupe) a consisté en l'investigation des effets du 4-MBC incorporé dans l'aliment à des doses de : 0, 50, 125 et 312 mg/kg pc./j. La deuxième partie de l'étude a consisté en l'administration de doses de 4-MBC de 0 et 25 mg/kg pc./j. également dans l'aliment et avec le même nombre d'animaux par groupe que dans la première partie.

Les résultats montrent, dans la première partie de l'étude, une diminution du poids des femelles traitées *versus* les témoins. Une augmentation du taux d'hémoglobine chez les animaux traités (mâles

et femelles) aux deux plus fortes doses, a également été constatée. Par ailleurs, cette augmentation est également notée chez le groupe traité à la plus faible dose mais cette dernière n'est pas significative. Une augmentation du taux de triglycérides a été observée chez les mâles traités aux deux plus fortes doses. Le taux de cholestérol a également augmenté mais seulement chez les femelles.

Les mâles traités à la plus forte dose ont montré une élévation des taux en T3 (triiodothyronine), T4 (thyroxine) et TSH (thyroïdostimuline). Les femelles traitées à la plus forte dose ont quant à elles, présenté une augmentation des taux de T3 à toutes les doses et des taux de T4 aux deux plus fortes doses. Les taux en TSH ont augmenté pour toutes les femelles traitées et ce, quelle que soit la dose. Les examens histologiques ont montré une hypertrophie de l'épithélium des glandes thyroïdiennes associée à une augmentation de l'activité des cellules sécrétoires chez tous les animaux traités.

Dans la deuxième partie de l'étude, une augmentation des taux en T4 a été observée chez les femelles traitées sans que cela ne soit observé chez les mâles. Etant donné l'absence de modifications histologiques au niveau de la thyroïde dans cette deuxième partie de l'étude, les auteurs proposent de retenir une NOAEL de 25 mg/kg pc./j.

Parmi les études présentées dans cet avis, figure une étude de tératogenèse chez le rat. Dans cette dernière, une diminution du poids des fœtus issus des mères traitées à la plus forte dose (100 mg/kg pc./j.) est observée. Par ailleurs, des retards d'ossification des fœtus sont également rapportés à 30 et 100 mg/kg pc./j. Toutefois, aucune NOAEL n'est retenue par le CSSC. Or, la dose la plus faible dans cette étude, 10 mg/kg pc./j, pour laquelle aucun effet adverse n'est observé, peut être retenue.

Les études de pénétration cutanée chez l'Homme montrent un taux d'absorption cutanée égal à 1,9 %. Ainsi, sur la base d'une NOAEL de 25 mg/kg pc./j, du taux d'absorption cutanée précité et d'une concentration de 4 % en 4-MBC, une marge de sécurité de 110 a été calculée. Le CSSC a donc conclu que l'utilisation du 4-MBC dans les produits cosmétiques à une concentration maximale de 4 %, peut être considérée comme sûre pour la santé des consommateurs.

3.2. Avis du CSSC de 2001 (17^{ème} session plénière du 12 juin 2001)

Dans cet avis, deux questions étaient posées :

- le CSSC peut-il fournir une analyse critique de l'article de Schlumpf *et al.* (2001) ?
- de manière générale, le CSSC peut-il considérer que les filtres UV utilisés dans les produits cosmétiques ont des effets oestrogéno-mimétiques pouvant présenter un risque pour la santé humaine ?

Afin de répondre à ces deux questions, le CSSC a procédé à l'analyse critique de l'article de Schlumpf *et al.* (2001) d'une part et à l'étude de données versées par l'Industrie d'autre part, afin de réaliser une nouvelle évaluation du risque lié à l'utilisation du 4-MBC dans les produits cosmétiques.

3.2.1. Conclusions du CSSC relatives à l'article de Schlumpf *et al.* (2001)

Des études *in vitro* et *in vivo* sont décrites dans la publication de Schlumpf *et al.* (2001). Concernant les études *in vitro* (*e-screen assay* ; lignée MCF-7), le CSSC conclut que le 4-MBC présente une activité oestrogénique significative mais 1 million de fois plus faible que le composé de référence (17 β -estradiol). Par ailleurs, les tests *in vitro* ne sont pas suffisants à eux seuls pour conclure sur une activité oestrogénique d'un composé.

Concernant les études *in vivo* (test utéro-trophique), elles ne sont pas conformes aux BPL et des déviations majeures par rapport aux lignes directrices OCDE ont été constatées (notamment s'agissant du choix de la souche animale ; de la période de traitement ; de la formulation du produit appliqué par voie cutanée ; des conditions d'exposition). De plus, l'activité du 4-MBC (ED₅₀=309 mg/kg pc./j.) est observée pour des doses environ 300 fois supérieures au composé de référence (éthinyloestradiol ; ED₅₀ = 0,818 mg/kg pc./j). Enfin, le CSSC indique que : « *le test utéro-trophique a une fonction limitée dans l'identification des produits estrogéno-mimétiques et qu'il nécessite un traitement aigu à fortes doses* ».

3.2.2. Analyse des données expérimentales issues de l'Industrie

Deux tests utéro-trophiques (l'un par gavage et l'autre par injection sous-cutanée) chez des rats femelles immatures Sprague Dawley ont été réalisés (lignes directrices OCDE et BPL respectées). Dans les deux études, seule une baisse du poids moyen des animaux traités a été observée. Aucun effet sur l'augmentation du poids de l'utérus n'a en revanche été constaté. Néanmoins, le nombre d'animaux par groupe n'est pas spécifié et les données brutes sont absentes.

3.2.3. Evaluation du risque

Le CSSC a utilisé les données rapportées dans l'avis de 1998 (ref. XXIV/1377/96, rev. 1/98) pour l'absorption cutanée qui serait de 1,9 % d'après les données chez l'Homme. Une MoS égale à 110 a été calculée sur la base du pourcentage d'absorption cutanée précité et de la NOAEL de 25 mg/kg pc./j issue d'une étude de toxicité répétée par voie orale chez le rat sur 90 jours rapportée dans l'avis de 1998.

Le CSSC s'est ensuite basé sur les travaux de Schlumpf *et al.* (2001) et a calculé une MoS égale à 287 en utilisant une NOEL (et non une NOAEL) de 66 mg/kg pc./j. Ainsi, d'après le CSSC, le 4-MBC ne présente donc pas d'effet oestrogénique pouvant présenter un risque pour la santé des consommateurs.

Le CSSC a conclu que l'article de Schlumpf *et al.* (2001) présentait de nombreux biais méthodologiques et scientifiques.

3.3. Avis du CSSC de 2004 (SCCNFP/0779/04)

Dans cet avis de 2004 (SCCNFP/0779/04), sont analysées par le CSSC des données relatives aux effets du 4-MBC sur la glande thyroïdienne. Ces données ont été versées par l'Industrie.

Ainsi, le CSSC a été saisi par la Commission européenne afin de fournir une nouvelle évaluation du risque lié à l'utilisation du 4-MBC dans les produits cosmétiques.

3.3.1. Toxicité sub-aigüe et subchronique

▪ Etude sur 17 jours chez le rat

Dix rats (Wi-AF/Han) par sexe et par dose (0 ; 30 ; 300 mg/kg pc./j. dans de l'huile de cacahuète) ont été traités par gavage pendant 17 jours. Les principaux effets sont observés chez les rats traités à 300 mg/kg pc./j. (tableau 2) :

- augmentation significative du taux de TSH (1,9 fois pour les femelles et 7,5 fois pour les mâles) ;
- augmentation significative du poids de la thyroïde pour les deux sexes. Des effets sont également observés par l'analyse macroscopique et microscopique ;
- baisse significative de la taille de la prostate aux deux doses testées de 30 et 300 mg/kg pc./j. (respectivement -18 % et -25 %).

Tableau 2 : Résumé des résultats rapportés dans une étude sur 17 jours chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04)

Dose (mg/kg bw/d)	0		30		300		dr
	m	f	m	f	m	f	
Mortality	-	-	-	-	-	-	dr
Clinical signs	-	-	After dosing: Restlessness, grooming, hypersalivation				
Body weight gain	-	-	-	-	-	-	
Food consumption	-	-	-	-	-	-	
Haematology	Not conducted						dr
Clinical chemistry	Not conducted						
Serum TSH levels	-	-	-	-	ic (1.9x)	ic (7.5x)	
Organ weights	-	-	-	i	ic	ic	
thyroids (r)	-	-	-	-	dc (75%) ¹	-	dr
prostate (r)	-	-	dc (82%) ¹	-	dc	dc	
thymus (r)	-	-	-	-	-	-	
adrenals (r)	-	-	-	-	dc	-	
Pathology							dr
Macroscopy							
Enlarged thyroid gland	-	-	-	-	++	++	
Discoloration renal cortex	-	-	-	-	++	+	

Dose (mg/kg bw/d)	0		30		300		dr
	m	f	m	f	m	f	
Microscopy (thyroid only)							dr
Hypertrophy of follicular epithelium	- (4/20)	-	- (8/20)	-	ic (16/20)	-	

dr dose related

dc/ic statistically significantly decreased/increased compared to the controls

d/i decreased/increased, but not statistically significantly compared to the controls

r relative organ weight (organ/bw ratio)

- not affected

+ present in one/a few animals

++ present in most/all animals

¹ Differences in comparison to control values (=100%)

Des effets sur la thyroïde sont donc observés à 300 mg/kg pc./j. et par ailleurs un effet sur la prostate est constaté dès 30 mg/kg pc./j. Aucune NOAEL ne peut être retenue, bien qu'une LOAEL de 30 mg/kg pc./j. puisse être proposée.

▪ Etude sur 4 semaines chez le rat

Le même protocole expérimental que dans l'étude précédente a été utilisé avec une dose de 1000 mg/kg pc./j. pendant 28 jours. Un groupe contrôle positif pour la thyroïde, traité par 20 mg/kg pc./j. de propylthiouracil (substance hypothyroïdienne), a été intégré au protocole de l'étude. Les modifications rapportées sont (tableau 3) :

- augmentation de la T3 (+96 % chez les femelles et +28 % chez les mâles) ;
- baisse significative de la T4 ;
- baisse de la thyroxine (23 % pour les femelles et 30 % pour les mâles) ;
- augmentation du poids des surrénaliennes ;
- augmentation du poids de la thyroïde (confirmée par analyse macroscopique et par l'augmentation de l'activité thyroïdienne) ;
- baisse du poids de la prostate.

Tableau 3 : Résumé des résultats rapportés dans une étude sur 4 semaines chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04)

Dose (mg/kg bw/d)	0		1000		0 - Pair fed (Feed intake comparable to that in the treatment group)		20 TPU ¹	
	m	f	m	f	m	f	m	f
Mortality	-	1/10	-	1/10	-	-	-	1/10
Clinical signs	-	-	After dosing: grooming, hypersalivation, disheveled fur		-	-	-	-
Body weight gain	-	-	dc	dc	dc	dc	dc	dc
Food consumption	-	-	dc	dc	dc	dc	dc	dc
Water consumption	-	-	ic	ic	-	-	dc	dc
Haematology	not conducted							
Clinical chemistry	not conducted							
Body temperature	-	-	-	-	not conducted		-	-
Cycle course (vaginal smears)	-	-	-	-	not conducted		-	-
Serum T3 (triiodothyronine)	-	-	ic (196%) ²	ic (128%) ²	not conducted		dc (95%) ²	dc (63%) ²
Serum T4	-	-	dc	dc	not conducted		dc	dc

Dose (mg/kg bw/d)	0		1000		0 - Pair fed (Feed intake comparable to that in the treatment group)		20 TPU ¹	
	m	f	m	f	m	f	m	f
(thyroxine)			(70%) ²	(77%) ²			(39%) ²	(23%) ²
Organ weights								
liver (r)	-	-	ic	ic	dc	-	dc	dc
kidneys (r)	-	-	-	ic	-	-	-	dc
thymus (r)	-	-	dc	dc	-	-	-	dc
prostate (r)	-	-	dc	-	-	-	-	-
adrenals (r)	-	-	ic	ic	-	ic	-	dc
spleen (r)	-	-	-	-	-	-	dc	dc
thyroid (r)	-	-	ic	ic	-	-	ic	ic
Pathology								
<u>macroscopy</u>								
dilated stomach	-	-	++	++	-	-	-	-
reduced adrenal size	-	-	-	++	-	-	++	++
reduced thymus size	-	-	++	++	-	-	-	++
enlarged thyroid	-	-	++	++	-	-	++	++
<u>microscopy</u>								
Thyroid stimulation	-	-			-	-		
- mild-marked			++	++				
- excessive							++	++

dc/ic statistically significantly decreased/increased compared to the controls

r relative organ weight (organ/bw ratio)

- not affected

++ present in most/all animals

¹ An additional reference group of 10 rats/sex was included, receiving 20 mg/kg bw/day of the thyroid depressant propylthiouracil (TPU) in their drinking water. The rats in this group were also dosed with 5 ml peanut oil/kg bw/day.

² Differences in comparison to control values (=100%)

Cette étude confirme les effets sur la thyroïde, malgré l'utilisation d'une dose unique. Cette étude ne devrait être considérée que d'ordre mécanistique afin d'éclaircir le mécanisme d'action du 4-MBC au niveau de la thyroïde. Cette étude est cotée en catégorie 2 selon l'échelle de Klimisch (1997), c'est-à-dire que l'étude est considérée comme « acceptable avec restriction ». En effet, le protocole n'est pas conforme à une ligne directrice internationale, de type OCDE.

▪ **Etude sur 14 jours chez le chien**

Deux chiens Beagle (environ 9 mois), un mâle et une femelle, ont reçu des doses quotidiennes croissantes de 4-MBC de J1 à J4 puis une dose fixe jusqu'à J14, dans l'aliment selon le protocole suivant :

- Jour 1 : 20 mg/kg pc./j ;
- Jour 2 : 100 mg/kg pc./j ;
- Jour 3 : 500 mg/kg pc./j ;
- Jour 4 : 2500 mg/kg pc./j ;
- Jour 5 à 14 : 500 mg/kg pc./j.

Les résultats rapportés dans le tableau 4 montrent une augmentation des hormones thyroïdiennes T3 et T4 au cours du traitement chez le mâle et la femelle.

Tableau 4 : Résumé des résultats rapportés dans une étude sur 14 jours chez le chien (d'après SCCNFP/0779/04)

Clinical signs	white particles in the faeces of both dogs on day 3-5. No mortality.					
Body weight / Feed consumption	not affected					
ECG (wk -1, day 1, 2, 3, 4 and 10; prior to and after treatment)	not affected					
Blood pressure (wk -1, day 1, 2, 3, 4 and 10; prior to and after treatment):	not affected					
Haematology (wk -1 and wk 2):	Trend for reduced red blood cell count, haemoglobin and PCV in the male dog in week 2.					
Clinical chemistry	No very obvious changes					
TT3, TT4 and TSH (RIA) (days -5, 1, 2, 3, 4 and 11; prior to and 2 h after treatment):	According to the authors, there were no treatment related effects. The data obtained after exposure were, however, consistently higher than those prior to exposure. Also there seemed to be a gradual increase in time (see data below). TSH was detected at the end of the study only. No reference ranges or data on circadian variation were given.					
	Male			Female		
Day	TT3(ng/dl)	TT4(µg/dl)	TSH(ng/ml)	TT3(ng/dl)	TT4(µg/dl)	TSH(ng/ml)
-5	42.6	0.00	0.00	39.8	1.66	0.00
1 before	50.2	0.90	0.00	46.1	1.71	0.00
1 2h after	73.4	1.88	0.00	74.5	3.07	0.00
2 before	38.2	0.00	0.00	48.0	1.45	0.00
2 2h after	65.9	1.37	0.00	65.8	2.22	0.00
3 before	50.1	0.00	0.00	53.4	1.47	0.00
3 2h after	91.7	1.44	0.00	80.0	2.38	0.00
4 before	95.6	1.67	0.00	37.2	1.29	0.00
4 2h after	127.4	2.80	0.00	47.0	1.48	0.17
11 before	79.9	2.08	0.17	54.4	1.99	0.20
Pathology	the male dog showed minimal activation of the thyroid gland					

Le CSSC précise que d'après les auteurs, il n'existe pas d'effet associé au traitement et que par ailleurs, le chien mâle a montré une faible augmentation de l'activité thyroïdienne.

Le CSSC ne conclut pas sur cette étude mais rapporte uniquement la contradiction dans les commentaires des auteurs. Il faut noter que cette étude est réalisée sur deux chiens uniquement. De plus, les résultats du dosage des hormones thyroïdiennes ne sont pas présentés pour la totalité de la durée du traitement (non valide, selon l'échelle de Klimisch).

▪ **Etude sur 3 semaines chez le chien**

Quatre chiens Beagle (2 mâles ; 2 femelles) ont été traités par du 4-MBC par gavage 2 heures avant de recevoir leur nourriture selon le protocole suivant :

- Jour 1 : 0 mg/kg pc./j ;
- Période de repos (3 jours) ;
- Jour 4 : 20 mg/kg pc./j ;
- Période de repos ;
- Jour 8 : 100 mg/kg pc./j ;
- Période de repos ;

- Jour 11 à 21 : 500 mg/kg pc/j.

Le CSSC précise que les données ne sont pas complètes et que selon les auteurs, il n'existe pas d'effet associé au traitement. Néanmoins, les figures (non fournies dans l'avis) montrent une tendance à l'augmentation des hormones thyroïdiennes T3, T4 et TSH avant et après traitement (tableau 5).

Tableau 5 : Résultats rapportés dans une étude de 3 semaines chez le chien (d'après SCCNFP/0779/04)

Clinical signs	not affected; no mortality.
Body weight / Feed consumption	not affected
ECG (wk -1, day 1, 4, 8, 11 and 16; prior to and after treatment):	not affected
Blood pressure (wk -1, days 1, 4, 8, 11 and 16; prior to and after treatment):	not affected
Haematology /Clinical chemistry (wk -1 and wk 3):	no very obvious changes
TT3, TT4 and TSH (RIA) (d-5, 1, 2, 3, 4 and 11; prior to and 2, 4, 6 and 24 h after treatment)	according to the authors there were no treatment related effects. The data were incompletely summarized. Figures obtained on TT3 and TT4 after exposure were consistently somewhat higher than those prior to exposure or 24 hours thereafter, but the circadian variation after dosing of 0 mg/kg bw seemed comparable to that after treatment with levels up to 500 mg/kg bw.
Pathology	no treatment related effects

Il est important de noter que les périodes de dosage des hormones thyroïdiennes ne semblent pas être corrélées avec les périodes de traitement par le 4-MBC. Les données de cette étude ne sont pas assez précises pour conclure.

3.3.2. Etudes subchroniques

- **Etude sur 13 semaines chez le rat**

Cette étude est décrite en deux parties.

Dans la première partie, 20 rats (Wi-AF/Han) par sexe et par dose (0 ; 50 ; 125 ; 312 mg/kg pc./j.) ont été traités par le 4-MBC dans l'aliment. La moitié des animaux traités pour chaque groupe a ensuite suivi une période de réversibilité d'un mois. Un groupe témoin positif traité avec le propylthiouracil (à une dose de 20 mg/kg pc./j. ; pour rappel substance hypothyroïdienne) a également été inclus au protocole.

Les résultats (tableau 6) ont montré une augmentation significative avec un effet dose-dépendant de l'hormone thyroïdienne T3 observée chez les femelles et les mâles pour toutes les doses tandis qu'une augmentation non significative selon les auteurs de l'hormone thyroïdienne T4 est observée (respectivement +46 % et +30 % chez les mâles et les femelles) à la dose la plus élevée. L'analyse microscopique montre une hypertrophie et une hyperplasie de l'épithélium de la thyroïde significative à toutes les doses chez la plupart des animaux *versus* le groupe témoin.

Tableau 6 : Résumé des résultats rapportés dans la première partie d'une étude sur 13 semaines chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04)

Dose (mg/kg bw)	0		50		125		312		dr
	m	f	m	f	m	f	m	f	
Parameters ⁵									
Mortality (not related to treatment)	-	-	-	1/20	3/20	3/20	-	-	
Clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	
Body weight gain	-	-	-	-	-	dc	-	dc	
Food consumption	-	-	-	-	-	-	-	dc	
Water consumption	-	-	-	-	-	-	ic	-	
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	
Haematology									
PCV	-	-	ic ²	dc ^{2,4}	ic ^{2,4}	dc ^{2,4}	ic ^{2,4}	dc ^{2,4}	-
haemoglobin	-	-	-	dc ³	dc ²	dc ³	dc ^{3,4}	dc ³	dr
red blood cells	-	-	-	dc ³	dc ¹	dc ³	dc ¹	dc ³	-
reticulocytes	-	-	ic ⁴	-	ic ⁴	-	ic ^{3,4}	-	-
Clinical chemistry									
creatinine	-	-	-	-	-	-	ic ³	-	-
cholesterol	-	-	-	ic ²	-	ic ²	ic ³	ic ³	dr
triglycerides	-	-	-	-	dc ²	-	dc ²	-	-
GPT (=ALAT) activity	-	-	-	-	-	ic ³	ic ³	ic ²	-
albumin	-	-	-	-	-	dc ¹	-	dc ^{2,4}	dr
total protein	-	-	-	-	-	-	ic ³	-	-
urea	-	-	-	-	-	-	ic ²	-	-
Serum T3 (triiodothyronine)	-	-	ic ⁴	ic ²	ic ⁴	ic ²	ic ^{2,4}	ic ²	dr
Serum T4 (thyroxine)	-	-	-	(ic ³) (+21%)	-	-	(ic ⁴) (+46%)	(ic ¹) (+30%)	-
Serum TSH	-	-	i ⁴ (+43%)	ic ² (+99%)	i ⁴ (+70%)	ic ² (+106%)	ic ⁴ (+74%)	ic ³ (+350%)	dr
Organ weights									
liver (r)	-	-	-	i (0%)	-	ic ² (+16%)	ic ² (+14%)	ic ² (+24%)	dr
thymus (r)	-	-	-	-	-	-	-	ic ²	
prostate (a)	-	-	-	-	-	-	dc ²	-	
adrenals (r)	-	-	-	-	-	-	dc ²	-	
spleen (r)	-	-	-	-	-	-	ic ²	ic ²	
pituitary (a)	-	-	-	-	-	-	-	dc ²	dr
thyroid (r)	-	-	-	-	ic ²	ic ²	ic ^{2,4}	ic ^{2,4}	
Pathology									
<u>macroscopy</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>microscopy</u>									
Thyroid stimulation (hypertrophy and hyperplasia of the epithelium)	-	-	++ ^{2,4}	++ ^{2,4}	++ ^{2,4}	++ ^{2,4}	++ ^{2,4}	++ ^{2,4}	dr

dr dose related

dc/ic statistically significantly decreased/increased compared to the controls

d/i decreased/increased, but not statistically significantly compared to the controls

r relative organ weight (organ/bw ratio)

Le tableau 6 présenté ci-dessus ne permet pas de savoir s'il s'agit des animaux qui ont subi une période de réversibilité ou non. Par ailleurs, seuls les résultats des animaux traités apparaissent et non ceux du groupe témoin positif. Il faut noter une augmentation de la taille de la prostate à la dose la plus élevée (étude « acceptable avec restriction » selon l'échelle de Klimisch).

Dans la seconde partie, un protocole similaire à la première partie a été utilisé mais avec une seule dose de 25 mg/kg pc./j. Les auteurs constatent une augmentation non significative de l'hormone

thyroïdienne T4 (de +10 % et +22 %, respectivement chez les mâles et les femelles). Aucune anomalie après analyse histopathologique n'a été constatée (tableau 7).

Tableau 7 : Résumé des résultats rapportés dans la deuxième partie d'une étude sur 13 semaines chez le rat (d'après SCCNFP/0779/04)

Dose (mg/kg bw)	0		25	
	m	f	m	f
Parameters ⁵				
Mortality	1/20	1/20	-	-
Clinical signs	-	-	-	-
Body weight gain	-	-	-	-
Food consumption	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-
Haematology				
PCV	-	-	-	(dc ²)
haemoglobin	-	-	-	(dc ²)
red blood cells	-	-	-	(dc ²)
Clinical chemistry				
GPT	-	-	-	(ic ²)
Serum T3 (triiodothyronine)	-	-	-	-
Serum T4 (thyroxine)	-	-	(ic ²) (+10%)	(ic ^{2,4}) (+22%)
Serum TSH	-	-	-	-
Organ weights				
liver I	-	-	-	(ic ²) (+8%)
Pathology				
macroscopy	-	-	-	-

Dose (mg/kg bw)	0		25	
	m	f	m	f
Parameters ⁵				
microscopy	-	-	-	-

dr dose related
dc/ic statistically significantly decreased/increased compared to the controls
d/I decreased/increased, but not statistically significantly compared to the controls
a/r absolute/relative organ weight
+ present in one/a few animals
++ present in most/all animals
(dc/ic) Not considered relevant by the authors
¹ In week 6/ 7 of the treatment period
² In week 13/ 14 of the treatment period
³ Both in week 6/ 7 and week 13/ 14 of the treatment period
⁴ Present in the treatment free period
⁵ Generally only parameters showing effects were listed

Le CSSC ne conclut pas non plus sur cette deuxième partie.

En résumé, dans la première partie, une perturbation thyroïdienne à toutes les doses testées a été observée. Dans la deuxième partie, une légère augmentation de l'hormone thyroïdienne T4 sans impact sanitaire selon les auteurs a été observée. Les auteurs ont conclu à une NOAEL égale à 25 mg/kg pc./j. Néanmoins, dans la mesure où une augmentation de l'hormone T4 est constatée à 25 mg/kg pc./j, même si elle est jugée non «pertinente» par les auteurs, ne peut-on pas parler de LOAEL ? Cette valeur est d'ailleurs à rapprocher de l'étude sur 17 jours pour laquelle une LOAEL de 30 mg/kg pc./j. peut être retenue.

3.3.3. Etudes d'embryotoxicité/térogénèse

Les trois études décrites ci-dessous sont rapportées dans l'avis du CSSC de 1998 (ref. XXIV/1377/96, rev. 1/98), pour autant le CSSC n'a pas retenu de NOAEL pour aucune de ces études. Il est intéressant de remarquer que dans l'avis de 2004, une NOAEL de 10 mg/kg pc./j a été retenue pour l'étude chez le rat (voir plus bas), NOAEL plus basse que celle retenue pour l'évaluation du risque. En effet, pour rappel, une NOAEL de 25 mg/kg pc./j. issue d'une étude de toxicité répétée de 90 jours chez le rat a été retenue par le CSSC.

▪ Etude chez le lapin

Quatre groupes de 3 lapins (souche non spécifiée) ont reçu par gavage du 4-MBC dans de l'huile d'arachide du 6^{ème} au 10^{ème} jour de la gestation aux doses de 0, 25, 50 et 100 mg/kg pc./j.

Aucun effet tératogène ni aucune toxicité fœtale n'a été rapporté bien que le nombre de petits soit anormalement faible d'après le CSSC. Il est aussi rapporté que l'huile d'arachide n'était pas un véhicule adapté pour ce composé sans que toutefois des explications ne soient données quant au véhicule le plus adapté en termes de solubilité du 4-MBC.

▪ Etude chez le rat

Quatre groupes de 25 rats femelles Wistar ont reçu par gavage du 6^{ème} au 16^{ème} jour de la gestation du 4-MBC (0, 10, 30, et 100 mg/kg pc./j.) dans de l'huile d'arachide. Pour rappel, dans l'étude précédente chez le lapin, il est précisé que l'huile d'arachide ne constitue pas un véhicule adapté. Néanmoins, aucune explication n'est fournie par le CSSC.

Les résultats obtenus montrent une baisse du poids corporel à la forte dose des mères et des fœtus. Par ailleurs, des troubles de l'ossification du sternum ont été observés chez les fœtus femelles des mères traitées à 30 et 100 mg/kg pc./j, alors qu'un retard d'ossification des extrémités a été observé chez les fœtus mâles issus des mères traitées à la plus forte dose.

Les auteurs ont conclu que ces observations étaient liées à la souffrance maternelle sans explication plus détaillée et ont proposé une NOAEL égale à 10 mg/kg pc./j. Il est important de noter que cette NOAEL n'a pas été retenue par le CSSC dans le calcul de la MoS alors que ces données étaient déjà rapportées dans l'avis de 1998 (ref. XXIV/1377/96, rev. 1/98).

▪ Etude sur œufs de poule

Six groupes de 20 œufs ont reçu une injection le premier jour d'incubation et une deuxième injection le 5^{ème} jour à des doses de 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ou 10 mg/œuf de 4-MBC (véhicule non précisé). Aucun effet n'a été observé sur le développement des embryons ; une NOAEL de 0,1 mg/œuf est proposée.

3.3.4. Etudes de reprotoxicité

Dix rats femelles Wistar par groupe (0 ; 12,5 ; 25 et 50 mg/kg pc./j.) ont été traitées par du 4-MBC pendant 28 jours avant l'accouplement, puis au cours de la gestation et de la lactation. La génération F1 n'a donc pas été traitée par du 4-MBC au moment du sevrage. La moitié de la génération F1 a été maintenue en vie durant 55 jours tandis que l'autre moitié a été sacrifiée au moment du sevrage pour les examens macroscopiques. Aucune anomalie significative concernant les fonctions reproductives des femelles F0 (poids des organes, dosages hormonaux ou données de fertilité) n'a été rapportée. Une diminution significative de la FSH a été rapportée chez les mâles de la génération F1 à partir de 25 mg/kg pc./j. Les auteurs expliquent cette baisse par une variation due à la période de la puberté, plutôt qu'à une suppression de l'axe hypothalamo-hypophysaire (en se fondant sur le développement et sur l'analyse histopathologique de la prostate et des testicules).

Il faut noter que les mâles F0 n'ont pas été traités par le 4-MBC. Par ailleurs, leur nombre par groupe était faible au regard des recommandations de l'OCDE expliquant ainsi le nombre insuffisant de petits de la génération F1. De plus, aucune donnée quantitative n'a été fournie.

3.3.5. Effets thyroïdiens et hypophysaires chez l'Homme après application topique

Plusieurs études ont été réalisées chez l'Homme, ces dernières sont rapportées dans la présente partie.

▪ Etude n°1

Deux hommes (identifiés 1 et 2) et deux femmes (identifiées 3 et 4) ont reçu par application locale 3 g d'une émulsion (soit huile/eau (H/E) pour les volontaires 2 et 3 et E/H pour les volontaires 1 et 4) contenant 5 % de 4-MBC sur 500 cm² de peau de l'abdomen et 500 cm² de peau du dos et ce, sans occlusion. Au total, les sujets ont reçu 6 g d'émulsion de 4-MBC à 5 % sur 1000 cm², soit un total de 300 mg de 4-MBC ou 0,3 mg/cm². L'application a été répétée deux fois à 3 heures d'intervalle, puis la peau a été nettoyée.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant l'application (T=0) puis à 3, 4, 6, 12, 24 et 48 heures. Le dosage de T3, T4 et TSH a été réalisé par une méthode immunologique.

Le taux de TSH est resté sensiblement inchangé (sous la limite de détection) pour les hommes tandis qu'il a augmenté chez les femmes :

- volontaire 3 (H/E) : augmentation à 156 % à 24 heures et 124 % à 48 heures (pourcentage par rapport à la valeur initiale) ;
- volontaire 4 (E/H) : augmentation à 270 % à 3 heures et jusqu'à 369 % à 12 heures, puis 195 % à 24 heures et 260 % à 48 heures.

Le taux de T3 a augmenté à 12 heures chez le volontaire 3 à 127 % puis a diminué pour atteindre une valeur de 87 % à 24 heures. Le taux de T4 ne semble pas être modifié chez ce volontaire tandis que chez le volontaire 4, il a augmenté à 220 % à 24 heures, puis a baissé à 81 % à 48 heures. Le taux de T3 est resté inchangé pour cet individu.

Le taux de T3 a augmenté à 120 % chez le volontaire 1 à 4 et 12 heures et à 134 % à 24 heures. Le taux de T4 est resté quant à lui inchangé chez les deux individus 1 et 3.

Il faut noter que de nombreuses incertitudes subsistent quant au protocole de cette étude (temps des prélèvements, choix de la formulation galénique, technique de dosage). Toutefois, les augmentations des taux hormonaux en T3, T4 et TSH chez les femmes volontaires de cette étude confirment les résultats rapportés dans les études chez l'animal.

▪ Etude n°2

Cinq volontaires hommes et 4 volontaires femmes euthyroïdiens (teneur normale d'hormone thyroïdienne dans le sang) ont reçu une fois par semaine pendant 3 semaines une application topique d'une :

- pommade à 5 % de 4-MBC sur une semaine ;
- crème sans 4-MBC sur les deux semaines suivantes.

Le traitement a consisté en l'application en une seule journée sur deux localisations différentes de 2x6 g de pommade (soit 600 mg de 4-MBC) sur une surface découverte de 1200 cm² (0,5 mg/cm²). Puis, 24 heures après le début du traitement, il a été administré de la « protirelin » (*thyrotrophin releasing hormone*, TRH) aux volontaires afin de stimuler la sécrétion de TSH. Cette étude a mis en évidence une diminution de la synthèse de TRH, hormone hypophysaire impliquée dans la synthèse des hormones thyroïdienne *via* la TSH. Après 4 heures, une augmentation du taux de TSH chez tous les sujets a été observée mais ce dernier est revenu à la normale après 48 heures. Par ailleurs, une baisse des taux en T3 et T4 a été constatée après traitement par le 4-MBC à 48 heures. Cette diminution, bien que significative serait, selon les auteurs, insuffisante pour entraîner un effet biologique.

Dans cette étude, le protocole expérimental n'est pas expliqué de manière exhaustive : alternance de 1 semaine de traitement avec 2 semaines sans traitement non justifiée et peu claire ; choix de la formulation galénique non justifié ; temps des prélèvements non précisés.

▪ Etude n°3

Une étude en double aveugle sur 24 hommes et 24 femmes a consisté à appliquer sans occlusion 5 g (2,5 sur le dos et 2,5 sur l'abdomen) de crème (E/H) à 6 % de 4-MBC deux fois par jour sur une période de 14 jours. La quantité totale de 4-MBC appliquée quotidiennement est donc égale à 600 mg. La surface totale exposée est de 1200 cm², soit 0,5 mg/cm²/j. Quatre heures après la seconde application, les sujets ont pris une douche. Le sang a été prélevé avant et après le traitement puis à J+4, 7, 12, 14, 16 et 21. Les paramètres thyroïdiens suivants ont été évalués : TSH, T3, T4 et la TBG (*thyroid binding globulin*).

Aucune anomalie thyroïdienne n'a été rapportée. Néanmoins, il est important de noter que les périodes des prélèvements sanguins ne sont pas précises car le premier prélèvement a été réalisé avant l'application puis le second juste après l'application alors que les prélèvements suivants semblent avoir été réalisés au plus tôt 4 jours après la fin des 14 jours. On pourrait donc supposer que le premier prélèvement a été réalisé avant le début de l'étude puis juste après le protocole et ensuite à J+4, 7, 12, 14, 16 et 21, après la fin du traitement.

3.3.6. Conclusion de l'avis du CSSC

Chez le rat, il a été noté un effet sur les fonctions thyroïdiennes. A la plus faible dose, 25 mg/kg pc./j., une augmentation du taux de T4 est observée chez les femelles, ce qui laisse suggérer que cette dose serait plutôt une LOAEL qu'une NOAEL, contrairement à ce que les auteurs proposent. Les études chez le chien montrent que les fonctions thyroïdiennes seraient altérées uniquement à fortes doses. Cependant, des biais méthodologiques (nombre d'animaux, temps d'exposition) observés dans ces mêmes études ne permettent pas de conclure ni de retenir une NOAEL.

Les études réalisées chez l'Homme ne mettent pas en évidence un effet thyroïdien d'après les auteurs ; cependant, la faible surface utilisée (maximum 1200 cm² *versus* 17 500 cm² dans le cas d'un produit de protection solaire appliqué sur le corps entier) ne représente pas des conditions normales et raisonnablement prévisibles d'utilisation.

Les études de tératogenèse chez le rat mettent en évidence des troubles de l'ossification du sternum à partir de la dose de 30 mg/kg pc./j. tandis qu'une autre étude chez le lapin, cette fois, ne révèle pas de tels effets. Une NOAEL de 10 mg/kg pc./j. est proposée.

Il semble qu'il existe une variation inter-espèce (rat/Homme) relative aux perturbations thyroïdiennes. Toutefois, ces perturbations thyroïdiennes observées chez l'Homme comme chez l'animal ne permettent pas de conclure sur l'impact du 4-MBC sur la santé humaine. Néanmoins, elles nécessitent une attention particulière et une meilleure compréhension des mécanismes impliqués.

Au stade des connaissances actuelles, une évaluation du risque relatif n'est pas possible étant donné d'une part l'absence de la possibilité d'extrapolation ou non à l'Homme des effets thyroïdiens observés chez le rat et d'autre part l'impossibilité de retenir une NOAEL.

Le tableau 8 synthétise les résultats des études montrant des effets thyroïdiens chez l'animal (SCCNFP/0779/04).

Tableau 8 : Résumé des résultats des études investiguant les effets thyroïdiens chez l'animal (d'après SCCNFP/0779/04)

Effets thyroïdiens chez l'animal			
Espèces	Doses	Durée et voie d'administration	Conclusion
Rat (n=10/sexe/dose)	30 ; 300 mg/kg pc./j.	17 jours ; gavage	NOAEL : 30 mg/kg pc./j.
Rat (n=10/sexe/dose)	1000 mg/kg pc./j	28 jours ; gavage	Hausse du taux en T3 et baisse du taux en T4 ; Hausse du poids de la thyroïde
Chien (n=1/sexe)	20 mg/kg pc./j. J1 100 mg/kg pc./j. J2 500 mg/kg pc./j. J3 2500 mg/kg pc./j. J4 500 mg/kg pc./j. J5-J14	14 jours ; aliment	Hausse des taux en T3 et en T4 Biais méthodologiques
Chien (n=2/sexe)	0 mg/kg pc./j. J1 20 mg/kg pc./j. J4 100 mg/kg pc./j. J8 500 mg/kg pc./j. J11-21	21 jours ? ; gavage	Biais méthodologiques
Rat (20/sexe/dose) La moitié est en récupération pendant 1 mois après le traitement	50 ; 125 ; 312 mg/kg pc./j.	13 semaines ; aliment	Hausse du taux de T3 à toutes les doses Hypertrophie et hyperplasie thyroïdienne Incertitude sur l'identification du groupe (avec ou sans récupération)
Rat (20/sexe/dose) La moitié est en récupération pendant 1 mois après le traitement	25 mg/kg pc./j.	13 semaines ; Nourriture	Hausse du taux de T4 mais sans effet biologique selon les auteurs 25 mg/kg pc./j. : NOAEL ou LOAEL ?

Le tableau 9 résume les résultats des études d'embryotoxicité et de tératogénèse.

Tableau 9 : Résumé des résultats des études investiguant les effets embryotoxiques et tératogènes chez l'animal (d'après SCCNFP/0779/04)

Effets embryotoxiques et tératogènes chez l'animal			
Espèces	Doses	Durée et voie d'administration	Conclusion
Lapin (n=3/dose)	25 ; 50 ; 100 mg/kg pc./j.	6 ^{ème} -10 ^{ème} jour de gestation ; gavage	Aucun effet
Rat (n=25/dose)	10 ; 30 ; 100 mg/kg pc./j.	6 ^{ème} -10 ^{ème} jour de gestation ; gavage dans huile de tournesol	NOAEL : 10 mg/kg pc./j.
Oeuf de poule (n=20/dose)	0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 mg/oeuf	1 dose J1 d'incubation et 1 dose J5 d'incubation	NOAEL : 0,1 mg/oeuf

Le tableau 10 résume les effets thyroïdiens et hypophysaires chez l'Homme.

Tableau 10 : Résumé des résultats des études explorant les effets thyroïdiens et hypophysaires chez l'Homme (d'après SCCNFP/0779/04)

Effets thyroïdiens et hypophysaires chez l'Homme			
	Doses	Durée, voie d'administration et paramètres évalués	Conclusion
Etude 1 (n=2 hommes et 2 femmes)	150 mg T=0 150 mg T=3 h sur 1000 cm ²	Application cutanée répétée 2 fois toutes les 3 heures puis rinçage Dosage de la TSH, T3 et T4	Augmentation du taux de TSH chez les femmes Augmentation du taux de T3 chez la femme 1 Augmentation du taux de T4 chez la femme 2
Etude 2 (n=5 hommes et 4 femmes)	2 x 0,25 mg Sur 1200 cm ²	4-MBC sur une journée Puis protirelin	Baisse significative de taux de T3 et de T4 après 48 heures (sans impact sanitaire d'après les auteurs)
Etude 2 (n=5 hommes et 4 femmes)	2 x 150 mg 1200 cm ² total	Application cutanée 2 fois par jour pendant 14 jours TSH, T3, T4 et la TBG	Aucun effet observé

Au regard de l'ensemble des résultats rapportés, il semble que le 4-MBC perturbe les fonctions thyroïdiennes chez le rat. Ces résultats ne sont pas observés chez le chien. Une perturbation thyroïdienne peut être suspectée chez l'Homme même s'il existe une grande différence d'activité thyroïdienne entre l'espèce humaine et le rat. Toutefois, il n'est pas possible d'exclure la présence d'effets thyroïdiens chez l'Homme sans en avoir montré le mécanisme d'action impliqué dans les effets observés chez le rat.

Le calcul d'une marge de sécurité dans ces conditions n'est pas possible à ce niveau des connaissances scientifiques.

3.4. Avis du CSSC de 2006 (SCCP/1042/06)

Suite aux conclusions de l'avis du CSSC de 2004 (SCCNFP/0779/04) mettant en exergue des effets thyroïdiens chez le rat et l'impossibilité de calculer une MoS, le CSSC a demandé à l'Industrie de fournir les données complémentaires suivantes :

- des données physicochimiques complètes ;
- des études de pénétration cutanée conformes aux lignes directrices actuelles (CSSC ou OCDE), prenant en compte différents facteurs pouvant influencer les résultats quantitatifs ;
- une NOAEL issue d'une étude réalisée avec une espèce pertinente ;
- la caractérisation de l'exposition incluant d'autres usages (cosmétique et non cosmétique) et notamment l'absorption orale *via* par exemple les produits cosmétiques destinés à être appliqués sur les lèvres.

Les données décrites ci-dessous ont été fournies par l'Industrie cosmétique sans toutefois répondre aux questions formulées par le CSSC.

3.4.1. Toxicité aiguë après application topique

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice OCDE 402 chez le rat Wistar traité par des produits de protection solaire contenant 0 ; 4 et 20 % de 4-MBC. Par ailleurs, des prélèvements plasmatiques ont été effectués. Une DL₅₀ supérieure à 2000 mg/kg pc. a été calculée. De plus, les mesures plasmatiques après exposition cutanée de 4-MBC montrent que l'exposition systémique aux composés parents et aux métabolites est dose-dépendante.

3.4.2. Toxicocinétique après application topique chez l'Homme

Six volontaires ont participé à cette étude (3 femmes et 3 hommes). Ils ont reçu une application topique d'un produit de protection solaire contenant 4 % de 4-MBC sur 90 % de la surface du corps à une dose de 2 mg/cm² (soit 22 mg/kg pc. de 4-MBC). Des prélèvements urinaires et plasmatiques ont ensuite été effectués. Les volontaires ont pris une douche 12 heures après l'application.

Les résultats montrent que seuls les métabolites 3-(4-carboxybenzylidène)-6-hydroxycamphor, 3-(4-carboxybenzylidène)-camphor et leurs glucuronides ont été retrouvés. De faibles taux plasmatiques ont été rapportés permettant de suggérer une faible absorption du 4-MBC (< 0,5 % de la dose).

Par ailleurs, au regard du poids moléculaire du 4-MBC et de ses métabolites, inférieur à 500 Da et donc au seuil de l'élimination biliaire, les auteurs de l'étude ont considéré que l'élimination fécale était très peu probable.

Enfin, les auteurs suggèrent que le métabolite 3-(4-carboxybenzylidène)-camphor reste le métabolite majeur dans le sang alors que les autres métabolites sont majoritaires dans l'urine.

3.4.3. Toxicocinétique chez le rat après administration d'une dose unique par voie orale

Six rats Sprague Dawley (3 mâles et 3 femelles) ont été traités par voie orale, par une dose unique de 4-MBC égale à 25 ou 250 mg/kg pc./j. Des prélèvements plasmatiques et urinaires ont ensuite été effectués. Les résultats montrent une augmentation dose-dépendante de la concentration plasmatique du 4-MBC chez les mâles et les femelles. Par ailleurs, le 4-MBC semble être métabolisé rapidement par le foie du rat, aboutissant à de faibles taux plasmatiques. Enfin, la glucuronisation semble être la voie de métabolisation majeure chez le rat.

3.4.4. Etude de toxicité répétée sur 90 jours après application topique

Des rats Wistar (19 mâles et 19 femelles par groupe sauf pour les groupes contrôle et forte dose constitués de 24 mâles et 24 femelles) ont été traités par voie cutanée à des doses de 0, 100, 400 et 2000 mg/kg pc./j. Du point de vue du protocole expérimental, l'étude semble être conforme aux lignes directrices 411 de l'OCDE mais il faut cependant noter une légère confusion dans le nombre d'animaux par dose réellement traités (est-ce 3 mâles et 3 femelles ou 19-24 mâles et 19-24 femelles ?). Par ailleurs, l'avis du CSSC mentionne qu'il a fallu euthanasier tous les animaux traités à

la plus forte dose au 15^{ème} jour de traitement en raison de réactions cutanées sévères. A cette dose, les animaux montrent une perte de poids significative dès le 8^{ème} jour de traitement. Les auteurs indiquent que les anomalies constatées ne sont pas à relier au traitement.

Enfin, à la dose de 400 mg/kg pc./j., les auteurs constatent (sans donner davantage d'information) une légère diminution de T4 et TSH chez les mâles et une légère augmentation de T3 chez les femelles considérée comme mineure.

Les auteurs proposent une NOAEL égale à 400 mg/kg pc./j. par voie cutanée et une NOEL égale à 100 mg/kg pc./j.

3.4.5. Toxicocinétique et marge de sécurité

▪ Argumentaire de l'Industrie cosmétique

L'industrie cosmétique a fourni un argumentaire, rapporté dans l'avis du CSSC. Ainsi, l'industrie rapporte qu'après administration orale de 4-MBC chez le rat, le 3-(4-carboxybenzylidene)-camphor a été identifié comme métabolite majeur dans le plasma. En effet, le 4-MBC a été retrouvé en faibles proportions. Après application cutanée de 4-MBC chez le rat, le métabolite précité est également retrouvé en fortes proportions dans le plasma et le 4-MBC est retrouvé à une concentration supérieure à celle rapportée par voie orale. Toutefois, l'industrie précise que le 3-(4-carboxybenzylidene)-6-hydroxycamphor, un autre métabolite, est également retrouvé dans le plasma (à un taux néanmoins plus faible que le 3-(4-carboxybenzylidene)-camphor) après application topique *versus* en très faibles proportions après administration orale.

Chez l'Homme, le 4-MBC est retrouvé en fortes proportions dans le plasma après application topique et, par ordre décroissant, le 3-(4-carboxybenzylidene)-camphor et le 3-(4-carboxybenzylidene)-6-hydroxycamphor.

De ce fait, l'industrie cosmétique conclut que le rat constitue un modèle adéquat pour extrapoler les résultats après application topique à l'Homme. Ainsi, l'industrie considère que le métabolisme et la cinétique chez le rat et chez l'Homme sont équivalents. Par ailleurs, elle précise que le rat est plus sensible aux perturbations thyroïdiennes que l'Homme et propose donc de diminuer le facteur de sécurité de 100 à 10.

Enfin, par voie orale, à la dose de 100 mg/kg pc./j., l'AUC (aire sous la courbe) du 4-MBC est de 18 à 110 fois plus élevée qu'à la dose de 25 mg/kg pc./j. Ainsi, d'après les auteurs, le 4-MBC ne serait pas responsable des effets thyroïdiens sans quoi ces effets auraient été observés à la dose de 100 mg/kg pc./j. Le 4-MBC est donc considéré comme ne présentant pas un risque pour la santé des consommateurs.

▪ Discussion du CSSC

Le CSSC précise que l'industrie n'a pas répondu aux questions posées en 2004 et que les études fournies n'ont pas été demandées par le CSSC. Par ailleurs, le CSSC ne rejoint pas les arguments proposés par l'industrie concernant la proposition de réduire le facteur variation inter-espèce de 10 à 1. Pour cela, le CSSC avance différents arguments.

Tout d'abord le CSSC précise qu'effectivement le 4-MBC est métabolisé par voie cutanée de manière identique chez l'Homme et chez le rat et ce, de manière **qualitative**. En effet, **quantitativement**, il existe une différence. La toxicocinétique du 4-MBC et de ses métabolites ne dépend pas uniquement de l'espèce mais également de la voie d'exposition et de la quantité appliquée.

Par ailleurs, toutes les études soumises par l'industrie ont été réalisées dans différentes conditions et avec différentes doses et différentes formes de 4-MBC, il est donc difficile de comparer les études entre elles. Néanmoins, le CSSC admet que les auteurs ont clairement montré que le 4-MBC et ses métabolites peuvent être absorbés par voie cutanée, après application de 2 mg/cm² de produit de protection solaire sur 90 % de la surface corporelle. Ainsi, considérant que l'utilisation de produit de protection solaire implique de nombreuses applications quotidiennes, les concentrations plasmatiques devraient donc être supérieures dans le cas de conditions réalistes *versus* celles rapportées dans des conditions expérimentales. Enfin, il aurait été judicieux que l'industrie mesure les taux en hormones thyroïdiennes dans l'étude réalisée chez l'Homme.

La conclusion du CSSC est qu'il n'est pas certain que l'usage d'un produit de protection solaire contenant 4 % de 4-MBC ne présente pas un risque pour la santé des consommateurs.

▪ **Commentaires de l’Afssaps**

L’Afssaps rejoint les conclusions du CSSC sur le fait que l’Industrie n’a pas répondu aux questions initialement posées et que cette dernière a décidé de présenter des travaux sans rapport avec les requêtes du CSSC. Par ailleurs, le raisonnement de l’Industrie est basé sur une forte métabolisation du 4-MBC par voie orale suggérant la présence des effets systémiques thyroïdiens rapportés par voie orale comme étant probablement liés aux métabolites du 4-MBC. Par ailleurs, l’Industrie indique que par voie cutanée le 4-MBC n’est pas autant métabolisé que par voie orale, il est ainsi fort peu probable que les effets systémiques thyroïdiens observés par voie orale soient observés par voie cutanée et que par conséquent l’utilisation du 4-MBC est considérée comme sûre pour la santé des consommateurs. Ce raisonnement n’est pas acceptable car l’Industrie cosmétique compare des études réalisées dans des conditions très différentes. A titre de rappel, le tableau 11 synthétise les différentes études soumises par l’Industrie cosmétique au CSSC.

Tableau 11 : Résumé des études soumises par l’Industrie dans l’avis du CSSC de 2006 (d’après SCCP/1042/06)

Espèces	Formulation étudiée	Traitement	Voie d’exposition	Doses
Rat Wistar	Produit de protection solaire	Application unique	Cutanée	0, 400 et 2000 mg/kg pc./j.
Volontaires	Produit de protection solaire	Application unique	Cutanée	22 mg/kg pc./j.
Rat Sprague Dawley	4-MBC dans de l’huile de maïs	Traitement unique	Orale	25 et 250 mg/kg pc./j.
Rat Wistar	Produit de protection solaire	Dose répétée pendant 90 jours	Cutanée	0, 100, 400 et 2000 mg/kg pc./j.

De plus, L’Industrie cosmétique discute des similarités de la toxicocinétique entre l’Homme et le rat qui pourrait justifier la suppression du facteur de sécurité inter-espèce. L’expertise menée par l’Afssaps sur la toxicocinétique et envoyée à la Commission européenne le 7 juillet 2009, tend à montrer une impossibilité de conclure sur cette similarité compte tenu notamment du faible nombre de volontaires participant à l’étude de toxicocinétique et la différence entre les métabolites M1 et M2. Cet avis du CSSC (SCCP/1042/06) n’apporte pas de nouvelles données mais pose plutôt de nouvelles questions. Par ailleurs, il semble que la pénétration cutanée du 4-MBC soit avérée.

1.4. Avis du CSSC de 2008 (SCCP/1184/08)

Cet avis présente des éléments supplémentaires apportés par l’Industrie. Cette dernière propose un calcul de la MoS basé sur les données toxicocinétiques au lieu d’utiliser les facteurs de sécurité conventionnels. Le CSSC a comparé les deux approches en y ajoutant les nouvelles données apportées par l’Industrie depuis 2006 puis en y associant un nouveau calcul de la MoS.

En 2004, le CSSC a demandé pour calculer la MoS, des données supplémentaires concernant différentes conditions d’exposition au 4-MBC dans un usage cosmétique, dont la voie orale dans le cas d’un usage en tant que bâton à lèvres (appelé communément « rouge à lèvres »). Il a aussi demandé des données sur l’absorption cutanée conformes aux lignes directrices existantes en incluant les facteurs pouvant interférer sur les résultats. Ces données ont été fournies ultérieurement par l’Industrie.

Ainsi, l’Industrie cosmétique a transmis de nouvelles données en 2007. Sur les différentes conditions d’exposition, l’Industrie indique que le 4-MBC :

- n'est plus utilisé dans les bâtons à lèvre ;
- peut être aussi utilisé pour protéger les formulations (<0,5 %) et dans les produits d'hygiène et de soins ($\leq 4\%$) mais à des concentrations moindres par rapport à l'utilisation du 4-MBC en tant que filtre UV pour protéger la peau (pour rappel 4 %).

Par ailleurs, l'Industrie précise que le risque lié à l'utilisation du 4-MBC en tant que crème solaire est basé sur un usage quotidien annuel et non limité aux périodes estivales (18 g/jour) ce qui couvre l'usage des autres crèmes de soins utilisées toute l'année (17 g/jour).

Enfin, l'Industrie conclut que le risque d'une exposition multiple n'est pas envisageable dans la mesure où les produits d'hygiène et de soins sont rarement associés à des crèmes solaires.

Toutefois, l'Afssaps rappelle que l'utilisation de produit de protection solaire effectuée *in situ*, au cours de l'exposition solaire, n'empêche pas d'utiliser d'autres crèmes le matin et/ou le soir avant et après l'exposition solaire.

L'Afssaps a formulé différents commentaires sur cet avis du CSSC (SCCP/1184/08). Ces derniers ont été envoyés à la Commission européenne en date du 7 juillet 2009. Néanmoins, aucune réponse n'a été apportée. La teneur de ces commentaires est exposée ci-dessous.

▪ **Concernant l'étude de tératogenèse**

Dans cette étude, des rats sont traités par gavage à des doses de 0, 10, 30 et 100 mg/kg pc./j. A la forte dose, le poids des fœtus est significativement plus faible que dans les autres groupes. Le degré d'ossification du sternum est plus faible à la dose intermédiaire et à la forte dose ; l'ossification des extrémités est retardée chez les mâles à la forte dose.

En raison d'effets sur le développement aux doses de 30 et 100 mg/kg pc./j., le directeur de l'étude a retenu une NOAEL fondée sur les effets observés sur le développement égale à 10 mg/kg pc./j. Il est à noter que cette valeur a été confirmée par l'expert auprès du CSSC dans l'avis de 2006 (SCCP/1042/06).

Cependant, dans l'avis du CSSC du 24 juin 2008 (SCCP/1184/08) et plus spécifiquement pour l'évaluation du risque, cette NOAEL n'a pas été considérée. En effet, pour le calcul de la MoS, une NOAEL de 25 mg/kg pc./j. a été retenue.

▪ **Concernant l'étude de toxicocinétique chez l'Homme après une administration unique cutanée d'un produit solaire contenant du 4-MBC**

Afin de considérer acceptable l'utilisation de cette étude dans l'évaluation du risque, il convient qu'elle comporte un nombre suffisant de volontaires d'âges différents. En effet, l'étude fournie par l'Industrie inclut uniquement 6 personnes (3 femmes et 3 hommes), âgées de 20 à 34 ans. La comparaison des profils toxicocinétiques rat *versus* Homme a conduit le CSSC à réduire le facteur de sécurité relatif à la toxicocinétique de 4 à 1, permettant de considérer une MoS de 25 comme suffisante pour assurer la sécurité sanitaire d'utilisation.

L'Afssaps considère que ces données ne sont pas suffisantes pour pouvoir conclure sur la réduction du facteur de sécurité et suggère de maintenir la MoS conventionnelle. De plus, il existe une différence quantitative du métabolite MET 1 et MET 2 entre le rat et l'Homme. Ne sachant pas lequel de ces deux métabolites se révèle le plus toxique chez le rat (aucune donnée fournie), il semble nécessaire de disposer de données suffisamment robustes afin de s'assurer de l'absence du risque pour le consommateur.

▪ **Concernant l'étude de toxicocinétique chez l'Homme après une administration répétée cutanée d'un produit contenant du 4-MBC**

Aucune information n'est fournie sur le nombre de participants à l'étude ni sur le dosage des hormones. Il n'est indiqué qu'une liste des hormones mais aucune donnée quantitative n'est précisée. Il est à noter dans cette étude que l'expert nommé par le CSSC rapporte des modifications des hormones thyroïdiennes mais sans préciser de valeur chiffrée.

▪ **Concernant l'étude d'absorption cutanée retenue pour calculer l'exposition systémique**

Le CSSC a utilisé dans le calcul de la SED (dose d'exposition systémique) une valeur d'absorption cutanée de 1,96 µg/cm². Néanmoins, des biais notamment méthodologiques ont été aussi notés par le CSSC dans cette étude :

- seul le résumé des huit expériences a été fourni par l'Industrie, les descriptions de ces études sont insuffisantes ;
- les informations fournies quant à la solubilité de la substance testée dans le fluide récepteur sont insuffisantes puisqu'aucune donnée permettant d'attester de cette solubilité n'a été précisée ;
- pour les valeurs faibles, les écarts-types sont très élevés.

Or, d'après les dernières recommandations du CSSC (2010)² relatives à l'absorption cutanée pour le calcul des MoS, lorsque l'étude comporte des biais méthodologiques, les quantités devraient au moins être augmentées d'un écart-type, soit 3,02 µg/cm², voire 4,08 µg/cm² dans le cas de deux écarts-types.

Le calcul de la MoS de 42,5 a été effectué pour une surface corporelle de 18 000 cm² et une NOAEL de 25 mg/kg/pc./j. ; cependant avec respectivement l'utilisation de 3,02 µg/cm² ou 4,08 µg/cm² comme absorption cutanée, la marge de sécurité n'est plus que de 27,6 ou 20,4. Cette dernière MoS est inférieure à 25 même en considérant l'approche de réduction de facteur de sécurité relatif à la toxicocinétique retenue par le CSSC.

²

Cette étude de pénétration cutanée fait suite à la demande du CSSC. Bien que les résultats fournis et la description de la méthodologie soient très succincts, l'avis du CSSC considère une absorption cutanée égale à la somme des moyennes des quantités de 4-MBC calculées dans l'épiderme et le derme, soit 1,96 µg/cm².

En absence d'informations sur les données fournies par l'investigateur concernant cette étude et conformément aux recommandations du CSSC précitées, l'Afssaps estime nécessaire de retenir la valeur de 4,08 µg/cm² (cas avec les 2 écarts-types).

² SCCS. Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 22 juin 2010.

4. Analyse des études issues de la littérature scientifique

Treize publications internationales à comité de lecture ont été référencées depuis 2001 concernant le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC. Une analyse de ces publications est exposée de manière chronologique dans le présent chapitre.

- ***In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens*** (Schlumpf *et al.*, 2001)

Dans cette publication, le potentiel oestrogénique des filtres UV, dont le 4-MBC, est évalué à l'aide de deux tests *in vitro* et deux tests *in vivo*. Pour rappel, il s'agit précisément de la publication évaluée par le CSSC dans son avis de 2001 (17^{ème} session plénière du 12 juin 2001) et rapportée dans le paragraphe 3.2. du présent rapport.

Un test de prolifération cellulaire sur la lignée tumorale humaine MCF-7 a été réalisé. Les résultats mettent en exergue une activité agoniste partielle du 4-MBC, 1000 fois plus faible que le composé de référence, le 17 β -estradiol. Par ailleurs, le mécanisme de cet effet agoniste passerait par les récepteurs du 17 β -estradiol étant donné l'abolition totale de cet effet lorsqu'un antagoniste de ces récepteurs (ICI 182,870) est ajouté.

Le deuxième test *in vitro* utilisé par cette équipe correspond à un test évaluant l'expression de la protéine pS2, protéine régulée par la concentration en œstrogènes. Les résultats montrent que parmi les filtres UV testés, le 4-MBC présente le plus fort taux d'induction de l'expression de la protéine pS2, soit jusqu'à 43,9 % de la réponse induite par la substance de référence, le 17 β -estradiol.

Afin d'évaluer le potentiel oestrogénique *in vivo* du 4-MBC, les auteurs ont réalisé un test utéro-trophique chez le rat femelle immature (Long Evans) traitée par voie orale dans l'aliment. Une augmentation significative du poids de l'utérus a été observée à partir de 119 mg/kg pc./j. Une NOEL de 66 mg/kg pc./j. a été retenue par les auteurs.

Il est important de noter que le protocole utilisé par Schlumpf *et al.* (2001) n'est pas conforme à la ligne directrice OCDE relatives au test utéro-trophique (OCDE 440). En effet, ces lignes directrices OCDE 440 ont été publiées en 2007 soit ultérieurement à la date de publication de l'article de Schlumpf *et al.* (2001). Le tableau 12 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf *et al.* (2001) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utéro-trophiques (OCDE 440).

Tableau 12 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf *et al.* (2001) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utérotophiques (OCDE 440)

	Protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf <i>et al.</i> (2001)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 440
Administration	Orale (dans l'aliment) 4-MBC repris dans l'éthanol mélangé à l'aliment (garanti sans phytoestrogène) puis évaporation du solvant	Gavage ou injection sous-cutanée Maximum 5 ml/kg
Nombre d'animaux	4-19/dose	Au moins 6/dose
Espèce	Rat Sprague Dawley	Sprague Dawley & Wistar
Durée du traitement	4 jours	3 jours
Âges des animaux	21-25 ^{ème} jour post-naissance (PN)	Traitement jusqu'au 25 ^{ème} jour PN maximum
Doses	8 (dont un témoin positif, l'éthinylestradiol, et un témoin négatif)	Au moins deux doses et un contrôle témoin Une dose unique tolérée si étude préliminaire réalisée (pour déterminer la dose maximale tolérable, DMT)
Sacrifice	Immédiatement après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Enfin, un test utérotophique chez le rat femelle immature (de souche « *hairless* », OFA hr/hr) après application topique a été réalisé par Schlumpf *et al.* (2001). Les conditions de ce test se rapprochent de celles décrites précédemment pour le test utérotophique par voie orale. Des quantités de 137,5 ; 275 et 412,5 mg/kg pc./j. équivalentes à une concentration en 4-MBC dans une émulsion de 2,5 ; 5 et 7,5 % respectivement, ont été appliquées deux fois par jour à 3 ou 4 heures d'intervalle pendant 6 jours. Les animaux ont été immergés dans un bain d'huile d'olive contenant ou non le 4-MBC pendant 15 secondes suivie d'une deuxième application sur le dos à l'aide d'un pinceau. La quantité appliquée a été estimée par pesée de l'animal avant et après l'application. Les auteurs ont utilisé un taux d'absorption cutanée de 0,6 % du 4-MBC déterminé chez cette souche de rat dans une étude d'absorption cutanée publiée (Aghazarian *et al.*, 1999). A partir de ce taux d'absorption cutanée, les auteurs ont calculé une dose interne de 37 mg/kg pc./j. pour une solution à 5 % en 4-MBC.

Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative (1,5 fois *versus* le témoin) du poids de l'utérus chez les groupes traités à 2,5 et 5 %. L'effet n'est pas proportionnel à la dose puisqu'une courbe « en cloche » est constatée sans pour autant être expliquée par les auteurs. Une saturation de l'absorption à la plus forte dose pourrait expliquer ce phénomène. La première dose sans effet adverse observable est équivalente à 2,5 % (soit 17,5 mg/kg pc./j en dose interne). Sachant que l'application est réalisée deux fois par jour, la NOAEL serait alors égale à 35 mg/kg pc./j.

▪ **Confirmation of Uterotrophic activity for 4-MBC in the immature rat** (Tinwell *et al.*, 2001)

Les auteurs ont étudié le potentiel estrogénique du 4-MBC (et d'autres composés) en utilisant les tests suivants :

- liaison aux récepteurs aux estrogènes *in vitro* ;
- transactivation des récepteurs aux estrogènes sur modèle de levure ;
- prolifération cellulaire sur lignée MCF-7 (*e-screen assay*) ;
- test utérotophique chez le rat femelle immature.

Le test de liaison aux récepteurs estrogéniques montre un résultat ambigu sur la capacité du 4-MBC à déplacer le ligand naturel (17 β -estradiol) de ses récepteurs (maximum 20 %). Les auteurs précisent que les limites de solubilité du 4-MBC n'ont pas permis d'envisager des concentrations plus élevées. Le test de transactivation des récepteurs aux estrogènes sur modèle de levure montre également un résultat équivoque puisqu'un effet légèrement au dessus du bruit de fond et rapidement en saturation de l'activité transcriptionnelle du gène rapporteur (luciférase) est observé. Les auteurs expliquent le phénomène par une sortie du composé à l'extérieur de la levure. Il s'agirait peut-être d'une limite dans l'absorption du composé à travers la paroi cellulaire des levures, connue pour être moins perméable que les cellules de mammifères. Cette perméabilité moindre constitue d'ailleurs une des limites de ce modèle.

Le troisième test *in vitro* montre un effet sur la prolifération des cellules MCF-7 à partir de 10 μ M de 4-MBC.

Enfin, le test utéroprolifératif chez le rat femelle immature a été réalisé selon un protocole non conforme à la ligne directrice de l'OCDE relative au test utéroprolifératif (OCDE 440). En effet, comme dans le cas de la publication de Schlumpf *et al.* (2001) précitée, cette ligne directrice OCDE 440 ont été publiées en 2007 soit ultérieurement à la date de publication de l'article de Tinwell *et al.* (2001). Le tableau 13 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Tinwell *et al.* (2001) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utéroprolifératifs (OCDE 440).

Tableau 13 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Tinwell *et al.* (2001) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utéroprolifératifs (OCDE 440)

	Protocole utilisé dans l'étude de Tinwell <i>et al.</i> (2001)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 440
Administration	Gavage Sous-cutanée	Gavage ou injection sous-cutanée Maximum 5 ml/kg
Nombre d'animaux	12/dose	Au moins 6/dose
Espèce	Rat Wistar	Sprague Dawley & Wistar
Durée du traitement	3 jours	3 jours
Âges des animaux	19 au 20 ^{ème} jour post-naissance (PN)	Traitement jusqu'au 25 ^{ème} jour PN maximum
Doses	Voie orale : 500 et 800 mg/kg pc./j. avec test préliminaire à 1000 mg/kg pc./j Voie sous cutanée : 500 et 1000 mg/kg pc./j. A 5 ml/kg pour les deux voies	Au moins deux doses et un contrôle témoin Une dose unique tolérée si étude préliminaire réalisée (pour déterminer la dose maximale tolérable, DMT)
Euthanasie	24 h après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Les auteurs observent une augmentation significative du poids de l'utérus chez tous les groupes traités par le 4-MBC aussi bien par gavage avec un effet-dose (1,5 à 2 fois le témoin), que par injection sous-cutanée sans effet-dose (1,3 fois le témoin). Des signes de toxicité sont observés à la plus forte dose (baisse du poids corporel). Dans cette étude, la LOAEL est donc de 500 mg/kg pc./j aussi bien par voie orale que par injection sous-cutanée.

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

Les auteurs de cette publication proposent le développement d'un test cellulaire de transactivation des récepteurs aux androgènes pour évaluer le potentiel perturbateur endocrinien des filtres UV, y compris le 4-MBC. Lorsque les cellules (lignée MDA-kb2) sont exposées au mélange comprenant le produit de référence androgénique et le produit à étudier, l'effet anti-androgénique de ce dernier se

visualise par une diminution de l'expression du gène rapporteur induit par le produit de référence seul. Les résultats montrent que le 4-MBC ne présente pas d'activité anti-androgénique.

▪ **Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor** (Schlumpf *et al.*, 2004a)

Cette publication fait état de l'étude du potentiel estrogénique du 4-MBC (et d'autres substances) à l'aide de deux tests *in vitro* et d'un test *in vivo*. Ces derniers correspondent à des tests :

- de prolifération cellulaire sur la lignée tumorale humaine MCF-7, estrogénodépendante (*e-screen assay*) ;
- d'affinité ligand récepteur (ER α ou ER β) (*Ligand binding assay*) ;
- utérothrophique chez le rat femelle immature.

Le test *in vitro* de prolifération cellulaire montre que le 4-MBC induit une hyperprolifération cellulaire : EC₅₀ : 3,99 x 10⁻⁶ M pour le 4-MBC *versus* 1,03 x 10⁻¹² M pour le composé de référence (17 β -estradiol). Le maximum d'induction des récepteurs atteint 58 % de l'activité maximale induite par le 17 β -estradiol. Le test *in vitro* d'interaction ligand-récepteur montre que le 4-MBC se lie préférentiellement aux récepteurs estrogéniques ER β .

Enfin en ce qui concerne le test utérothrophique chez le rat femelle immature, comme vu précédemment pour les publications de Schlumpf *et al.* (2001) et Tinwell *et al.* (2001), le protocole utilisé dans cette publication n'est pas conforme à la ligne directrice 440 étant donnée qu'elle est parue ultérieurement à la publication du présent article (Schlumpf *et al.*, 2004a).

Le tableau 13 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf *et al.* (2004a) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utérothrophiques (OCDE 440).

Tableau 14 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf *et al.* (2004a) et celui recommandé par l'OCDE dans le cas de la réalisation de tests utérothrophiques (OCDE 440)

	Protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf <i>et al.</i> (2004a)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 440
Administration	Gavage 4 ml/kg	Gavage ou injection sous-cutanée Maximum 5 ml/kg
Nombre d'animaux	6-8/dose	Au moins 6/dose
Espèce	Rat Long Evans	Sprague Dawley & Wistar
Durée du traitement	3 jours	3 jours
Agés des animaux	21 au 23 ^{ème} jour post-naissance (PN)	Traitement jusqu'au 25 ^{ème} jour PN maximum
Doses	300 mg/kg pc./j. dans huile d'olive (dose unique justifiée par une étude précédente, DMT=1000 mg/kg pc./j.)	Au moins deux doses et un contrôle témoin Une dose unique tolérée si étude préliminaire réalisée (pour déterminer la dose maximale tolérable, DMT)
Euthanasie	24 h après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Les résultats montrent que le 4-MBC dans les conditions expérimentales décrites par les auteurs induit une augmentation significative du poids de l'utérus chez les animaux traités (poids = 44,64 +/- 6,45 mg) par rapport aux témoins (poids = 24,13 +/- 1,23 mg) à la dose unique de 300 mg/kg pc./j. Le choix de la dose est justifié par une étude précédente qui a montré que la dose maximale tolérable était de 1000 mg/kg pc./j. Les auteurs ont donc choisi la dose de 300 mg/kg pc./j, proche de l'ED₅₀.

- **Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-an update** (Schlumpf *et al.*, 2004b)

Cette publication récapitule des résultats précédemment publiés sur l'effet oestrogénique de plusieurs filtres UV parmi lesquels figure le 4-MBC. Par ailleurs, les auteurs publient les résultats d'une étude de l'effet de ces filtres UV, dont le 4-MBC, sur le développement pré- et post-natal.

Des groupes de mâles et femelles rats Long Evans de génération parentale (F0) ont été traités *per os* pendant 10 semaines à plusieurs doses de 4-MBC (0,7 ; 7 ; 24 ; 47 et 70 mg/kg pc./j.). Puis, après accouplement, les femelles ont été traitées pendant toute la gestation et la lactation tandis que la génération F1 a reçu le traitement jusqu'à l'âge adulte. Le choix des doses est basé sur les études décrites précédemment par Schlumpf *et al.* (2001 ; 2004). A la dose de 70 mg/kg pc./j., une baisse de la natalité a conduit à l'arrêt du traitement des animaux à cette dose.

La méthodologie décrite est très succincte tandis qu'aucune référence à des lignes directrices n'est spécifiée quoiqu'elle semble correspondre à la ligne directrice OCDE 415 (étude de toxicité pour la reproduction sur une génération). Le tableau 15 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf *et al.* (2004b) et celui recommandé par la ligne directrice OCDE 415.

Tableau 15 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf *et al.* (2004b) et celui recommandé par l'OCDE 415

	Protocole utilisé dans l'étude de Schlumpf <i>et al.</i> (2004b)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 415
Administration	Aliment	Aliment ou boisson
Nombre d'animaux	Non précisé	Au moins 20 femelles gravides/dose Nombre de mâles de la génération F0 suffisant En F1 : 4 mâles et 4 femelles
Espèce/souche	Rat Long Evans	Rat ou souris sans qu'une souche ne soit précisée. Eviter les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement
Durée du traitement Ages des animaux	10 semaines avant accouplement (F0) Pendant gestation et lactation F1 jusqu'à l'âge adulte	70 jours chez le rat avant accouplement (mâles génération P) et période d'accouplement deux cycles menstruels (femelles génération P), période d'accouplement, de gestation et lactation Toute la génération F1
Doses	0,7 ; 7 ; 24 ; 47 ; 70 mg/kg pc./j. dans huile d'olive (0,04 ml/10 g)	Au moins 3 et un contrôle témoin
Euthanasie	24 h après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Les effets suivants ont été observés :

- baisse dose-dépendante du poids corporel des femelles gravides ;
- diminution de la taille de la portée et du taux de survie à deux semaines à 24 et 47 mg/kg pc./j ;
- augmentation du poids de la thyroïde pour les groupes traités à 24 et 47 mg/kg pc./j pour les générations F0 et F1 avec un effet plus prononcé pour F1 ;
- retard de puberté chez les mâles pour tous les groupes traités dès la plus faible dose ;
- augmentation du poids de l'utérus et des ovaires pour la génération F1.

Dans cette étude, une NOAEL de 0,7 mg/kg pc./j peut être retenue. La première dose avec effet est celle de 7 mg/kg pc./j. en ce qui concerne des perturbations endocriniennes (poids de l'utérus).

- **Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor** (Durrer *et al.*, 2005)

Les auteurs ont réalisé une étude de toxicité sur une génération chez le rat. Ils ont aussi analysé l'expression de gènes cibles codant pour des récepteurs tels que les récepteurs estrogéniques ER α , ER β , PR (récepteur à la progestérone), AR (récepteurs androgéniques) et IGF-1 (*insuline growth factor*) par la technique RT-PCR au cours du traitement.

Le protocole expérimental est le même que celui décrit dans la publication précédente (Schlumpf *et al.*, 2004b) et il s'agit de la même équipe de recherche. Les résultats montrent une augmentation du poids de l'utérus chez les animaux traités à la dose de 24 mg/kg pc./j. La NOAEL est alors de 7 mg/kg pc./j. Cependant, les résultats présentés dans cette publication portent à confusion. En effet, il semblerait que cette étude *in vivo* corresponde à l'étude décrite dans l'article précédent de Schlumpf *et al.* (2004b). Cette remarque a été également formulée dans la publication de Maerkel, *et al.* (2007) qui sera décrite plus bas dans le présent rapport.

Or, d'après l'article précédent (Schlumpf *et al.*, 2004b) la NOAEL serait égale à 0,7 mg/kg pc./j. alors que dans cet article elle serait de 7 mg/kg pc./j. en raison d'un effet non statistiquement significatif à 7 mg/kg pc./j. La conclusion sur le choix de la NOAEL issue de ces deux articles est donc incertaine.

La deuxième partie de cette publication expose le calcul du taux d'expression de certains gènes cibles impliqués dans les voies endocriniennes. Le taux d'ARNm est ainsi perturbé lorsque les animaux sont traités avec le 4-MBC. Ces résultats confirment le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC mais ne sont pas suffisants à eux seuls pour pouvoir statuer sur le caractère perturbateur endocrinien de cette même substance.

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

Cette étude porte sur les effets *in vivo* d'une exposition chronique (3 mois) au 4-MBC (et d'un autre composé de filtre UV, l'octylmethoxycinnamate) sur les paramètres vaginaux, osseux et utérin de rats femelles ovariectomisées. En parallèle, les auteurs ont analysé l'expression de plusieurs gènes marqueurs d'un effet perturbateur endocrinien. Cette étude n'est conforme à aucune ligne directrice de l'OCDE.

Dans cette étude, des rats femelles Sprague-Dawley ovariectomisées ont été traitées pendant 3 mois. Les animaux, dont l'âge avant l'ovariectomie n'est pas précisé, ont subi l'ablation des ovaires 2 semaines après leur arrivée et ont été traités pendant 6 semaines.

Cinq groupes (11 animaux/groupe) ont été constitués dont un groupe contrôle non traité et non ovariectomisé et un groupe ovariectomisé et non traité :

- deux groupes traités par du 4-MBC incorporé dans l'aliment, à des doses de 57,5 et 250 mg pour 20 g d'aliment ;
- un groupe traité par de l'estradiol 17 β (E2), témoin positif, avec une dose de 0,6 mg pour 20 g d'aliment.

Les paramètres vaginaux, utérins et osseux ont été analysés.

Les résultats montrent que le 4-MBC perturbe l'épaisseur des tissus utérins (épithélium ; endomètre ; myomètre) aux deux doses testées tandis que le poids de l'utérus augmente uniquement à la plus forte dose. L'épaisseur du vagin est aussi augmentée, cette fois-ci aux deux doses, tandis que le 4-MBC aurait également un effet protecteur contre l'ostéoporose provoquée par l'ovariectomie.

Cette étude ne précise pas les doses journalières par unité de poids corporel que les animaux ont ingérées. De fait, aucune NOAEL ne peut être déduite.

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

Le protocole de cette étude réalisée *in vivo* est identique à celui rapporté dans la précédente étude qui par ailleurs, est issue de la même équipe de recherche (Seidlova-Wuttke *et al.*, 2006a). Toutefois, les marqueurs d'exposition sont dans cette étude des marqueurs métaboliques (lipides, triglycérides) et les hormones hypophysaires. Par ailleurs, le poids de l'utérus a également été estimé. Deux doses journalières de 50 et 250 mg pour 20 g de nourriture sont administrées aux animaux. Contrairement à l'étude précédente (Seidlova-Wuttke *et al.*, 2006a), aucune toxicité n'a été observée à la plus forte dose alors que cette dernière correspond à la dose où une toxicité a été observée dans l'étude précédente.

Après 3 mois de traitement au 4-MBC, le poids utérin est légèrement augmenté tandis que les taux de LH et TSH augmentent significativement. L'hormone T4 est quant à elle diminuée tandis que la T3 augmente légèrement. Par ailleurs, une perturbation des quantités des triglycérides est également observée, associée à une baisse du poids corporel par rapport aux animaux témoins ovariectomisés non traités.

Aucune NOAEL ne peut être retenue à partir de ce travail mais les auteurs montrent un effet significatif du 4-MBC sur les hormones hypophysaires et thyroïdiennes.

- **Sexually dimorphic gene regulation in brain as a target for endocrine disrupters: developmental exposure of rats to 4-methylbenzylidene camphor** (Maerkel *et al.*, 2007)

Les auteurs ont réalisé une étude de toxicité sur une génération chez le rat dont certains résultats ont déjà été publiés (Durrer *et al.*, 2005 ; Schlumpf *et al.*, 2004b). Cette étude se rapproche des lignes directrices OCDE 415. Le tableau 16 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Maerkel *et al.* (2007) et celui recommandé par l'OCDE 415.

Tableau 16 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Maerkel *et al.* (2007) et celui recommandé par l'OCDE 415

	Protocole utilisé dans l'étude de Maerkel <i>et al.</i> (2007)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 415
Administration	Aliment	Aliment ou boisson
Nombre d'animaux	Génération F0 : non connu Génération F1 : 5 à 21	Au moins 20 femelles gravides/dose Nombre de mâles de la génération F0 suffisant En F1 : 4 mâles et 4 femelles
Espèce/souche	Rat Long Evans	Rat ou souris sans qu'une souche ne soit précisée. Eviter les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement
Durée du traitement Ages des animaux	10 semaines avant accouplement (F0) Pendant gestation et lactation F1 jusqu'à l'âge adulte	70 jours chez le rat avant accouplement (mâles génération F0) et période d'accouplement deux cycles menstruels (femelles génération F0), période d'accouplement, de gestation et lactation Toute la génération F1
Doses	Deux séries de doses : Série A : 7 ; 24 ; 47 mg/kg pc./j. Série B : 0,7 mg/kg pc./j. dans huile d'olive (0,04 ml/10 g)	Au moins 3 et un contrôle témoin
Euthanasie	24 h après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Les résultats montrent une augmentation du poids de la thyroïde et du taux de T3 chez les animaux de la génération F1 traités et ce, à toutes les doses mais de manière plus prononcée pour les animaux traités à des doses de 24 et 47 mg/kg pc./j.

Le reste de l'étude porte sur l'évaluation de l'expression de l'ARNm de marqueurs d'un effet perturbateur endocrinien. Cette expression est relativement modifiée selon le gène considéré sans toutefois qu'il ne soit possible d'en tirer une conclusion quant à l'interprétation de ces résultats.

Une LOAEL de 7 mg/kg pc./j. peut être retenue de cette étude en considérant la perturbation du poids de la thyroïde sur la génération F1.

- ***Estrogen sensitivity of target genes and expression of nuclear receptor co-regulators in rat prostate after pre- and postnatal exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor*** (Durrer *et al.*, 2007)

Les auteurs ont réalisé une étude de toxicité sur une génération chez le rat dont certains résultats ont déjà été publiés (Durrer *et al.*, 2005 ; Maerkel *et al.*, 2007). Cette étude se rapproche des lignes directrices OCDE 415. Les résultats concernant la génération F1 sont ici décrits. Deux études réalisées à deux périodes différentes sont combinées. Le tableau 17 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Durrer *et al.* (2007) et celui recommandé par l'OCDE 415.

Tableau 17 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Durrer *et al.* (2007) et celui recommandé par l'OCDE 415

	Protocole utilisé dans l'étude de Durrer <i>et al.</i> (2007)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 415
Administration	Aliment	Aliment ou boisson
Nombre d'animaux	Génération F0 : non connu Génération F1 : 5 à 21	Au moins 20 femelles gravides/dose Nombre de mâles de la génération P suffisant En F1 : 4 mâles et 4 femelles
Espèce/souche	Rat Long Evans	Rat ou souris sans qu'une souche ne soit précisée. Eviter les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement
Durée du traitement Ages des animaux	10 semaines avant accouplement (F0) Pendant gestation et lactation F1 jusqu'à l'âge adulte	70 jours chez le rat avant accouplement (mâles génération F0) et période d'accouplement deux cycles menstruels (femelles génération F0), période d'accouplement, de gestation et lactation Toute la génération F1
Doses	En deux séries : Série A : 7 ; 24 ; 47 mg/kg pc./j. Série B : 0,7 mg/kg pc./j. dans huile d'olive (0,04ml/10g)	Au moins 3 et un contrôle témoin
Euthanasie	24 h après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Le traitement entraîne chez les mâles uniquement un retard dans la puberté (mis en évidence par la séparation du prépuce) à partir de 7 mg/kg pc./j. (facteur non étudié à la dose de 0,7 mg/kg pc./j.). Le poids corporel à la puberté est inchangé chez les mâles tandis qu'il diminue chez les femelles.

Par ailleurs, plusieurs effets sont observés chez la génération F1 traités :

- diminution du poids relatif de la prostate ;
- augmentation du poids des testicules ;
- diminution du poids de l'épididyme à la plus forte dose.

Le reste de l'étude porte sur l'évaluation de l'expression de l'ARNm de marqueurs d'un effet perturbateur endocrinien. Cette expression est relativement modifiée selon le gène considéré.

Une LOAEL de 7 mg/kg pc./j. peut être retenue dans cette étude en considérant la perturbation du poids de la prostate sur la génération F1.

- **Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review** (Schlumpf *et al.*, 2008)

Cette revue reprend l'ensemble des études réalisées sur la toxicité du système endocrinien des filtres UV. En ce qui concerne le 4-MBC, la plus faible dose provoquant un effet (LOAEL) est égale à 7 mg/kg pc./j. tandis que la plus forte dose sans effet (NOAEL) est égale à 0,7 mg/kg pc./j.

- **Region-specific growth effects in the developing rat prostate following fetal exposure to estrogenic ultraviolet filters** (Hofkamp *et al.*, 2008)

Cette étude dont le protocole est proche de celui recommandé par la ligne directrice OCDE 415 porte notamment sur l'effet du 4-MBC sur le développement de la prostate chez le fœtus rat. Il est précisé que ce travail fait partie d'une plus large étude *in vivo* au cours de laquelle d'autres organes cibles ont été analysés tels que le cerveau et les organes reproducteurs à différents stades de développement. Les références de ces études ne sont pas mentionnées si bien qu'il n'est pas possible de la rapprocher d'autres études ultérieures.

Le tableau 18 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Hofkamp *et al.* (2008) et celui recommandé par l'OCDE 415.

Tableau 18 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Hofkamp *et al.* (2008) et celui recommandé par l'OCDE 415

	Protocole utilisé dans l'étude de Hofkamp <i>et al.</i> (2008)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 415
Administration	Aliment	Aliment ou boisson
Nombre d'animaux	Génération F0 : non connu Génération F1 : 4 mâles	Au moins 20 femelles gravides/dose Nombre de mâles de la génération P suffisant En F1 : 4 mâles et 4 femelles
Espèce/souche	Rat Long Evans	Rat ou souris sans qu'une souche ne soit précisée. Eviter les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement
Durée du traitement Ages des animaux	10 semaines avant accouplement (F0) Pendant gestation et lactation F1 jusqu'à J+1 post-natal	70 jours chez le rat avant accouplement (mâles génération F0) et période d'accouplement deux cycles menstruels (femelles génération F0), période d'accouplement, de gestation et lactation Toute la génération F1
Doses	0,7 et 7 mg/kg pc./j.	Au moins 3 et un contrôle témoin
Euthanasie	24 h après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Les résultats mettent en évidence une perturbation de la croissance *in utero* de la prostate à la plus forte dose (7 mg/kg pc./j.). Par ailleurs, il est à noter que ces modifications diffèrent selon les régions corporelles (ventrale, dorso-crânienne, dorso-caudale, latérale et dorso-latérale). Cette étude peut permettre de déduire une NOAEL égale à 0,7 mg/kg pc./j.

- **Female sexual behavior, estrous cycle and gene expression in sexually dimorphic brain regions after pre- and postnatal exposure to endocrine active UV filters** (Faass *et al.*, 2009)

L'effet du 4-MBC est évalué sur le comportement sexuel du rat, le cycle menstruel et l'expression de gènes cibles tels que ceux codant pour les récepteurs oestrogéniques ER α , ER β , le SRC-1 (*Steroid receptor coactivator-1*) et le récepteur à la progestérone dans différentes régions du cerveau après un traitement *per os* pré- et post-natal. Cette étude qui est aussi réalisée sur la génération F1 peut être associée aux lignes directrices OCDE 415 contrairement aux auteurs qui rapprochent leur étude de la

ligne directrice OCDE 416 (étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations). Les résultats de cette étude *in vivo* sont associés à d'autres résultats d'autres études réalisées par les mêmes auteurs (Maerkel *et al.*, 2005, 2007 ; Durrer *et al.*, 2005, 2007 ; Schlumpf *et al.*, 2008). Le tableau 19 présente la comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Faass *et al.* (2009) et celui recommandé par l'OCDE 415.

Tableau 19 : Comparaison entre le protocole utilisé dans l'étude de Faass *et al.* (2009) et celui recommandé par l'OCDE 415

	Protocole utilisé dans l'étude de Faass <i>et al.</i> (2009)	Protocole recommandé dans la ligne directrice OCDE 415
Administration	Aliment	Aliment ou boisson
Nombre d'animaux	Génération F0 : non connu Génération F1 : 4 mâles	Au moins 20 femelles gravides/dose Nombre de mâles de la génération P suffisant En F1 : 4 mâles et 4 femelles
Espèce/souche	Long Evans	Rat ou souris sans qu'une souche ne soit précisée. Eviter les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement
Durée du traitement Ages des animaux	10 semaines avant accouplement (F0) Pendant gestation et lactation F1 jusqu'à 11-13 semaines	70 jours chez le rat avant accouplement (mâles génération F0) et période d'accouplement deux cycles menstruels (femelles génération F0), période d'accouplement, de gestation et lactation Toute la génération F1
Doses	7 et 24 mg/kg pc./j.	Au moins 3 et un contrôle témoin
Euthanasie	24 h après le dernier traitement	24 h après le dernier traitement

Dans cet article, seul le comportement sexuel a réellement été évalué. En effet, les résultats sur le cycle menstruel et sur l'expression de gènes cibles sont issus d'études antérieures mais non publiées. Il est difficile de savoir si l'ensemble des résultats décrits sont issus d'une seule étude *in vivo* ou de plusieurs études.

Pour étudier l'effet du 4-MBC sur le comportement sexuel, des femelles traitées ou non sont accouplées à des mâles non traités. Selon les caractères décrits ci-dessous, le traitement des femelles perturbe leur comportement sexuel :

- capacité des femelles à attirer les mâles (sauts ; oreilles agitées) ;
- nombre d'accouplements réalisés par le mâle ;
- nombre de position d'« acceptations » à l'accouplement par la femelle (lordoses) indépendant du nombre d'accouplements réels.

Concernant le cycle menstruel, le traitement des femelles au 4-MBC ne perturbe pas ce paramètre tandis que l'expression des gènes cibles est, quant à elle, perturbée. Une LOAEL égale à 7 mg/kg pc./j. peut être retenue à partir de cette étude.

Conclusion relative à l'analyse des études issues de la littérature scientifique

Depuis 2001, 13 articles portant sur le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC ont été recensés dans la littérature scientifique. Parmi l'ensemble de ces études, 11 sont issues du même laboratoire (Institut de Pharmacologie et Toxicologie, Suisse). La difficulté est de déterminer combien d'études *in vivo* ont réellement été réalisées par cette équipe. En effet, les auteurs ajoutent et mélangent des données entre les articles sans préciser si le travail présenté est issu d'une nouvelle étude *in vivo* ou des mêmes études publiées plusieurs fois.

Les deux autres études issues d'une autre équipe de recherche n'ont pas pu aboutir à l'établissement d'une NOAEL.

Le tableau 20 récapitule de l'ensemble des études de cette revue de la littérature.

Tableau 20 : Récapitulatif des études majeures réalisées avec du 4-MBC et présentées dans l'analyse des études issues de la littérature scientifique

Etude	Date	Marqueur	Conclusion
*Schlumpf <i>et al.</i>	2001	Utérotrophique	<i>Voie orale</i> NOAEL : 66 mg/kg pc./j. <i>Application topique</i> NOAEL : 66 mg/kg pc./j.
Tinwell <i>et al.</i>	2001	Utérotrophique	<i>Voie orale et injection sous-cutanée</i> LOAEL : 500 mg/kg pc./j.
*Schlumpf <i>et al.</i>	2004	Utérotrophique	<i>Voie orale</i> NOAEL : 0,7 mg/kg pc./j. LOAEL : 7 mg/kg pc./j.
*† Schlumpf <i>et al.</i>	2004	Utérotrophique	<i>Voie orale</i> NOAEL : 0,7 mg/kg pc./j. LOAEL : 7 mg/kg pc./j.
*† Durrer <i>et al.</i>	2005	Utérotrophique	<i>Voie orale</i> NOAEL : 7 mg/kg pc./j. LOAEL : 24 mg/kg pc./j. (sans effet à 47 mg/kg pc./j.)
Seidlova-Wuttke. <i>et al.</i>	2006	Exposition chronique	<i>Voie orale</i> pas de NOAEL possible
Seidlova-Wuttke <i>et al.</i>	2006	Exposition chronique	<i>Voie orale</i> pas de NOAEL possible
*† Maerker <i>et al.</i>	2007	Toxicité sur une génération (poids de la thyroïde en F1)	<i>Voie orale</i> LOAEL : 7 mg/kg pc./j.
*Durrer <i>et al.</i>	2007	Toxicité sur une génération (poids de la prostate en F1)	<i>Voie orale</i> LOAEL : 7 mg/kg pc./j.
*Hofkamp <i>et al.</i>	2008	Toxicité sur une génération (poids de la prostate en F1)	<i>Voie orale</i> LOAEL : 7 mg/kg pc./j. NOAEL : 0,7 mg/kg pc./j.
*Faass <i>et al.</i>	2009	Toxicité sur une génération (comportement sexuel)	<i>Voie orale</i> LOAEL : 7 mg/kg pc./j.

†Même étude

*Mêmes auteurs

Concernant les tests utérotrophiques, il existe une différence dans les NOAEL proposées entre les études (entre 0,7 et 66 mg/kg pc./j.) qui semble difficile à expliquer en raison d'un manque d'information notamment sur les solvants utilisés pour solubiliser le 4-MBC, composé très peu soluble en milieu aqueux.

Au regard des informations décrites dans ces études, une NOAEL de 0,7 mg/kg pc./j. est proposée par les auteurs en ce qui concerne le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC. Cependant, au vu des incertitudes sur les études présentées et le manque d'information sur les protocoles utilisés il convient de ne retenir que les effets rapportés comme potentiels sans pouvoir toutefois retenir une NOAEL avec une confiance élevée.

5. Conclusion générale

En ce qui concerne les avis du CSSC relatifs au 4-MBC, les études sont rapportées de manière « parcellaire » et ne permettent pas d'avoir une position claire notamment sur le choix de la NOAEL. En effet, aucun des avis publiés par le CSSC ne justifie le choix de la NOAEL de 25 mg/kg pc./j. (issu d'une étude de toxicité répétée de 90 jours) retenue dans le calcul de la MoS alors qu'une NOAEL, de 10 mg/kg pc./j. (issu d'une étude de tératogenèse), a été considérée dans les avis précédents.

Au cours du processus d'évaluation, pendant de nombreuses années, le CSSC s'est efforcé d'obtenir des données supplémentaires auprès de l'Industrie sans pour autant obtenir la ou les bonnes réponses aux questions initialement posées. Néanmoins, un calcul de la MoS est effectué dans le dernier avis du CSSC à partir d'une NOAEL de 25 mg/kg pc./j. et d'une exposition systémique de 0,588 mg/kg pc./j. Ainsi la marge de sécurité obtenue est égale à **42,5**. Afin de déterminer si cette MoS est suffisante pour garantir la sécurité sanitaire des consommateurs, deux approches sont utilisées : une approche conservatrice et une approche fondée sur la « toxicocinétique ». La première considère le facteur de sécurité habituellement utilisé de 100. *A contrario*, la seconde approche considère qu'il serait possible de s'affranchir du facteur de sécurité relatif aux variabilités interspèces dans la mesure où la toxicocinétique du 4-MBC chez l'Homme et chez le rat serait similaire. Le facteur de sécurité pris en compte serait alors de 25 au lieu de 100 habituel.

Ainsi, en se fondant sur l'approche conservatrice, le 4-MBC ne peut être considéré comme ne présentant pas de risque pour la santé humaine car la MoS est inférieure à 100. Par contre, selon l'approche « toxicocinétique », cette MoS est supérieure au facteur de sécurité de 25 et permet de conclure que le 4-MBC ne présenterait pas de risque sanitaire. Il faut noter que dans ce cas, la MoS est supérieure d'un facteur 1,7 au facteur de sécurité de 25.

Ces calculs sont basés sur une NOAEL de 25 mg/kg pc./j. issue d'une étude de toxicité répétée de 90 jours chez le rat qui a par ailleurs montré un effet sur les fonctions thyroïdiennes. La question de l'utilisation de cette NOAEL peut donc être posée. Une étude de tératogenèse permet de retenir une NOAEL de 10 mg/kg pc./j. basée sur les troubles d'ossification chez les fœtus à la dose de 30 mg/kg pc./j. Or, cette NOAEL, plus basse, reste la plus pertinente pour l'évaluation des risques.

Il est à noter que l'approche « toxicocinétique » a été retenue sur le fondement de données observées uniquement chez 6 volontaires, 3 hommes et 3 femmes, ce qui ne peut constituer une base solide pour la suppression d'un facteur de sécurité. De plus, il existe une différence quantitative du métabolite MET 1 et MET 2 entre le rat et l'Homme. Ne connaissant pas le métabolite le plus toxique chez le rat (aucune donnée fournie), il ne semble pas possible de consolider l'hypothèse selon laquelle la toxicocinétique est similaire chez le rat et l'Homme.

En ce qui concerne l'étude d'absorption cutanée retenue pour calculer l'exposition systémique, le CSSC a utilisé dans le calcul de la dose d'exposition systémique, une valeur d'absorption cutanée de 1,96 µg/cm². Néanmoins, des biais notamment méthodologiques ont été également notés par le CSSC dans cette étude :

- seul le résumé des huit expériences a été fourni par l'Industrie, les descriptions de ces études sont insuffisantes ;
- les informations fournies quant à la solubilité de la substance testée dans le fluide récepteur sont insuffisantes puisqu'aucune donnée permettant d'attester de cette solubilité n'a été précisée ;
- pour les valeurs faibles, les écarts-types sont très élevés.

Or, d'après les dernières recommandations du CSSC (2010)³ relatives à l'absorption cutanée pour le calcul des MoS, lorsque l'étude comporte des biais méthodologiques, les quantités devraient au moins être augmentées d'un écart-type, soit 3,02 µg/cm², voire 4,08 µg/cm² dans le cas de deux écarts-types.

³ SCCS. Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 22 juin 2010.

Le calcul de la MoS de 42,5 a été effectué pour une surface corporelle de 18 000 cm² et une NOAEL de 25 mg/kg/pc./j. ; cependant l'utilisation d'une absorption cutanée respectivement de 3,02 µg/cm² ou 4,08 µg/cm² donne une marge de sécurité qui n'est plus que de 27,6 ou 20,4. Cette dernière MoS est inférieure à 25 même si l'approche de réduction de facteur de sécurité relatif à la toxicocinétique retenue par le CSSC est considérée.

Concernant l'analyse des études issues de la littérature scientifique, 13 publications portant sur le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC ont été recensées depuis 2001. Dans la plupart des publications, le protocole expérimental utilisé n'est pas suffisamment détaillé pour permettre de juger de la qualité scientifique et par là même de la validité pour une utilisation dans l'évaluation du risque. Néanmoins, d'une manière générale les études semblent acceptables pour se forger une opinion sur le profil toxicologique.

Parmi l'ensemble de ces études, 11 sont issues du même laboratoire (Institut de Pharmacologie et de Toxicologie, Suisse). La difficulté est d'évaluer le nombre d'études *in vivo* réellement réalisées par cette équipe. En effet, les auteurs ajoutent et mêlent des données entre les articles sans préciser si le travail présenté dans chaque publication est issu d'une nouvelle étude *in vivo* ou non. Quant aux deux autres études issues d'une autre équipe de recherche, elles n'ont pas permis d'aboutir à l'établissement d'une NOAEL.

Néanmoins, au regard des informations décrites dans ces études sur les mécanismes impliqués dans la toxicité du 4-MBC et en utilisant une approche maximaliste, il est possible de retenir une NOAEL de 0,7 mg/kg pc./j. concernant le potentiel perturbateur endocrinien du 4-MBC sans pour autant avoir une confiance acceptable dans le choix de cette NOAEL.

Dans ce dernier cas, la MoS serait inacceptable et ceci quel que soit le facteur de sécurité retenu.

L'Afssaps estime en se fondant sur la dernière évaluation du CSSC (SCCP/1184/08) que :

- le choix de la NOAEL de 25 mg/kg pc./j. au lieu de celle de 10 mg/kg pc./j. retenue dans la première évaluation n'a pas été justifié et ne semble pas pertinent ;
- le taux d'absorption cutanée retenu pourrait être augmenté de 2 écarts-types, soit 4,08 µg/cm², étant donné le manque d'informations fournies dans cette étude.

L'Afssaps estime aussi que la réduction (de 4 à 1) de la composante toxicocinétique du facteur de sécurité relatif à la variation inter-espèce n'est pas acceptable sur la base des données disponibles, en raison :

- des limites des données de toxicocinétique chez l'Homme fournies dans le dossier (nombre insuffisant de volontaires, âges des participants non représentatifs de la population générale...) ;
- de l'absence d'information sur la toxicité de chaque métabolite retrouvé. En effet, les données disponibles montrent que la proportion du MET 1 et MET 2 est différente chez l'Homme par rapport au rat. Ne sachant pas la part des effets toxiques de chacun des métabolites observés chez le rat, il semble plus judicieux de ne pas réduire ce facteur de sécurité inter-espèce.

Dans ces conditions, l'Afssaps estime qu'une marge de sécurité de 100 est nécessaire pour s'assurer de l'innocuité du 4-MBC utilisé dans les produits cosmétiques en tant que filtre UV.

Par ailleurs, l'analyse critique des études de la littérature, bien que ces dernières ne soient pas conformes aux lignes directrices OCDE, permet de montrer un effet de perturbation endocrinienne à des doses inférieures à la NOAEL retenue par le CSSC. Il convient qu'une nouvelle étude de multigénération menée selon les lignes directrices de l'OCDE soit réalisée afin de s'assurer de l'absence du risque pour le consommateur dans les conditions d'utilisation.

Ainsi, quelle que soit la méthodologie retenue, la marge de sécurité est insuffisante pour conclure à l'absence du risque du 4-MBC utilisé en tant que filtre UV chez l'homme.

Références bibliographiques

Aghazarian V., Tchiakpe L., Reynier J.P., Gayte-Sorbier A. (1999). Release of benzimidazole and benzylidene camphor from topical sunscreen formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25: 1277-1282.

Durrer S., Maerkel K., Schlumpf M., Lichtensteiger W. (2005). [Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor.](#) *Endocrinology*, 146: 2130-2139.

Durrer S., Ehnes C., Fuetsch M., Maerkel K., Schlumpf M., Lichtensteiger W. (2007). Estrogen sensitivity of target genes and expression of nuclear receptor co-regulators in rat prostate after pre- and postnatal exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor. *Environmental Health Perspective*, 115: 42-50.

Faass O., Schlumpf M., Reolon S., Henseler M., Maerkel K., Durrer S., *et al.* (2009). Female sexual behavior, estrous cycle and gene expression in sexually dimorphic brain regions after pre- and postnatal exposure to endocrine active UV filters, *Neurotoxicology*, 30: 249-260.

Hofkamp L., Bradley S., Tresguerres J., Lichtensteiger W., Schlumpf M., Timms B. (2008). Region-specific growth effects in the developing rat prostate following fetal exposure to estrogenic ultraviolet filters. *Environmental Health Perspectives*, 116: 867-872.

Janjua N.R., Mogensen B., Andersson A.M., Petersen J.H., Henriksen M., Skakkebaek N.E., Wulf H.C. (2004). Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene) camphor after whole body topical application and reproductive hormone levels in humans. *Journal of Investigative, Dermatology*, 123: 57-61.

Janjua N.R., Kongshoj B., Petersen J.H., Wulf H.C. (2007). Sunscreens and thyroid function in humans after short-term whole-body topical application: a single-blinded study. *British Journal of Dermatology*, 156: 1080-1082.

Klimisch H.J., Andreae M., Tillmann U. (1997). A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 25: 1-5.

Ma R., Cotton B., Lichtensteiger W., Schlumpf M. (2003). UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences*, 74: 43-50.

Maerkel K., Durrer S., Henseler M., Schlumpf M., Lichtensteiger W. (2006). Sexually dimorphic gene regulation in brain as a target for endocrine disrupters: developmental exposure of rats to 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218: 152-165.

Rougier A., Lotte C., Predictive approaches. I. The stripping technique, in: V.P. Shah, H.I. Maibach (Eds.), *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and Penetration*, Plenum Press, New York, 1993, pp. 163-181.

Scalia S., Tursilli R., Iannuccelli V. (2007). Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: effect on photostability and human *stratum corneum* penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44: 29-34.

Schauer U., Völkel W., Heusener A., Colnot T., Broschard T., Von Landenberg F., *et al.* (2006). Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene) camphor in rats and humans after dermal application. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216: 339-346.

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

Schlumpf M., Jarry H., Wuttke W., Ma R., Lichtensteiger W. (2004a). Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology*, 199: 109-20.

Schlumpf M., Schmid P., Durrer S., Conscience M., Maerkel K., Henseler M., *et al.* (2004b). Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update. *Toxicology*, 205: 113-122.

Schlumpf M., Durrer S., Faass O., Ehnes C., Fuetsch M., Gaille C., *et al.* (2008). Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *International Journal of Andrology*, 31: 144-151.

Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers (SCCNFP). (1998). Opinion concerning 3-(4'-methylbenzylidene)-d,l camphor adopted by the plenary session of January 21, 1998. (ref. XXIV/1377/96). En ligne :

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/sccnfp_opinions_97_04/sc_cp_out27_en.htm

Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers (SCCNFP). (2001). Opinion on the evaluation of potentially estrogenic effects of UV-filters adopted by the SCCNFP during the 17th Plenary meeting of 12 June 2001. En ligne :

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

Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers (2004). Opinion concerning 4-methylbenzylidene camphor (SCCNFP/0779/04). En ligne :

http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out282_en.pdf

Scientific committee on consumer product (2006). Opinion on 4-methylbenzylidene camphor (SCCP/1042/06). En ligne :

http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_075.pdf

Scientific committee on consumer product (2008). Opinion on 4-methylbenzylidene camphor (SCCP/1184/08). En ligne :

http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_141.pdf

Scientific committee on consumer safety (2010). Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (SCCS/1358/10). En ligne :

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf

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

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

Søeborg T., Hollesen Basse L., Halling-Sørensen B. (2007). Risk assessment of topically applied products. *Toxicology*, 236: 140–148.

Tinwell H., Lefevre P. A., Moffat G.J., Burns A., Odum J., Spurway T.D., *et al.* (2001). Confirmation of Uterotrophic activity for 4-MBC in the immature rat. *Environmental Health Perspectives*, 110: 533-536.