HAL
open science

Identification des perturbateurs endocriniens dans les matières premières cosmétiques

Léna Theaux

To cite this version:

Léna Theaux. Identification des perturbateurs endocriniens dans les matières premières cosmétiques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03096656

HAL Id: dumas-03096656

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03096656v1

Submitted on 5 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. des SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020 Thèse n° [140]

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par THEAUX Léna

Née le 13/04/1995 à PAU (64)

Le 17/12/2020

IDENTIFICATION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS DANS LES MATIERES PREMIERES COSMETIQUES

Sous la direction de Antoine LODIOT

Membres du jury :

GUILLON Jean	Président
LODIOT Antoine	Directeur de thèse
PASSAGNE Isabelle	Rapporteur

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse,

Antoine Lodiot,

Docteur en Pharmacie et Toxicologue au sein de Chanel Parfums Beauté,

Merci d'avoir accepté de m'encadrer dans ce projet à la fois lors de mon stage et pour cette thèse, merci infiniment de m'avoir accompagnée et suivie avec tant de patience et de bienveillance à mon égard. J'ai énormément appris grâce à toi.

A mon président de jury,

Jean Guillon,

Enseignant-chercheur au sein de l'UFR de Pharmacie de Bordeaux,

Merci pour votre enseignement au cours de mes études, pour votre disponibilité, et pour avoir accepté d'être le président de mon jury.

A Madame Isabelle Passagne,

Enseignant-chercheur au sein de l'UFR de Pharmacie de Bordeaux,

Merci pour votre disponibilité, pour avoir accepté de lire et de juger cette thèse.

A l'ensemble de mon équipe,

J'adresse mes sincères remerciement au responsable du service de Toxicologie de CHANEL Parfums Beauté, Yves VALTY, pour m'avoir permis d'intégrer son équipe.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à toute l'équipe Toxicologie de la Maison Chanel, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont fait vivre.

A l'UFR de Pharmacie et ses professeurs,

Merci aux différents professeurs pour leurs enseignements tout le long de ce parcours, pour avoir assuré une formation approfondie de la Pharmacie et de la Toxicologie, et pour m'avoir permis de développer les compétences nécessaires pour le métier de Toxicologue.

A mes proches,

Merci à ma famille et à mes amis pour leur présence à mes côtés et leur grand soutien tout au long de mes études.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES 6

TABLE DES TABLEAUX ET FIGURES 12

INTRODUCTION 13

I. SYSTEME ENDOCRINIEN 16

A. MECANISTIQUE 16

B. PERTURBATION ENDOCRINIENNE 20

C. PHYSIOPATHOLOGIE 28

II. CONTEXTE REGLEMENTAIRE 35

A. REGLEMENTATIONS EXISTANTES 35

1. REGLEMENT COSMETIQUES 35

2. REGLEMENT REACH 36

3. REGLEMENT CLP 39

4. REGLEMENT PESTICIDES ET BIOCIDES 40

5. REGLEMENTATION ETATS UNIS 42

B. DOCUMENTS DE REFERENCE 44

1. 2E STRATEGIE NATIONALE SUR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS 44

2. LIGNE DIRECTRICE OCDE 150 52

3. LIGNE DIRECTRICE EFSA/ECHA 54

4. COMITE SCIENTIFIQUE POUR LA SECURITE DES CONSOMMATEURS (CSSC) 62

III. RESULTATS 65

A. STRATEGIE PROPOSEE POUR L'EVALUATION 65

1. STRATEGIE PROPOSEE LORSQUE TOUTES LES DONNEES SONT DISPONIBLES POUR CONCLURE, TELLES QUE PRESENTEES DANS LA LIGNE DIRECTRICE EFSA/ECHA : 66

2. STRATEGIE PROPOSEE LORSQU'IL MANQUE DES DONNEES : 67

a) STRATEGIE PROPOSEE POUR LES SUBSTANCES OU MATIERES PREMIERES DE COMPOSITION CHIMIQUEMENT DEFINIE 67

b) STRATEGIE POUR LES SUBSTANCES OU MATIERES PREMIERES DE COMPOSITION NON CHIMIQUEMENT DEFINIE (EXEMPLE : EXTRAITS VEGETAUX) :..... 68

B. CAS PRATIQUES 73

1. NITRURE DE BORE – N° CAS : 10043-11-5 73

2. ACRYLATES/POLYTRIMETHYLSILOXYMETHACRYLATE COPOLYMER – N° CAS : 262299-63-8..... 74

3. BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE DEHP - N° CAS 117-81-7 75

4. GLYCERYL STEARATE N° CAS 85251-77-0..... 77

5. EXTRAIT VEGETAL DE COMPOSITION INCONNUE 79

6. CAPRYLYL GLYCOL – N° CAS : 1117-86-8 80

IV. DISCUSSION 82

CONCLUSION 91

ANNEXES 96

BIBLIOGRAPHIE 99

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

A

ABS : Absorption

AE : Adverse Event

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

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

AR : Récepteur aux androgènes

ARN : Acide ribonucléique

B

BPA : Bisphénol A

BPR : Biocidal Product Regulation

C

CAS : Chemical Abstract Service

CC : Caractéristiques Clés

CE : Commission Européenne

CGAER : Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux

CGEDD : Conseil général de l'environnement et du développement durable

CIR : Cosmetic Ingredient Review

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CLP : Classification, Labelling, Packaging

CMR : Cancérogènes, Mutagènes, Reprotoxiques

CoRAP : Community Rolling Action Plan

CPSC : Consumer Product Safety Commission

CSP : Code de Santé Publique

CSSC : Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs

D

Da : Dalton

DA : Absorption Dermale

DBP : Phtalate de Dibutyle

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DEHP : phtalate de bis(2-éthylhexyle)

DES : Diéthylstilbestrol

DHT : Dihydrotestostérone

DIP : Dossier Information Produit

DT2 : Diabète de Type 2

E

EASIS : Endocrine Active Substances Information System

EATS : Estrogens, Androgens, Thyroid, Steroids

ECHA : European Chemicals Agency

EDSP : Endocrine Disruptors Screening Program

EDTA : Endocrine disruptor testing and assessment task force

EFSA : European Food Safety Authority

EPA : Environmental Protection Agency

EPO : Erythropoïétine

ER : Recepteur aux oestrogènes

F

FEBEA: Fédération des Entreprises de la Beauté

FC : Facteur de Conversion

FDA : Food Drug Administration

FFDCA : Federal Food, Drug and Cosmetic Act

FSH : Hormone Folliculo-Stimulante

G

GRAS : Generally Recognized as Safe

I

IGAS : Inspection générale des affaires sociales

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

INSL3 : Insulin-Like Factor 3

IRSN : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire

J

JRC : Centre commun de recherche

K

KE : Key Event

KER : Key Event Relationship

L

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

LH : Hormone Lutéinisante

M

MoA : Mode of Action

MoS : Marge de sécurité

MR : Récepteur des minéralocorticoïdes

N

N.B. : Nota Bene

NGRA : next generation risk assessment

NICNAS : National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme

NOAEL : No Observable Adverse Effect Level

O

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONG : Organisation Non Gouvernementale

OSHA : Occupational Safety and Health Administration

P

PBB : polybromobiphényles

PC : Poids corporel

PCB : Polychlorobiphényles

PE : Perturbateur Endocrinien

PEPPER : Plateforme Public-privé sur la pré-validation des méthodes d'essai sur les Perturbateurs EndocRiniens

PKPD : pharmacokinetic/pharmacodynamic

PM : Poids Moléculaire

PNRPE : Programme national de recherche sur les perturbateurs endocrinien

PNREST : Programme national de recherche Environnement-Santé-Travail

PPPR : Plant Protection Product Regulation

Q

QSAR : Relation quantitative structure à activité

R

REACH : Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

S

SAE : Substances Actives Endocriniennes

SE : Système Endocrinien

SED : Dose d'exposition systémique

SF1 : Steroidogenic factor 1

SGH : Système général harmonisé

SMILES : Simplified Molecular Input Line Entry Specification

SNPE : Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens

SOPK : Syndrome des ovaires polykystique

SRC1 : Steroid receptor coactivator-1

SVHC : Substance of Very High Concern

T

TBT : Tributylétain

TCDD : Tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TDS : Syndrome de dysgénésie testiculaire

TSH : Thyroid-stimulating hormone

TTC : seuil de préoccupation toxicologique

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

U

UE : Union Européenne

US EPA : United States Environmental Protection Agency

V

VTR : Valeur Toxicologique de Référence

W

WoE : Weight of Evidence

TABLE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Système endocrinien humain : glandes et principales hormones (site de l'INRS) . 16
Figure 2 : Synthèse des hormones sexuelles 18
Figure 3 : Rétrocontrole thyroïd stimulating hormone 19
Figure 4 : 10 caractéristiques clés 27
Figure 5 : Stratégie de tests pour l'évaluation de l'activité endocrinienne (Ligne directrice EFSA/ECHA)..... 57
Figure 6 : Résumé des scénarios (ligne directrice EFSA/ECHA)..... 59
Figure 7 : Mode Of Action (ligne directrice EFSA/ECHA) 60
Figure 8 : Schéma décisionnel stratégie interne à l'entreprise identification PE 72
Figure 9 : Nitrure de bore 73
Figure 10 : Acrylates/Polytrimethylsiloxymethacrylate Copolymer 74
Figure 11 : Bis(2-ethylhexyl) phthalate DEHP 75
Figure 12 : Glyceryl Stearate 77
Figure 13 : capture d'écran de ToxCast - Glyceryl Stearate 78
Figure 14 : Caprylyl glycol 80
Figure 15 : Exemples de courbes dose-réponse monotones et non monotones 88

Tableau 1 : Stratégie de l'EFSA/ECHA pour l'évaluation de l'effet adverse du DEHP 76
Tableau 2 : Stratégie de l'EFSA/ECHA pour l'évaluation de l'effet adverse du Glyceryl Stearate 78
Tableau 3 : Tests OCDE in vivo caprylyl glycol 81

INTRODUCTION

Les produits cosmétiques sont réglementés par le règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques depuis le 11 juillet 2013, à l'exception de certaines dispositions qui ont été applicables avant cette date. (1)

L'article 2 du règlement (CE) n °1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques définit le produit cosmétique comme «*toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles*». Un produit cosmétique ne peut pas être présenté comme ayant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines, le produit relevant dans ce cas de la définition du médicament par présentation au sens de l'article L. 5111-1 du code de la santé publique (CSP). Un produit cosmétique ne peut pas être ingéré, inhalé, injecté ou implanté dans l'organisme.

Selon l'article 3 du règlement cosmétique, les produits cosmétiques ne font pas l'objet d'une autorisation préalable à leur mise sur le marché, mais il incombe à la personne responsable de commercialiser des produits sûrs pour la santé humaine lorsqu'ils sont utilisés dans des conditions normales d'emploi ou raisonnablement prévisibles.

L'évaluation de la sécurité du produit cosmétique (partie B du Dossier Information Produit ou DIP), est effectuée par une personne titulaire d'un diplôme ou autre titre sanctionnant une formation universitaire d'enseignement théorique et pratique en pharmacie, toxicologie, médecine ou dans une discipline analogue, ou une formation reconnue équivalente par un État membre.

Depuis 2004, l'expérimentation de produits cosmétiques finis sur les animaux de laboratoire est interdite. En 2009, cette interdiction d'expérimentation sur l'animal de laboratoire a été élargie aux substances utilisées dans les produits cosmétiques.

En effet l'article 18 du Règlement 1223/2009 interdit « *la mise sur le marché des produits cosmétiques dont la formulation finale a fait l'objet d'une expérimentation animale au moyen*

d'une méthode autre qu'une méthode alternative validée et adoptée au niveau communautaire », « *la mise sur le marché de produits cosmétiques contenant des ingrédients ou des combinaisons d'ingrédients qui ont fait l'objet d'une expérimentation animale au moyen d'une méthode autre qu'une méthode alternative validée et adoptée au niveau communautaire* » et « *la réalisation, dans la Communauté, d'expérimentations animales portant sur des produits cosmétiques finis* ».

Le 11 Mars 2013, l'interdiction de commercialisation des produits finis contenant des substances testées sur les animaux de laboratoire sans exception est entrée en vigueur dans l'ensemble des pays de l'Union Européenne.

Le défi pour l'évaluateur de la sécurité est donc de garantir la sécurité du consommateur et la sûreté du produit cosmétique, par le biais de méthodes alternatives (*in vitro*, *in silico*, Relation quantitative structure à activité ou (Q)SAR) sans avoir recours aux essais sur les animaux. L'industrie cosmétique peut cependant utiliser les résultats de tests ayant été effectués sur animaux pour des substances utilisées également dans d'autres secteurs industriels (pharmaceutique, agro-alimentaire, biocides…) et réalisés par ces mêmes entreprises. Elle peut aussi utiliser des résultats de tests sur animaux effectués par des entreprises cosmétiques si ces tests ont eu lieu avant l'interdiction réglementaire.

Nous verrons dans la suite de cette thèse la variété des tests disponibles pour l'évaluation de la perturbation endocrinienne, non seulement *in vivo* mais également *in vitro*, ou encore les tests *in silico*, read-across etc., nous verrons également que la question d'évaluer le risque ou de seulement évaluer le danger des perturbateurs endocriniens se pose.

La 10ème édition des « *Notes d'orientation* » du Comité Scientifique Européen pour la Sécurité des Consommateurs (CSSC) ou « *notes of guidance* » fournit une assistance dans le processus de tests et d'évaluation de la sécurité des ingrédients cosmétiques au sein de l'Union Européenne (UE). (2) Elle est régulièrement révisée et mise à jour afin d'intégrer l'évolution des connaissances scientifiques. Dans ce document d'orientation, l'accent est mis sur l'application de méthodes alternatives, non animales. Une attention particulière est notamment portée sur la méthodologie d'évaluation de la perturbation endocrinienne, que nous développerons dans la suite de cette thèse.

En 1991, par la déclaration de Wingspread, des scientifiques ont exprimé pour la première fois à la communauté internationale leurs préoccupations concernant les conséquences de l'exposition de l'Homme et de l'environnement à des substances chimiques pouvant interagir

avec le système endocrinien. Ces substances sont désignées sous le terme de « perturbateurs endocriniens ». (3)

Les perturbateurs endocriniens regroupent une vaste famille de composés, capables d'interagir avec le système hormonal. Ces composés peuvent potentiellement affecter différentes fonctions de l'organisme telles que les fonctions métaboliques, les fonctions reproductrices, le système nerveux etc.

Les sources d'exposition sont difficiles à identifier et les conséquences biologiques de ces expositions sont encore mal appréhendées et complexes à étudier. C'est pourquoi l'étude des perturbateurs endocriniens représente aujourd'hui un enjeu majeur pour l'industrie des cosmétiques qui se doit d'évaluer la sécurité du produit avec pour but de prouver son innocuité.

Les perturbateurs endocriniens font l'objet de débats non seulement scientifiques mais également politiques et sociétaux, et ouvrent de nombreuses perspectives en termes de recherche épidémiologique, fondamentale, clinique et en sciences humaines et sociales. De plus, la médiatisation d'études sur certaines substances et la démonstration de possibles contaminations des milieux, des organismes et de l'ensemble de la population à des substances susceptibles d'être des perturbateurs endocriniens a amené l'opinion publique à s'emparer de la question de la perturbation endocrinienne.

Selon l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), les attentes des Français sont fortes : 50% des Français pensent que les risques liés aux perturbateurs endocriniens sont forts, mais seuls 10 % environ ont confiance dans les autorités pour les protéger des perturbateurs endocriniens. (3)

Le but de ce rapport est d'établir une stratégie d'identification des perturbateurs endocriniens dans les matières premières des produits cosmétiques, sans avoir recours aux tests *in vivo*. Un travail de recherche approfondi a ainsi été effectué sur les règlementations actuelles, ainsi que sur les avis et publications scientifiques. Les perspectives de recherche ont également été étudiées.

I. SYSTEME ENDOCRINIEN

A. MECANISTIQUE

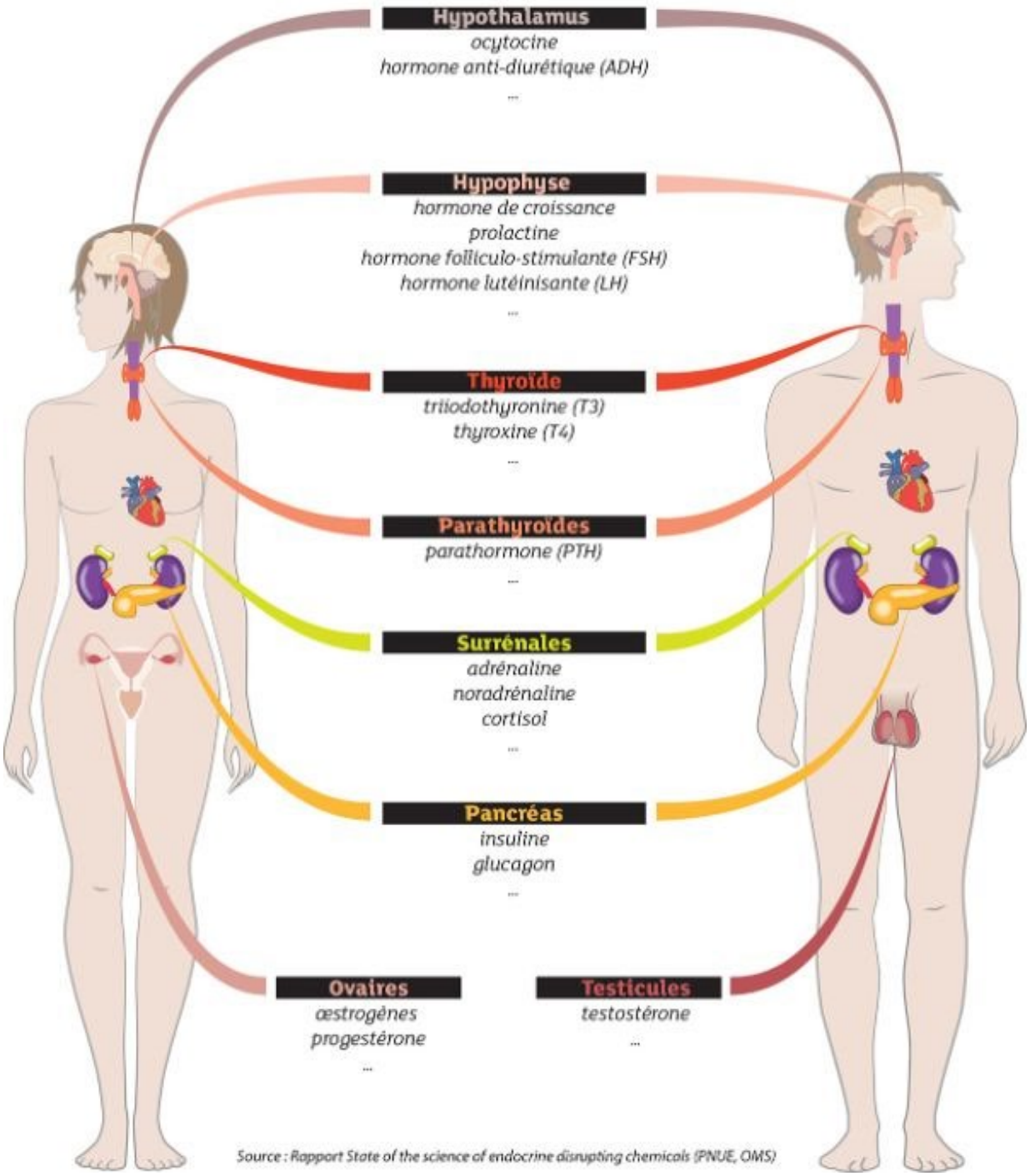

Figure 1 : Système endocrinien humain : glandes et principales hormones (site de l'INRS) (4)

Le système endocrinien (figure 1) est un ensemble de glandes endocrines (« *endo* » à l'intérieur et *« crine »* sécrétion) et de cellules qui sécrètent des hormones et qui les libèrent dans le sang. Il comprend l'ensemble épiphyse, hypophyse et hypothalamus, la glande thyroïde, le thymus, les glandes surrénales et le pancréas, les ovaires, les testicules, le rein et le tube digestif. D'autres tissus de l'organisme comme le tissu adipeux peuvent aussi exercer une activité endocrinienne. Les hormones sont des messagers chimiques qui sont véhiculés par le sang jusqu'aux organes-cibles (organes dont les cellules possèdent des récepteurs à ces hormones) dont elles modifient l'activité en se fixant sur un récepteur spécifique.

Une hormone est constituée soit de protéines, soit de lipides (stéroïde) fabriquée par une glande endocrine ou un tissu comme le rein (érythropoïétine ou EPO), le tube digestif (gastrine).

Le système endocrinien contrôle de très nombreuses fonctions de l'organisme, comme par exemple : le métabolisme, l'homéostasie, la croissance, l'activité sexuelle. Les hormones agissent à faible concentration et leur sécrétion peut être déclenchée par une stimulation nerveuse (décharge d'adrénaline lors d'un stress par exemple), par une modification de l'homéostasie (une augmentation de la concentration en glucose dans le sang stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas) ou par d'autres hormones (les hormones de l'hypophyse FSH et LH stimulent la production d'œstrogènes et de progestérone par les ovaires).

Les hormones sexuelles d'origine gonadique sont des stéroïdes dérivant du cholestérol. On distingue les androgènes dérivés du noyau androstane, dont la molécule type est la testostérone, les progestogènes dérivés du noyau pregnane, dont la molécule type est la progestérone, les œstrogènes dérivés du noyau estrane, dont la molécule type est l'estradiol (figure 2). Leur sécrétion est régulée par des hormones polypeptidiques d'origine hypophysaire (LH, FSH). Les autres hormones non sexuelles à structure stéroïde sont le cortisol et l'aldostérone. Les stéroïdes sont synthétisés par les gonades (testicules, ovaires), la corticosurrénale et le placenta mais aussi par le système nerveux central. Les hormones stéroïdes (œstrogènes, androgènes, progestatifs) contrôlent des processus physiologiques complexes de la reproduction. Les hormones stéroïdes ont tendance à être transportées dans le sang par un transporteur spécifique, et sont capables d'entrer passivement dans les cellules et d'interagir avec des récepteurs à l'intérieur des cellules. (5)

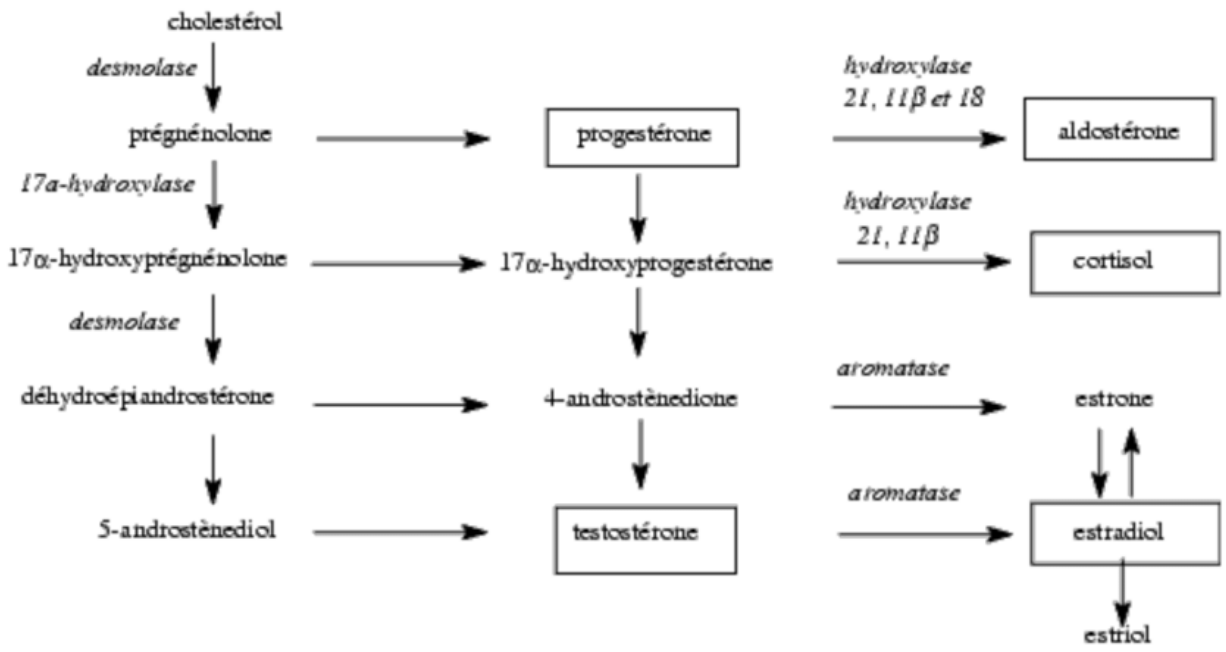

Figure 2 : Synthèse des hormones sexuelles (6)

Les hormones thyroïdiennes (la thyroxine T_4 et la triiodothyronine T_3), sont des hormones produites dans la thyroïde à partir d'iode et d'un acide aminé, la tyrosine. Celles-ci sont produites majoritairement sous forme de T_4. La T_4 agit comme une pro-hormone, relativement peu active, qui est convertie en T_3, plus active. La conversion de la T_4 en T_3 a lieu dans les cellules cibles, sous l'effet d'une enzyme, la thyroxine 5'-désiodase. Les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la croissance et au développement corrects, à la multiplication et à la différenciation des cellules de l'organisme. Les hormones thyroïdiennes agissent sur des récepteurs intracellulaires, mais nécessitent des protéines de transport spécifiques pour accéder à l'intérieur d'une cellule, contrairement aux hormones stéroïdes.

En plus de leurs actions physiologiques, de nombreuses hormones contrôlent également leur propre sécrétion en "*rétrocontrôles négatifs*" (figure 3). Par exemple, la sécrétion d'hormones thyroïdiennes est stimulée par une hormone protéique hypophysaire, TSH (thyroïd stimulating hormone), et les hormones thyroïdiennes inhibent à leur tour la TSH. De cette façon, les niveaux d'hormones thyroïdiennes sont maintenus dans une fourchette relativement étroite pour un individu en condition normale.

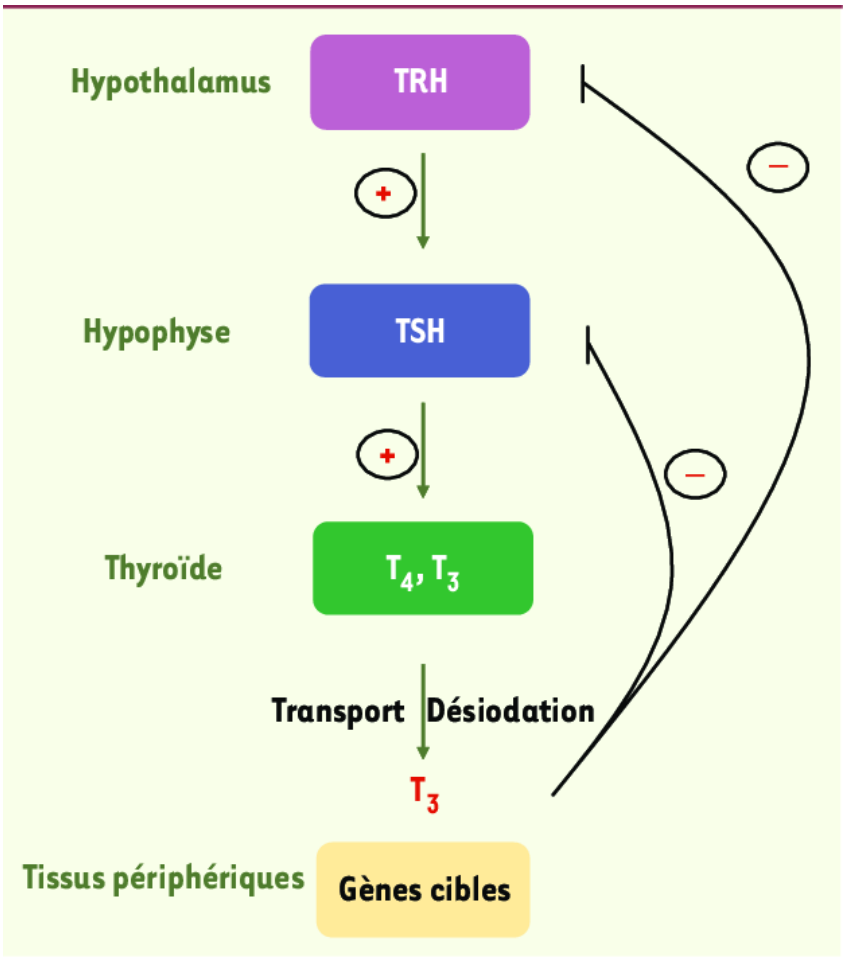

Figure 3 : Rétrocontrole thyroïd stimulating hormone (7)

Les récepteurs hormonaux sont limités dans leur quantité et provoquent des effets moindres et spécifiques après la liaison hormonale. La plupart des hormones n'agissent pas dans toutes les cellules car leurs récepteurs ne s'y trouvent pas toujours. La plupart des hormones n'agissent pas non plus à tout moment au cours du cycle de vie car leurs récepteurs ne s'y trouvent qu'à des moments précis du développement ou à l'âge adulte. Une hormone peut également agir sur plusieurs types de récepteurs différents. La distribution spatiale des récepteurs hormonaux peut varier considérablement et cela explique le degré d'effet qu'aura une hormone. Par exemple, les récepteurs à l'insuline se trouvent partout dans le corps et cela explique la capacité de l'insuline à affecter tous les tissus. En revanche, les récepteurs à la TSH l'hormone thyroïdienne se trouvent principalement dans la glande thyroïde. Cette distribution limitée explique l'impact plus limité de la TSH dans le corps.

De même, les œstrogènes exercent leurs effets en agissant sur au moins deux principaux types de récepteurs nucléaires (récepteurs alpha des œstrogènes et bêta : ERα et ERβ). La testostérone

exerce ses effets en agissant sur un seul récepteur androgénique (AR). Malgré le fait que certaines hormones agissent par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs alors que d'autres agissent par récepteur unique, dans tous les cas, les actions d'une même hormone dans une cellule sont différentes des actions de cette hormone dans un autre type de cellule.

Dans le cas des récepteurs nucléaires le complexe hormone-récepteur se lie à des régions spécifiques de l'ADN pour réguler le processus de transcription génique entraînant la formation de nouvelles protéines. Ces hormones régulent des gènes différents dans différents types de cellules ou à différents moments du développement.

B. PERTURBATION ENDOCRINIENNE

La perturbation endocrinienne fait l'objet de nombreuses études, mais on peut remarquer un manque de consensus certain entre les experts. L'identification des perturbateurs endocriniens est très complexe, sachant que leur structure chimique, mécanisme d'action et effets sont très variables.

La définition même des perturbateurs endocriniens fait l'objet de débat au niveau international du fait notamment du niveau de preuve requis, très élevé selon les Organisation Non Gouvernementale (ONG), ou des dérogations pouvant être faites pour certaines substances (biocides, pesticides). Je me suis basée sur celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la plus communément admise, endossée par la Commission Européenne, et en vigueur dans les pays de l'UE. (ANSES, 2016) (SNPE, 2017). (8)(9)

"*Un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)- populations*". OMS 2002

Un perturbateur endocrinien (PE) est défini par trois critères :

« *Une substance est considérée comme avoir des propriétés de perturbateurs endocriniens si elle remplit tous les critères suivants :*

a) *Elle montre un effet adverse sur un organisme intact ou sa progéniture/ environnement, qui peut être un changement dans la morphologie, physiologie, croissance, développement, reproduction, durée de vie d'un organisme, système ou (sous)population résultant en une déficience d'une capacité fonctionnelle, déficience de la capacité à compenser un stress, ou une augmentation de la sensibilité à d'autres facteurs ;*
b) *Il a un mode d'action endocrinien, il altère les fonctions du système endocrinien ;*
c) *L'effet adverse est une conséquence du mode d'action endocrinien* »

Donc pour démontrer qu'une substance est un perturbateur endocrinien, on doit pouvoir montrer qu'elle engendre un effet indésirable, qu'elle possède une action endocrinienne, et qu'il existe un lien entre cet effet indésirable et cette action endocrinienne.

Le mécanisme par lequel un produit chimique perturbe l'action hormonale a un très grand impact sur les effets que l'on s'attend à observer. Généralement, il y a deux voies par lesquelles un produit chimique pourrait perturber l'action d'une hormone : une action directe sur un complexe protéique récepteur hormonal, ou une action directe sur une protéine spécifique qui contrôle certains aspects de l'action de l'hormone au bon endroit et bon moment. Cela pourrait être une protéine impliquée dans la production de l'hormone (par ex. l'aromatase), un transporteur important (par ex. symporteur sodium / iodure) ou une protéine porteuse (par ex. cortisol protéine de liaison). Ainsi, un produit chimique pourrait bloquer la synthèse d'une hormone, de sorte que les taux sanguins de l'hormone augmenteraient ou diminueraient. L'impact systémique serait alors le même que dans la situation dans laquelle les niveaux d'hormones sont modifiés en raison d'une maladie ou d'un défaut génétique où la synthèse hormonale est inhibée ou stimulée. En revanche, si un produit chimique interagit directement avec un récepteur hormonal, alors les effets pourraient être assez complexes à anticiper. (10)

D'après *La Merrill, M.A et al. (11),* les produits chimiques qui interfèrent avec l'action hormonale ont des caractéristiques clés (CC) liées à leur capacité à interagir avec les principales étapes des systèmes hormonaux et ces CC peuvent être utilisées pour identifier les perturbateurs endocriniens. Dix CC pour PE sont identifiées, représentant les catégories des différents mécanismes d'action. Les dix CC identifiées sont basées sur une analyse de la littérature scientifique (figure 4, p26).

CC1 : Activation des récepteurs hormonaux

Toutes les hormones agissent en se liant à un récepteur spécifique. Une activation inappropriée du récepteur peut avoir des effets négatifs profonds sur le développement et la santé.

Par exemple, les PE qui activent les récepteurs aux œstrogènes (ERα et ERβ) au cours du développement augmentent le risque d'infertilité chez les deux sexes ainsi que le cancer de l'appareil reproducteur chez la femme et cancer de la prostate chez l'homme. Le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT (insecticide), se lie à ERα et ERβ33 et stimule la transcription dépendante de l'activation et la prolifération du récepteur oestrogénique dans une variété d'espèces, y compris les humains. De plus, le DDT se lie au domaine transmembranaire du récepteur de l'hormone folliculo-stimulante, un récepteur couplé à une protéine G protéique, pour modifier allostériquement la stimulation de la production d'AMPc. De même, un polychlorobiphényle (PCB) peut activer le récepteur de l'hormone thyroïdienne humaine à médiation β.

CC2 : antagonisme des récepteurs hormonaux

Les perturbateurs endocriniens peuvent inhiber ou bloquer les effets des hormones endogènes en agissant comme antagonistes sur le récepteur.

Par exemple, le dichlorodiphényldichloroéthylène, un pesticide organochloré (encadré 2 figure 4), inhibe la liaison des androgènes aux récepteurs aux androgènes (AR) chez l'homme et le rat. D'autres pesticides organochlorés inhibent également la liaison de la dihydrotestostérone aux AR. Comme les androgènes sont des régulateurs clés de la différenciation sexuelle au cours du développement fœtal, la perturbation de l'action des androgènes par antagonisme sur les récepteurs androgéniques peut démasculiniser définitivement les fœtus mâles et conduire à des malformations du tractus génital.

CC3 : modification de l'expression des récepteurs hormonaux

Les récepteurs des hormones modulant les actions de ces dernières, leur expression dicte leur réponse aux signaux hormonaux. Par exemple, l'abondance des récepteurs peut déterminer à la fois la concentration d'hormones qui produit un effet ainsi que l'ampleur de l'effet lui-même. Les perturbateurs endocriniens peuvent moduler l'expression de l'hormone, mais aussi l'internalisation et la dégradation des récepteurs.

Par exemple, le phtalate di (2-éthylhexyle) diminue l'expression du récepteur des minéralocorticoïdes (aldostérone) (MR) dans les testicules de souris adultes, où, dans des conditions normales, le MR agit comme un modulateur positif de la biosynthèse de la testostérone. De plus, le Bisphénol A (BPA) modifie l'expression des récepteurs aux œstrogènes, de l'ocytocine et de la vasopressine dans le cerveau. Le DDT empêche l'internalisation du récepteur au TSH.

CC4 : modification de la transduction du signal aux cellules répondant à l'hormone

La liaison d'une hormone à un récepteur déclenche des réponses intracellulaires spécifiques qui dépendent des propriétés spécifiques du récepteur et du tissu de la cellule cible. La transduction du signal médiée par les deux membranes et les récepteurs hormonaux intracellulaires peut être modifiée par certains PE.

Par exemple, le BPA bloque un faible taux de glucose induit par signalisation calcique dans la sécrétion de glucagon par les cellules pancréatiques de souris mâles adultes. Il a également été démontré que les produits chimiques dans certains filtres ultraviolets peuvent perturber la signalisation du calcium dans le sperme humain. Dans des études *in vitro*, le fongicide tolylfluanide altère l'action de l'insuline. Les PE peuvent également affecter la transduction du signal initiée par des récepteurs nucléaires. Ces effets incluent des interactions avec des facteurs co-régulateurs tels que les activateurs et les répresseurs, qui sont un élément clé de la machinerie moléculaire. Certaines études suggèrent que les xénoestrogènes, en particulier le BPA, augmente l'expression de Steroid receptor coactivator-1 (SRC1), vu dans l'hypothalamus de rat, et dans le sein humain. Un autre PE, le 4-méthylbenzylidène, le camphre (qui est utilisé dans les filtres ultraviolets), augmente également l'expression de SRC1 dans l'hypothalamus de rat femelle.

CC5 : induction de modification épigénétique dans la production d'hormones ou cellules sensibles aux hormones

Les hormones peuvent exercer des effets permanents - en particulier pendant le développement et la différenciation - en modifiant les processus épigénétiques (changements dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires) (5). Un PE qui interfère avec l'hormone peut le faire en interférant avec la capacité d'une hormone à induire ces changements épigénétiques.

Le phtalate de bis(2-éthylhexyle) déméthyle de manière inappropriée l'ADN dans les testicules de souris mâles. Les PE peuvent également modifier l'expression du codage de l'ARN, comme on le voit avec les PCB altérant l'expression des microARN hypothalamiques ainsi que le BPA et phtalates affectant l'expression des microARN dans le placenta.

CC6 : modification de la synthèse hormonale

La synthèse hormonale est régulée par les mécanismes de rétrocontrôles intra et extra cellulaires. Les PE peuvent agir sur un des mécanismes de synthèse des hormones, et ainsi la bloquer ou au contraire l'augmenter.

La synthèse de l'hormone thyroïdienne est contrôlée par une combinaison d'activation du récepteur de la TSH médiant l'absorption de l'iode et l'activation de divers enzymes. Après transcription et traduction, les protéines et les hormones peptidiques sont stockées dans des vésicules. La synthèse des hormones y compris la transformation d'une pro- hormone à une hormone, se produit plus ou moins simultanément avec l'activité hormonale. Certains PE sont connus pour interférer avec cette synthèse. Par exemple, le perchlorate peut bloquer l'absorption d'iode dans les cellules thyroïdiennes, inhibant ainsi la synthèse de l'hormone thyroïdienne. Les phtalates peuvent également réduire la synthèse de testostérone dans le testicule de rat fœtal.

CC7 : modification du transport des hormones à travers les membranes cellulaires

En raison de leur lipophilie, les hormones stéroïdes (œstrogènes, androgènes, progestatifs) peuvent se déplacer passivement à travers les membranes. D'autres hormones (telles que les hormones thyroïdiennes) doivent être transportées sélectivement à travers les membranes soit pour gagner l'entrée et/ou pour quitter la cellule. Ces processus de transport sélectifs et passifs peuvent être perturbés par les PE.

Le BPA à faible dose, réduit l'entrée de calcium dans les cellules β-pancréatiques de souris et réduit ainsi la sécrétion d'insuline.

CC8 : modification de la distribution hormonale ou des niveaux circulants d'hormones

Les hormones circulent généralement partout dans le sang à de faibles concentrations (de l'ordre du ng/mL). Une hormone circulante est soit transportée « *libre* » (non liée aux protéines sériques) avec ou sans conjugaison (comme la glucuronidation ou la sulfatation) ou liée à diverses protéines. Les PE peuvent modifier la biodisponibilité des hormones en interférant avec la distribution des hormones dans les tissus sensibles ou avec la circulation d'hormones, y compris en déplaçant les hormones de leurs protéines de liaison, ce qui peut entraîner une altération de la délivrance d'hormones actives aux tissus cibles.

Par exemple, le BPA provoque une diminution concentration-dépendante des taux circulants de testostérone chez les rats mâles et les hommes, et le malathion (pesticide) réduit les niveaux de testostérone dans le sérum, les testicules et les ovaires expérimentalement chez plusieurs animaux. Quand le Diéthylstilbestrol (Distilbène® ou DES) est administré aux hommes par voie intraveineuse, on peut observer une réduction de la testostérone et des œstrogènes.

CC9 : modification du métabolisme ou de la clairance des hormones

Les différents types d'hormones (tels que protéines, peptides, stéroïdes ou thyroïdes) sont inactivés différemment. Par exemple, après sécrétion, les hormones protéiques sont inactivées lorsqu'elles sont décomposées par des protéases dans le sang. En revanche, les stéroïdes et les hormones thyroïdiennes sont métabolisés par des enzymes qui les rendent hormonalement inactifs et augmentent leur solubilité dans l'eau afin qu'ils puissent être retirés de la circulation sanguine et excrétés. Les PE peuvent modifier les taux d'inactivation, y compris dégradation ou clairance métabolique des hormones, qui pourraient modifier les concentrations d'hormones et, finalement, leur activité.

Par exemple, un grand nombre de produits chimiques activent des glucuronidases, qui augmentent l'élimination de l'hormone thyroïdienne du sang dans les urines.

CC10 : modification du sort des cellules productrices d'hormones ou répondantes aux hormones

Les hormones affectent la structure et l'organisation tissulaire en affectant l'état des cellules (par exemple, la prolifération, migration ou différenciation cellulaire) et / ou la mort cellulaire pendant le développement et l'âge adulte. À l'âge adulte, de nombreux organes endocriniens sains ont un nombre assez stable de cellules (par exemple : les glandes surrénales et le pancréas), tandis que d'autres organes endocriniens ou tissus sensibles aux hormones dépendent de la croissance cellulaire pour une fonction normale (comme les testicules pour former du sperme, l'endomètre utérin et la muqueuse vaginale). Les PE peuvent modifier le nombre total ou le positionnement des cellules dans les tissus producteurs d'hormones ou sensibles aux hormones en perturbant ou favorisant la différenciation, la prolifération, la migration ou la mort cellulaire.

Par exemple, l'hormone thyroïdienne contrôle la prolifération cellulaire et l'apoptose dans le développement du cervelet. Des souris femelles exposées à l'oxybenzone, filtre ultraviolet, pendant la grossesse et l'allaitement ont eu une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium mammaire, phénomène observé même des semaines après la fin des expositions.

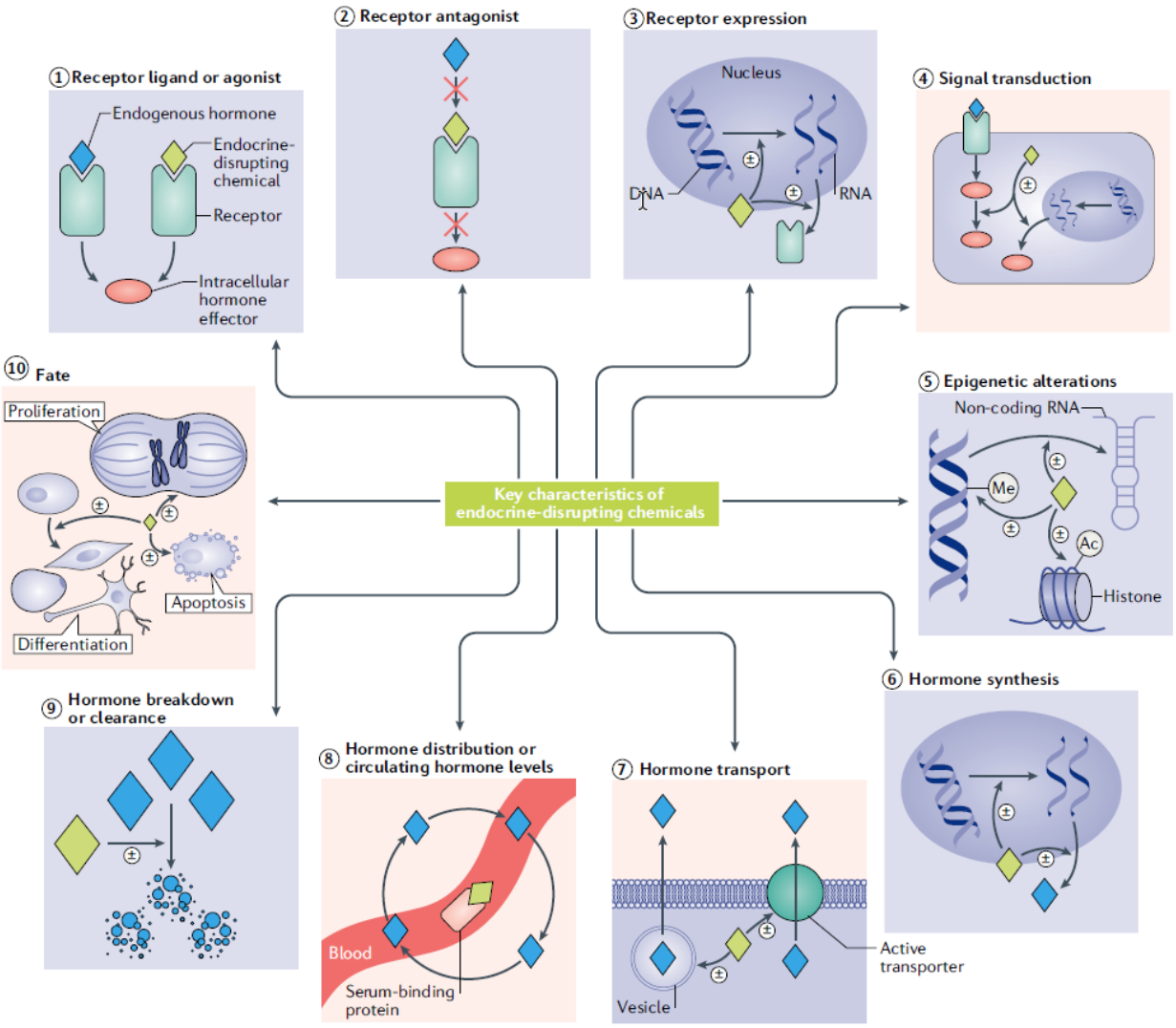

Figure 4 : 10 caractéristiques clés

C. PHYSIOPATHOLOGIE

La France est confrontée à une progression des maladies chroniques (diabètes, maladies respiratoires, maladies inflammatoires, cancers hormono-dépendants…) et à une augmentation des troubles de la fertilité et de la reproduction, troubles pour lesquels le facteur environnemental est largement mis en avant, mais reste difficile à caractériser, notamment de par le vieillissement considérable de sa population. L'OMS estime que 23 % de la mortalité mondiale est liée à l'environnement, ce qui représente 12,6 millions de décès par an, dont 1,4 million pour l'Europe. Les substances chimiques toxiques, dont les perturbateurs endocriniens, contribuent à cette mortalité. Ces évènements ont un coût pour la société, qu'il est difficile d'estimer avec précision, mais que certaines études évaluent à 160 milliards d'euros par an pour le système de santé européen, sans compter notamment les coûts environnementaux. (3)

Les perturbateurs endocriniens ont un impact sur la faune (changement de sexe dans certaines populations de poissons, troubles du développement…) et les écosystèmes, et participent à l'érosion de la biodiversité. Ils contribuent également au développement de pathologies chez l'Homme. (3)

En effet, beaucoup d'affections humaines sont suspectées d'être la conséquence d'une exposition aux perturbateurs endocriniens telles que la survenue de certains cancers hormono-dépendants. Un des exemples les plus connus est le diéthylstilbestrol (Distilbène® ou DES) qui a été prescrit dans les années 1950-60 pour éviter les avortements spontanés. Il a ensuite été interdit suite à la découverte d'un possible lien dans les années 1970 entre l'administration de DES à des femmes enceintes et la survenue de cancers du vagin, du sein et de l'utérus chez les filles des mères traitées sur plusieurs générations (12).

Parmi les autres pathologies hormono-dépendantes appréhendées, on retrouve la baisse de la fertilité chez la femme comme chez l'homme notamment la baisse de la quantité de spermatozoïdes et de la qualité du sperme ; le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS ou Testicular Dysgenesis Syndrome) qui associe, à la naissance, au moins deux des anomalies suivantes : pénis mal formé (hypospadias), pénis anormalement petit, testicules non descendus dans le scrotum (cryptorchidie) qui affecte 2 à 4% des garçons, une augmentation du recours à la procréation médicalement assistée (1 couple sur 6), l'augmentation des cancers du sein et de la thyroïde (1 femme sur 8). Au niveau mondial, le nombre de diabétiques de type 2 a doublé entre 1980 et 2008 (153 à 347 millions), l'obésité est le 5ème facteur de mortalité dans le monde, les maladies neuro-développementales connaissent une augmentation exponentielle.

En effet, les perturbateurs endocriniens ont ainsi d'abord été suspectés d'être responsables d'une augmentation des troubles de la fertilité, notamment masculine (baisse de la qualité du sperme) ainsi que des malformations génitales chez les garçons, des pubertés précoces des filles, et des cancers hormono-dépendants (prostate, endomètre, sein…). Puis les effets envisagés ont ensuite été étendus à des troubles métaboliques (obésité, diabète de type 2) et neurocomportementaux (troubles de l'attention et hyperactivité des enfants, autisme).

Cependant, mettre en évidence la responsabilité des perturbateurs endocriniens pour ces pathologies et troubles multifactoriels est très difficile.

L'Agence européenne de sécurité alimentaire (EFSA) indique que 117 pesticides sur 287 affectent les hormones thyroïdiennes. Le rôle des hormones thyroïdiennes maternelles est primordial dans le développement neuronal du foetus, en particulier en début de grossesse. Une atteinte de la fonction thyroïdienne maternelle aura des conséquences sur le neuro-développement de l'enfant.

Selon le rapport Endocrine Disruptors : From Scientific Evidence to Human Health Protection, précité, les perturbateurs endocriniens sont suspectés (13) *« d'être impliqués dans des phénomènes observés à l'échelle de la population mondiale, comme la nette augmentation des troubles du spectre de l'autisme et des troubles du comportement chez l'enfant (déficit de l'attention avec hyperactivité par exemple) ou une baisse globale de QI. Des associations ont été montrées entre certains de ces troubles ou déficits et l'exposition du foetus ou du jeune enfant à certains perturbateurs endocriniens (phtalates, PCB, pesticides, bisphénol A). Les altérations du développement neural peuvent résulter d'effets oestrogéniques ou d'impacts sur l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde. L'effet oestrogénique du BPA sur les fonctions de mémoire et d'apprentissage constitue un des meilleurs exemples de démonstration d'un effet délétère induit par une perturbation endocrinienne. Le plus souvent toutefois, le lien de causalité reste difficile à établir : les individus sont exposés à de très nombreuses substances, dont certaines, parmi les pesticides notamment, peuvent présenter une neurotoxicité indépendante de tout effet endocrinien. Il semble néanmoins plausible que les effets neuraux (comportementaux, cognitifs et développementaux) soient induits par des multi-expositions aux perturbateurs endocriniens. »*

L'Institut national de la recherche agronomique (INRA) (14) met en exergue le fait que « *depuis plus de vingt ans, de nombreux travaux (dont les analyses de dons de sperme collectés des années 1940 à nos jours) ont montré chez l'homme une augmentation conjointe (temporelle et*

géographique) de l'incidence de l'infertilité masculine, de l'hypofertilité, du cancer testiculaire et d'anomalies génitales. »

« Des malformations et des anomalies fonctionnelles de l'appareil reproducteur présentant des similitudes ont été observées chez des animaux sauvages exposés à des pesticides ou d'autres produits chimiques présents dans l'environnement. L'association chez les sujets masculins d'au moins deux anomalies des organes ou du sperme a été dénommée syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT). Dans presque tous les cas, l'origine des problèmes est associée à un mauvais développement du testicule in utero, au moment clé de la première sécrétion de testostérone, importante pour induire la programmation des organes génitaux masculins. Les pesticides et certains plastifiants comptent parmi les premières causes du SDT identifiées dans les pays industrialisés. »

« Des recherches actuelles s'intéressent aux effets sur les comportements de reproduction (comportement sexuel, parental…), qui pourraient aussi être affectés par les perturbateurs endocriniens, comme l'ont déjà montré quelques expérimentations sur rongeurs. »

L'INRA indique également que « *les cibles des perturbateurs endocriniens pouvant affecter la fertilité sont tous les organes ou cellules qui possèdent des récepteurs aux hormones sexuelles : l'hypothalamus et l'hypophyse au niveau central ; les ovaires, l'utérus, et le vagin au niveau périphérique. Les perturbateurs endocriniens peuvent également agir via d'autres types de récepteurs que ceux des hormones sexuelles, et avoir un effet indirect sur la fertilité en modifiant les sécrétions hormonales d'autres organes (thyroïde, surrénales, pancréas, adipocytes).*

Chez les filles, dans les pays occidentaux, l'observation la plus marquante concerne la tendance séculaire à une puberté plus précoce. La courbe de cette évolution varie d'un pays à l'autre. En France, une diminution de 0,18 an par décennie est observée. (15)

« La littérature rapporte des effets multiples des expositions aux perturbateurs endocriniens sur l'âge à la puberté, la régularité des cycles oestriens ou menstruels, le taux d'ovulation et la capacité des ovocytes à être fécondés, la réceptivité utérine et la capacité à l'implantation des embryons et la gestation à terme (avortements, retards de croissance, prématurité). »

Le rôle de plusieurs perturbateurs endocriniens est suspecté dans l'apparition de cancers hormonaux-dépendants (sein, utérus, prostate, testicules) mais certaines substances ayant des propriétés de perturbateurs endocriniens ont également un effet cancérogène avéré par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) sur des localisations non endocriniennes. Il

s'agit notamment des dioxines dont la dioxine 2, 3, 7, 8 TCDD dite dioxine Sévéso, considérée comme cancérogène chez l'homme, tout organes confondus. Le benzo[a]pyrène, considéré comme cancérogène par ses propriétés génotoxiques. L'exposition aux polychlorobiphényles (PCB) est quant à elle impliquée dans le développement de mélanomes malins.

A l'heure actuelle, il paraît impossible d'évaluer le nombre de cancers qui seraient directement la conséquence à une exposition aux perturbateurs endocriniens.

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, avec une incidence élevée qui continue à croître et une répartition géographique hétérogène. Une modification de l'incidence lors des migrations des populations initialement à faible risque évoque des causes environnementales, sachant que seulement 10 % des cancers sont à caractère familial, génétique, héréditaire.

L'implication du BPA dans les cancers du sein est soutenue par plusieurs arguments, notamment les femmes ayant été exposées au distilbène *in utero* dans le ventre de leur mère et dont la cohorte a été suivie aux États-Unis pendant plus de 50 ans, ont 2 à 3 fois plus de risques de développer un cancer du sein à partir de 40 ans par rapport à des femmes non exposées (16).

De plus, les cellules cancéreuses mammaires humaines expriment un récepteur très affin pour le BPA qui stimule leur prolifération *in vitro*. Il est également possible sur des cellules mammaires humaines souches ou malignes d'induire *in vitro* par exposition à faibles doses de BPA des modifications épigénétiques portant sur des gènes suppresseurs illustrant un possible mécanisme physiopathologique à l'origine du cancer du sein. Enfin, le BPA à faibles doses neutralise *in vitro* les effets suppresseurs de plusieurs chimiothérapies sur des cellules de cancer du sein humain, alertant de façon critique sur la présence de BPA dans les dispositifs médicaux (poches de perfusion, tubulures) utilisés en cancérologie. (17)

Selon l'INRA, *« quelques dizaines de composés ont été identifiés comme perturbateurs métaboliques. Parmi ceux-ci figurent quelques pesticides organochlorés ou organophosphorés, le bisphénol A, le tributylétain (TBT), certains phtalates et certains composés perfluorés. Bien que leur responsabilité reste encore l'objet de débats et de controverses en médecine humaine, il est de plus en plus vraisemblable qu'ils interviennent comme facteurs de risque dans de nombreuses pathologies chroniques telles l'insulino-résistance, le diabète, l'obésité ou la stéatose hépatique non alcoolique. »*

L'obésité et le diabète de type 2 présentent une prévalence en augmentation à travers le monde. Ces pathologies sont considérées aujourd'hui comme une véritable pandémie.

Ces augmentations s'expliquent en partie par les prédispositions génétiques et les modifications de style de vie (sédentarité, excès et déviances nutritionnelles). Cependant ces facteurs ne semblent pas être suffisants pour expliquer cette croissance exponentielle.

L'exposition aux perturbateurs endocriniens, dont le bisphénol A et les phtalates, participe très vraisemblablement à cette évolution.

De plus, de fortes corrélations ont été rapportées chez des populations américaines et chinoises, de façon transversale, entre le taux urinaire de BPA ou de phtalates et la présence de diabète. Le suivi d'infirmières américaines de façon prospective a permis de prédire 15 ans à l'avance la survenue de Diabète de Type 2, en prenant en compte un ensemble de facteurs de risque dont l'obésité.

Une étude française a retrouvé une relation dose-réponse non monotonique en U inversé entre le bisphénol urinaire chez la mère et le poids du nouveau-né (18). Chez la femme adulte, le taux sanguin de BPA est significativement plus élevé en cas de syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), endocrinopathie gynécologique très fréquente (19) associant obésité et insulinorésistance avec laquelle il est corrélé.

Cela peut être une conséquence d'une exposition au distilbène, durant le développement au cours de la grossesse.

Une exposition prénatale ou néonatale chez la souris à des faibles doses de BPA entraîne une augmentation du poids des animaux adultes, variable selon le sexe, un syndrome métabolique avec insulino-résistance périphérique (foie, muscle, tissu adipeux) et à la longue, une altération de la sécrétion pancréatique conduisant au DT2.

L'utilisation *in vitro* de cultures de fibroblastes, d'adipocytes et de cellules pancréatiques murines a permis de mettre en évidence les effets à faibles doses.

La répétition de ces expériences sur des cellules adipeuses et pancréatiques humaines avec des résultats strictement identiques en renforce la plausibilité et conduit à considérer aujourd'hui l'exposition chronique à faibles doses au BPA et aux phtalates – en particulier au cours du développement foetal – comme un facteur de risque d'exacerbation et d'accélération dans le développement de l'obésité du syndrome métabolique et l'insulinorésistance, ainsi que du DT2. (51)

Les perturbateurs endocriniens peuvent être retrouvés dans des produits de consommation courante, notamment dans l'alimentation, les plastiques, les dispositifs médicaux, médicaments, mais également les jouets pour enfants, les vêtements, produits ménagers, et les cosmétiques. On peut les retrouver aussi dans les produits de traitement comme les pesticides et biocides répartis dans l'environnement (air, sol, eau).

Ils peuvent provenir de produits naturels comme les phytoestrogènes tel que le soja qui ont des effets semblables à ceux des œstrogènes ou synthétiques provenant de l'industrie.

On retrouve parmi ces substances les polychlorobiphényles (PCB), les polybromobiphényles (PBB) et les dioxines. Le bisphénol A dans les plastiques, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) (pesticides), la vinclozoline (fongicides) et le diéthylstilbestrol (DES) (agents pharmaceutiques) sont d'autres exemples de perturbateurs endocriniens.

En Mai 2019, la Commission Européenne a publié un appel à données sur 14 ingrédients utilisés en cosmétique et soupçonnés d'avoir des propriétés de perturbateurs endocriniens. Benzophenone-3, kojic acid, 4-methylbenzylidene camphor, propylparaben, triclosan, resorcinol, octocrylene, triclocarban, butylated hydroxytoluene (BHT), benzophenone, homosalate, benzyl salicylate, genistein and daidzein. Ces 14 ingrédients font partie du groupe A, c'est-à-dire les substances à évaluer prioritairement. Le groupe B contient 14 autres substances à évaluer ensuite. (20)

La Commission Européenne demande l'envoi de toute information pertinente de la part de toutes les parties intéressées, y compris les instituts de recherches universitaires, les autorités des pays de l'UE, les fabricants de produits cosmétiques, les producteurs des substances concernées et les associations de consommateurs.

Ces informations et avis seront évalués par le CSSC (Comité Scientifique Européen pour la Sécurité des Consommateurs), comité européen composé de 17 experts, pour la plupart spécialisés en chimie et toxicologie.

Ce comité scientifique émet des avis sur les risques sanitaires et de sécurité, plus particulièrement sur les risques chimiques, biologiques et tous les risques physiques des produits de consommation non alimentaires. Cela concerne par exemple les produits cosmétiques et leurs ingrédients, l'habillement, les produits à usage domestique, ou les tatouages.

Les avis émis par le comité sont généralement issus d'une requête émise par la Commission Européenne, ils peuvent néanmoins publier des déclarations de leur propre initiative. Les avis et déclarations émis par ce comité sont souvent à l'origine des évolutions futures de la réglementation européenne.

II. CONTEXTE REGLEMENTAIRE

A. REGLEMENTATIONS EXISTANTES

1. REGLEMENT COSMETIQUES

Le règlement sur les cosmétiques N°1223/2009 ne contient aucune disposition spécifique concernant les perturbateurs endocriniens. Il prévoit cependant une révision pour les perturbateurs endocriniens lorsque des critères d'identification auront été adoptés :

Article 15.4 :

« *Lorsque des critères convenus par la Communauté ou au niveau international pour l'identification des substances présentant des propriétés perturbant le système endocrinien sont disponibles, ou au plus tard le 11 janvier 2015, la Commission révise le présent règlement en ce qui concerne les substances présentant des propriétés perturbant le système endocrinien.* ».

En 2018, la Commission Européenne a publié un avis sur le règlement cosmétique, où il est dit que, contrairement aux CMR (Cancérogènes, Mutagènes, Reprotoxiques), le règlement cosmétique ne prévoit pas spécifiquement de conséquences réglementaires pour les perturbateurs endocriniens. Toutefois, les substances identifiées ou considérées comme des perturbateurs endocriniens potentiels qui ont été classées comme CMR doivent être interdites en vertu de l'article 15, à moins qu'une dérogation spécifique ne soit pleinement justifiée et approuvée scientifiquement par le CSSC. Pour les substances autres que les CMR qui sont identifiées ou considérées comme des perturbateurs endocriniens potentiels, les dispositions de l'article 31 visant à interdire ou à restreindre leur utilisation s'appliqueraient à la suite d'une évaluation des risques lorsqu'il existe un risque potentiel pour la santé humaine identifié. Dans la procédure d'évaluation des risques pour les substances utilisées comme ingrédients cosmétiques, le CSSC prend également en compte l'évaluation de l'exposition pour des groupes vulnérables spécifiques, tels que les enfants et les femmes enceintes. Ceci est essentiel car les produits cosmétiques sont des produits de consommation utilisés par toute la population chaque jour.

Par conséquent, selon la Commission Européenne, le règlement sur les cosmétiques fournit les outils adéquats pour réglementer l'utilisation de substances cosmétiques qui présentent un risque potentiel pour la santé humaine et pour prendre les mesures réglementaires appropriées

sur la base d'une évaluation scientifique des données disponibles concernant la santé humaine. (CE, 2018). (21)

Lorsque l'évaluation de la sécurité du CSSC conclut à un risque pour la santé humaine des substances considérées comme des perturbateurs endocriniens potentiels, la Commission est en mesure de prendre les actions appropriées pour interdire ou restreindre l'utilisation de ces substances dans les cosmétiques au cas par cas.

2. REGLEMENT REACH

L'encadrement des produits chimiques en Europe est régi par le règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals), règlement (CE) N° 1907/2006 du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances. Le règlement « *REACH* » est entré en vigueur le 1er juin 2007. Ce texte constitue le cadre législatif pour la fabrication et l'utilisation des produits chimiques en Europe. Il vise à transférer, des pouvoirs publics à l'industrie (fabricants, importateurs, metteurs sur le marché ou utilisateurs des substances), la responsabilité de veiller à ce que les produits chimiques produits, importés, vendus et utilisés dans l'Union Européenne soient sûrs. Les quantités fabriquées ou importées doivent dépasser le seuil de une tonne par an pour être soumises au règlement. (22)

Ce règlement s'applique à tous les Etats Membres. Il impose aux fabricants et importateurs de produits chimiques d'identifier les dangers associés à leurs substances, d'évaluer les risques potentiels et d'indiquer les mesures à prendre pour écarter tout dommage pour la santé et l'environnement.

Ses objectifs sont pluriels : il vise à assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement, ainsi que la libre circulation des substances, tout en améliorant la compétitivité et l'innovation. Il a également pour objectif de promouvoir des méthodes alternatives aux essais sur les animaux.

Il impose aux industriels du secteur plusieurs obligations : collecter les informations en matière de sécurité chimique, concevoir et mettre en œuvre les mesures de gestion du risque appropriées, communiquer ces mesures aux utilisateurs des substances et documenter les procédures suivies dans le dossier d'enregistrement déposé auprès de l'European Chemicals Agency (ECHA).

Selon la dangerosité et le « *caractère préoccupant* » des substances, deux modes de gestion du risque sont possibles :

- Les restrictions servent généralement à limiter ou à interdire la fabrication, la mise sur le marché (y compris l'importation) ou l'utilisation d'une substance, mais elles peuvent aussi imposer des conditions pertinentes, comme des mesures techniques ou des étiquetages spécifiques. Une restriction peut s'appliquer à toute substance en elle-même, à un mélange de substances ou à une substance dans un article, y compris celles qui n'exigent pas d'enregistrement, par exemple, les substances fabriquées ou importées dans une quantité inférieure à une tonne par an ou certains polymères. Les substances utilisées en tant qu'intermédiaires restant sur le site, les substances utilisées dans le cadre de recherche et développement scientifiques, ainsi que les substances qui ne présentent des risques pour la santé humaine que lorsqu'elles sont utilisées dans des cosmétiques, ne font pas partie des substances pour lesquelles des restrictions REACH s'appliquent.
- La procédure d'autorisation a pour objectif de veiller à ce que les substances extrêmement préoccupantes (SVHC) soient progressivement remplacées par d'autres substances ou technologies moins dangereuses lorsque des solutions de remplacement appropriées économiquement et techniquement viables existent. La procédure d'autorisation débute lorsqu'un État membre ou l'ECHA, à la demande de la Commission, propose d'identifier une substance comme étant une SVHC.

Actuellement, il n'existe pas de liste consensuelle de perturbateurs endocriniens avérés, mais plusieurs listes élaborées par des organismes différents sont disponibles.

Les organismes ayant compilé des listes de substances suspectées d'avoir des effets perturbateurs endocriniens ou recensant les études ayant conclu à des effets perturbateurs endocriniens sont principalement :

– *The Endocrine Disruption Exchange* – TEDX, une organisation scientifique à but non lucratif. La liste de la base de données TEDX, programme basé aux États-Unis, recense 1 482 « *perturbateurs endocriniens potentiels* » dont 234 utilisés dans les plastiques et caoutchoucs ;

– La Commission européenne, qui a établi des listes de substances prioritaires à évaluer ;

– Le Centre commun de recherche (JRC), qui est le service scientifique interne de la Commission européenne, et a établi la base de données *Endocrine Active Substances Information System* (EASIS).

– D'autres listes de produits chimiques permettant d'identifier les produits chimiques dangereux, non uniquement centrées sur les perturbateurs endocriniens, les ont également recensés et identifiés. Ainsi, l'*International Chemical Secretariat* (Chemsec), association indépendante suédoise visant à la substitution des substances chimiques dangereuses, a établi la « *Chemsec'SIN LIST* » qui regroupe 931 substances, dont 127 perturbateurs endocriniens.

Les listes ayant force réglementaire dans le cadre de la réglementation de l'usage des produits chimiques (la réglementation REACH), sont établies par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA), sur la base des travaux des autorités des États membres. Les travaux menés dans ce cadre ont permis l'identification de substances surveillées (liste des substances extrêmement préoccupantes – *substances of very high concern* dites « SVHC ») en vue de les inclure dans un processus de demande d'autorisation de mise sur le marché sur le motif de propriétés perturbatrices endocriniennes identifiées pour la santé ou l'environnement, ou dans un processus de restriction des usages. Cette liste est disponible sur le site internet de l'Agence européenne des produits chimiques. L'annexe XIV au règlement dresse la liste des substances soumises à autorisation et l'annexe XVII, celle des substances soumises à restriction.

Le dernier plan d'action continu communautaire pour l'évaluation des substances (Community Rolling Action Plan - CoRAP), établi dans le cadre de la réglementation REACH, sur la période 2019-2021, précise que les États membres évalueront 31 substances en 2019, puis 44 en 2020 et 25 en 2021. Les États membres contribuent à l'élaboration du CoRAP en proposant des substances. L'évaluation de ces 100 substances chimiques sur 3 ans a été confiée à 19 États membres.

Seize substances sont incluses dans la liste des substances candidates à une mesure d'autorisation du fait de leurs propriétés de perturbateur endocrinien (principalement des phtalates et des phénols, dont le BPA. Deux nouveaux phénols ont été ajoutés en raison de propriétés de perturbateur endocrinien en juillet 2019). Douze ont des propriétés de perturbateur endocrinien pour l'environnement et 6 des propriétés de perturbateur endocrinien pour la santé

humaine (certaines sont présentes dans les deux catégories). Les substances sont listées en annexe.

À ce jour, les substances figurant dans la liste des SVHC au titre de leur caractère de perturbateur endocrinien sont très peu nombreuses. Mais plusieurs classements récents de substances ayant des propriétés de perturbateur endocrinien peuvent donner à penser que la problématique prend de l'ampleur.

3. REGLEMENT CLP

Le règlement CLP (règlement n°1272/2008 CLP qui aligne l'ancienne législation de l'UE sur le SGH (système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques), un système mis en place par les Nations Unies pour identifier les produits chimiques dangereux et informer les utilisateurs de ces dangers) impose un étiquetage spécifique pour les substances CMR 1A et 1B dont certaines sont des perturbateurs endocriniens potentiels.

Il requiert que les fabricants, les importateurs ou les utilisateurs en aval de substances ou de mélanges procèdent à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage de leurs produits chimiques dangereux de manière appropriée avant leur mise sur le marché.

L'un des principaux objectifs du CLP est de déterminer si une substance ou un mélange présente des propriétés qui conduisent à une classification comme substance ou mélange dangereux. Dans ce contexte, la classification est le point de départ de la communication relative au danger.

Lorsque des informations pertinentes (par exemple, des données toxicologiques) sur une substance ou un mélange répondent aux critères de classification du CLP, les dangers d'une substance ou d'un mélange sont identifiés en attribuant une certaine classe et catégorie de danger. Les classes de danger du CLP couvrent les dangers physiques, les dangers pour la santé, les dangers pour l'environnement et des dangers supplémentaires.

Une fois qu'une substance ou un mélange est classé, les dangers identifiés doivent être communiqués aux autres acteurs de la chaîne d'approvisionnement, y compris les consommateurs. L'étiquetage des dangers permet de communiquer la classification des dangers à l'utilisateur d'une substance ou d'un mélange, grâce aux étiquettes et aux fiches de données de

sécurité, et de l'alerter de la présence d'un danger ainsi que de la nécessité de gérer les risques qui en résultent. (23)

4. REGLEMENT PESTICIDES ET BIOCIDES

A ce jour, seuls les règlements sur les produits phytopharmaceutiques et biocides prévoient de manière explicite le principe d'exclusion des perturbateurs endocriniens.

Le règlement (CE) n°1107/2009 du 21 octobre 2009 établit les règles régissant l'autorisation des phytopharmaceutiques, la mise sur le marché, l'utilisation et le contrôle de ceux-ci à l'intérieur de l'Union Européenne. Il stipule notamment qu'une substance active ne peut être approuvée que si elle n'est pas considérée comme ayant des effets perturbateurs sur le système endocrinien, pouvant être néfastes pour l'homme, à moins que l'exposition à cette substance ne soit négligeable. Ce règlement se réfère au principe de précaution, en faisant prévaloir la notion de danger sur celle du risque (sans considération de la dose) (24) :

Annexe 2 3.6.5 de ce règlement : « *Une substance active, un phytoprotecteur ou un synergiste n'est approuvé(e) que si, sur la base de l'évaluation d'essais fondés sur des lignes directrices adoptées au niveau communautaire ou international ou d'autres données et informations disponibles, notamment une analyse de la documentation scientifique examinée par l'Autorité, il/elle n'est pas considéré(e) comme ayant des effets perturbateurs endocriniens pouvant être néfastes pour l'homme, à moins que l'exposition de l'homme à cette substance active, ce phytoprotecteur ou ce synergiste contenu dans un produit phytopharmaceutique ne soit négligeable dans les conditions d'utilisation réalistes proposées, c'est-à-dire si le produit est mis en œuvre dans des systèmes fermés ou dans d'autres conditions excluant tout contact avec l'homme et si les résidus de la substance active, du phytoprotecteur ou du synergiste en question dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux ne dépassent pas la valeur par défaut fixée conformément à l'article 18, paragraphe 1, point b), du règlement (CE) no 396/2005.* »

Le règlement n° 528/2012 du 22 mai 2012 concerne la mise sur le marché et l'utilisation des produits biocides (employés dans les soins aux cultures agricoles). Selon ce texte, ne sont pas approuvées les substances actives qui sont considérées comme ayant des propriétés perturbant le système endocrinien pouvant être néfastes pour l'homme. (25)

Article 5, petit d : « *les substances actives qui, sur la base des critères établis en vertu du paragraphe 3, premier alinéa, ou, en attendant que soient adoptés ces critères, sur la base des indications données au paragraphe 3, deuxième et troisième alinéas, sont considérées comme ayant des propriétés perturbant le système endocrinien pouvant être néfastes pour l'homme, ou qui sont désignées en tant que substances possédant des propriétés perturbant le système endocrinien conformément à l'article 57, point f), et à l'article 59, paragraphe 1, du règlement (CE) no 1907/2006;* »

Cependant, la substance peut être approuvée selon certaines dérogations :

« *2. Sans préjudice de l'article 4, paragraphe 1, les substances actives visées au paragraphe 1 du présent article peuvent être approuvées s'il est démontré qu'au moins une des conditions suivantes est remplie :*

a) le risque que représente pour les êtres humains, les animaux ou l'environnement une exposition à la substance active contenue dans un produit biocide, dans les conditions réalistes les plus défavorables d'utilisation, est négligeable, notamment lorsque le produit est utilisé dans des systèmes fermés ou dans d'autres conditions qui visent à exclure tout contact avec l'homme et la dissémination dans l'environnement ;

b) il est établi, sur la base d'éléments de preuve, que la substance active est indispensable pour prévenir ou combattre un risque grave pour la santé humaine, pour la santé animale ou pour l'environnement ; ou

c) la non-approbation de la substance active aurait des conséquences négatives disproportionnées pour la société par rapport aux risques que son utilisation représente pour la santé humaine, pour la santé animale et pour l'environnement. »

Dans les domaines des biocides et des produits phytopharmaceutiques, les perturbateurs endocriniens, y compris ceux qui ne sont pas classés comme CMR ne devraient pas être approuvés sauf dérogations limitées.

Actuellement, les différentes réglementations existantes ne permettent pas une application homogène de l'identification des perturbateurs endocriniens pour une même substance.

5. REGLEMENTATION ETATS UNIS

Les États-Unis réglementent les perturbateurs endocriniens sur la base de l'évaluation des risques, c'est-à-dire en considérant à la fois le danger et les niveaux d'exposition attendus. Les différentes agences chargées de la sécurité des produits pharmaceutiques et des aliments (FDA), de l'environnement et de la santé (EPA), des produits de consommation (CPSC) de la santé et de la sécurité en milieu professionnel (OSHA) ne proposent pas directement d'encadrement des perturbateurs endocriniens. (26)

L'article 408 (p) de la Loi fédérale sur les médicaments et cosmétiques alimentaires (FFDCA, pour Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) impose à l'Agence de protection de l'environnement (EPA, pour Environmental Protection Agency) d'élaborer un programme de criblage des composés oestrogéniques, et lui confère autorité pour la suspension d'autorisation de commercialisation des substances qui ne se conformeraient pas aux exigences édictées dans le cadre de ce programme (EDSP, pour Endocrine Disruptors Screening Program). (26)

Des lignes directrices OCDE ont été élaborées en 2012 et mises à jour en 2018, pour standardiser les tests et ainsi permettre une interprétation pertinente des résultats (OCDE 150). (27)

Dans le cadre du programme EDSP, l'EPA utilise une approche à deux niveaux pour détecter les éventuels effets perturbateurs endocriniens. Les données de dépistage de niveau 1 sont utilisées pour identifier les substances susceptibles d'interagir avec le système endocrinien. Les produits chimiques qui passent par le dépistage de niveau 1 et qui présentent un potentiel d'interaction avec les systèmes d'oestrogène, d'androgène ou d'hormone thyroïdienne passeront au niveau 2 pour les tests. Les données des tests de niveau 2 identifient tout effet indésirable lié au système endocrinien causé par la substance et établissent une relation quantitative entre la dose et cet effet indésirable. Les résultats des tests de niveau 2 seront combinés avec d'autres informations sur les dangers et une évaluation de l'exposition à un produit chimique donné, ce qui entraînera une évaluation des risques. Les évaluations des risques sont utilisées pour éclairer les mesures d'atténuation des risques, si nécessaire, et les décisions réglementaires concernant les produits chimiques.

Le dépistage de niveau 1 de l'EDSP est utilisé pour déterminer si les produits chimiques ont le potentiel d'interagir avec les voies hormonales du système endocrinien du corps - les voies

œstrogènes, androgènes, stéroïdogéniques et thyroïdiennes. Onze tests, cinq *in vitro* (systèmes cellulaires) et six *in vivo* (animal vivant) sont utilisés pour déterminer si ces produits chimiques interagissent avec ces trois voies hormonales. Les résultats de ces données sont examinés ainsi que d'autres informations scientifiquement pertinentes, y compris des données générales sur la toxicité et des études bibliographiques ouvertes de qualité suffisante.

Group A - EDSP Tier 1 Test Guidelines

890.1100 – Amphibian Metamorphosis (Frog)
890.1150 – Androgen Receptor Binding (Rat Prostate)
890.1200 – Aromatase (Human Recombinant)
890.1250 – Estrogen Receptor Binding
890.1300 – Estrogen Receptor Transcriptional Activation (Human Cell Line HeLa-9903)
890.1350 – Fish Short-Term Reproduction
890.1400 – Hershberger (Rat)
890.1450 – Female Pubertal (Rat)
890.1500 – Male Pubertal (Rat)
890.1550 – Steroidogenesis (Human Cell Line – H295R)
890.1600 – Uterotrophic (Rat)

Group B - EDSP Tier 2 Test Guidelines

890.2100 – Avian Two-Generation Toxicity Test in the Japanese Quail
890.2200 – Medaka Extended One Generation Reproduction Test
890.2300 – Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)

B. DOCUMENTS DE REFERENCE

1. 2E STRATEGIE NATIONALE SUR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

En Avril 2014, la première Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE 1) a été adoptée par le Gouvernement, une première au niveau mondial. (28)

Cette stratégie, qui fixe comme objectif premier la réduction de l'exposition de la population et de l'environnement aux perturbateurs endocriniens, s'articule autour de quatre axes :

1. Recherche, valorisation, surveillance ;
2. Expertise sur les substances ;
3. Réglementation et substitution des perturbateurs endocriniens ;
4. Formation et information.

Elle a été évaluée par une mission conjointe de trois inspections générales (CGAER, CGEDD, IGAS), qui a remis un rapport sur sa mise en œuvre et des recommandations au Gouvernement en février 2018.

La deuxième Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE 2) structure les actions nationales relatives aux perturbateurs endocriniens et assure leur pleine cohérence avec le cadre européen. La Commission européenne a publié le 7 novembre 2018 une communication sur sa stratégie pour minimiser l'exposition des Européens aux perturbateurs endocriniens.

La SNPE 2 a pour objectif principal la réduction de l'exposition des populations et de l'environnement aux perturbateurs endocriniens, ce qui conforte l'objectif premier de la SNPE 1.

Réduire la présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement suppose de collecter des données sur l'imprégnation des différents milieux pour pouvoir agir à la source. L'accélération de l'expertise de substances et de leur encadrement par les règlements européens sur les substances chimiques, à la lumière des connaissances scientifiques, permettra de substituer et d'interdire celles dont le caractère de perturbateur endocrinien est avéré ou présumé, et d'encadrer par des mesures de prévention et de précaution l'utilisation de celles dont le caractère est suspecté, et donc d'agir à la source.

Dans certains cas, la contamination des écosystèmes est déjà avérée. Il convient alors de réfléchir aux moyens de les détoxifier et de les protéger. La SNPE 2 inscrit cette détoxification comme un axe de progrès.

Les formations initiales et continues des professionnels (de santé et des professionnels manipulant et/ou travaillant en contact avec des produits perturbateurs endocriniens, par exemple dans les écoles d'ingénieurs, les écoles vétérinaires et les lycées agricoles) mais aussi l'information des jeunes à l'école doivent évoluer pour mieux prendre en compte les perturbateurs endocriniens. L'action collective est prioritaire sur la question des perturbateurs endocriniens, sachant également que chacun à son échelle peut aussi devenir acteur de la réduction des expositions à ces substances.

Enfin, il est nécessaire de renforcer les connaissances actuelles sur les perturbateurs endocriniens.

Les 3 objectifs de la SNPE 2 :

- Former et informer
- Protéger l'environnement et la population
- Améliorer les connaissances sur les perturbateurs endocriniens

AXE 1 : FORMER ET INFORMER

Continuer l'évaluation de substances PE en prenant en compte à la fois leur impact sur la santé et l'environnement :

Le partenariat et la mobilisation des agences nationales dans le cadre de l'expertise réglementaire européenne devra être renforcé.

L'ANSES expertisera au moins 6 substances par an en 2020 (9 par an à partir de 2021) dont au moins 3 substances au titre de REACH et au moins 3 substances biocides ou phytopharmaceutiques. Elle proposera quand elle juge les données suffisantes, la reconnaissance de substances comme perturbatrices du système endocrinien au titre des règlements européens. Elle définira une méthode de priorisation des substances potentiellement PE, afin d'établir une liste d'évaluations à mener mais également d'informer les citoyens ainsi que les parties prenantes.

La collaboration entre l'ANSES et l'ANSM sera renforcée concernant les produits de santé et les cosmétiques. Les deux agences auront pour mission commune de dresser le bilan des substances qui peuvent présenter des propriétés de PE pour l'Homme et pour l'environnement dans les cosmétiques, les dispositifs médicaux et les médicaments. Elles recommanderont ensuite les mesures possiblement envisagées pour les règlements de chacun de ces produits.

Sensibiliser et informer les acteurs et les citoyens :

De nos jours, les citoyens ont de fortes attentes d'information concernant l'exposition aux produits chimiques via les produits de consommation courante. Les actions proposées visent donc à apporter aux citoyens ainsi qu'aux acteurs de la prévention les informations scientifiques les plus récentes disponibles sur ce sujet de façon claire, utile et vérifiable (mise en place d'un étiquetage commun au niveau européen, bonnes pratiques pour réduire son exposition aux PE), à expliquer les règlementations en vigueur ainsi que les différentes actions menées de la part des institutions en matière de sécurité et de santé ; encourager à la sensibilisation dans différents secteurs tels que les établissements de santé, les établissements scolaires, les entreprises etc.

Former pour renforcer la prévention des expositions aux PE :

L'objectif est de renforcer la formation sur les perturbateurs endocriniens, d'une part, auprès des professionnels de santé, et de ceux en contact avec les personnes les plus vulnérables à l'exposition aux perturbateurs endocriniens ; et d'autre part auprès des professionnels susceptibles de manipuler ou d'être exposés à des substances chimiques potentiellement perturbatrices endocriniennes dans le cadre de leur travail (professionnels du bâtiment, agriculteurs, architectes, etc.).

AXE 2 : PROTEGER L'ENVIRONNEMENT ET LA POPULATION

Recueillir des données sur l'imprégnation des milieux

Le but ici est d'améliorer nos connaissances sur l'imprégnation de l'environnement par les perturbateurs endocriniens, selon les différents compartiments environnementaux et les différentes sources d'exposition.

Une synthèse des connaissances des effets des substances aux propriétés de PE présentes dans l'environnement devra être menée, pour appréhender les effets des perturbateurs endocriniens sur la biodiversité, et mettre en avant les déficits en termes de connaissances limitant l'évaluation des risques et la gestion des PE.

L'ANSES a également pour mission de consacrer un volet spécifique aux PE dans les nouvelles études d'alimentation totale, l'alimentation étant une voie d'exposition de la population aux PE.

Prémunir les écosystèmes de l'impact des PE et optimiser leurs capacités de détoxification

Des mesures de décontamination des milieux devraient être mises en place (suppression/ réduction de l'imprégnation du milieu) ; tout en sachant que la décontamination totale est difficile voire impossible à atteindre. Un des objectifs est donc de hiérarchiser les traitements à mettre en place sur les milieux en fonction des impacts estimés sur la biodiversité mais également sur la santé publique. La gestion des déchets vecteurs ou précurseurs de PE est donc un sujet essentiel.

Adapter le cadre règlementaire aux PE en vue de disposer d'outils effectifs

Une réflexion est actuellement en cours pour disposer d'une définition des perturbateurs endocriniens, commune à tous les règlements. Cette définition devrait permettre de discriminer les niveaux de preuve selon les connaissances scientifiques en trois catégories (avérés, présumés, suspectés) comme pour les substances cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques.

Cette stratégie nationale soutient une approche réglementaire permettant une réduction maximale de l'exposition aux PE ; approche devant être identique à celle des substances les plus dangereuses pour la santé ou l'environnement (cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques et

substances persistantes et bioaccumulables). Cette stratégie visera alors à limiter au maximum l'exposition de la population aux PE.

La règlementation des perturbateurs endocriniens se fera notamment en utilisant des approches par groupe sur la base de structures similaires et/ou propriétés chimiques similaires. Le développement des filières d'élimination des déchets contenant des PE sera encouragé, afin de ne pas recycler et remettre sur le marché des produits contenant des PE. Les normes environnementales seront révisées afin de prendre en compte les connaissances scientifiques actuelles (dont les effets faibles doses et réponses non monotones).

Renforcer le contrôle de l'application de la règlementation et évaluer l'efficacité des règlementations

L'efficacité de la réglementation dépend du niveau de contrôle de l'application. Ce niveau de contrôle est réparti selon les enjeux sanitaires, environnementaux et économiques. Les produits susceptibles de contenir des perturbateurs endocriniens devraient donc faire l'objet d'un niveau de contrôle plus important avec également des prélèvements et mesures afin d'évaluer l'évolution de la concentration des perturbateurs endocriniens dans l'environnement.

Favoriser la substitution

La recherche de solutions alternatives plus sûres est un moteur d'innovation pour les entreprises et pour l'industrie. Les réglementations européennes mentionnant les perturbateurs endocriniens imposent une démarche de substitution et des contrôles pour protéger les travailleurs tout au long de la chaîne d'approvisionnement.

AXE 3 : AMELIORER LA CONNAISSANCE SUR LES PE

Développer les outils et méthodes pour identifier les PE et caractériser leurs effets

L'État soutient la mise en place d'une plateforme publique-privée afin de sélectionner et accompagner la validation des méthodes développées dans les laboratoires de recherche :

Les associations professionnelles France Chimie, la FEBEA ainsi que la Fondation de la Maison de la Chimie, en partenariat avec le ministère de la transition écologique et solidaire, ont

annoncé en 2019 la création de PEPPER, une plateforme publique-privée destinée à développer la recherche sur l'identification des perturbateurs endocriniens. Plusieurs acteurs publics et privés se sont associés pour créer PEPPER, dont l'objectif est de réaliser une « *pré-validation* » des méthodes d'essai en toxicologie et écotoxicologie pertinentes pour caractériser des propriétés de perturbation endocrinienne. L'action de la plateforme conduira à s'assurer que les méthodes répondent à des critères de qualité et à construire des éléments de preuve reconnus internationalement.

Trois fonctions sont assurées et financées par la plateforme :

– l'identification et la documentation de méthodes d'essai matures, scientifiquement fondées et répondant à un besoin en termes d'identification des perturbateurs endocriniens ;

– l'organisation de tests sur ces méthodes, en faisant appel à des laboratoires d'essai, pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité des résultats ;

– l'accompagnement des acteurs pour transmettre aux instances internationales de validation leurs méthodes et les rapports scientifiques requis.

Organiser sur le temps long la recherche sur les PE au niveau national pour accélérer les connaissances

Les organismes de recherche sont encouragés à développer la modélisation dans toutes ses composantes : modélisation des voies d'exposition pour identifier la ou les voies principales, modélisation de la contamination des écosystèmes, modélisation de la cinétique et de la dynamique dans les organismes ; modélisation des effets des perturbateurs endocriniens grâce à la biologie des systèmes ; capacité d'analyse des grands jeux de données. L'ensemble de ces travaux de modélisation apporteront des éléments sur les risques d'exposition, par exemple par l'accumulation dans la chaîne trophique et dans les différents tissus cibles des organismes. Ils permettront aussi de développer des biomarqueurs indicateurs de l'exposition des écosystèmes, et de dangers associés pour la biodiversité.

L'une des actions de cette stratégie est également de mobiliser les grandes cohortes (CONSTANCES, Autisme, E3N, Pélagie, Eden, TiMoun…), les études épidémiologiques ciblées (parmi lesquelles les études nationales sur les pesticides à proximité de zones agricoles)

pour étudier les effets des perturbateurs endocriniens notamment en ayant recours à des approches permettant une caractérisation de l'exposition à des substances souvent peu persistantes dans l'organisme dans les fenêtres développementales et de vie pertinentes. Les cohortes peuvent en effet apporter des arguments en faveur d'une relation causale entre l'exposition aux perturbateurs endocriniens et des pathologies (effets rares et de grande variabilité), arguments qui peuvent être renforcés par des études épidémiologiques ciblées.

Définir et organiser la coordination au niveau national

La mobilisation d'une approche pluridisciplinaire et multi-acteurs a pour objectif de renforcer et mieux coordonner les réseaux existants parmi les établissements de recherche spécialisés et les dispositifs de financements agissant dans ce domaine aux niveaux international, européen et national.

Il est également nécessaire d'organiser une interaction permanente entre, d'une part, les acteurs en charge de la surveillance et de l'expertise, et d'autre part, les acteurs politiques, gestionnaires publics, entreprises et acteurs de la société civile pour contribuer à l'élaboration des orientations de la recherche sur ce thème et pour favoriser sa valorisation.

Mobiliser les moyens

Les moyens doivent être mobilisés prioritairement autour des axes suivants :

- Prise en considération des différents volets de la recherche : depuis la compréhension des mécanismes d'action des substances jusqu'aux aspects opérationnels dans le cadre de la recherche translationnelle ;
- Mise en synergie des moyens mobilisés par les établissements pour promouvoir et faciliter l'émergence de programmes de recherche fédérant des équipes de recherche au niveau européen et international ;
- Développement de l'articulation entre la recherche, les dispositifs de surveillance et l'expertise, notamment à travers le partage des données d'observation et l'utilisation des données de surveillance par les acteurs de la recherche ;

- Proposition d'un financement pérenne de ces projets ambitieux dans l'ensemble des disciplines scientifiques pour permettre aux organismes de recherche de développer leur leadership aux niveaux européen et international dans ce domaine.

Renforcer la surveillance sanitaire et environnementale et développer l'approche clinique

Les surveillances sanitaires et environnementales permettent un suivi des tendances spatiales et temporelles des expositions notamment aux perturbateurs endocriniens et des éventuels effets sanitaires. L'agence Santé Publique France mène depuis plusieurs années deux types d'actions:

- Des actions de surveillance des imprégnations des populations (études de biosurveillance humaine avec dosage de biomarqueurs d'expositions aux substances suspectées d'être à l'origine de perturbations endocriniennes).
- Des actions de surveillance épidémiologique visant à décrire des événements sanitaires en lien avéré ou suspecté avec les perturbateurs endocriniens (survenue de pathologies mais aussi effets précoces détectables biologiquement), afin notamment de surveiller les tendances temporelles et spatiales et d'évaluer l'efficacité des politiques de prévention.

Ces travaux pourront permettre également de mieux appréhender l'existence des inégalités socioéconomiques d'exposition et de poursuivre la surveillance des indicateurs de santé. De nouveaux dispositifs de surveillance de pathologies suspectées d'être en lien avec les perturbateurs endocriniens seront développés.

Enfin, la compilation de ces données de surveillance associée à des investigations sur les mécanismes d'action permettra de décrire au mieux les événements de santé indésirables possiblement en lien avec des perturbateurs endocriniens, et démontrer *in fine* l'impact sanitaire.

2. LIGNE DIRECTRICE OCDE 150

L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) est une organisation internationale qui œuvre pour la mise en place de politiques meilleures. En étroite collaboration avec les pouvoirs publics, les acteurs économiques et sociaux ainsi que les représentants de la société civile, elle établit des normes internationales et propose des solutions fondées sur des données factuelles en réponse aux défis du monde d'aujourd'hui.

En 2002, le cadre conceptuel pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens a été abordé par un groupe d'étude de l'OCDE (EDTA Endocrine disruptor testing and assessment task force).

Les essais évoqués sont des études de différente nature (*in silico, in vitro, in vivo*, de toxicologie, d'écotoxicologie, etc.) dont la méthodologie est dans la majorité des cas standardisée et qui ont fait l'objet d'une procédure de validation.

Ce cadre conceptuel, qui a vocation à évoluer lors de révisions régulières, unifie les pratiques au niveau européen et permet de disposer d'une méthodologie robuste d'autant plus lorsqu'elle est appliquée à de nouvelles substances.

Le cadre conceptuel est destiné à fournir un guide des tests disponibles qui peut fournir des informations pour l'évaluation des perturbateurs endocriniens mais n'est pas destiné à être une stratégie de test.

De plus, l'évaluation de l'exposition n'est pas comprise dans ce cadre conceptuel, or, celle-ci est nécessaire pour décider si des tests supplémentaires sont nécessaires.

Dans sa ligne directrice OCDE 150 (2018), L'OCDE présente 5 niveaux de tests différents d'investigation pour la détection des produits chimiques perturbateurs endocriniens.

- Les tests de niveau 1 :

  Regroupent les données existantes et modèles informatiques concernant les substances et leurs mécanismes telles que les données physico-chimiques, issues de la littérature, mais aussi des méthodes alternatives informatiques et statistiques *in silico* tel que le modèle de relation quantitative structure-activité ou (Q)SAR qui est un modèle mathématique utilisé pour prédire les propriétés physico-chimiques, biologiques et le devenir dans l'environnement des composés à partir d'un ou plusieurs paramètres quantitatifs, qui sont

dérivés de structures chimiques. La validation des modèles repose sur cinq grands principes mis en place par l'OCDE (OCDE, 2014) :

- Une propriété ciblée définie ;
- Un algorithme sans équivoque ;
- Un domaine d'applicabilité défini ;
- Des mesures appropriées de la qualité d'ajustement, de robustesse et du pouvoir prédictif ;
- Une interprétation des mécanismes sous-jacents.

Il existe plusieurs bases de données de modèles (Q)SAR qui regroupent beaucoup de molécules et permettent une prédiction des propriétés potentielles de molécules d'intérêt.

La lecture croisée ou « *read-across* » est un autre type d'approche prédictive qui repose sur la même hypothèse qui caractérise la modélisation (Q)SAR. C'est une technique de prédiction d'une donnée inconnue d'une substance (substance cible), en utilisant les données d'une autre substance (substance source). Ceci permet d'identifier des molécules similaires qui partagent le même mécanisme d'action.

- Les tests de niveau 2 :
  Regroupent les essais *in vitro* renseignant sur des mécanismes/voies de signalisation de la substance. Ils donnent des informations sur ce qu'il se passe au niveau de la cellule, au niveau des chaînes de signalisation, du taux d'hormones. Il est recommandé de réaliser une batterie de tests pour pouvoir déterminer les activités endocriniennes d'une substance.

- Les tests de niveau 3 :
  Regroupent les essais *in vivo* renseignant sur des mécanismes/voies de signalisation servant à détecter une éventuelle perturbation endocrinienne et fournir des réponses claires sur la capacité d'un produit chimique à interagir avec les modalités « *médiées par l'EATS »* examinant les altérations des tissus endocriniens.

- Les tests de niveau 4 :
  Regroupent les essais *in vivo* renseignant sur les effets néfastes au niveau de l'organisme entier.

- Les tests de niveau 5 :

  Regroupent les essais *in vivo* renseignant sur les effets indésirables des perturbateurs endocriniens sur le cycle de vie des organismes. Ces deux derniers niveaux (4 et 5) sont principalement des méthodes sur la toxicité pour le développement, la toxicité pour la reproduction, la cancérogénicité et les effets (sub)aigus et (sub)toxicité chronique à doses répétées.

3. LIGNE DIRECTRICE EFSA/ECHA

La commission européenne a demandé à l'Autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA) et à l'Agence Européenne des produits chimiques (ECHA) de développer une ligne directrice d'identification des perturbateurs endocriniens pour les biocides et pesticides. Cette ligne directrice décrit comment regrouper, évaluer et considérer toutes les informations pertinentes pour l'évaluation, établir une analyse du mode d'action (MoA), appliquer un poids de l'évidence (Weight of Evidence ou WoE) afin de qualifier une substance de PE ou non (EFSA/ECHA, 2018). (29)

Pour l'instant, la ligne directrice ne traite que les modalités oestrogéniques, androgéniques, stéroïdogéniques et thyroïdiennes (EATS) car leurs mécanismes d'action sont bien connus. On retrouve des tests validés *in vitro* et *in vivo* dans la ligne directrice 150 de l'OCDE.

Selon cette ligne directrice, une substance a des propriétés de perturbateur endocrinien si elle répond aux critères de la définition de l'OMS.

Toutes les données scientifiques pertinentes disponibles doivent être considérées dans l'évaluation des substances, et l'application d'un poids de l'évidence pour l'évaluation de ces données scientifiques est primordiale.

La stratégie générale d'évaluation de l'EFSA/ECHA inclut :

- La réunion des informations : toute information pertinente est recueillie en termes de donnée scientifique. Donc on doit considérer tout type de donnée du moment qu'elle est pertinente et fiable.
- L'évaluation de la preuve : assemblage de l'information dans des « *lignes de preuve* », intégration des informations sur l'activité endocrinienne et l'effet indésirable. C'est un

ensemble d'informations pertinentes groupées pour évaluer une hypothèse. Les paramètres sont groupés sur leur potentiel à informer sur les modalités EATS.

- L'analyse initiale de la preuve : inclut un arbre décisionnel avec différents scénarios possibles. Les scénarios sont conduits par des paramètres médiés par EATS disponibles et la preuve de l'activité endocrinienne. Ils fournissent une indication à l'évaluateur et au fabricant des situations où la preuve disponible permet de conclure que la substance n'a pas les critères requis d'un PE, ou que des informations additionnelles sont nécessaires, ou que le mode d'action est nécessaire pour conclure sur les propriétés PE.
- L'analyse du mode d'action : vise à établir s'il existe un lien plausible entre un EI observé et l'activité endocrinienne. Plusieurs informations sont nécessaires et c'est à l'évaluateur et au fabricant de décider de quelles informations ils auront besoin dans le but d'étudier l'activité endocrinienne, les EI, ou les autres modes d'action alternatifs.
- La conclusion sur les critères PE : toutes les données doivent se trouver dans un document transparent, même s'il persiste des incompréhensions, doutes, incertitudes.

D'après la ligne directrice, les tests à effectuer pour vérifier **l'effet adverse (AE)** lié aux propriétés EATS d'une substance sont les suivants :

- Pour la modalité T : **OCDE 407** (Etude de toxicité orale à doses répétées chez les rongeurs sur 28 jours), **OCDE 408** (sur 90 jours), **OCDE 409** (90 jours chez les non rongeurs), **OCDE 416** (étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations), ou **OCDE 443** (sur une génération), **OCDE 451-3** (étude combinée de toxicité chronique et carcinogénicité). S'il n'y a pas de réaction avec ces études, c'est suffisant pour la modalité T.

- Pour les modalités E, A et S : **OCDE 443** (étude de toxicité de reproduction sur une génération) ou **OCDE 416** (deux générations).

N.B. : l'analyse du danger est toujours basée sur le poids de l'évidence et non pas seulement sur les résultats bruts.

Si l'adversité n'a pas été suffisamment étudiée (et même si aucune adversité n'a été observée), alors l'activité endocrinienne liée à EATS devra être examinée.

D'après la ligne directrice, les tests à effectuer pour vérifier **l'activité endocrinienne** liée aux propriétés EATS d'une substance sont les suivants (figure 5):

La stratégie consiste à effectuer en premier les tests *in vitro* listés :

- Pour E : **ToxCast Estrogen Receptor** (ER) model (intègre 18 tests de criblages mesurant la liaison aux récepteurs, la dimérisation, la liaison à la chromatine, l'activation transcriptionnelle et la prolifération cellulaire) ou **OCDE 455** (Essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur d'œstrogène alpha humain transfecté de façon stable pour la détection de l'activité œstrogénique agoniste des substances testées)
- Pour S : **OCDE 456** (détecte les effets de produits chimiques sur la stéroïdogenèse, en particulier la production de 17β-œstradiol (E2) et de testostérone (T) avec la lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain)
- Pour A : **OCDE 458** (Essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur des androgènes humain transfecté de façon stable pour la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques)
- Pas de test pour T

Si ces tests sont positifs à l'activité endocrinienne, on peut passer directement à la recherche du mode d'action. S'ils sont négatifs, on passe aux tests *in vivo* de niveau 3, afin de confirmer la négativité sur modèles *in vivo* :

- Pour E : **OCDE 440** (Bio-essai utérotrophique chez les rongeurs, basé sur l'augmentation du poids utérin ou de la réponse utérotrophique)
- Pour A : **OCDE 441** (Bio-essai de Hershberger sur le rat fondé sur les variations de poids de cinq tissus dépendant des androgènes)
- Pas de test disponible pour S et T

N.B. : on pourra être susceptible de réaliser d'autres tests (non cités ci-dessus) si le demandeur considère qu'il manque encore des informations.

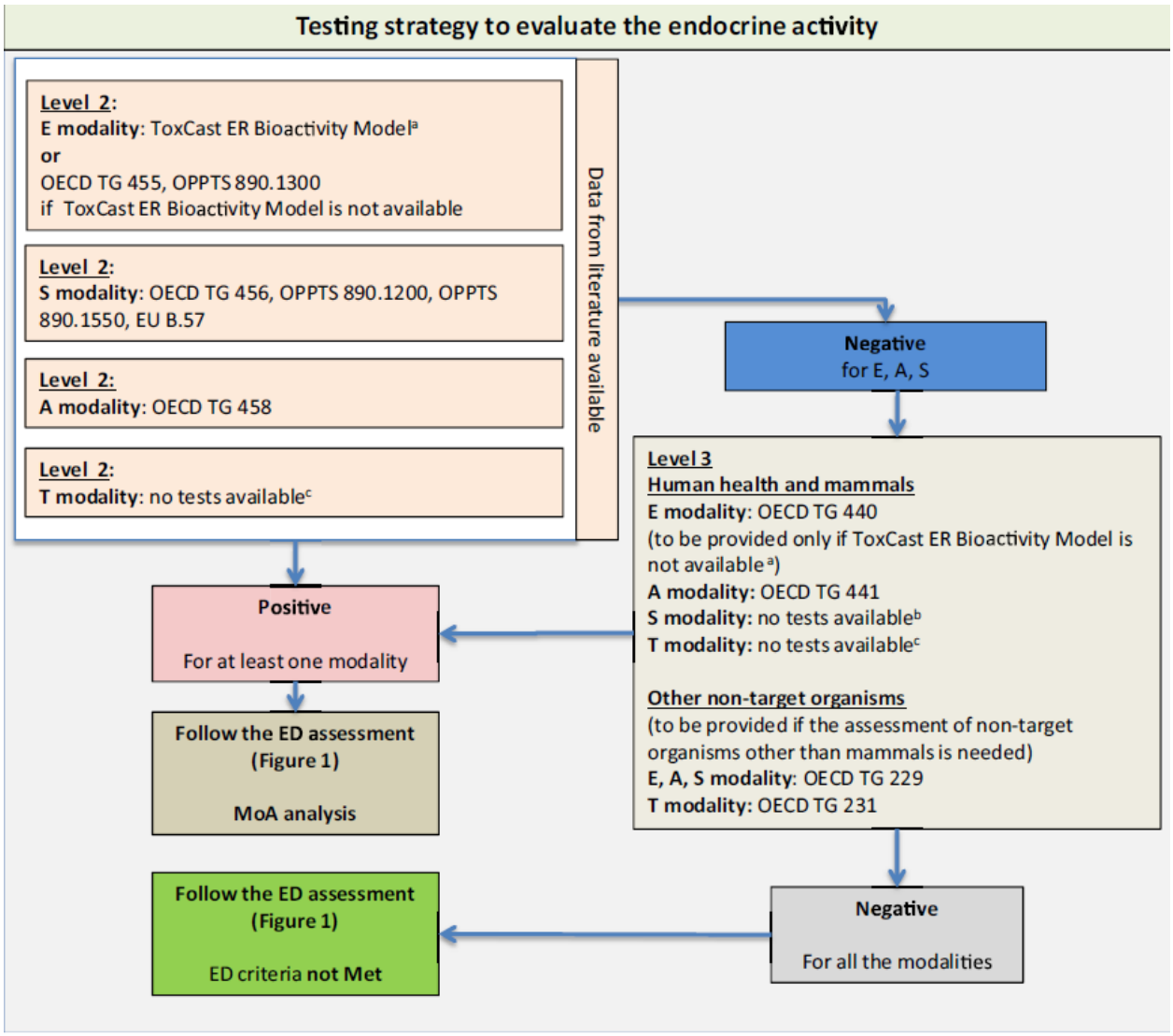

Figure 5 : Stratégie de tests pour l'évaluation de l'activité endocrinienne (Ligne directrice EFSA/ECHA)

La ligne directrice liste plusieurs types de scénarios d'évaluation des propriétés perturbatrices endocriniennes pour une substance (figure 6) :

- Scénarios basés sur le fait que les paramètres EATS ont été suffisamment analysés :
    1) **Scénario 1a :** Pas d'effet adverse indiqué par les paramètres EATS → la substance ne détient pas les critères PE.
    2) **Scénario 1b :** Un effet adverse est indiqué par les paramètres EATS → recherche du MoA

- Scénarios basés sur le fait que les paramètres EATS n'ont pas été suffisamment analysés (situation la plus commune) :
    3) **Scénario 2a :** Pas d'effet adverse mis en évidence par les paramètres EATS, mais ceux-ci n'ont pas été suffisamment analysés (tous les tests n'ont pas été réalisés) ou un effet adverse non spécifique de la perturbation endocrinienne est apparu. On passe alors à la recherche de l'activité endocrinienne :

        i) **Activité endocrinienne observée** : recherche du MoA

        ii) **Pas d'activité endocrinienne observée,** (en ayant suffisamment étudié) : la substance ne détient pas les critères PE

        iii) **Pas d'activité endocrinienne observée, mais pas suffisamment analysée** : plus d'études sont nécessaires pour procéder à une conclusion

    4) **Scénario 2b :** Effet adverse spécifique de la perturbation endocrinienne est observé, mais non suffisamment analysé (tous les tests n'ont pas été réalisés) → Recherche du MoA

Table 5: High level summary of the scenarios, including the next steps in the assessment; for a full description of the scenario, refer to Section 3.4.4

Adversity based on 'EATS-mediated' parameters	Positive mechanistic OECD CF level 2/3 test	Scenario	Next step of the assessment
No (sufficiently investigated)	Yes/No	1a	Conclude: ED criteria not met because there is no 'EATS-mediated' adversity
Yes (sufficiently investigated)	Yes/No	1b	Perform MoA analysis (postulate and document the MoA, see Section 3.5.1)
No (not sufficiently investigated)	Yes	2a (i)	Perform MoA analysis; additional information may be needed for the analysis
No (not sufficiently investigated)	No (sufficiently investigated)	2a (ii)	Conclude: ED criteria not met because no endocrine activity has been observed for the EATS modalities
No (not sufficiently investigated)	No (not sufficiently investigated)	2a (iii)	Generate missing level 2 and 3 information. Alternatively, generate missing 'EATS-mediated' parameters. Depending on the outcome of these tests move to the corresponding scenario
Yes (not sufficiently investigated)	Yes/No	2b	Perform MoA analysis (postulate and document the MoA, see Section 3.5.1)

EATS: Estrogen, androgen, thyroid, steroidogenic; MoA: Mode of action.

Figure 6 : Résumé des scénarios (ligne directrice EFSA/ECHA)

Analyse du Mode d'Action

Quand on a déterminé un effet adverse endocrinien et/ou une activité endocrinienne, on doit ensuite établir le lien entre les deux, basé sur une plausibilité biologique et un support empirique, en utilisant un poids de l'évidence.

Le mode d'action (MoA) est une série d'évènements biologiques (Key Event ou KE) qui résultent en un effet adverse (figure 7). Les KE sont les événements essentiels à l'induction de la réponse toxique. Ils peuvent être placés à différents niveaux d'organisation (cellules, tissus, organes, individu, population). Les différents KE sont reliés entre eux, on appelle cela le Key Event Relationship (KER).

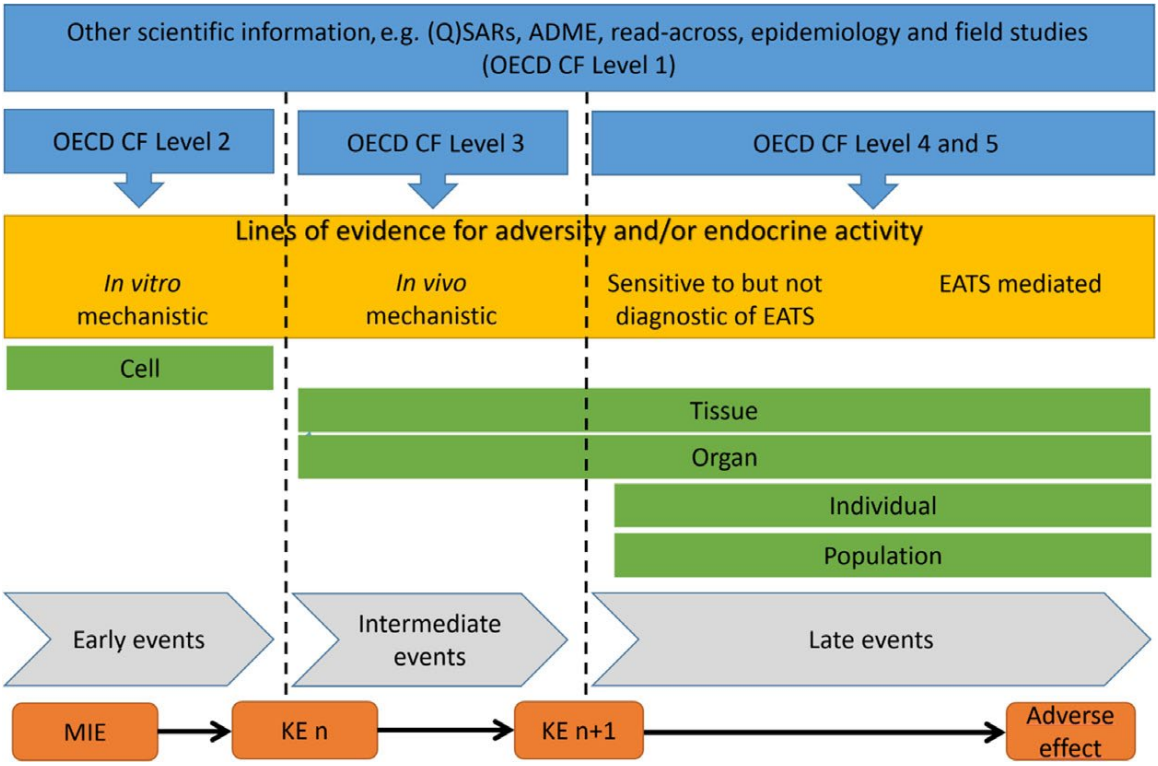

Figure 7 : Mode Of Action (Ligne directrice EFSA/ECHA)

Etablir le lien biologique plausible

Pour les scénarios 1a et 2aii, on conclut que la substance ne rencontre pas les critères PE, ici aucun MoA n'est à développer.

Dans certains cas, la recherche du MoA peut s'avérer très simple.

Par exemple, dans les scénarios 1b et 2b, où l'adversité est basée sur des paramètres « *médiés par EATS* », la connaissance sous-jacente de la nature endocrinienne probable des effets peut être telle que ce jugement peut être rendu sur la plausibilité biologique d'un lien sans avoir recours à une analyse du MoA.

Dans de tels cas, l'analyse du MoA pourrait être très simple ; lorsqu'un effet indésirable est « *médié par EATS* », le lien biologiquement plausible est déjà préétabli en l'absence d'informations prouvant le contraire (c'est-à-dire un MoA non PE entièrement développé).

Dans le scénario 2aiii, il manque à la fois des informations sur les effets adverses observés mais également sur l'activité endocrinienne, une enquête plus approfondie est nécessaire avant la détermination du MoA.

Dans le scénario 2ai, quand une activité endocrinienne a été observée ainsi que des adverse events non spécifiques des modalités EATS, la plausibilité biologique que les effets néfastes soient exclusivement dus à un MoA endocrinien n'est pas aussi forte que pour les scénarios 1b et 2b. Néanmoins, ces effets pourraient fournir des indications pour approfondir l'enquête. Dans ce cas, il est probable que d'autres données empiriques soient nécessaires (par exemple des données issues du niveau 4 et 5) sur la substance pour démontrer le lien entre l'effet indésirable et le MoA endocrinien.

Multiples MoAs : une substance peut agir avec plusieurs MoA, on doit faire une analyse pour chacun. Si c'est trop compliqué à comprendre, on peut dire que c'est un PE sans définir s'il agit sur E, A, T ou S.

La plausibilité biologique est mesurée comme suit :

- Fort : si on a assez d'informations sur le KER basée sur de la documentation et un large consensus scientifique.
- Modéré : si le KER est plausible, basé sur des analogies sur les relations biologiques acceptées mais la compréhension scientifique n'est pas complètement établie.
- Faible : on ne comprend pas les relations des KE.

On a besoin d'avoir les informations sur la temporalité (moment des observations) et la sévérité/incidence des effets observés. Cela est essentiel pour évaluer l'effet-dose et la concordance temporelle.

Les KE devraient apparaître avant l'AE et être concordants entre eux d'un point de vue temporel (doivent arriver les uns à la suite des autres).

Evaluation de la preuve du MoA :

Evaluation centrée sur la preuve du lien entre les KE d'un MoA et l'AE.

- Essentialité : quand il est démontré qu'on arrive à éviter un AE quand on réduit ou élimine un KE c'est une démonstration d'essentialité.
- Consistance : c'est la répétabilité des KEs dans différents systèmes, études, espèces…
- Analogie : montrer que les mêmes KEs ont lieu pour d'autres substances pour lesquelles le même MoA a été établi.
- Spécificité : l'AE est une conséquence directe de l'hypothétique MoA endocrinien (et pas un résultat indirect ou non-endocrinien).

Conclusion :

Lorsque, sur la base d'un ensemble de données suffisantes, aucune adversité « *médiée par EATS* » n'a été observée ou lorsque l'activité endocrinienne a été jugée négative, il est possible de se dispenser de l'analyse du MoA et de conclure que les critères ne sont pas remplis.

Lorsqu'un MoA est basé sur une adversité médiée par EATS, les critères de PE sont considérés comme remplis ; à moins qu'un MoA non endocrinien alternatif soit démontré et, dans une analyse comparative, s'est révélé être l'explication la plus probable.

Lorsqu'un MoA est basé sur une adversité non spécifique mais que ce MoA soutient la plausibilité biologique du lien entre les effets indésirables observés et l'activité endocrinienne, la substance est considérée comme répondant aux critères de PE.

4. COMITE SCIENTIFIQUE POUR LA SECURITE DES CONSOMMATEURS (CSSC)

Selon *the CSSC notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 10th revision*, un PE est une substance naturelle et/ou synthétique qui peut interférer, interagir, empêcher une ou des fonction(s) du système endocrinien qui régule lui-même plusieurs fonctions métaboliques et fonctionnelles dans le corps humain. Le SE est complexe, comprend de nombreux signaux de signalisation et feedback (négatif ou positif).

Le SE régule la sécrétion des hormones et des mécanismes d'homéostasie.

Un perturbateur endocrinien peut agir sur tous ces mécanismes, amenant ainsi à des effets néfastes ; cependant un PE peut également passer par le système de détoxication et passer inaperçu.

Certains PE peuvent également être sans risque à certaines périodes du développement mais avoir des effets à des périodes précises (fenêtres de susceptibilité).

De nombreux produits chimiques ont été identifiés (ou sont suspectés) comme étant des PE mais seulement une petite partie d'entre eux a été évaluée par des tests pouvant démontrer un effet endocrinien avéré sur des organismes intacts.

Le CSSC a exposé son approche de l'évaluation de la sécurité des perturbateurs endocriniens dans son mémorandum sur les perturbateurs endocriniens (SCCS/1544/14) du 16 décembre

2014. Dans ce document, le CSSC a soutenu les conclusions de l'EFSA selon lesquelles « *[les perturbateurs endocriniens] peuvent […] être traités comme la plupart des autres substances préoccupantes pour la santé humaine et l'environnement, c'est-à-dire être soumis à une évaluation des risques et pas seulement à une évaluation des dangers* ». (30)

Le CSSC a déjà évalué des substances cosmétiques suspectées d'avoir des propriétés perturbatrices du système endocrinien. Des exemples d'ingrédients sur lesquels le CSSC a émis de tels avis scientifiques sont plusieurs parabènes (SCCP/1017/06, SCCP/1183/08, SCCS/1348/10, SCCS/1446/11, SCCS/1514/13), conservateurs cosmétiques ; le triclosan (SCCP/1192/08, SCCS/1414/11), utilisé comme conservateur et déodorant ; l'homosalate (SCCP/1086/07), utilisé dans les écrans solaires comme filtre UV ; la mélatonine (SCCS/1315/10), utilisée comme antioxydant etc.

Ces avis illustrent le type de données utilisées pour garantir une évaluation scientifique des substances suspectées d'avoir des propriétés perturbatrices endocriniennes. Des conclusions sont tirées pour évaluer la sécurité de ces substances pour les consommateurs, y compris les groupes vulnérables tels que les enfants, le cas échéant. Ils confirment que le CSSC peut effectuer une évaluation des risques, et pas seulement du danger de ces substances pour une utilisation dans les cosmétiques conformément à sa méthodologie actuelle.

En effet, les conclusions de ces évaluations donnent des doses seuils à ne pas dépasser pour qu'il n'y ait pas de risque, ou une certaine catégorie de population (enfants) pour qui l'utilisation du produit est déconseillée.

Pour leur évaluation ils prennent en compte les données *in vitro*, *in vivo* mais aussi les données ADME et PKPD (Pharmacocinétique Pharmacodynamique).

Dans la plupart des études, les tests *in vitro* montrent une liaison aux récepteurs oestrogéniques ou androgéniques. Mais les tests *in vivo* ne montrent aucun effet endocrinien. Les évaluateurs concluent que la substance est considérée comme sûre dans les conditions d'application définies. Dans leur évaluation ils ajoutent le fait qu'il y a en général très peu d'absorption, et quand il y en a c'est la métabolisation qui fait que la substance ne se lie plus aux récepteurs.

Il est à noter que ces avis ont été émis avant la publication en 2018 de la ligne directrice EFSA/ECHA, et que la Note of guidance du CSSC 10th édition (2018) propose des éléments et études qui permettent de se positionner sur le potentiel de perturbation endocrinienne des substances. Sa stratégie repose sur l'étude de l'activité endocrinienne d'une substance par des

tests de niveaux 1 et 2 de la ligne directrice OCDE 150. Elle reconnaît la limite de l'interdiction des tests sur animaux et insiste sur l'importance du poids de l'évidence qui doit être suffisamment fort pour exclure la toxicité potentielle d'un ingrédient cosmétique via des effets endocriniens.

III. RESULTATS

A. STRATEGIE PROPOSEE POUR L'EVALUATION

L'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques est un procédé en 4 étapes :

1. Une identification des dangers, c'est-à-dire des effets délétères ou indésirables que l'ingrédient peut provoquer sur la santé. On identifie quels sont les potentiels effets délétères de l'ingrédient et quel est l'effet critique c'est-à-dire le danger le plus grave apparaissant à la plus faible dose, en se basant sur le profil toxicologique des ingrédients et l'identification des impuretés pertinentes.

2. Une estimation des relations dose-réponse, (et des seuils d'effets) et de l'incidence et/ou de la gravité de ces effets. Cette évaluation est parfois complexe, dans le cas des perturbateurs endocriniens par exemple. A ce stade la dose sans effet toxique communément nommée NOAEL (Non Observed Adverse Effect Level) est définie.

3. Une évaluation de l'exposition : il faut pour cela identifier les voies d'exposition de l'homme à l'ingrédient (la plupart du temps voie cutanée pour les cosmétiques) et estimer l'importance de l'exposition, c'est-à-dire l'exposition systémique de la substance, en calculant la SED (Systemic Exposure Dose) en fonction de la concentration de l'ingrédient présente dans le produit cosmétique, la quantité de cosmétique appliquée, la fréquence d'application, la fraction de l'ingrédient appliqué pouvant traverser la barrière cutanée.

4. Une évaluation du risque par application d'une marge de sécurité (MoS) qui est la NOAEL divisée par la SED. La marge de sécurité doit être supérieure à 100 pour déclarer l'innocuité pour la santé humaine de l'ingrédient considéré ce qui signifie que l'exposition maximale attendue chez l'homme est 100 fois plus faible que la dose identifiée comme sans effet.

L'évaluation du risque est donc une prise en compte à la fois du danger mais également de l'exposition à ce danger : le danger est tout ce qui peut causer du mal, tandis que le risque est le potentiel du danger à causer du mal. En d'autres termes, un danger ne présentera aucun risque à moins que l'exposition à ce danger ne soit suffisamment élevée pour causer des dommages.

Dans ce rapport, nous traiterons principalement des effets dus aux modalités EATS (œstrogéniques, androgéniques, thyroïdiens et stéroïdogéniques). En effet, c'est pour ces

modalités là qu'il existe actuellement une bonne compréhension mécanistique de la façon dont les perturbations induites par les substances EATS peuvent entraîner des effets indésirables via un mode d'action endocrinien. De plus, pour l'instant, c'est pour celles-ci qu'il existe la majorité des tests standardisés *in vivo* et *in vitro* entraînant un consensus scientifique pour leur interprétation.

Selon le CSSC notes of guidance, une manière de démontrer qu'une substance ne provoquera pas d'AE endocrinien, est de montrer qu'il n'y a pas d'exposition systémique, et donc pas d'exposition biologique pertinente pouvant provoquer un effet adverse (ici le danger ne posera donc pas de risque). Les études de toxicocinétiques et les modélisations PKPD pourraient aider à combler le fossé entre les données *in vivo* et *in vitro* en apportant des données d'exposition en fonction des concentrations trouvées actives *in vitro*.

D'après le CSSC, on considère que si la masse molaire d'une substance est supérieure à 1000 Da, l'ingrédient ne peut pas traverser la barrière cutanée, la pénétration est négligeable (pas d'exposition systémique, pas d'effet sur le système endocrinien). (2)

Selon l'ECHA, si la substance est insoluble dans l'eau ou l'huile (log Kow < -1 ou > 4), l'absorption dermale est considérée à 10%. (ECHA, 2017). (31)

D'après le chapitre précédent, nous avons décidé d'élaborer deux stratégies différentes selon les informations dont nous disposons pour évaluer une substance.

1. STRATEGIE PROPOSEE LORSQUE TOUTES LES DONNEES SONT DISPONIBLES POUR CONCLURE, TELLES QUE PRESENTEES DANS LA LIGNE DIRECTRICE EFSA/ECHA :

Quand une substance est utilisée depuis longtemps, ou dans divers secteurs industriels tels que l'industrie alimentaire, le médicament, les produits chimiques, il arrive qu'on dispose de toutes les informations nécessaires pour l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien selon la ligne directrice de l'EFSA/ECHA (études *in vitro* et études *in vivo*). Ainsi, lorsque l'on dispose des résultats de ces tests, on appliquera exactement la stratégie décrite dans la ligne directrice.

2. STRATEGIE PROPOSEE LORSQU'IL MANQUE DES DONNEES :

Lorsqu'il s'agit d'une substance nouvelle à visée uniquement cosmétique, ou lorsqu'on ne dispose pas de toutes les informations nécessaires pour l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien selon la ligne directrice de l'EFSA/ECHA (études *in vitro* et études *in vivo*), nous ne pouvons entreprendre des études *in vivo*. De ce fait, la stratégie adoptée sera différente :

- On ne pourra pas mettre en évidence un AE puisque la substance n'a jamais été utilisée et que tous les tests supposés mettre en évidence un AE sont *in vivo*.
- On ne pourra montrer l'effet endocrinien que grâce aux tests *in vitro* cités dans la ligne directrice ECHA/EFSA mais on ne pourra pas confirmer par les tests *in vivo*.

Dans la stratégie interne à l'entreprise, nous avons décidé de séparer deux sortes de substances :

- Les substances ou matières premières de composition chimiquement définie
- Les substances ou matières premières de composition non chimiquement définie (exemple : extraits végétaux)

a) STRATEGIE PROPOSEE POUR LES SUBSTANCES OU MATIERES PREMIERES DE COMPOSITION CHIMIQUEMENT DEFINIE

1) En premier lieu, les substances qui ne peuvent pas provoquer d'effet indésirable endocrinien car non absorbées lors d'application cutanée (c'est-à-dire celles au poids moléculaire supérieur à 1000 Da ou dont l'absorption dermale est nulle) seront exclues d'emblée. On exclura aussi les molécules qui présentent un risque mineur car connues en cosmétique ou en alimentaire et sur lesquelles nous disposons d'un recul d'utilisation important.
2) Ensuite, un travail de récupération des données disponibles peut être réalisé (revue de la littérature, analyse de structure), correspondant au niveau 1 de l'OCDE.
3) Si possible, une approche read-across peut être envisagée sur la molécule.
4) Si les résultats permettent de conclure sur l'absence de potentiel de perturbation endocrinienne, alors il n'est pas jugé nécessaire de continuer les investigations. Si les données disponibles apportent un doute sur le potentiel perturbateur endocrinien de la substance, une étude *in silico* (QSAR) peut être entreprise. Un prestataire de services pourra être sollicité pour réaliser cette étude QSAR à l'aide de leur base de données

internes mais également d'autres bases de données connues (Derek, Danish QSAR Database, OCDE QSAR Toolbox). Leurs tests apportent des informations précieuses et permettent d'exclure un nombre important de substances avec une fiabilité très élevée.

5) Lorsqu'il ne sera pas possible de conclure sur la base des résultats *in silico*, alors des tests *in vitro* sur organismes entiers pourront être réalisés. Ces tests sont validés par l'OCDE et permettent de détecter les éventuelles activités endocriniennes, de mesurer l'effet sur un organisme entier, et de comprendre le mécanisme d'action grâce à des œufs de Médaka (poissons de rizières d'Asie) et de Xénope (amphibiens) à un stade qui les exclut du domaine *vivo.* Ce stade resterait donc applicable à l'industrie cosmétique. Les œufs sont porteurs d'une construction génétique comprenant le promoteur du gène cible naturellement présent, couplé au gène rapporteur de fluorescence GFP. Cela permet de mesurer le niveau d'activité endocrinienne induite par l'échantillon testé, le niveau de fluorescence mesuré est proportionnel à l'effet.

b) STRATEGIE POUR LES SUBSTANCES OU MATIERES PREMIERES DE COMPOSITION NON CHIMIQUEMENT DEFINIE (EXEMPLE : EXTRAITS VEGETAUX) :

Pour ces substances ou matières premières, il pourra être difficile de trouver des informations dans la littérature, ou de faire des read-across. Il est impossible de faire des QSARs, analyse qui se base sur un identifiant chimique (numéro CAS, code SMILES). (32)

1) La première étape consistera comme pour la première à éliminer les substances non absorbées lors d'application cutanée, c'est-à-dire celles au poids moléculaire supérieur à 1000 Da ou dont l'absorption dermale est nulle. (CE, 2004). (33)
2) Ensuite une revue de la littérature pourra être conduite. La composition des extraits végétaux dépend de nombreux paramètres : notamment la plante d'origine, son utilisation ou non en alimentaire ou en médecine traditionnelle et le type d'extraction (aqueux, semi-aqueux, organique). Extrapoler des données depuis un autre extrait végétal reste difficile mais peut être réalisé au cas par cas.
3) Des études *in vitro* de binding pourront être réalisées au cas par cas.
4) Enfin, des tests *in vitro* sur organismes entiers pourront être réalisés. Ces tests permettent d'analyser des mélanges de substances contenant des produits connus et inconnus.

N.B. : pour les extraits, le fait d'analyser chacun des composants et d'isoler les substances majoritaires permettra de retourner à l'autre stratégie.

Ces stratégies correspondent à une approche séquentielle qui suit les recommandations de la ligne directrice EFSA/ECHA et permettent d'identifier le degré de risque, les études disponibles, puis de générer des données *in silico* et *in vitro* qui apportent des informations sur ce qu'il se passe au niveau de la cellule, au niveau des chaînes de signalisation, du taux d'hormones. Les tests *in vitro* sur organismes entiers apportent des informations importantes car permettent de mettre en évidence un effet adverse. La réglementation ne permet pas, de toute façon, de réaliser d'autres tests notamment *in vivo*.

Si on conclut que la substance a un potentiel PE, nous ne l'utiliserons pas. En effet, malgré le fait que le CSSC dans la Note of Guidance accepte une analyse du risque classique pour les perturbateurs endocriniens : « *De l'avis du CSSC, ces substances devraient être traitées comme d'autres substances préoccupantes pour la santé humaine et donc être soumises à une évaluation des risques et pas seulement à une évaluation des dangers.* », nous avons décidé de suivre l'avis de la Commission Européenne. En vertu des règlements de l'UE sur les produits biocides et les produits phytopharmaceutiques (UE no 528/2012 (BPR) et CE no 1107/2009 (PPPR)), une substance active, qui est considérée comme ayant un potentiel de PE, ne sera approuvée que si le risque d'exposition est négligeable, sauf si l'exposition est négligeable, ou si cela est nécessaire pour des raisons socioéconomiques.

Dans notre stratégie interne (figure 8), nous avons décidé de ne pas inclure de façon standard les tests OCDE *in vitro* cités dans la ligne directrice de l'EFSA/ECHA (OCDE 455/456/458). En effet, la ligne directrice affirme que ces tests seuls ne sont pas suffisants, et qu'ils doivent être confirmés par des tests *in vivo*. Même en cas de résultats négatifs de ces test *in vitro,* il n'est pas possible de conclure sur l'absence de potentiel endocrinien de la substance.

De plus, d'un point de vue formel, ces tests sont des essais sur cultures de cellules immortalisées issues de carcinomes. Ce sont donc des tests classés par l'OCDE de niveau 2 dans l'échelle des méthodes.

Les tests *in vitro* sur organisme entier, bien qu'exclus de la définition d'animal de laboratoire, sont des essais classés de niveau 3 sur l'échelle de l'OCDE, et apportent donc formellement un poids supérieur de la preuve.

D'un point de vue physiologique, les cellules sont faiblement « *équipées* » pour apporter une réponse spécifique et sensible. Même si l'on considère les cellules H295R de carcinome surrénalien, celles-ci ne couvrent pas toutes les étapes métaboliques. Ainsi par exemple l'étape clé de la 5alpha réductase (conversion de la testostérone en DHT, impactant à la fois la signalisation œstrogène et androgène) n'est pas incluse dans ce test. Les modèles *in vitro* sur organisme entier vont prendre en compte à la fois les effets sur les récepteurs, les enzymes telles que l'aromatase et la 5alpha réductase, mais également le métabolisme et l'interaction entre ces mécanismes. La réponse est donc à la fois plus fiable avec un moindre risque de faux positifs ou de faux négatifs.

Cette stratégie sur organisme entier utilise trois tests :

- XETA Xenopus Eleutheroembryonic Thyroid (thyroïde): validé à l'OCDE 248 (34)

Le but du test est de mesurer la capacité d'un produit chimique à activer ou inhiber la transcription d'une construction génétique (THb / ZIP-GFP X. laevis eleutheroembryos) soit en se liant au récepteur de l'hormone thyroïdienne, soit en modifiant la quantité d'hormone thyroïdienne disponible pour la transcription. Le test est basé sur l'utilisation d'un xenope transgénique (possédant la construction génétique THb / ZIP-GFP) à un stade non autonome. La GFP est une protéine fluorescente qui peut être utilisée pour confirmer la présence de la substance et suivre son action. Ce test est basé sur la quantification de la fluorescence, et donc de la protéine GFP, dans tout l'éleuthéroembryon exposé à un produit chimique à tester.

- REACTIV Rapid Estrogen Activity Tests *In Vivo* (œstrogène): (29)

Le test REACTIV est inspiré d'autres tests validés à l'OCDE (n°229, 230 et 234) et est équivalent à un test de niveau 3. Les tests sont réalisés sur des organismes entiers (œufs de Medaka), exposés *in vitro* pendant 24h.

- RADAR Rapid Androgen Disruption Adverse Outcome Reporter Assay (androgen): (29)

Le test RADAR est listé dans la ligne directrice de l'EFSA/ECHA sur l'évaluation de la perturbation endocrinienne et est en cours de validation par l'OCDE. Les tests sont réalisés sur organismes entiers (œufs de Médaka), exposés *in vitro* de 72 à 96h.

Le test thyroïdien TG 248 (XETA) est désormais utilisé très régulièrement pour l'évaluation de produits phytosanitaires ou biocides soumis à une évaluation systématique de leur capacité endocrinienne. Ces tests permettent de détecter d'éventuelles activités endocriniennes, de

mesurer l'effet sur tout un organisme, et de comprendre le mécanisme d'action grâce aux œufs de Medaka (poissons des rizières en Asie) et Xenopus (amphibiens) à un stade qui les exclut du domaine *vivo* et qui resterait donc applicable à l'industrie cosmétique.

Ces tests sont exclus du stade *vivo* car ils ne répondent pas à la Directive Européenne 2010/63/UE du 22 Septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. (35)

Article 1.3.a.i :

« *La présente directive s'applique aux animaux suivants:*

a) Animaux vertébrés non humains vivants, y compris:

i) ***les formes larvaires autonomes****; et*

ii) les formes fœtales de mammifères à partir du dernier tiers de leur développement normal;

b) *Les céphalopodes vivants* »

Les tests effectués se font sur formes larvaires non autonomes (ne peuvent pas s'alimenter seules) et sont donc exclues du domaine *vivo*.

Bien entendu, les tests OCDE *in vitro* cités dans la ligne directrice ne sont pas exclus de notre stratégie, et pourront être utilisés au cas par cas, pour augmenter le poids de la preuve.

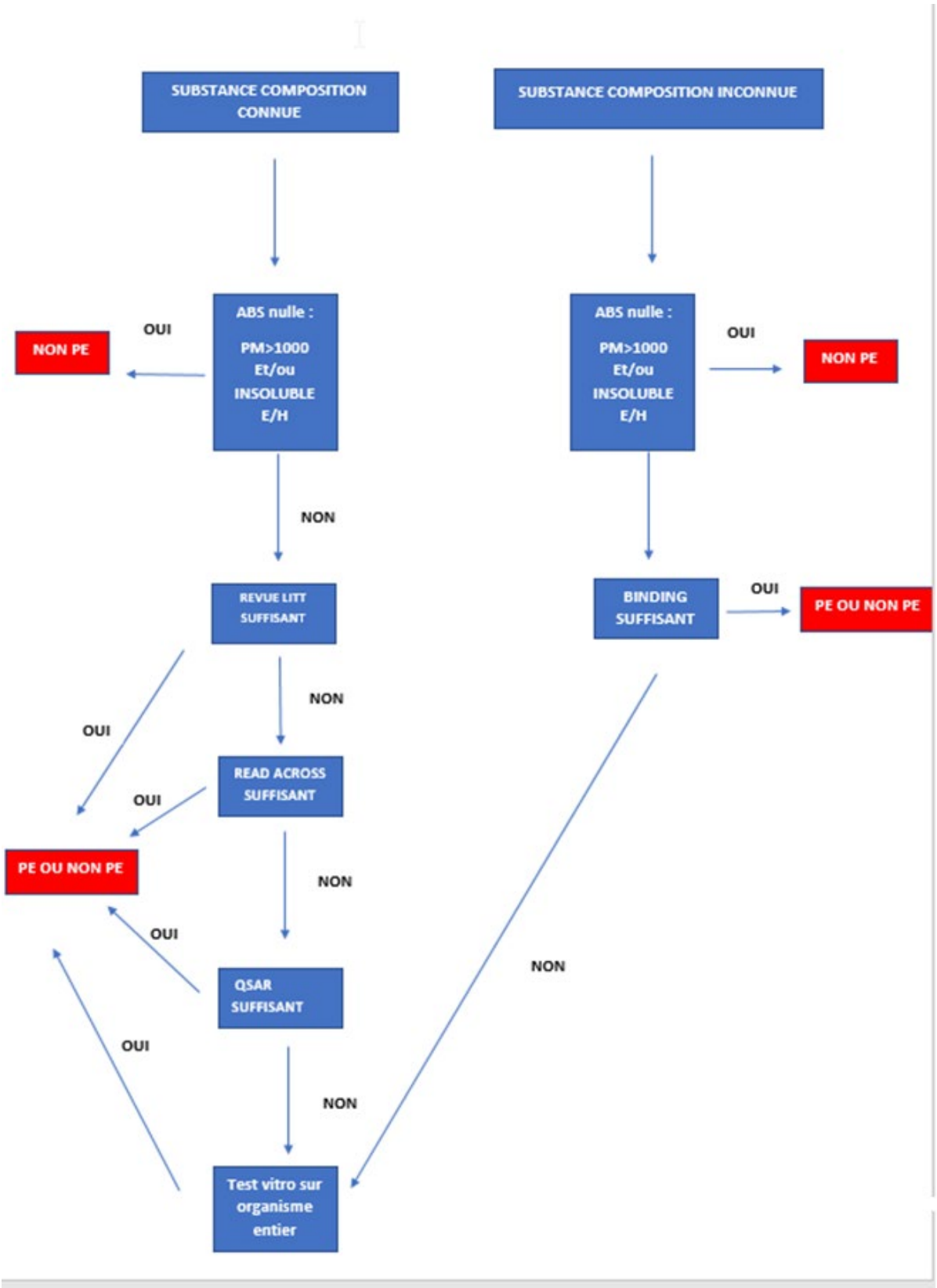

Figure 8 : Schéma décisionnel stratégie interne à l'entreprise identification PE

B. CAS PRATIQUES

1. NITRURE DE BORE – N° CAS : 10043-11-5

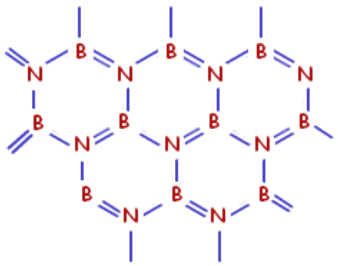

Figure 9 : Nitrure de bore (36)

Le nitrure de bore (figure 9) est un composé de la classe chimique des sels inorganiques utilisé pour ses fonctions de lubrifiant, notamment dans des produits de soins (lotion après rasage) et de maquillage (rouge à lèvres, eyeliner).

La première étape de la stratégie interne consiste à vérifier le poids moléculaire et la solubilité de la molécule :

- Solubilité : insoluble dans l'eau et dans les acides, inerte. Log Kow : 0,23
- Poids moléculaire : 24,8 Da
- Absorption dermale : négligeable

Selon le CIR du nitrure de Bore (Cosmetic Ingredient Review, 2012) (37), la substance est insoluble, de ce fait l'absorption percutanée peut être considérée comme négligeable. On ne pourra pas voir d'effet adverse, on conclut donc que la substance n'est pas perturbateur endocrinien sans avoir besoin de faire plus de test.

2. ACRYLATES/POLYTRIMETHYLSILOXYMETHACRYLATE COPOLYMER – N° CAS : 262299-63-8

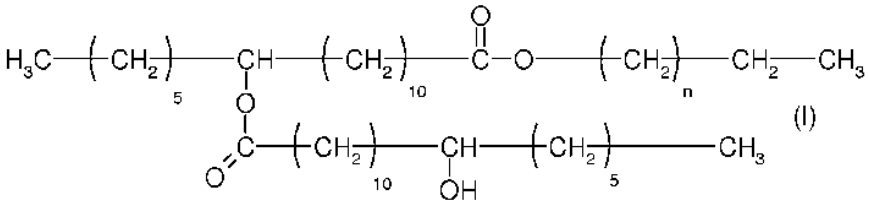

Figure 10 : Acrylates/Polytrimethylsiloxymethacrylate Copolymer (38)

L'acrylates/polytrimethylsiloxymethacrylate (figure 10) est un copolymère du monomère dendritique polytrimethylsiloxymethacrylate. En cosmétique, il est utilisé comme agent filmogène, on le retrouve notamment dans les laques, rouges à lèvres, fonds de teint…

La première étape de la stratégie interne consiste à vérifier le poids moléculaire et la solubilité de la substance :

- Solubilité : soluble dans l'eau
- Poids moléculaire : >10000 Da

Selon le NICNAS (NICNAS, 2013) (39) le poids moléculaire de Acrylates/Polytrimethylsiloxymethacrylate Copolymer se trouve entre 10000 et 70000 Da c'est-à-dire supérieur à 1000 Da, de ce fait, on peut conclure que la biodisponibilité est nulle, qu'il n'y a pas d'exposition systémique de la substance quand celle-ci est utilisée dans un produit cosmétique, et donc on en déduit qu'il n'y aura pas d'effet adverse systémique d'origine endocrinienne. On peut donc s'arrêter là dans la stratégie et dire que Acrylates/Polytrimethylsiloxymethacrylate Copolymer n'est pas un perturbateur endocrinien.

3. BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE DEHP - N° CAS 117-81-7

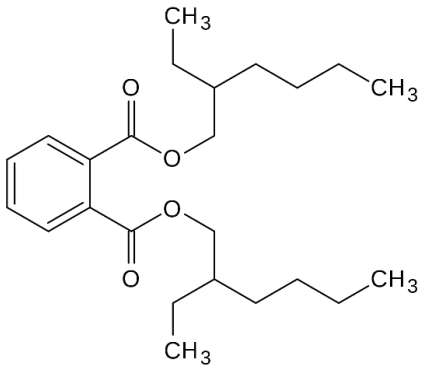

Figure 11 : Bis(2-ethylhexyl) phthalate DEHP (40)

Le phtalate de bis(2-éthylhexyle), aussi désigné sous le sigle DEHP (figure 11) est utilisé essentiellement comme plastifiant pour les matières plastiques et élastomères. Il servait d'agent fixateur dans les parfums, les laques ou encore les vernis à ongles.

La première étape de la stratégie interne consiste à vérifier le poids moléculaire et la solubilité de la substance :

- Solubilité : log Kow = 7,5 ; soluble dans la plupart des solvants organiques, insoluble dans l'eau.
- Poids moléculaire : 390.56 Da
- Absorption dermale : 5%. La poursuite de l'évaluation est donc nécessaire, malgré le log de Kow supérieur à 4 car l'absorption dermale n'est pas nulle.

On ne peut pas exclure cette molécule car il y a aura une absorption dermale probable (même très faible), et on passe à la deuxième phase de la stratégie, la revue complète de la littérature, dont les résultats sont présentés dans le tableau 1 synthétique suivant :

Tableau 1 : Stratégie de l'EFSA/ECHA pour l'évaluation de l'effet adverse du DEHP

MODALITES	NIVEAU	TEST	RESULTATS	CONCLUSION
OESTROGENES ANDROGENES STEROIDOGENESE	3	OCDE 416	Malformations histologiques des testicules, foie, rein à 7500 ppm chez F0, F1 et F2. L'étude montre que le DEHP est un reprotoxique à 7500 et 10 000 ppm.	La substance est toxique pour la reproduction.
THYROIDIENNE	3	OCDE 407, 408, 416, 451, 452, 453	Atteinte du sperme (qualité et quantité). Le DEHP est carcinogène chez la souris B6C3F1.	En plus d'être reprotoxique, la substance est également carcinogène.

Conclusion

L'étude OCDE 416 montre bien une toxicité pour la reproduction pour les modalités EAS.
Les études OCDE 407 et 408 montrent bien une toxicité pour la reproduction pour la modalité T.
De plus, le site de l'ECHA classe la substance en tant que perturbateur endocrinien et substance SVHC (Substance of Very High Concern). La substance est bien un perturbateur endocrinien. (41)

4. GLYCERYL STEARATE N° CAS 85251-77-0

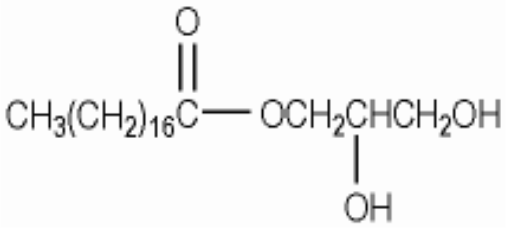

Figure 12 : Glyceryl Stearate (42)

Le glyceryl stearate (figure 12) est un corps gras d'origine végétale, dérivé de l'huile de palme. Le stearate de glycérol est utilisé en tant qu'émulsifiant non ionique ou émollient dans les produits cosmétiques. Il est très employé dans les soins hydratants et on le retrouve aussi dans les soins capillaires pour ses propriétés antistatiques.

La première étape de la stratégie interne consiste à vérifier le poids moléculaire et la solubilité de la substance :

- Solubilité : soluble dans la plupart des solvants organiques, insoluble dans l'eau.
- Poids moléculaire : 358,57 Da

Les caractéristiques physico-chimiques (log Kow et hydrosolubilité) de la substance et la distribution du poids moléculaire se situent dans une plage suggérant une absorption modérée à faible par le tractus gastro-intestinal après ingestion orale.

Les propriétés physico-chimiques (log Kow et hydrosolubilité) de la substance et le poids moléculaire se situent dans une plage suggérant une faible absorption à travers la peau.

On ne peut pas exclure cette molécule car il y a aura une absorption dermale probable (même très faible), et on passe à la deuxième phase de la stratégie, la revue complète de la littérature, dont les résultats sont présentés dans le tableau 2 synthétique suivant :

Tableau 2 : Stratégie de l'EFSA/ECHA pour l'évaluation de l'effet adverse du Glyceryl Stearate

MODALITES	NIVEAU	TESTS	RESULTATS	CONCLUSION
OESTROGENES	3	OCDE 443 OCDE 416	Il n'y a pas de signe clinique lié au traitement.	Rien à signaler pour EA et S
ANDROGENES				
STEROIDOGENESE				
THYROIDIENNE	3	OCDE 408, 416	Il n'y a pas de signe clinique lié au traitement.	Rien à signaler pour T.

Sur le modèle ToxCast (figure 13), l'activité sur les récepteurs androgènes et œstrogènes est égale à zéro.

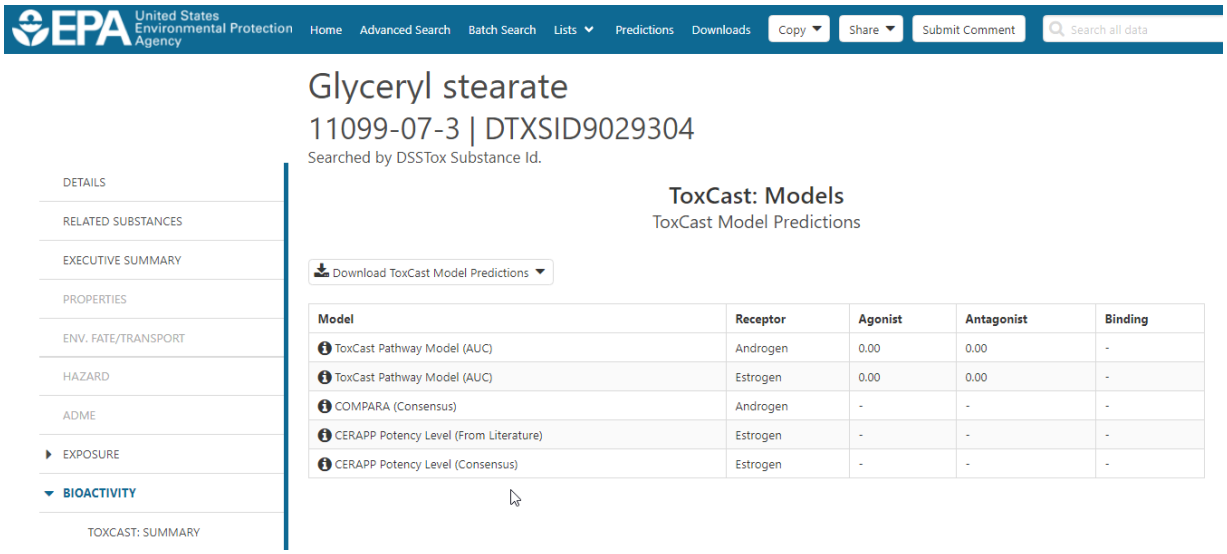

Figure 13 : capture d'écran de ToxCast - Glyceryl Stearate (43)

Selon la Food Drug Administration (FDA) (44), de nombreux monoesters de monoglycéryle sont des substances alimentaires directes affirmées comme Generally Recognized as Safe (GRAS) aux États-Unis à usage humain et/ou animal, et sont autorisés comme additifs alimentaires directs ou sont autorisés comme additifs alimentaires indirects.

Conclusion

Le test pour les modalités E, A et S recommandé par la ligne directrice est disponible (OCDE 416), et il ne signale pas de toxicité pour la reproduction. De plus le modèle Toxcast indique une activité nulle sur les récepteurs oestrogéniques et androgéniques. Les informations disponibles sont donc jugées suffisantes pour conclure sur ces 3 modalités.

Les tests recommandés par la ligne directrice EFSA/ECHA permettant de conclure sur la modalité T ne sont pas disponibles (seuls deux sont présentés dans le dossier d'enregistrement REACH).

Cependant, compte tenu de la faible absorption systémique par voie orale et cutanée, ainsi que de l'utilisation fréquente de cette matière (notamment dans l'alimentation) et de l'absence d'alerte de perturbation endocrinienne, de l'hydrolyse de la molécule en glycérol et en acide stéarique, qui sont des molécules connues et considérées comme sans risque d'utilisation, ainsi que les résultats des tests OCDE 408 et 416, les données obtenues forment un poids de l'évidence. Le glyceryl stéarate n'est très probablement pas un perturbateur endocrinien d'après les connaissances scientifiques actuelles.

Dans notre stratégie interne nous considérons que les informations sont suffisantes et nous pouvons donc nous arrêter là. S'il persiste un doute, il y a toujours la possibilité de poursuivre la stratégie en lançant des tests QSAR ou *in vitro* sur organismes entiers chez les prestataires cités.

5. EXTRAIT VEGETAL DE COMPOSITION INCONNUE

Pour un extrait végétal de composition inconnue, et en partant du principe que la substance est soluble dans l'eau et dans l'huile, on appliquera alors la stratégie d'effectuer dans un premier temps une étude binding puis dans un deuxième temps une étude *in vitro* sur organisme entier.

6. CAPRYLYL GLYCOL – N° CAS : 1117-86-8

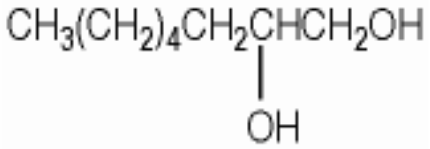

Figure 14 : Caprylyl glycol (45)

Le Caprylyl Glycol (figure 14) est un alcool dérivé de l'acide caprylique. On le retrouve présent dans le lait de certains mammifères, ainsi que dans les huiles de palme et de coco. C'est un humectant et un émollient. (46)

La première étape de la stratégie interne consiste à vérifier le poids moléculaire et la solubilité de la substance :

- Solubilité : soluble dans l'eau et dans l'huile
- Poids moléculaire : 146,13 Da

On ne peut pas exclure cette molécule car il y a aura une absorption dermale probable, et on passe à la deuxième phase de la stratégie, la revue complète de la littérature :

Pour cette substance, nous ne disposons pas de tous les tests demandés par l'EFSA/ECHA, ainsi nous allons devoir appliquer notre stratégie interne (tableau 3).

Tableau 3 : Tests OCDE in vivo caprylyl glycol

TESTS	NIVEAU	RESULTATS	CONCLUSION
OCDE 421 (toxicité développement)	3	Pas d'effet sur la reproduction ou sur le développement.	Une NOAEL est définie à 300 mg/kg.
OCDE 414 (développement prénatal)	3	Diminution du poids de l'utérus aux doses de 300 et 1000 mg/kg pc/jour.	NOAEL de 150, 300 et 1000 mg/kg pc/jour pour la toxicité maternelle, la toxicité pour le développement et la tératogénicité On a une alerte toxicologique, ces effets peuvent aussi être liés à la dose forte et pas seulement à un potentiel PE.
OCDE 408	3	Aucun effet toxique sur les organes. Prise de poids corporel chez les mâles et femelles des groupes à dose moyenne et élevée.	La NOAEL a été calculée pour le groupe à faible dose, soit 150 mg/kg pc/jour.

Cette substance présente une toxicité oculaire, mais aucune autre alerte, le CIR considère l'utilisation sûre.

Conclusion

Pour cette substance, la revue de la littérature n'apporte pas d'informations très alarmantes sur sa capacité à être un PE. Cependant, une alerte de toxicité maternelle a été relevée. On ne peut donc pas conclure, les informations dans la littérature sont considérées insuffisantes, on peut donc passer à la prochaine étape de la stratégie interne, c'est-à-dire effectuer un read-across en interne, s'il n'apporte pas assez d'informations, faire des tests *in silico* QSAR, et si on ne peut toujours pas conclure, finir l'évaluation de la substance par un essai *in vitro* sur organisme entier.

IV. DISCUSSION

A l'heure actuelle, seuls les tests sur organismes entiers permettent une extrapolation pertinente et fiable à l'Homme, et ainsi assurent l'innocuité exigée pour les produits cosmétiques.

Les modèles *in vivo* cités dans la ligne directrice de l'EFSA/ECHA sur les perturbateurs endocriniens permettent de mettre en évidence un effet adverse, quel que soit le mécanisme d'action de la substance ou la caractéristique clé qui est biologiquement impactée.

Or, l'industrie cosmétique ne peut pas générer de nouvelles études de ce type (seulement utiliser les données existantes si disponibles). Les méthodes *in vitro* validées suivant les lignes directrices internationales (OCDE ou US EPA) dont on dispose à l'heure actuelle apportent des informations importantes mais elles se concentrent sur des mécanismes d'action précis biologiques, or tous les PE n'ont pas le même mécanisme d'action, cela pourrait ainsi entraîner des faux positifs et faux négatifs car les tests effectués ne sont pas toujours suffisants pour conclure. La ligne directrice EFSA/ECHA considère donc que les tests *in vitro* seuls ne peuvent pas prédire de manière certaine la probabilité qu'une substance aura une activité de perturbateur endocrinien.

En effet, l'éventuel effet PE *in vivo* pourrait être une conséquence de la perturbation de plusieurs mécanismes simultanément, dont certains pourraient ne pas être couverts par la stratégie actuelle de tests *in vitro*. En outre, les tests *in vitro* ne donnent pas d'informations sur l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion (ADME).

De plus, il est important de faire la distinction entre les termes « *substances actives endocriniennes* » (SAE) et « *perturbateurs endocriniens* » car ils ne signifient pas la même chose. Si une substance a le potentiel d'imiter une hormone (mécanisme que l'on pourra éventuellement voir *in vitro*), cela ne signifie pas qu'elle perturbera notre système hormonal, puisque notre système endocrinien est capable de faire face à ces interactions et de maintenir un équilibre. Ce n'est que lorsque cet équilibre est perturbé que des effets indésirables peuvent survenir. Or il est impossible de visualiser un effet indésirable sans tests *in vivo*. Les tests *in vitro* et de niveau 1 pourront ainsi montrer une interaction avec le système endocrinien qui ne présenterait pas d'effet indésirable *in vivo*.

Pour cette raison et en raison des limites inhérentes aux systèmes *in vitro*, un résultat *in vitro* négatif ne peut pas être utilisé seul pour exclure une éventuelle activité perturbatrice du système endocrinien sur la modalité endocrinienne à l'étude.

L'interdiction des tests sur animaux est sans aucun doute une avancée éthique, mais qui rend difficile l'évaluation de plusieurs points clés toxicologiques notamment de la perturbation endocrinienne.

Néanmoins, nous nous approchons petit à petit d'une interdiction complète des tests sur les animaux, et ce, quelle que soit l'industrie concernée. Ce frein à l'évaluation pousse donc la toxicologie actuelle à la recherche de nouvelles façons d'évaluer les substances de la manière la plus fiable possible, sans avoir recours aux essais *in vivo*. Cela encourage l'innovation en termes d'essais *in vitro* et *in silico*, et de nouvelles manières d'aborder la toxicologie commencent à apparaître. On retrouve par exemple le next generation risk assessment, évaluation des risques de nouvelle génération (NGRA) définie comme une approche d'évaluation des risques fondée sur l'exposition et fondée sur des hypothèses qui intègrent des approches *in silico*, *in chemico* et *in vitro*. L'objectif global d'une « *NGRA* » est qu'elle soit pertinente pour les humains. Elle doit être menée en utilisant une approche à plusieurs niveaux et itérative, après une recherche documentaire appropriée et une évaluation des données disponibles et en utilisant des méthodologies et des stratégies d'essais pertinentes pour garantir la confiance dans la validité de l'évaluation de la sécurité. Ou encore le modèle ToxCast qui est le premier modèle recommandé, avant les tests *in vivo*, dans la ligne directrice de l'EFSA/ECHA pour la modalité oestrogénique. Ce modèle ToxCast existe également pour la modalité androgénique, mais n'est pas encore recommandé en premier lieu par l'EFSA/ECHA. Dans le futur, on peut penser qu'une manière éthique et fiable d'analyser la perturbation endocrinienne serait de développer ces modèles sur les autres modalités, en identifiant très clairement la mécanistique de signalisation de chacun des produits testés.

D'après *La Merrill, M.A., et al. (2020)*, un perturbateur endocrinien peut interagir selon dix caractéristiques-clés (agonisme/antagonisme des récepteurs hormonaux, modification du signal de transduction, modification de la synthèse hormonale etc…). En théorie, il serait donc possible de confirmer qu'une substance n'a pas de propriétés de perturbation endocrinienne, si elle n'agit pas sur ces 10 caractéristiques clés. En pratique, il est très dur d'étudier chacune des 10 caractéristiques dans des modèles *in vitro*, par manque de modèles.

De plus, qu'il s'agisse de tests *in vivo* ou *in vitro*, aucune des deux catégories ne permet vraiment une extrapolation complète des résultats à l'Homme. La pertinence des études chez l'animal utilisées en toxicologie par rapport à leur extrapolation à l'homme est parfois mise en cause ou non établie. Les modèles *in vitro* sont également critiqués car ce ne sont pas des études sur organismes entiers. Toutefois, leur intérêt est réel, en raison de leurs apports sur la connaissance des mécanismes.

Un autre paramètre qui complique l'extrapolation des résultats des travaux réalisés à partir de modèles *in vitro* ou avec des animaux de laboratoire à l'être humain est l'hétérogénéité génétique de la population humaine. En effet, bien que cet aspect soit encore quasiment inexploré dans le cadre des perturbateurs endocriniens, divers polymorphismes dans des gènes clés de la fonction de reproduction sont connus. Ces polymorphismes pourraient modifier l'activité des protéines codées par ces gènes et s'ajouter à l'effet de perturbateurs tels que le phtalate DBP qui perturbe l'expression de l'INSL3. Des polymorphismes ont également été décrits pour les récepteurs aux androgènes (AR) et aux œstrogènes (ER) ainsi que pour SF1 (*steroidogenic factor* 1). Il pourrait exister des individus ou des populations ayant une plus ou moins grande susceptibilité à l'égard des perturbateurs endocriniens du fait de fond génétique différent. (47)

La perturbation endocrinienne est un mécanisme très complexe à étudier et à mettre en évidence. La stratégie proposée dans ce rapport nous semble être la plus appropriée à notre problématique, cependant elle présente plusieurs limites.

Premièrement, bien que l'on cite une stratégie « *standard* », chaque substance est différente et les évaluations se feront au cas par cas. En effet, ce processus de recherche a pu mettre en évidence les failles de certaines méthodologies de la stratégie, notamment le log de Kow du DEHP bien supérieur à 4 (7,5), et dont l'absorption dermale est relativement faible (5%), mais qui entraîne malgré tout des effets perturbateurs endocriniens très néfastes. L'utilisation de la base de données ToxCast, première recommandation par l'EFSA/ECHA pour la modalité oestrogénique, rend également une évaluation pour le DEHP négative, ce qui montre que l'évaluation ne peut pas s'arrêter simplement à ToxCast et doit comprendre une revue complète de la littérature.

Ensuite, bien que couvrant les voies essentielles de la perturbation endocrinienne, les modalités EATS ne sont pas les seuls paramètres endocriniens de l'organisme. En effet, un effet adverse peut être aussi la conséquence de la perturbation d'autres modalités endocriniennes, c'est-à-dire

non-EATS. Par exemple l'adversité dans le surrénal ou l'hypophyse peut être consécutive à une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien résultant en une réponse au stress modifiée. Il n'existe actuellement aucune méthode de test de l'OCDE pour évaluer le mécanisme non-EATS potentiel. En l'absence de méthodologies d'essais validées au niveau international, aucune directive spécifique ne peut être donnée sur la manière d'identifier les liens potentiels entre ces effets et les modalités endocriniennes non EATS.

Enfin, tout ce rapport ainsi que les stratégies évoquées (celle de la ligne directrice de l'EFSA/ECHA, et celle interne à l'entreprise), ne prennent en compte que la santé Humaine, en excluant l'Environnement, et donc l'écotoxicologie n'est pas évaluée. Ainsi, nous passons à côté d'une source de contamination potentielle. Les perturbateurs endocriniens sont d'origine multiple et peuvent, selon leurs propriétés physico-chimiques, être transférés dans différents milieux. Divers composés suspectés d'être des perturbateurs endocriniens peuvent donc se retrouver dans l'environnement à l'état de traces. Les organismes vivants peuvent ainsi être exposés par de multiples voies (ingestion, inhalation, contact cutané) à des doses infimes de plusieurs composés, dont les effets peuvent être variés et pourraient se combiner.

Une autre limite importante à ce sujet est liée aux périodes de vulnérabilité. L'effet adverse dû aux propriétés perturbatrices endocriniennes d'une substance n'est pas toujours identifiée selon la période de la vie à laquelle on l'évalue. En effet, Il existe des périodes de vulnérabilité durant lesquelles certaines personnes, par exemple les femmes enceintes et leur fœtus, sont plus sensibles à l'action des perturbateurs endocriniens. Selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), la sensibilité aux perturbateurs endocriniens peut varier selon les périodes de la vie (48). C'est notamment le cas de la période du développement foeto-embryonnaire, de la petite enfance, ainsi que de la puberté. C'est ce que l'on appelle la fenêtre d'exposition. L'âge d'exposition est déterminant, les impacts étant pour beaucoup consécutifs à l'exposition durant la période de gestation. La toxicité et les effets néfastes induits peuvent donc dépendre en grande partie du moment auquel l'organisme est exposé.

Ainsi, les tests de niveau 3 sont incapables de révéler le spectre complet des effets PE possibles, étant donné que les animaux avec une production endocrinienne minimale sont exposés pendant une courte période de temps, ne couvrant qu'une partie limitée de leur cycle de vie, qui peut ne pas couvrir les plus sensibles fenêtres d'exposition, et ne pas permettre d'examiner les effets retards.

De plus, pour certaines substances, l'effet adverse sera difficilement prédictif. En effet, lorsque la toxicité des produits chimiques est évaluée, leurs effets sont généralement considérés isolément, avec des hypothèses de « *tolérabilité* » d'expositions dérivées de données sur un seul produit chimique. Outre la complexité intrinsèque du concept de perturbation endocrinienne, un degré supplémentaire dans cette complexité apparaît avec la notion de mélanges, c'est-à-dire de cocktails de substances toxiques pouvant avoir, tant au niveau de la cellule qu'au niveau de l'organisme, voire des populations et des écosystèmes, des effets additifs ou synergiques selon Hass et coll. (2007)(49) et Christiansen et coll. (2009)(50), ou encore des effets décrits comme « *something from nothing* » par Kortenkamp (2007, 2008)(51)(52).

L'effet cocktail des perturbateurs endocriniens est complexe à mettre en évidence : il découle parfois de l'addition des effets délétères de plusieurs composés, qui agissent sur les mêmes mécanismes biologiques. Ensemble, ils peuvent perturber l'organisme sans que chacun, pris isolément, n'ait d'effet. Par ailleurs, il peut y avoir des interactions entre perturbateurs endocriniens agissant par des mécanismes différents (synergiques ou antagonistes). (53)

Le grand défi des décennies à venir est de pouvoir décrypter la composition et les actions de ces mélanges et d'identifier les molécules les plus toxiques ainsi que les différents types d'interactions de leurs effets.

Selon Paracelse « *Tout est poison, rien n'est poison, c'est la dose qui fait le poison* », c'est le principe clé de la toxicologie, et le concept de la relation dose-effet est à l'origine des notions de seuil de toxicité dans les réglementations actuelles des produits chimiques. Ce paradigme, qui consiste à dire que plus la dose est élevée, plus l'effet est important (avec ou sans seuil), a permis l'élaboration des valeurs toxiques de référence (VTR) nécessaires à l'établissement des normes sanitaires, et est le pilier de l'évaluation du risque des substances.

C'est sur ce principe que les évaluations du risque et les calculs du seuil d'acceptabilité d'une substance se basent.

Lorsqu'elle est issue d'études de toxicité réalisées chez l'animal, la dose sans effet indésirable observé (NOAEL) pour le calcul de la marge de sécurité doit être la plus pertinente possible. Ces études doivent être réalisées par une voie assurant une exposition systémique suffisante et documentée.

C'est sur ce principe que les évaluations du risque et les calculs du seuil d'acceptabilité d'une substance se basent. En effet, la dose maximale pouvant être utilisée pour une substance est calculée selon la formule suivante :

Seuil ppm = NOAEL syst X PC X FC / MoS X exposition cosmétique quotidienne X DA (2)

Avec :

NOAEL systémique : NOAEL X absorption exprimée en mg/kg poids

La fixation de la dose sans effet indésirable observé (NOAEL), repose généralement sur des études de toxicité réalisées chez l'animal. Lorsqu'elle est issue d'études de toxicité réalisées chez l'animal, la NOAEL retenue pour le calcul de la marge de sécurité doit être la plus basse observée.

PC = Poids corporel moyen : 60 kg corporel/jour

FC = Facteur de conversion mg vers µg : 1000

Marge de sécurité (MoS) : Sans unité

Exposition cosmétique quotidienne : 17,4 g/jour (2)

DA = Absorption cutanée : 50% par défaut

On obtient donc une valeur seuil à ne pas dépasser.

Cependant, ce principe de base a été remis en cause après l'observation de courbes dose-réponse non monotones, comme par exemple des courbes en U, les réponses maximales pouvant alors se trouver dans la gamme des doses les plus faibles et les plus fortes mais pas dans la gamme intermédiaire, d'autres sont en cloche ou en U inversé, les effets maximaux se trouvant alors dans la gamme des concentrations intermédiaires (figure 15). On peut également observer ce qu'on appelle des effets faibles doses (ou Low-Dose effect) où la toxicité de la substance se manifeste à des doses inférieures à la NOAEL. Ces courbes ont notamment été observées pour des perturbateurs endocriniens (54).

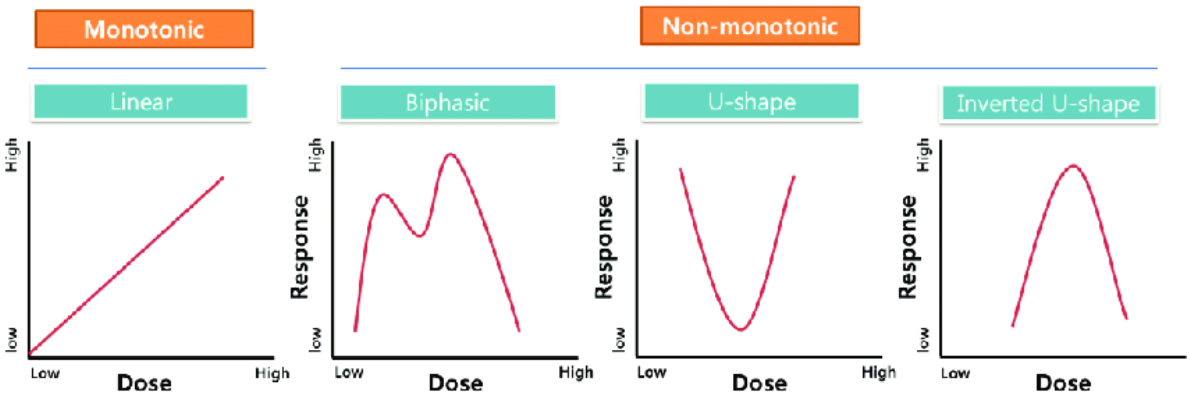

Figure 15 : Exemples de courbes dose-réponse monotones et non monotones

Ces toxicités ne sont alors pas prévisibles par les études toxicologiques réglementaires classiques qui supposent une relation dose-effet linéaire avec ou sans seuil. De plus les études toxicologiques *in vivo* actuelles ne testent d'ordinaire que trois doses (faible – intermédiaire – forte) pour estimer la NOAEL. Il serait non éthique de tester une multitude de doses supplémentaires pour contrôler la présence ou l'absence de réponses non monotones. De ce fait, les tests *in vivo* ne peuvent pas le vérifier.

Ces effets ne sont pas encore expliqués clairement, mais des hypothèses ont été avancées, par exemple cela pourrait s'expliquer par une sélectivité des récepteurs, une internalisation des récepteurs, une désensibilisation, une compétition entre différents récepteurs, un rétrocontrôle… (55)

Ces notions sont débattues par de nombreux chercheurs et toxicologues dans le monde. Malgré tout, elles font l'objet d'un consensus de plus en plus large.

Quelques agences reconnaissent l'existence de ces notions : un avis de l'ANSES en 2016 énonce que « *Les experts ne sont pas favorables à ce que, pour un PE, le cadre réglementaire prenne en considération la notion d'exposition ou de risque, étant donné qu'il est difficile en l'état actuel des connaissances, de définir un seuil en deçà duquel l'exposition ou le risque pourraient être qualifiés de « négligeables ». Ces difficultés sont dues aux spécificités liées aux modes d'action des PE ; les fenêtres de vulnérabilité des populations exposées (Homme et autres espèces vivantes), ainsi que la possibilité de relations dose-réponse non monotones justifient cette position. En revanche, les experts sont en faveur de l'extension du principe d'un cadre réglementaire des PE fondé sur le danger aux usages autres que ceux applicables aux produits biocides et aux produits phytopharmaceutiques (produit cosmétiques, produits*

chimiques ...). Concernant les PE « suspectés », une évaluation de risque pourrait être conduite au préalable à l'autorisation pour la substance incriminée. ». (56)

La ligne directrice de l'ECHA/EFSA souligne le manque de consensus dans la communauté scientifique, mais reconnaît les preuves apportées (notamment par Beausoleil, 2013).

En 2012, l'OMS dans le State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, admet que les perturbateurs endocriniens sont susceptibles de produire des réponses non linéaires *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, l'OMS assure que l'on ne peut pas utiliser de TTC (Threshold of Toxicological Concern) ou seuil de préoccupation toxicologique pour les perturbateurs endocriniens. Le TTC est une méthodologie pragmatique et scientifiquement valide pour évaluer la sécurité des substances de toxicité inconnue. Il a été développé pour filtrer et prioriser l'évaluation des risques des substances lorsque la structure chimique de la substance est connue et lorsque l'exposition humaine peut être estimée comme relativement faible. Cet outil correspond à une approche probabiliste dont l'application n'est envisageable que dans le cas de substances chimiques présentes à très faibles concentrations et pour lesquelles les données toxicologiques spécifiques s'avèreraient insuffisantes pour conduire une évaluation toxicologique classique. (57)

L'utilisation de l'approche TTC est exclue d'office pour certaines catégories de substances : les substances présentant un fort potentiel cancérogène, les substances inorganiques, les métaux et les composés organométalliques, les protéines, les stéroïdes, les substances connues comme étant bioaccumulables ou présumées l'être, les nanomatériaux, les substances radioactives et, enfin, les mélanges de substances qui contiennent des structures chimiques à la fois connues et inconnues.

Le comité scientifique de l'EFSA s'est penché attentivement sur la possibilité d'appliquer l'approche TTC aux substances actives sur le système endocrinien, y compris celles qui pourraient potentiellement présenter des effets à faible dose. Il a conclu que :

- S'il existe des données démontrant qu'une substance active sur le système endocrinien a des effets indésirables, alors l'approche TTC ne devrait pas être utilisée et une évaluation complète des risques devrait être réalisée sur la base de ces données.
- S'il existe des données montrant qu'une substance a des effets sur le système endocrinien mais que la pertinence de ces données n'est pas claire pour la santé

humaine, alors les évaluateurs du risque devraient décider au cas par cas s'il y a lieu d'utiliser ou non l'approche TTC.

Le règlement (CE) n°1107/2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques est le premier à traiter spécifiquement les perturbateurs endocriniens, et à se référer au principe de précaution, en faisant prévaloir la notion de danger sur celle de risque. Ici, l'exclusion des PE est explicite, la simple présence d'une substance qualifiée d'effet perturbateur endocrinien est interdite, sans considération de la dose, ni de l'exposition.

C'est également le principe de précaution que nous avons décidé d'appliquer dans notre stratégie interne, c'est-à-dire que l'identification d'une substance aux propriétés perturbant le système endocrinien suffira à la retirer de nos produits.

Il est à noter que l'avis de l'industrie est similaire à celui du CSSC, qui affirme la possibilité d'effectuer une évaluation du risque et non du danger.

CONCLUSION

Les perturbateurs endocriniens se trouvent au cœur des préoccupations de santé actuelles. Ces substances capables d'interférer avec notre système hormonal, provenant de multiples sources d'exposition et entraînant une inquiétude croissante auprès des consommateurs, représentent un défi scientifique et un enjeu majeur en matière de santé publique.

Bien que la recherche sur la perturbation endocrinienne ait fait des avancées considérables ces dernières années, ces substances font encore l'objet de débat quant à leur mécanisme d'action et à l'impact réel de leur exposition sur les organismes vivants, entraînant parfois un manque de consensus entre les experts.

Ces substances exogènes provoquent des effets délétères sur l'environnement accentués dans les zones polluées : baisse de la fertilité de la faune sauvage, féminisation des espèces. Ceci a été vu notamment chez les poissons avec des malformations du système reproducteur et une altération du sex/ratio. Chez les oiseaux une diminution de la résistance des coquilles d'œufs, et une augmentation des malformations embryonnaires ont également été mises en évidence.

Pour ce qui est de la toxicologie Humaine, depuis 50 ans, une diminution de la fertilité de l'Homme dans les pays industrialisés, des malformations des organes sexuels, ainsi qu'une augmentation importante des cancers hormonaux-dépendants ont pu être observées et incriminent de manière certaine grâce à des études épidémiologiques notamment le distilbène, ou encore la chlordécone (insecticide).

En plus de l'apparition de pathologies spécifiques, un effet sur la descendance est également observé. Malheureusement, lorsqu'un PE contamine une femme enceinte, cela peut avoir des répercussions sur elle, mais également sur son fœtus et les gamètes de son fœtus. Ce n'est donc pas une mais au moins 3 générations de touchées. Un phénomène allant au-delà de 3 générations a même déjà été observé avec 4 générations pour le distilbène, probablement dû à des mécanismes épigénétiques (actuellement en cours d'étude).

A cela s'ajoute également la problématique de bioaccumulation pour les composés POP (Persistants bio-accumulables) : une substance PE peut se bioaccumuler dans l'environnement, pouvant aller jusqu'à 700 ans comme pour la chlordécone ; ainsi que la toxicité sans seuil de certains PE rendant une évaluation du risque très délicate voire impossible.

Si une réglementation européenne les régit strictement, l'hétérogénéité des différentes réglementations européennes rend leur évaluation difficile. En effet, à l'heure actuelle, seules les règlementations concernant les pesticides et les biocides se basent sur la notion d'exclusion des PE après une évaluation du danger et non du risque.

Pour ce qui est des produits cosmétiques, le règlement REACH permet la classification de certaines substances identifiées comme PE dans la catégorie des substances extrêmement préoccupantes (SVHC).

La réglementation des cosmétiques, elle, est peu claire : en effet, le cadre réglementaire s'appliquant aux produits cosmétiques ne donne pas d'indications spécifiques sur l'évaluation de la perturbation endocrinienne dans les substances utilisées, et c'est à l'industrie de se positionner elle-même en élaborant une stratégie qui lui est propre.

Une réflexion importante est en cours au niveau européen afin d'harmoniser ces différentes réglementations, pour l'instant très hétérogènes.

La loi AGEC, LOI n° 2020-105 du 10 février 2020 (58) relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire, promulguée le 10 février 2020, recense 103 articles dont une cinquantaine de mesures applicables par décrets ou arrêtés. Parmi les mesures d'application rapprochée, l'article 13 de la loi prévoit la définition, par voie réglementaire, des modalités d'application de l'article L. 5232-5 du code de la santé publique relatif aux informations mises à la disposition du public par voie électronique par toute personne qui met sur le marché des produits qui comportent des substances dont l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qualifie les propriétés de perturbation endocrinienne :

Article 13-2 :

« I.- *Toute personne qui met sur le marché des produits qui, au terme de leur fabrication, comportent des substances dont l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, qualifie les propriétés de perturbation endocrinienne d'avérées ou présumées met à la disposition du public par voie électronique, dans un format ouvert, aisément réutilisable et exploitable par un système de traitement automatisé, pour chacun des produits concernés, les informations permettant d'identifier la présence de telles substances dans ces produits.*

II.- Pour certaines catégories de produits présentant un risque d'exposition particulier, l'obligation prévue au I s'applique également pour les substances dont l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail qualifie les propriétés de perturbation endocrinienne de suspectées. »

Ce décret devrait être pris en Décembre 2020 et la date d'entrée en vigueur imposée par la loi au plus tard le 1er janvier 2022. Cette loi requiert une information des consommateurs sur les substances chimiques présentes dans les produits, notamment si un des composants de ces produits sont susceptibles d'avoir un effet PE. Ces effets peuvent être avérés, présumés mais également suspectés : cela augmente la pression vis-à-vis des industriels et va pousser à une véritable évaluation des effets PE des substances, évaluation manquante aujourd'hui.

Dans le même domaine, l'article 14 de cette loi prévoit la mise en place d'un pictogramme ou un autre moyen de marquage, d'étiquetage ou d'affichage, lorsque l'ANSES a émis des recommandations spécifiques à destination des femmes enceintes sur certaines catégories de produits contenant des substances à caractère perturbateur endocrinien (décret prévu à partir de l'été 2021).

« *Art. L. 1313-10-1.-Lorsque l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a émis des recommandations spécifiques à destination des femmes enceintes sur certaines catégories de produits contenant des substances à caractère perturbateur endocrinien, en tenant compte des risques d'exposition, le pouvoir réglementaire peut imposer aux fabricants des produits concernés d'y apposer un pictogramme ou d'avoir recours à un autre moyen de marquage, d'étiquetage ou d'affichage.* » (56)

L'ANSES a été saisie par les ministères pour l'application de cette loi et travaille actuellement pour identifier les substances les plus pertinentes devant faire l'objet d'une telle évaluation.

Ainsi, des évolutions réglementaires sont actuellement en cours concernant ces substances néfastes.

Le travail bibliographique effectué dans le cadre du présent rapport permet de conclure qu'il n'existe, à ce jour, aucune preuve avérée ou confirmée sur l'effet néfaste des perturbateurs endocriniens, à leurs concentrations normales d'utilisation dans les produits cosmétiques. Le doute n'est cependant pas totalement levé et nécessiterait la mise en œuvre de nouvelles études plus pertinentes.

Les méthodes scientifiques disponibles à l'heure actuelle ne couvrent pas encore l'ensemble des mécanismes d'action de la perturbation endocrinienne. Chaque organe endocrine a une régulation propre, ce qui entraîne la nécessité d'avoir un modèle spécifique de test pour chaque type d'organe, afin de pouvoir évaluer tous les aspects PE potentiels. Les tests OCDE recommandés par l'EFSA et l'ECHA, bien que *in vivo*, ne permettent pas d'évaluer chacun des mécanismes d'action pouvant mener à un effet PE.

Cette situation s'explique notamment par l'insuffisance du nombre de méthodes d'essais validées. De plus, ces tests imposant une extrapolation de l'animal vers l'Homme entraînent très souvent des faux positifs et des faux négatifs. Il est donc nécessaire, particulièrement pour l'industrie cosmétique qui ne peut pas faire de test sur animaux, d'aller vers de nouvelles générations de tests.

Les tests *in vitro* existants étudient la toxicité à court terme. Or, il y a très peu de toxicité à court terme pour les PE (sauf cas particulier de la femme enceinte et de l'enfant à naître : une exposition à court terme à des PE peut provoquer une toxicité aigüe se reflétant par des avortements spontanés, accouchements prématurés, atrophies placentaires, souffrances fœtales, altération de la fonction placentaire, cryptorchidie…).

Ainsi, les modèles de test recherchés actuellement sont les tests pouvant mettre en évidence un effet à long terme, issu d'un modèle cellulaire humain (pour une extrapolation à l'Homme plus évidente), permettant une mesure de la sécrétion d'hormones (afin de confirmer la perturbation hormonale) ainsi que la mesure d'un effet délétère (confirmer un effet délétère présentant un danger pour l'homme et non une simple adaptation hormonale engendrée par une SAE).

Cela fait partie des objectifs de la plateforme Européenne PEPPER (59), qui vise à pré-valider trois méthodes de nouvelles générations (méthodes alternatives) répondant aux questions de toxicité Humaine et environnementale, afin de passer par la suite la procédure OCDE et être utilisées dans le cadre des nouvelles réglementations. Une évaluation de tous les tests existants sur le marché de niveau 2 et 3 a été effectuée, avec une définition de scores sur plusieurs critères PE. 256 méthodes ont été évaluées, et 17 tests ont été sélectionnés. Trois d'entre eux sont sur le point de rentrer en pré-validation. :

- Zebrafish : modèle de poissons zèbres transgéniques originaux : *cyp19a1a*-GFP et *cyp11c1*-GFP. Dans ces lignées, une analyse quantitative de la fluorescence de la protéine rapportrice (GFP73) permettrait d'apporter une réponse directe quant aux

potentielles perturbations des voies de biosynthèse des oestrogènes (inducteur/inhibiteur d'aromatase) et des androgènes 11-oxygénés.

- H295 cellules d'adénocarcinome : Essais de stéroïdogenèse permettant de détecter les effets des produits chimiques et de leurs métabolites sur la stéroïdogenèse, en particulier la production de 17β-œstradiol et de testostérone par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS).
- hPlacentox-PE : mesure le taux d'hormones passant par le placenta de la mère au fœtus (concentration de 200 à 1000 fois dans le placenta) et les effets délétères par la mesure de pathologies placentaires activées par des voies de dégénérescences placentaires connues. Chez la femme enceinte, un PE passe obligatoirement par le placenta. Ainsi, les effets toxiques d'une substance peuvent être observés en la perfusant sur un placenta *ex vivo* (atrophie placentaire, problème d'oxygénation, nutrition fœtus, modifications des hormones placentaires). Cette méthode permet d'étudier les effets à court terme mais aussi les effets à long terme (carcinogénèse).

La stratégie proposée dans ce rapport a été élaborée dans le respect de la réglementation actuelle et semble être la plus adéquate compte tenu des limites imposées car elle permet d'exclure certaines substances non critiques et propose un argumentaire sur le potentiel PE pour les autres. Cependant, celle-ci reste critiquable et est destinée à évoluer dans le temps, avec la réglementation et les méthodes d'identification futures.

Les perspectives futures de la recherche telle que la plateforme PEPPER sur le développement de tests *non-vivo* d'identification des perturbateurs endocriniens, le développement de la base de données ToxCast ou encore les tests *non-vivo* sur organismes entiers sont réellement prometteurs et apportent une espérance d'amélioration considérable de cette stratégie au cours des prochaines années.

ANNEXES

SUBSTANCES EXTRÊMEMENT PRÉOCCUPANTES
AU TITRE DE LEUR CARACTÈRE PERTURBATEUR ENDOCRINIEN

Nom de la substance	Date d'inclusion	Motif de l'inclusion
4-tert-butylphenol	16/07/2019	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)
Tris(4-nonylphenyl, branched and linear) phosphite (TNPP) with ≥ 0.1% w/w of 4-nonylphenol, branched and linear (4-NP) **Phenol, 4-nonyl-, phosphite (3:1)** N° CE : 608-492-4 | N° CAS : 3050-88-2 **Tris(nonylphenyl) phosphite** N° CE : 247-759-6 | N° CAS : 26523-78-4 **tris(4-nonylphenyl, branched) phosphite** N° CE : 701-028-2 | N° CAS : -	16/07/2019	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)
1,7,7-trimethyl-3-(phenylmethylene)bicyclo[2.2.1]heptan-2-one 3-benzylidene camphor; 3-BC	15/01/2019	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)
Dicyclohexyl phthalate DCHP	27/06/2018	Toxic for reproduction (Article 57c) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - human health)
Reaction products of 1,3,4-thiadiazolidine-2,5-dithione, formaldehyde and 4-heptylphenol, branched and linear (RP-HP) with ≥0.1% w/w 4-heptylphenol, branched and linear (4-HPbl) **Formaldehyde, reaction products with branched and linear heptylphenol, carbon disulfide and hydrazine** N° CE : 300-298-5 | N° CAS : 93925-00-9 **Reaction product of 1,3,4-thiadiazolidine-2,5-dithione, formaldehyde and phenol, heptyl derivs.** N° CE : 939-460-0 | N° CAS : -	15/01/2018	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)
4,4'-isopropylidenediphenol Bisphenol A; BPA	12/01/2017	Toxic for reproduction (Article 57c) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - human health)
4-heptylphenol, branched and linear substances with a linear and/or branched alkyl chain with a carbon number of 7 covalently bound predominantly in position 4 to phenol, covering also UVCB- and well-defined substances which include any of the individual isomers or a combination thereof **4-heptylphenol** N° CE : 217-862-0 | N° CAS : 1987-50-4 **Phenol, heptyl derivs.** N° CE : 276-743-1 | N° CAS : 72624-02-3	12/01/2017	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)

p-(1,1-dimethylpropyl)phenol	**12/01/2017**	**Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)**
4-Nonylphenol, branched and linear, ethoxylated substances with a linear and/or branched alkyl chain with a carbon number of 9 covalently bound in position 4 to phenol, ethoxylated covering UVCB- and well-defined substances, polymers and homologues, which include any of the individual isomers and/or combinations thereof **20-(4-nonylphenoxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-ol** N° CE : 248-743-1 | N° CAS : 27942-27-4 **2-[2-[2-[2-(4-nonylphenoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol** N° CE : 230-770-5 | N° CAS : 7311-27-5 **Nonylphenol, branched, ethoxylated (CAS# 68412-54-4)** N° CE : 932-688-1 | N° CAS : - **Nonylphenol, ethoxylated (15-EO) (9016-45-9)** N° CE : 931-756-8 | N° CAS : - **Nonylphenol, ethoxylated (10-EO) (9016-45-9)** N° CE : 931-755-2 | N° CAS : - **Nonylphenol, ethoxylated (8-EO) (9016-45-9)** N° CE : 931-754-7 | N° CAS : - **Nonylphenol, ethoxylated (6,5-EO) (9016-45-9)** N° CE : 931-753-1 | N° CAS : - **26-(4-nonylphenoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24-Octaoxahexacosan-1-ol** N° CE : 604-395-6 | N° CAS : 14409-72-4 **Nonylphenol, branched, ethoxylated** 1 - 2.5 moles ethoxylated N° CE : 500-209-1 | N° CAS : 68412-54-4 **4-Nonylphenol, ethoxylated** 1 - 2.5 moles ethoxylated N° CE : 500-045-0 | N° CAS : 26027-38-3 **2-[2-(4-nonylphenoxy)ethoxy]ethanol** N° CE : 243-816-4 | N° CAS : 20427-84-3 **Nonylphenol, ethoxylated** N° CE : 500-024-6 | N° CAS : 9016-45-9 **2-[4-(3,6-dimethylheptan-3-yl)phenoxy]ethanol** N° CE : 687-832-3 | N° CAS : 1119449-37-4 **Poly(oxy-1,2-ethanediyl), a-(nonylphenyl)-w-hydroxy-(CAS 9016-45-9)** N° CE : 931-562-3 | N° CAS : 9016-45-9 **Isononylphenol, ethoxylated** N° CE : 609-346-2 | N° CAS : 37205-87-1 **Nonylphenolpolyglycolether** N° CE : 932-998-7 | N° CAS : - **26-(nonylphenoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosan-1-ol** N° CE : 247-816-5 | N° CAS : 26571-11-9 **Nonylphenol, ethoxylated (EO = 10)** N° CE : 939-993-9 | N° CAS : - **Nonylphenol, ethoxylated (EO = 4)** N° CE : 939-975-0 | N° CAS : - **Nonylphenol, ethoxylated (polymer)** N° CE : 938-618-6 | N° CAS : - **2-{2-[4-(3,6-dimethylheptan-3-yl)phenoxy]ethoxy}ethanol** N° CE : 687-833-9 | N° CAS : 1119449-38-5 **4-Nonylphenol, branched, ethoxylated** 1 - 2.5 moles ethoxylated N° CE : 500-315-8 | N° CAS : 127087-87-0	20/06/2013	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)
4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol, ethoxylated covering well-defined substances and UVCB substances, polymers and homologues **20-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3,6,9,12,15,18-**	19/12/2012	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)

hexaoxaicosan-1-ol N° CE : 219-682-8 | N° CAS : 2497-59-8 **4-tert-Octylphenol monoethoxylate** N° CE : 621-345-9 | N° CAS : 2315-67-5 **[No public or meaningful name is available]** N° CE : 621-341-7 | N° CAS : 2315-61-9 **2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol** N° CE : 618-344-0 | N° CAS : 9002-93-1		
4-Nonylphenol, branched and linear substances with a linear and/or branched alkyl chain with a carbon number of 9 covalently bound in position 4 to phenol, covering also UVCB- and well-defined substances which include any of the individual isomers or a combination thereof **p-nonylphenol** N° CE : 203-199-4 | N° CAS : 104-40-5 **4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)phenol** N° CE : 635-391-2 | N° CAS : 142731-63-3 **4-(3,5-Dimethyl-3-heptyl)phenol** N° CE : 635-389-1 | N° CAS : 186825-36-5 **p-(1-methyloctyl)phenol** N° CE : 241-427-4 | N° CAS : 17404-66-9 **Phenol, 4-nonyl-, branched** N° CE : 284-325-5 | N° CAS : 84852-15-3 **p-isononylphenol** N° CE : 247-770-6 | N° CAS : 26543-97-5 **p-(1,1-dimethylheptyl)phenol** N° CE : 250-339-5 | N° CAS : 30784-30-6 **4-(1-ethyl-1-methylhexyl)phenol** N° CE : 257-907-1 | N° CAS : 52427-13-1 **4-(2,6-Dimethyl-2-heptyl)phenol** N° CE : 635-388-6 | N° CAS : 521947-27-3 **Isononylphenol** N° CE : 234-284-4 | N° CAS : 11066-49-2 **4-(3-ethylheptan-2-yl)phenol** N° CE : 635-696-0 | N° CAS : 186825-39-8 **Phenol, nonyl-, branched** N° CE : 291-844-0 | N° CAS : 90481-04-2 **Nonylphenol** N° CE : 246-672-0 | N° CAS : 25154-52-3	19/12/2012	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)
Diisobutyl phthalate	13/01/2010	Toxic for reproduction (Article 57c) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - human health)
4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol	19/12/2011	Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment)
Benzyl butyl phthalate (BBP)	28/10/2008	Toxic for reproduction (Article 57c) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - human health)
Bis (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	28/10/2008	Toxic for reproduction (Article 57c) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - environment) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - human health)
Dibutyl phthalate (DBP)	28/10/2008	Toxic for reproduction (Article 57c) Endocrine disrupting properties (Article 57(f) - human health)

Source : Assemblée Nationale. *Rapport d'information n°2483 sur les perturbateurs endocriniens présents dans les contenants en plastique*. Décembre 2019. 252 p.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Parlement Européen, 2009. *Règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques*. JO du 22 décembre 2009. 151p.

(2) SCCS. *The SCCS Notes of Guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation - 10th revision*. Report No.: SCCS/1602/18. Brussels : European Commission, 2018b : 152 p.

(3) Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens [Internet]. Ministère de la Transition écologique. [cité 28 oct 2020]. Disponible sur: https://www.ecologie.gouv.fr/strategie-nationale-sur-perturbateurs-endocriniens

(4) INRS. *Le système endocrinien.* http://www.inrs.fr/risques/perturbateurs-endocriniens/definition-mecanismes-action.html. 12 Juillet 2018.

(5) Pharmacorama. *Hormones sexuelles stéroïdiennes.* https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/hormones-cytokinesantigenes-anticorps/hormones-sexuelles-steroidiennes/. 02/08/2020.

(6) Research Gate. *Etude du système dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre.* https://www.researchgate.net/publication/311770115_Etude_du_systeme_dopaminergique_inhibiteur_de_la_fonction_gonadotrope_chez_le_poisson-zebre. Décembre 2014

(7) Research Gate. *Répression transcriptionnelle du gène TRH.* *https://www.researchgate.net/publication/242567501_Repression-_transcriptionnelle-_du-gene-TRH. 2005.*

(8) ANSES. *Avis relatif à "la définition de critères scientifiques définissant les perturbateurs endocriniens.* Juillet 2016. 11 p.

(9) Ministère des solidarités et de la Santé ; Ministère de l'agriculture et de l'alimentation ; Ministère de la transition écologique et solidarité. *La stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE).* Décembre 2017. 144 p.

(10) OMS. *State of the science of Endocrine Disrupting Chemicals* – 2012 OMS. 289 p.

(11) La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T. et al. *Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification.* Nat Rev Endocrinol 16, 45–57 (2020)

(12) Cancer Environnement. *Perturbateurs endocriniens et risques de cancer.* https://www.cancer-environnement.fr/274-Perturbateurs-endocriniens.ce.aspx. 11 décembre 2018.

(13) Parlement Européen. *Endocrine Disruptors: from Scientific Evidence to Human Health Protection*. May 2019. 132 p.

(14) INRAE, l'Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement [Internet]. [cité 28 oct 2020]. Disponible sur: https://agriculture.gouv.fr/inrae-linstitut-national-de-recherche-pour-lagriculture-lalimentation-et-lenvironnement

(15) INSERM, *Les troubles de la fertilité – état des connaissances et pistes pour la recherche.* Remis au Parlement le 18 décembre 2012

(16) Palmer JR, Wise LA, Hatch EE et coll. "Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer". Cancer Epidemiol Biomarkers 2006; 15(8):1509-14.

(17) INSERM. *Epigénétique, un génome, plein de possibilité !* https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/epigenetique. 18 Février 2015.

(18) Philippat, et al.. *Exposure to Phthalates and Phenols during Pregnancy and Offspring Size at Birth.* EHP. 2011

(19) Alonso-Magdalena et al. *Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus.* 2011

(20) Parlement Européen. *Call for data on ingredients with potential endocrinedisrupting properties used in cosmetic products: "Benzophenone-3, Kojic acid, 4-methylbenzylidene camphor, Propylparaben, Triclosan, Resorcinol, Octocrylene, Triclocarban, Butylated Hydroxytoluene (BHT), Benzophenone, Homosalate, Benzyl salicylate, Genistein and Daidzein" in the framework of Regulation (EC) 1223/2009*. Mai 2019.

(21) Parlement Européen, *Révision du règlement (CE) nº 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques en ce qui concerne les substances présentant des propriétés perturbant le système endocrinien.* Bruxelles, le 7 Novembre 2018. 151 p.

(22) Parlement Européen, *règlement (ce) nº 1907/2006 du parlement européen et du conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (reach), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/ce et abrogeant le règlement (cee) nº 793/93 du conseil et le règlement (ce) nº 1488/94 de la commission ainsi que la directive 76/769/cee du conseil et les directives 91/155/cee, 93/67/cee, 93/105/ce et 2000/21/ce de la commission.* JO du 30 Décembre 2006. 520 p.

(23) Parlement Européen, *Règlement (ce) no 1272/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances*

et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006. JO du 31 Décembre 2008. 1355 p.

(24) Parlement Européen, 2009. *Règlement (CE) n°1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil*. JO du 24 Novembre 2009. 50 p.

(25) Parlement Européen, *Règlement (CE) n° 528/2012 du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides*. JO du 27 Juin 2012. 123 p.

(26) US EPA O. *Summary of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* [Internet]. US EPA. 2013 [cité 28 oct 2020]. Disponible sur: https://www.epa.gov/laws-regulations/summary-federal-food-drug-and-cosmetic-act

(27) OCDE. *Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption.* 03 Septembre 2018. 692 p.

(28) Ministère des solidarités et de la Santé ; Ministère de l'agriculture et de l'alimentation ; Ministère de la transition écologique et solidarité. *2e stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE2).* Janvier 2019. 63 p.

(29) EFSA, ECHA. *Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009* EFSA Journal 2018;16(6):531. 135 p.

(30) SCCS. *Memorandum on Endocrine Disruptors.* Report No. : SCCS/1544/14. Brussels : European Commission, 2014 : 10 p.

(31) ECHA. *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment*, Chapter R.7a : Endpoint specific guidance - version 6.0. 2017 : 600p.

(32) OCDE. *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship Models.* 03 Septembre 2014. 154 p.

(33) European Commission. *Guidance Document on Dermal Absorption.* Sanco/222/2000 rev. 7. 19 March 2004. 15 p.

(34) Test No. 248: Xenopus Eleutheroembryonic Thyroid Assay (XETA) [Internet]. [cité 17 nov 2020]. Disponible sur: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/tg-248-xenopus-eleutheroembryonic-thyroid-assay-xeta_a13f80ee-en

(35) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposesText with EEA relevance. :47.

(36) Boron Powder. *Hexagonal Boron Nitride coating test on handgun ammo*. https://www.boron-powder.com/hexagonal-boron-nitride-coating-test-on-handgun-ammo/ 07 Janvier 2014.

(37) Cosmetic Ingredient Review. *Safety Assessment of Boron Nitride as Used in Cosmetics Status*. November 21, 2012. 9 p.

(38) Google Image. *Cosmetic composition containing a silicone acrylate and a polyester wax.* https://patents.google.com/patent/WO2009156375A1/en. 2008.

(39) NICNAS. *Polymer of low concern public report.* July 2013 : 7 p.

(40) INERIS. *Portail Substances Chimiques.* https://substances.ineris.fr/fr/substance/nom/dehp. 13 Avril 2018.

(41) ECHA. European Chimical Agency. *Substance Infocard.* https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.003.829 13 Juin 2020.

(42) CIR. Cosmetic Ingredient Review. *Ingredient Database.* https://online.personalcarecouncil.org/jsp/IngredientDetail.jsp?monoid=1100. Décembre 2019.

(43) US EPA. TOXCAST. *Glyceryl stearate.* https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID9029304#bioactivity-toxcast-models. 05/07/2020

(44) FDA. *GRAS Notices* [Internet]. [cité 28 oct 2020]. Disponible sur: https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices

(45) CIR. Cosmetic Ingredient Review. *Ingredient Database.* https://online.personalcarecouncil.org/jsp/IngredientDetail.jsp?monoid=6525. Décembre 2019.

(46) ECHA. *Octane-1,2-diol.* https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/14120/4/5/?documentUUID=88c10fbf-2ad6-41c6-ae6d-b3cd53f79bd4. 12 Juillet 2020.

(47) INSERM. *Méthodes et outils de caractérisation de l'impact de xénobiotiques sur la reproduction.* http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Chapitre_22.html?sequence=1548&isAllowed=y. 2011.

(48) ANSES. *Les perturbateurs endocriniens.* https://www.anses.fr/fr/content/les-perturbateurs-endocriniens. 03 Septembre 2019.

(49) Hass U, Scholze M, et al. *Combined exposure to ant-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat.* Environmental Health Perspectives 2007, 115 (suppl 1) : 122-128

(50) Christiansen S, Scholze M, et al. *Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens.* Environmental Health Perspectives 2009, 117 : 1839-1846

(51) Kortenkamp A. *Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals.* Environmental Health Perspectives 2007, 115 (suppl 1) : 98-105

(52) Kortenkamp A. *Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology*. International Journal of Andrology 2008, 31 : 233-240

(53) Assemblée Nationale. *Rapport d'information n°2483 sur les perturbateurs endocriniens présents dans les contenants en plastique*. Décembre 2019. 252 p.

(54) Beausoleil C, Ormsby JN, Gies A, Hass U, Heindel JJ, Holmer ML, Nielsen PJ, Munn S and Schoenfelder G, 2013. *Low dose effects and non-monotonic dose responses for endocrine active chemicals: science to practice workshop: workshop summary.* Chemosphere 93, 847–856. 15 p.

(55) Yeon-Pyo Hong and Yun-Jung Yang. *Low-Dose Exposure to Bisphenol A in Early Life.* June 2017. 17 p.

(56) ANSES. *Traitement de l'incertitude dans le processus d'évaluation des risques sanitaires des substances chimiques*. Rapport d'expertise collective. Mars 2016. 92 p.

(57) European Commission. *Thresholds for Endocrine Disrupters and Related Uncertainties*. 2013. 22 p.

(58) LOI n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire (1). 2020-105 févr 10, 2020.

(59) PEPPER. *Lancement de la plateforme publique-privée PEPPER* [Internet]. Les perturbateurs endocriniens [cité 28 oct 2020]. Disponible sur: https://www.perturbateurendocrinien.fr/plateforme-sur-les-perturbateurs-endocriniens/

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

TITRE et RESUME en français :

IDENTIFICATION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS DANS LES MATIERES PREMIERES COSMETIQUES

La perturbation endocrinienne est un sujet de préoccupation très sensible. Les perturbateurs endocriniens peuvent provenir de multiples sources d'exposition et entraînent une inquiétude croissante auprès des consommateurs et des scientifiques, notamment par la difficulté de leur identification. En raison de l'interdiction des tests *in vivo*, l'industrie cosmétique est dans l'incapacité d'effectuer les tests recommandés par la ligne directrice d'identification des perturbateurs endocriniens de l'EFSA/ECHA. La stratégie élaborée propose une approche séquentielle et utilise des tests ne faisant pas intervenir les animaux de laboratoire (QSAR, *in silico*, *in vitro*). Ces tests sont de plus en plus admis et validés par les autorités règlementaires et sont des outils pour l'évaluation du risque nouvelle génération, mais l'industrie cosmétique a besoin de davantage de modèles pour conclure sur le potentiel de perturbation endocrinienne d'une substance. L'étude des perturbateurs endocriniens est loin d'être achevée malgré les avancées scientifiques considérables de ces dernières années.

TITLE and ABSTRACT in english :

IDENTIFICATION OF ENDOCRINE DISRUPTORS IN COSMETIC RAW MATERIALS

Endocrine disruption is a very sensitive subject. Substances that disrupt the hormonal system can come from multiple sources of exposure and raise concern for consumers and scientists, in particular because of the difficulty of their identification. Due to the ban of animal experimentation, the cosmetics industry cannot perform *in vivo* testing as described in the EFSA/ECHA guideline for identification of endocrine disruptors. The strategy developed in this report proposes a sequential approach and uses tests (QSAR, *in silico*, *in vitro*), which do not involved laboratory animals. These tests are more and more accepted and validated by regulatory authorities and are tools that can be used as part of the next generation risk assessment. However, the cosmetic industry will need additional models to be able to conclude on the endocrine disruption properties of substances. The study of endocrine disruptors is far from being finished despite the significant scientific advances this past few years.

DISCIPLINE : PHARMACIE

MOTS-CLES : Perturbateurs endocriniens ; Cosmétiques ; Stratégie d'identification ; Tests *in vitro* ; Réglementation européenne ; Doses non monotones ; Effets cocktails ; Périodes de sensibilité

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R OU DU LABORATOIRE :

CHANEL Parfums Beauté, 8 rue du Cheval Blanc 93500 PANTIN France

Service de Toxicologie