
ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : SOURCES DE DONNEES POUR L'ORGANISATION DES CONNAISSANCES, MISES EN EVIDENCE JUSQU'EN 2005

ANNEXE 2 : PROPOSITION DE CONSTRUCTION DE VTR REPROTOXIQUES POUR LE DnBP, LE LINURON, L'EGEE, LE BBP, LE NONYLPHENOL ET LE TOLUENE

ANNEXE 3 : PROPOSITION DE CONSTRUCTION DE BENCHMARK DOSES (BMD) POUR LE DnBP, LE LINURON ET L'EGEE.

ANNEXE 1 : SOURCES DE DONNEES POUR L'ORGANISATION DES CONNAISSANCES, MISES EN EVIDENCE JUSQU'EN 2005**A. Informations spécifiques liées à la reprotoxicité****a. Evaluations détaillées***i. Cal EPA Hazard Identification Documents on Reproductive and Developmental Toxicity*

Sur le site Internet de l'OEHHA (Office of Environmental Hazard Health Assessment), de l'EPA Californie, sont répertoriées, dans le cadre de la proposition 65, des synthèses sur la toxicité sur la reproduction et le développement pour un certain nombre de substances. Seules quelques substances ont été évaluées à ce jour. Les documents produits sont évalués par un comité scientifique (comité DART) puis mis en consultation publique. <http://www.oehha.ca.gov/>

ii. Evaluations du CERHR

Le CERHR (Center of the Evaluation of Risks to Human Reproduction), du NIESH, propose sur son site Internet des profils toxicologiques complets pour quelques substances considérées comme reprotoxiques. Les documents sont préparés par des groupes d'experts puis évalués par un comité d'experts (du NIEHS, du CERHR et autres institutions). <http://cerhr.niehs.nih.gov/>

b. Documents synthétiques*i. Reprorisk package (base de données Micromedex)*

Ces bases sont du même type que la base HSDB, avec une mise à jour régulière, des informations sur les propriétés physico-chimiques, les usages, les effets pour différents types d'expositions, les classifications existantes, spécifiques à la reprotoxicité. Il n'y a pas de revue par des groupes d'experts indépendants. La base de données n'est pas accessible gratuitement.

ii. Fiches Demeter

Les fiches Demeter sont des Documents pour l'évaluation médicale des produits toxiques vis-à-vis de la reproduction, publiés par l'INRS. Il s'agit de fiches synthétiques qui regroupent les données disponibles sur la toxicité sur la reproduction pour 60 produits. Elles seront diffusées sous forme d'un CD joint au n°108 des Documents pour le médecin du travail (parution prévue en décembre 2006).

c. Données primaires

Le NTP propose sur son site Internet les rapports d'études (en résumé ou en entier) réalisées pour identifier les dangers relatifs aux substances. Plusieurs segments spécifiques à la reprotoxicité sont couverts :

- les études sur le développement (*NTP teratology studies*) ;
- les études sur la reproduction via l'allaitement (*NTP reproductive assessment by continuous breeding studies*);
- les études de screening à court terme (*NTP short-term developmental and reproductive toxicity studies*).

Les études sont conduites chez des animaux de laboratoire et respectent les lignes directrices du NTP. Les rapports d'études sont évalués par des comités scientifiques et sont mis en consultation publique. <http://ntp-server.niehs.nih.gov/>

d. Bases de données bibliographiques : Developmental and reproductive database (DART)

Cette base de données disponible via le site Internet de la National Library of Medicine fait une interrogation implicite basée sur la reprotoxicité. On peut également avoir accès directement à pubmed à partir de mots clés relatifs à la toxicité sur le développement. L'interrogation peut se faire par numéro CAS, comme sur Toxline. <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

B. Informations générales

a. Evaluations détaillées

i. ATSDR toxicological profiles

L'ATSDR publie sur son site Internet des profils toxicologiques complets pour un certain nombre de substances. Les données disponibles concernant les propriétés physico-chimiques, les expositions, la toxicité à court et long terme, la toxicocinétique et les mécanismes d'action sont synthétisées.

<http://www.atsdr.cdc.gov/>

ii. IARC monographs

Les monographies de l'IARC permettent de retrouver des informations sur les données générales liées aux substances chimiques. Sont également résumées les données sur la toxicité générale. Une évaluation détaillée est disponible pour les données de cancérogenèse chez l'animal et chez l'homme.

<http://monographs.iarc.fr/>

iii. IRIS toxicological profiles

L'US EPA publie sur sa base de données IRIS, pour certaines substances, un profil toxicologique complet fondé sur le même principe que ceux de l'ATSDR.

<http://www.epa.gov/iris/search.htm>

iv. IPCS environmental health criteria documents

L'IPCS publie des documents complets regroupant les informations sur les propriétés physico-chimiques des substances, leur toxicité et les expositions connues.

<http://www.inchem.org/>

v. NCEA evaluations

Le NCEA propose, pour quelques substances, des évaluations complètes prenant en compte l'ensemble des informations toxicologiques disponibles.

<http://www.epa.gov/ncea/>

b. Documents synthétiques

Certains documents synthétiques sont disponibles sur des substances chimiques au travers de programme en cours.

Il s'agit par exemple des fiches toxicologiques de l'INERIS, des fiches toxicologiques de l'INRS, des fiches d'élaboration des VLEP, si elle sont disponibles, des documents de l'OMS pour la construction de valeurs guides de qualité d'air ou d'eau, ainsi que du document publié par le groupe de travail européen INDEX sur les valeurs guides de la qualité de l'air intérieur¹.

c. Données primaires

Les rapports toxicologiques suivants pourront être consultés pour rassembler les éléments scientifiques pertinents à prendre en compte dans la rédaction du profil toxicologique de la substance.

- i. NTP report series : <http://ntp-server.niehs.nih.gov/>
- ii. OECD screening information data set profiles : <http://www.inchem.org>
- iii. IUCLID (ECB) database : <http://ecb.jrc.it/>

d. Bases de données bibliographiques et toxicologiques

Les bases de données suivantes pourront être consultées pour rassembler les éléments scientifiques pertinents à prendre en compte dans la rédaction du profil toxicologique de la substance.

- i. Pubmed (articles scientifiques) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ii. Toxline (articles scientifiques) : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
- iii. HSDB (N°CAS, propriétés physico-chimiques) : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
- iv. ChemFinder (formules brutes, développées et structure, N°CAS) : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

¹ INERIS : <http://www.ineris.fr> ; VLEP : http://europa.eu.int/comm/employment_social/health_safety/ ; OMS : <http://www.who.int/> ; INDEX sur <http://www.jrc.cec.eu.int/>

**ANNEXE 2 : PROPOSITION DE CONSTRUCTION DE VTR REPROTOXIQUES POUR LE DnBP, LE LINURON,
L'EGEE, LE BBP, LE NONYLPHENOL ET LE TOLUENE**

**Construction/ Choix d'une VTR reprotoxique
pour le Di-n-butyl-phtalate (DBP, CAS 84-74-2),
selon la méthode proposée dans le document de référence**

Organisation des connaissances

24 mars 2006

Etude réalisée par :

Organisme d'expertise : LTA EA 3880, ESMISAB/UBO, Technopole Brest-Iroise
29280 PLOUZANE

Contact : Pr D. Parent-Massin, ESMISAB/UBO ,Technopole Brest-Iroise 29280
Plouzané Tel 33 2 98 05 61 41 Fax : 33 2 98 05 61 01 E-mail : parentm@univ-
brest.fr

Pour :

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AFSSET

253 avenue du Général Leclerc
94701 Maison Alfort Cedex

Contact : Nathalie Bonvallot (01 56 29 19 33 / nathalie.bonvallot@afsset.fr)

Information sur la propriété et la diffusion du document

Les résultats des travaux demeurent la propriété de l'AFSSET, qui se réserve le droit de les rendre publics. Ils ne peuvent être utilisés, ou rendus en tout ou partie publics qu'avec l'accord écrit préalable de l'AFSSET. Les informations communiquées par l'AFSSET à l'occasion de la réalisation des travaux sont confidentielles et ne doivent pas être communiquées à des tiers, sauf accord.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUME | 4 |
| 2. LE PROFIL TOXICOLOGIQUE | 8 |
| 2.1. INFORMATIONS GENERALES | 8 |
| 2.1.1. <i>Identification de la substance</i> | 8 |
| 2.1.2. <i>Propriétés physico-chimiques</i> | 8 |
| 2.1.3. <i>Plausibilité d'exposition humaine</i> | 8 |
| 2.2. TOXICOCINETIQUE | 9 |
| 2.3. TOXICITE GENERALE | 9 |
| 2.3.1. <i>Etudes de toxicité aiguë</i> | 9 |
| 2.3.2. <i>Etudes de toxicité subaiguë</i> | 10 |
| 2.3.3. <i>Etudes de toxicité subchronique</i> | 10 |
| 2.3.4. <i>Etudes de toxicité chronique</i> | 10 |
| 2.3.5. <i>Génotoxicité</i> | 10 |
| 2.3.6. <i>Etudes de cancérogenèse</i> | 11 |
| 2.3.7. <i>Irritation et sensibilisation</i> | 11 |
| 2.3.8. <i>Données chez l'Homme</i> | 11 |
| 2.4. TOXICITE SUR LA REPRODUCTION ET LE DEVELOPPEMENT | 12 |
| 2.4.1. <i>Données humaines</i> | 12 |
| 2.4.1.1. Effets sur la reproduction..... | 12 |
| 2.4.1.2. Effets sur le développement..... | 12 |
| 2.4.2. <i>Données animales</i> | 13 |
| 2.4.2.1. Effets sur la reproduction..... | 13 |
| 2.4.2.2. Effets sur le développement | 14 |
| 2.4.3. <i>Mécanismes d'action proposés</i> | 16 |
| 2.5. ANALYSE DE LA COHERENCE DES DONNEES ANIMALES ET HUMAINE | 17 |
| 2.6. COMPARAISON DES INDICES DE TOXICITE EN FONCTION DES EFFETS | 18 |
| 2.7. CONCLUSION..... | 19 |
| 3. LA CONSTRUCTION DE LA VTR | 19 |
| 3.1. IDENTIFICATION D'UNE DOSE CRITIQUE | 19 |
| 3.1.1. <i>Présentation des doses repères</i> | 19 |
| 3.1.1.1. Effets sur le développement | 19 |
| 3.1.1.2. Effets sur la reproduction | 20 |
| 3.1.2. <i>Choix de la dose critique</i> | 20 |
| 3.2. FACTEURS D'INCERTITUDE | 21 |
| 3.3. DISCUSSION ET PRESENTATION DE LA VTR | 21 |
| 4. BIBLIOGRAPHIE | 22 |

1. Résumé

Compte tenu de la richesse de la littérature scientifique sur les effets toxiques du DBP, ce rapport a été rédigé en se basant sur les monographies réalisées au préalable par les grandes agences qui ont validées les études retenues. Les données de la littérature parues postérieurement à ces monographies ont été examinées en détail.

Le Di-n-butyl phthalate (DBP), qui est une substance synthétique, est largement utilisé par l'homme, essentiellement comme plastifiant pour les matières plastiques et élastomères, en particulier les polymères de chlorure de vinyle, d'acétate de vinyle et de cellulose. Son utilisation dans la vie courante est ubiquitaire comme en témoigne sa présence dans les emballages alimentaires et dans de nombreux cosmétiques.

La population humaine peut être exposée sur son lieu de travail (production, incorporation du DBP), au travers des produits de consommation ou via l'environnement. L'exposition peut se faire par inhalation, par voie digestive ou contact cutané. La voie orale est celle qui prédomine largement.

Par voie orale, la prolifération des péroxyosomes hépatiques chez le rat a longtemps été considérée comme l'effet néfaste le plus sensible. Désormais, il existe un consensus scientifique selon lequel cette sensibilité hépatique du rongeur ne peut être retenue pour être transposée à l'homme (absence de cohérence toxicodynamique pour cet effet, pour lequel l'homme serait beaucoup moins sensible que le rongeur). L'étude de génotoxicité et de cancérogénicité étant négative, la toxicité du DBP se focalise sur la reprotoxicité et les troubles du développement principalement au niveau de l'appareil reproducteur mâle. Outre les expérimentations animales, ce fait s'appuie sur une première étude épidémiologique humaine rapportée en août 2005. Les effets reprotoxiques et sur le développement sont, en l'état actuel des connaissances, considérés comme les effets critiques pour l'exposition orale au DBP.

Des effets reprotoxiques et développementaux sont décrits chez les rats exposés *via* l'alimentation maternelle *in utero* en fin de gestation, période clef du développement de l'appareil reproducteur. Ces deux types d'effets s'intriquent parfois et ne sont pas toujours faciles à séparer en particulier au niveau testiculaire. Parmi les effets critiques, les plus fréquents sont les troubles de la fertilité et de l'appareil reproducteur mâle (diminution de la distance anogénitale, cryptorchidie, hypospadias, hypoplasie ou agénésie epididymaire, hypospermie, dysgénésie testiculaire focale, persistance mamelonnaire).

A partir de la revue de la littérature effectuée, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, trois études ont été retenues. Elles apparaissent représentatives d'effets reprotoxiques pertinents observés lors des expérimentations animales. L'étude la plus

ancienne (NTP, 1995) est une étude multi-générationnelle, réalisée sur le rat en alimentation continue, et qui a par ailleurs été retenue par le RIVM pour la construction d'une VTR. Des LOAEL de 52 mg/kg pc/j chez le mâle et de 80 mg/kg pc/j chez la femelle pour des lésions embryotoxiques ont été identifiés (nombre et poids des progénitures diminués, absence de toxicité maternelle). Le RIVM propose une VTR égale à 52 µg/kg pc/j après application d'un facteur d'incertitude de 1000 sur le LOAEL le plus faible, chez le mâle (10 pour l'utilisation d'un LOAEL, 10 pour le facteur inter-espèces et 10 pour le facteur intra-espèce).

La deuxième étude est uni-générationnelle et réalisée chez le rat exposé *in utero* (Mylchreest *et al.* 2000). L'effet toxique pertinent est une persistance des mamelons. On retrouve un LOAEL de 100 mg/kg pc/j et un NOAEL de 50 mg/kg pc/j. Le NTP, en 2002, a proposé une VTR de 500 µg/kg pc/j fondée sur cette étude, après l'application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour l'extrapolation inter-espèces et 10 pour la variabilité humaine).

L'étude de Lee *et al.* (2004) est uni-générationnelle chez le rat exposé *in utero* et pendant la lactation (exposition des mères par voie orale à partir du 15^{ème} jour de gestation et jusqu'au 21^{ème} jour après la mise bas). Le LOAEL identifié est d'environ 2 mg/kg pc/j (calcul à partir des concentrations de DBP dans la nourriture et des consommations alimentaires) sur l'observation d'une diminution spermatocytaire et de dysplasies mamelonaires chez les nouveaux-nés mâles et femelles. Cette dernière étude a servi à l'EFSA pour établir une Dose Journalière Tolérable de 10 µg/kg pc/j après application d'un facteur d'incertitude de 200 (un facteur inter-espèces de 10, un facteur intra-espèce de 10 et un facteur de 2 pour l'utilisation d'un LOAEL).

Les trois expérimentations animales sont conduites sur des protocoles rigoureux : « *National Toxicology Program's, R.A.C.B. Protocol* » pour les deux premières, « *Animal Care and Use Committee of the National Institute of Health Sciences* » (Japan) pour la troisième. Dans les études de reprotoxicité, aucune référence n'est faite aux lignes directrices de l'OCDE.

Une première grande étude épidémiologique humaine menée par Swan *et al.* (2005), retrouve une relation significative entre les concentrations de DBP urinaire maternel prélevé pendant la grossesse et la constatation chez les nouveau-nés mâles d'anomalies de l'appareil génital externe (diminution de la distance anogénitale, trouble de la migration testiculaire, hypoplasie scrotale). Il serait souhaitable que d'autres études épidémiologiques viennent confirmer ou infirmer ces données. D'autre part, une meilleure connaissance des degrés d'exposition humaine par voie orale ou toutes autres voies d'exposition permettrait une meilleure évaluation du risque en particulier chez la femme en âge de procréation.

Les effets sur le développement les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle, à la fois au niveau histologique et fonctionnel. Une énumération non exhaustive rapporte des lésions testiculaires (troubles de la migration, lésions dégénératives des tubes séminifères, diminution des spermatoctyes, hyperplasie des cellules interstitielles, voire adénomes), des lésions de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate, une

diminution de la distance anogénitale, l'augmentation du taux d'hypospadias, et enfin des persistances des mamelons.

Les effets indésirables sur la fertilité sont une diminution des indices de fertilité, de la durée de gestation, du nombre de fœtus vivants par portée, du poids des nouveau-nés, mais aussi du poids de la mère, des lésions testiculaires des nouveau-nés, une puberté mâle retardée.

Le marqueur le plus pertinent de ces effets semble être la mesure de la distance anogénitale. Ce paramètre est facilement identifiable et mesurable chez l'homme et chez l'animal. Il peut donc être un lien entre les études toxicologiques et les études épidémiologiques. D'autre part, c'est un indicateur sensible puisque la diminution de la distance anogénitale apparaît à de très faible dose.

L'étude de Lee *et al.* (2004) est plus récente et semble être celle qui a défini la dose la plus basse mettant en évidence un effet. Le LOAEL est égal à 2 mg/kg pc/j sur l'observation d'une diminution spermatocytaire et de dysplasies mamelonaires chez les nouveaux-nés mâles et femelles. Par comparaison, d'autres études ont mis en évidence des effets sur le développement, après une exposition pendant la gestation uniquement, pour des doses de 50 à 100 mg/kg/j. Pour les autres effets, des NOAEL de 62,5 et 125 mg/kg/j ont été mis en évidence mais les études étaient de qualité médiocre.

Tableau résumé des VTR orales existantes pour le DBP

| Organisme (date) | VTR proposée | Voie et durée d'application | Référence de l'étude source | Espèce | Effets considérés | Voie d'expo- sition | Durée de l'exposition | Dose critique utilisée | Facteurs d'incer- titude |
|---------------------|-----------------|--|-------------------------------------|------------|--|---------------------------|---|------------------------------|---|
| EFSA (2005) | 10 µg/kg/j | Voie orale, Durée sub- chronique (femme enceinte et allaitante) | Lee et al. 2004 | Rats SD | Diminution du nombre des spermatocytes Anomalies mamelonaires sur progéniture | Orale, <i>ad lib</i> | 28 jours J15-21 gestation et J21 de lactation | LOAEL = 2 mg/kg/j | 200 (10 UF _A , 10 UF _H , 2 UF _L) |
| NTP (2002) | 500 µg/kg/j | Voie orale, Durée subaiguë ou subchronique (femme enceinte) | Mylchreest et al. 2000 | Rats SD | Persistante mamelonaire (développement) | Orale, gavage | 9 jours (J12- 21 gestation) | NOAEL = 50 mg/kg/j | 100 (10 UF _A , 10 UF _H) |
| RIVM (2000) | 52 µg/kg/j | Voie orale, Durée sub- chronique | NTP, 1995 Wine et al. 1997 | Rats SD | Diminution du poids des rats nouveaux- nés F2 (embryotoxicité) | Orale, <i>ad lib</i> | 14 semaines | LOAEL = 52 mg/kg/j | 1000 (10 UF _A , 10 UF _H , 10 UF _L) |

2. Le profil toxicologique

2.1. Informations générales

2.1.1. Identification de la substance

Les données d'identification ont été recherchées dans le rapport européen d'évaluation des risques (EU, 2004).

| | |
|---|--|
| Numéro CAS, ENEICS. | CAS N°84-74-2 / ENEICS N°201-55 7-4 |
| Nom | Di-n-butyl-phtalate |
| Synonymes | Dibutyl-phtalate ; 1,2-Benzeneddicarboxylic acid ; dibutylester(9Cl) ; Bis-n-butylphtalate ; Butyl phtalate ; DBP ; DBP(ester) ; Dibutyl o-phtalate ; di(n-butyl)1,2-bezeneddicarboxylate ; n-Butyl phtalate ; Palatinol C ; Phtalique acide di-n-butyl ester. |
| Formule brute | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ |
| Formule développée | |
| Appartenance à une liste reprotoxique et classification | Repr.Cat.2 ;R61 Repr.Cat.3 ;R62 N;R50 S:53-45-61 |

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

| | |
|--|--|
| Forme physique | Liquide huileux (INRS FT98). |
| Poids moléculaire | 278,34 (INRS FT98). |
| Point d'ébullition | 340°C (INRS FT98). |
| Point de fusion | - 35°C (INRS FT98). |
| Pression de vapeur | 9,7±3,3 10 ⁻⁵ hPa à 25°C (IUCLID dataset, 2000). |
| Densité | 1,04 kg/l (INRS FT98) |
| Facteurs de conversion | 1 ppm = 11,4 mg/m ³ à 25 °C et 101 kPa (INRS FT98) |
| Solubilité | 10 mg/l à 20°C (IUCLID dataset, 2000). |
| LogKow | 4,72 (4,31-4,79) (IPCS-EHC 189, 1997) |
| Koc | 3,14 (5,23) (IPCS-EHC 189, 1997) |
| BCF | 1,8 l/kg (Hulls, 1996). |
| BAF | ND* |
| Produits de dégradation environnementale | Monoester butyl phtalate (MBP), Acide phtalique, Méthane et CO ₂ (Anaérobie) (EU, 2004) |

* ND : données non disponibles dans les bases de recherche.

2.1.3. Plausibilité d'exposition humaine

| | |
|-------------------------------------|---|
| Types d'utilisation | Plastifiant dans les émulsions de polyvinyle, adhésifs, encres d'imprimerie, cosmétiques, emballages alimentaires (IPCS/WHO 1997) |
| Restrictions d'usages | / |
| HPV/ tonnages (Europe, France) | Europe : 26000 t/an (1998)* (EU, 2004). |
| Médias de l'environnement concernés | Eaux de surface et souterraine, eaux usées, sédiments, sols, air, biotope aquatique, alimentation, air intérieur, eau de boisson (IPCS-EHC 189, 1997) |
| Types de populations concernées | Exposition professionnelle, exposition en population générale : alimentaire et via les cosmétiques (IPCS- |

* Sites > 1000 tonnes/an : 2 sites de production en Allemagne, 1 site de production en Italie. Production en baisse.

2.2. Toxicocinétique

| | Données chez l'animal | Données chez l'homme |
|--|--|--|
| Substance mère | Di-n-butyl-phtalate | Di-n-butyl-phtalate |
| Voies de métabolisation possibles | Hépatique et excrétion urinaire après absorption orale (EU, 2004). | Cycle entéro-hépatique et glucurono-conjugaison (EU, 2004). |
| Métabolites principaux | Phtalate de monobutyle (MBP), MBP-glucuronide (EU, 2004). | Phtalate de monobutyle (MBP), MBP-glucuronide (EU, 2004). |
| Absorption (%/ voie) | Rat : Cutanée : 9,33 µg/cm ² /h, Orale : 90% (INRS FT98). | Cutanée : 0,07 µg/cm ² /h (in vitro). Scott et al. 1987 Voie orale, taux plasmatique : 0,1mg DBP/L (Tomita et al. 1977). |
| Distribution | Dans tout l'organisme, 4h après l'injection chez le rat. Cerveau : 0,33 %, Reins : 0,66 % (Williams et al. 1975). | Dans tout l'organisme : 0,01-0,3 mg/kg (Mes et al. 1974). |
| Stockage, accumulation (% et cible) | Chez le rat < 0,01 % 48 heures après administration orale, non mis en évidence après administration cutanée (Williams et al. 1975) | Pas d'accumulation |
| Transferts Barrière Hémato-Encéphalique | Chez le rat. Cerveau : 0,33 % (Williams et al. 1975) | ND |
| Transferts placenta Liquide amniotique | Chez le rat : 30 % (Saillenfait, 1998) 13µg/ml pour une diète de 250 mg/kg/j (Calafat et al. 2006) | ND |
| Transferts lait maternel | ND | 10 à 51 µg/kg (Gruber et al. 1998 ; Bruns-Weller et Pfordt, 2000) |
| Elimination (demi-vies) | Pour le MBP, la ½ vie est < à 24h dans le sang (NTP, 1995). | ND |

2.3. Toxicité générale

2.3.1. Etudes de toxicité aiguë

Pour des expositions aiguës, le Di-n-butyl-phtalate (DBP) est peu毒. La DL50 du DBP par voie orale varie entre 6,3 et 8 g/kg pc chez le rat; et 4,8 et 5,3 g/kg pc chez la souris. La DL50 du DBP par voie cutanée chez le lapin est supérieure à 20 g/kg pc (Smith et al. 1953 ; BASF, 1961 ; BIBRA, 1987 ; RTECS, 1993a, 1993d).

Par voie sous-cutanée chez la souris, la DL50 est égale à 20,8 g/kg pc (RETCS, 1993f).

Par inhalation, la CL50 chez le rat est supérieure à 15,68 mg/L après 4 heures d'exposition et égale à 25 mg/L chez la souris après 2 h d'exposition (Voronin, 1975 ; Greenough et al. 1981).

La DL50 par intraveineuse (i.v.) du DBP chez la souris est égale à 720 mg/kg pc, par intramusculaire (i.m.) chez le rat elle est supérieure à 8 g/kg pc. Enfin, par intra péritonéale (i.p.) chez la souris, elle varie entre 3,4 et 4 g/kg pc, et chez le rat de 3,1 à 4 g/kg pc (Smith, 1953 ; BASF, 1958 ; BASF, 1961 ; Calley et al. 1966 ; Singh et al. 1972 ; Lawrence et al. 1975 ; RETCS, 1993e).

2.3.2. Etudes de toxicité subaiguë

Par voie orale chez le rat, dans une étude de 15 jours, des lésions dégénératives au niveau de la lignée spermatique et une nécrose de 5 % des tubes séminifères dues à des modifications enzymatiques ont été décrites pour la plus petite dose testée soit 250 mg/kg pc/j (Srivastava *et al.* 1990).

Dans une étude par inhalation, pendant 28 jours chez le rat, la plus forte dose testée est considérée comme le NOAEL (509 mg/m³), des observations d'effets considérés comme non pathologique sont décrits à toutes les concentrations (légère irritation du tractus respiratoire) (Gamer *et al.* 2000).

2.3.3. Etudes de toxicité subchronique

Il y a 6 études de toxicité subchronique par voie orale sur rongeurs, 2 chez la souris, 4 chez le rat. La plus petite dose avec effet (LOAEL) chez le rat dans l'étude la plus pertinente est égale à 752 mg/kg pc/j, le NOAEL est égal à 152 mg/kg pc/j. Les effets observés sont des modifications des paramètres hématologiques et biologiques. Aucun effet sur les testicules n'a été décrit dans cette étude (Schilling *et al.* 1992). Dans l'étude souris la plus pertinente, le LOAEL chez le male est égal à 812 mg/kg pc/j et le NOAEL est égal à 353 mg/kg pc/j. Les effets observés sont chez le mâle une diminution significative du poids de l'épididyme gauche, et une augmentation du nombre de spermatides à 2 têtes dans les testicules. Chez la femelle, une augmentation du poids relatif et absolu des reins est observée, aucun NOAEL n'a pu être déterminé (Gamer *et al.* 2000).

Par voie cutanée, une étude menée dans des conditions expérimentales inadéquates a été réalisée chez le lapin, pendant 90 jours. Le seul effet toxique pertinent décrit est une atteinte rénale peu sévère (Lehman, 1955).

Par inhalation, des rats ont été exposés 6 heures/jour, 5 jours/semaine, pendant 4 semaines à des concentrations de 0 – 1,18 – 5,57 – 49,3 ou 509 mg/m³ de DBP sous forme d'aérosol (étude menée selon les lignes directrices de l'OCDE n° 412). Il n'a pas été constaté d'effet systémique, toutefois, à toutes les concentrations, des lésions histologiques non inflammatoires des voies aériennes supérieures sont décrites. Il est conclu à une NOAEC de 509 mg/m³ pour les effets systémiques et neurologiques. La LOAEC étant de 1,18 mg/m³ pour les effets locaux respiratoires (Gamer *et al.* 2000).

2.3.4. Etudes de toxicité chronique

Deux études de toxicité orale chez le rat d'une durée de 12 mois, très anciennes et de qualité médiocre (Smith, 1953 ; Nikonorow *et al.* 1973) sont disponibles. Seuls les NOAEL ont été identifiés (pas de LOAEL), respectivement à 125 et 62,5 mg/kg pc/j.

2.3.5. Génotoxicité

Le DBP a fait l'objet de nombreuses études de génotoxicité. On dispose de 6 études utilisant le test d'Ames avec ou sans activation métabolique sur plusieurs souches de *Salmonella*

typhimurium. Tous les résultats sont négatifs à l'exception de 2 tests réalisés sur la souche TA 100, dont l'un est équivoque et l'autre positif sans activation métabolique à des concentrations proches des concentrations cytotoxiques. Un test sur *Saccharomyces cerevisiae* est également négatif (Kurata, 1975 ; Shahin et von Borstel, 1977 ; Florin et al. 1979 ; Seed, 1982 ; Zimmermann et al. 1984 ; Agarval et al. 1985 ; Zieger et al. 1995). Deux tests sur cellules de lymphome de souris (L5178Y) ont été réalisés, et donnent des résultats contradictoires : l'un est négatif en l'absence d'activation métabolique, l'autre est positif en présence d'activation métabolique (NTP, 1995). Le DBP n'induit pas d'aberrations chromosomiques ni de cassure d'ADN dans les tests réalisés. On dispose de 3 tests *in vivo*, l'un chez *Drosophila melanogaster* (Izmerov et al. 1982 résumé seulement) et les deux autres sont des tests du micronoyau *in vivo* chez la souris (BASF, 1990d ; NTP, 1995). Ils sont tous les trois négatifs. A partir de ces éléments, le DBP est considéré comme non génotoxique.

2.3.6. Etudes de cancérogenèse

Il n'existe pas d'étude pertinente à long terme de cancérogenèse disponible chez les animaux de laboratoire. Plusieurs phtalates dont le DBP sont connus pour induire une prolifération des péroxyosomes au niveau hépatique chez le rat et la souris qui se traduit par des modifications structurales après observation au microscope électronique et des changements dans les activités enzymatiques associées aux péroxyosomes. Le NOAEL le plus faible pour les observations est trouvé dans une étude sur des rats mâles Wistar recevant pendant deux semaines par voie orale du DBP à 1,1 – 5,2 – 19,9 – 60,6 et 212,5 mg/kg pc/j. Ce NOAEL est de 19,9 mg/kg pc/j (Jansen et al. 1993). Il a été suggéré une relation entre la prolifération des péroxyosomes et la survenue de tumeurs hépatiques chez les rongeurs. Cet effet ne peut cependant pas être transposé à l'homme, pour lequel la réponse à une exposition au DBP n'induit pas une prolifération des péroxyosomes (IARC Technical report N°24, 1994).

2.3.7. Irritation et sensibilisation

Deux études conduites selon les lignes directrices de l'OCDE (n°404 et 405) ne montrent pas de signe d'irritation, de même que pour les voies aériennes (BASF, 1990a ; BASF, 1990b ; Gamer et al. 2000). Deux autres études, l'une conduite selon la ligne directrice n°406 de l'OCDE et l'autre selon les recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) ont montré l'absence de sensibilisation (Greenough et al. 1981 ; BASF, 1990c).

2.3.8. Données chez l'Homme

Il n'existe pas de données chez l'homme par voie orale, à l'exception d'un cas d'intoxication aiguë après ingestion accidentelle de 10 grammes de DBP, l'atteinte oculaire fut la plus sérieuse avec une kératite érosive régressive en deux semaines (Cagianut, 1954). Deux études d'exposition professionnelles rapportent des perturbations neurologiques chez des

travailleurs exposés par voie respiratoire au DBP, mais elles sont inadéquates pour évaluer le risque en raison de biais méthodologiques importants (Milov *et al.* 1973; Gilioli *et al.* 1978).

2.4. Toxicité sur la reproduction et le développement

2.4.1. Données humaines

2.4.1.1. Effets sur la reproduction

L'étude réalisée par Murature *et al.* (1987) sur la densité et la concentration d'éjaculat d'étudiants pris au hasard, non exposés professionnellement au DBP, a montré une corrélation négative entre ces paramètres et la concentration du sperme en DBP. La valeur réelle de cette étude est entachée par une contamination probable des instruments de laboratoire.

2.4.1.2. Effets sur le développement

La seule étude épidémiologique disponible est celle publiée en 2005 par Swan *et al.* sur une cohorte de 346 femmes enceintes. Elle décrit une corrélation positive entre les concentrations de métabolite principal du DBP (le MBP) ainsi que de trois autres métabolites des phtalates retrouvés dans l'urine des mères au cours de la grossesse et l'incidence d'apparition de malformations génitales décrites lors d'un examen postnatal (moyenne 12,6 mois après la naissance) des 85 enfants mâles retenus pour la poursuite de l'étude. Parmi ces 85 enfants pour lesquels un examen d'urine de la mère avait été réalisé, 25 présentaient une diminution de l'index anogénital (distance anogénitale/poids) de 18,3 % en moyenne. Parmi ces enfants, 20 % présentaient un trouble uni ou bilatéral de la migration testiculaire, et une proportion plus faible (non indiquée) présentait une diminution de la taille de la verge et une hypoplasie scrotale. La concentration moyenne des métabolites phtaliques associée avec un index anogénital court et un trouble de la migration testiculaire est similaire à celles trouvées chez 25 % de la population féminine des USA (échantillon national) (Silva *et al.* 2004). Il en ressort des niveaux de métabolites urinaires non inhabituels chez les mères ayant un enfant à index anormalement court suggérant que les humains puissent être plus sensibles que les rongeurs à une exposition prénatale aux phtalates. Sharpe (2005) souligne l'importance de cette première étude épidémiologique humaine menée par Swan *et al.* (2005) car elle relance l'importance du rôle que l'exposition aux phtalates pendant la grossesse pourrait jouer dans l'étiologie des désordres reproductifs de l'humain mâle. L'étude apporte la première évidence de la relation entre l'exposition aux phtalates des mères pendant la grossesse et l'atténuation de l'action androgénique chez leurs bébés mâles. Si cette relation indique une relation de cause à effet elle établirait un lien entre 3 éléments clefs de la recherche à savoir : le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT) (Skakkebaek *et al.* 2001), l'induction d'un tel syndrome lors de l'administration de phtalates

aux animaux de laboratoire pendant leur gestation et la large exposition des humains à des phtalates variés. Sharp conclut à la nécessité de confirmer ces premiers résultats en enrichissant les connaissances sur les niveaux de métabolites dans le liquide amniotique, de la testostérone chez le nouveau-né (salive, sang de cordon) et enfin de l'exposition des femmes enceintes aux phtalates.

2.4.2. Données animales

2.4.2.1. Effets sur la reproduction

Plusieurs types d'effets sont observés, des effets testiculaires à la fois structuraux et fonctionnels, une diminution de la fertilité mâle consécutive probablement à ces effets ainsi qu'une diminution de la fertilité femelle. La plupart des études dans lesquelles des effets testiculaires sont décrits sont des études au cours desquelles une seule dose a été testée (de 1200 à 2400 mg/kg pc/j dont la durée est variable, de 7 jours à 90 jours). Parmi les 14 études rapportées dans la monographie de l'IPCS (1997), les effets testiculaires décrits sont une diminution du poids des testicules, des glandes sexuelles accessoires, une dégénérescence des tubes séminifères, diminution du taux de zinc et de fer testiculaire, diminution du taux de testostérone sanguine mais une augmentation du taux de testostérone testiculaire, une hyperplasie des cellules interstitielles, diminution du nombre de spermatocytes, décollement des cellules germinales, diminution d'activité enzymatique dans la cellule de Sertoli (succinate déshydrogénase) et une augmentation de l'excrétion urinaire du zinc (Cater *et al.* 1977 ; Gray et Butterworth, 1980 ; Oishi et Hiraga, 1980a, 1980b ; Gray *et al.* 1982 ; Ikemoto *et al.* 1983 ; Fukuoka *et al.* 1989, 1990, 1993 ; Zhou *et al.* 1990 ; Srivastava *et al.* 1990a, 1990b ; Lake *et al.* 1991 ; NTP, 1995 ; Wine *et al.* 1997). Les rats et les cobayes sont plus sensibles à ces effets que les souris, et surtout les hamsters qui sont insensibles (Gray *et al.* 1982). Le NOAEL le plus faible identifié dans ces études est égal à 250 mg/kg pc/j ; à cette dose, aucune modification histopathologique ni diminution du poids testiculaire n'est observée chez le rat après une exposition par voie orale pendant 90 jours. Cependant, les auteurs notent qu'à cette dose une modification de l'activité de la succinate déshydrogénase dans la cellule de Sertoli est observée et fixent un LOAEL égal à cette dose pour cette activité enzymatique (Srivastava *et al.* 1990 a, b). Dans une étude de reproduction sur deux générations publiée en 1997 (Wine *et al.* 1997), le DBP est administré par voie orale à des rats Sprague Dawley à des doses représentant 0,1 ; 0,5 et 1 % du régime alimentaire soit respectivement 52 ; 256 et 509 mg/kg pc/j chez les mâles et 80, 385 et 794 mg/kg pc/j chez les femelles. Le poids corporel des femelles gestantes (F0) diminue en fonction de la dose jusqu'à atteindre une diminution de 13 % à la plus forte dose au moment de la délivrance et de la lactation. Le nombre de petits par portée est diminué à toutes les doses et le poids moyen à la naissance et pendant la lactation est diminué aux deux plus fortes doses. Aucun effet sur la fertilité n'est observé après croisement de mâles témoins

avec des femelles soumises à fortes doses et inversement. En revanche, le poids des nouveaux-nés rapporté à la taille des portées est significativement diminué dans les portées des femelles exposées. Les indices d'accouplement, de gestation et de fertilité de la génération F1 sont inférieurs à ceux de F0 aux plus hautes doses. Aux moyennes et fortes doses, de nombreuses anomalies des organes reproducteurs sont observées (diminution du poids de ces organes, lésions dégénératives de l'épithélium germinal testiculaire, hyperplasie interstitielle, absence ou hypoplasie de l'épididyme). Les effets au niveau de la seconde génération (F2) sont identiques mais plus sévères et apparaissent également à la plus petite dose. De plus, un effet sévère sur la spermatogenèse apparaît à la plus forte dose. Ces résultats suggèrent que les effets indésirables sont plus marqués chez les animaux exposés durant leur développement et leur maturation que chez les animaux adultes exposés. Le NTP, en 1995, avait utilisé cette étude pour fixer une DJA en considérant la moyenne des plus faibles doses chez les mâles et les femelles (66 mg/kg pc/j) comme LOAEL et en lui appliquant un triple facteur de sécurité de 10 (pour l'utilisation du LOAEL, et pour les transpositions inter et intra-espèce).

2.4.2.2. Effets sur le développement

La plupart des études ont été réalisées chez le rat à forte dose ($> 500 \text{ mg/kg pc/j}$) et le nombre d'animaux par groupe de dose est faible (10 à 15). Il est difficile d'affirmer si la plupart des études a été faite selon des lignes directrices ou selon les bonnes pratiques de laboratoire. Dans le rapport publié en 2002 par le NTP sur la toxicité reproductive et développementale du DBP, 16 études par voie orale ont été expertisées, 12 concernaient le rat, 3 la souris, et une à la fois la grenouille et le lapin. Les signes de toxicité maternelle sont une diminution de la consommation alimentaire et du gain de poids. Les effets indésirables pertinents retenus pour l'identification des NOAEL et des LOAEL sont une diminution du nombre de fœtus vivants par portée, une diminution du poids des fœtus, une augmentation du nombre des résorptions, une augmentation de l'incidence des fentes palatines, des malformations squelettiques (vertébrales, costales, sternales, retards d'ossification), une diminution de la distance anogénitale, des troubles de la migration testiculaire, des hypospadias, un retard de la séparation préputiale, une hypoplasie ou une absence d'épididyme et ou des canaux déférents, une atrophie des tubes séminifères, une diminution des cellules germinales et enfin la persistance des aréoles et des mamelons chez le nouveau-né mâle (Shiota *et al.* 1980, 1982 ; Ema *et al.* 1993, 1994, 1995, 1998 ; Wine *et al.* 1997 ; Lamb *et al.* 1987 ; Reel *et al.* 1984 ; Gray *et al.* 1999 ; NTP, 1995 ; Mylchreest *et al.* 1998, 1999, 2000 ; Higuchi *et al.* 1999 ; Imajima *et al.* 1997). Parmi ces études, le NTP 2002 souligne la qualité des travaux de Mylchreest et al. (1998, 1999, 2000) qui retrouvent le NOAEL le plus faible à 50 mg/kg pc/j, l'effet néfaste pertinent étant la persistance des

aréoles et des mamelons chez le nouveau-né mâle qui survient après une exposition de la mère au DBP par gavage de 100 mg/kg pc/j du 12^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation.

McKee *et al.* font référence à des études décrites dans un abstract (Patel *et al.* 2001). La première étude chez le rat s'étale sur deux générations. Les rats sont soumis via l'alimentation à du DBP à des concentrations de 0,01 – 0,2 – 1,7 – 6 – 60 – 600 mg/kg pc/j. Selon cet abstract, aucun effet n'est noté chez le rat femelle, les premiers effets chez le mâle apparaissent à 600 mg/kg pc/j. Une diminution de la distance anogénitale, un retard de la séparation préputiale, une augmentation des troubles de la migration testiculaire et une diminution du taux de testostérone sérique sont décrits. Dans le même abstract une étude parallèle est menée par gavage avec 600 mg/kg pc/j. Ses résultats montrent des effets majorés, suggérant l'importance de la voie d'administration et son retentissement sur le NOAEL obtenu. Le NOAEL établi à partir de cette étude est de 60 mg/kg pc/j chez le mâle et de 600 mg/kg pc/j chez la femelle. Selon McKee *et al.* cette étude serait suffisamment robuste pour être proposée pour fixer des VTR préférentiellement à d'autres études expertisées par le NTP en 2002 (NTP, 1995 ; Wine *et al.* 1997 ; Ema *et al.* 1998 ; Mylchreest *et al.* 2000). Cependant, cette étude publiée sous sa forme complète n'a pas été retrouvée dans la littérature scientifique.

En 1995, le « *Scientific Committee for Food* » (SCF) fixait une Dose Journalière Tolérable temporaire égale à 50 µg/kg pc/j basée sur la prolifération des peroxysomes hépatiques chez les rongeurs (UE, 1995). Il existe maintenant un consensus scientifique selon lequel cette sensibilité hépatique du rongeur ne peut être retenue pour être transposée à l'homme (IARC, 1995). Cette constatation a induit la réévaluation du DBP par l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA, 2005). L'EFSA s'est appuyée sur le récent rapport du « *Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment* » (SCTEE) et sur les données les plus récentes de la littérature pour déterminer l'effet néfaste le plus pertinent sur la reproduction et le développement (EU, 2004). Le SCTEE retient le système reproducteur mâle comme la principale cible de la toxicité du DBP.

Trois études, deux expertisées dans le rapport d'évaluation de risque de l'Union Européenne (EU, 2004) et une autre, plus récente, peuvent être retenues pour l'évaluation du risque reprotoxique.

La plus ancienne (NTP, 1995 ; Wine *et al.* 1997) est une étude sur deux générations chez le rat par voie orale. Aucun NOAEL n'a pu être identifié, mais un LOAEL de 52 mg/kg pc/j chez le mâle et de 80 mg/kg pc/j chez la femelle a été établi sur la base des effets embryotoxiques (poids des nouveaux-nés F2).

L'étude de Mylchreest *et al.* (2000) porte sur les rats exposés *in utero* de J12 à J21 pendant la gestation par un gavage maternel à des doses de 0 – 0,5 – 50 – 100 – 600 mg/kg pc/j. Les résultats ne montrent pas de toxicité maternelle, de malformations chez les nouveaux-nés femelles. Chez le nouveau-né mâle pour une exposition égale à 500 mg/kg pc/j, la quasi-

totalité des lésions de l'appareil reproducteur mâle liée à l'hypo-androgénie est constatée. La réduction de la distance ano-génitale et la rétention mamelonaire apparaissent comme les marqueurs non invasifs les plus représentatifs de l'altération de la différenciation sexuelle masculine. C'est la persistance des mamelons constatée dès 100 mg/kg pc/j dans cette étude qui permet d'établir un LOAEL à 100 mg/kg pc/j et un NOAEL à 50 mg/kg pc/j.

L'étude la plus récente (Lee *et al.* 2004) étudie la toxicité développementale par exposition maternelle du quinzième jour de la gestation jusqu'à la fin de la lactation (21 jours après la mise-bas). L'alimentation est supplémentée en DBP à des concentrations égales à 0 – 20 – 200 – 2000 – 10000 mg/kg pc/j. Une réduction des spermatocytes testiculaires est constatée à J21 dès la concentration de 20 mg/kg/j de même que des changements au niveaux des glandes mammaires des deux sexes : dégénérescence vacuolaire chez le mâle, hypoplasie des bourgeons alvéolaires chez les nouveaux-nés de sexe féminin.

Le comité scientifique qui a analysé cette étude note l'impossibilité d'établir un NOAEL, les lésions constatées survenant à la plus petite concentration de 20 mg/kg dans la nourriture, ce qui correspond à une dose ingérée de 1,5 à 3 mg/kg pc/j. Le LOAEL de 2 mg/kg pc/j retenu dans cette étude est 30 fois plus faible que ceux d'autres études à exposition plus prolongée. La réversibilité des lésions constatées à la 11^{ème} semaine de la vie pour la plus faible concentration et le LOAEL à 2 mg/kg pc/j font proposer au panel un facteur d'incertitude de 200 pour obtenir une Dose Journalière Tolérable égale à 10 µg/kg pc/j. Le comité souligne la proximité de ce chiffre de celui de l'exposition quotidienne par voie alimentaire chez l'homme (MAAF, 1996 ; Petersen et Breindal, 2000 ; Muller, 2003).

2.4.3. Mécanismes d'action proposés

Le di-n-butyl phtalate (DBP) a initialement été considéré comme un perturbateur endocrinien de type œstrogénique car il avait été trouvé une faible action agoniste des récepteurs œstrogéniques lors d'études cellulaires *in vitro*. Cependant, des études évoquaient le fait que les phtalates pouvaient interagir avec les récepteurs aux androgènes (Jobling *et al.* 1995 ; Harris *et al.* 1997 ; Sohoni et Stumper, 1998).

Le caractère androgénique a été évoqué au vu des effets sur le développement et la fonction de l'appareil reproducteur chez le rat et la souris mâle dont le profil étaient similaire aux anomalies observées après administration de flutamide, puissant antagoniste des récepteurs androgéniques (Imperato-McGingley *et al.* 1982 ; van der Schoot, 1992 ; Kassim *et al.* 1997 ; Mylchreest *et al.* 1999). Par ailleurs le DBP ne provoque aucun des effets classiques d'un composé à action œstrogénique chez le rat femelle en développement tels que retard pubertaire, anomalies des cycles œstraux, augmentation du poids utérin, cornification vaginale, hypofertilité (NTP, 1991 ; Gray *et al.* 1998 ; Mylchreest *et al.* 1998).

Le mécanisme d'action anti-androgénique du DBP n'est pas lié au blocage des récepteurs androgéniques mais à une diminution importante de la sécrétion de testostérone (65-70%

dans le testicule entre J18 et J21 de gestation) (Mylchreest, 2002). Si un rôle partiel des processus PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptors alpha) peut être retenu, le rôle d'une atteinte des cellules de Sertoli par le DBP semble central, par altération de la sécrétion de facteurs paracrinés régulant la différentiation et la fonction des cellules de Leydig qui ne sont pas régulées par la LH pituitaire pendant la période fœtale (El-Gehani et al. 1998 ; Ward et al. 1998). La prolifération des cellules de Leydig pourrait être un mécanisme compensatoire mais insuffisant de la dérégulation des interactions cellulaires entre cellules de Sertoli et cellules de Leydig (Mylchreest et al. 2002).

L'atteinte des cellules de Sertoli qui régulent la différentiation, la croissance et les fonctions des cellules germinales explique la prolifération de gonocytes multinucléées. De même, les cellules de Sertoli jouent un rôle important pendant la vie fœtale par la sécrétion de facteurs impliqués dans la régression müllérienne (hormone antimüllérienne), la morphogenèse des tubes séminifères et la différenciation des gonocytes (de Rooij, 1998).

Imagna et al. (1997) suggèrent que le MBP, sous sa forme non conjuguée, principal métabolite du DBP, soit l'agent responsable des effets toxiques testiculaires. Les différences de métabolisme entre les espèces montrent la sensibilité particulière des rats, dont le taux de conjugaison du métabolite est moins important que celui du hamster (Gray et al. 1982).

2.5. Analyse de la cohérence des données animales et humaine

Les voies d'exposition chez l'homme sont celles utilisées dans les études toxicologiques chez l'animal. Le devenir métabolique du DBP chez l'homme semble identique à celui décrit chez l'animal. Le DBP est hydrolysé en monobutyl-phtalate, puis incorporé dans le cycle entéro-hépatique, et glucuronoconjugué. Ses métabolites sont excrétés par voie urinaire.

La distribution du DBP et de ses métabolites se fait dans tout l'organisme avec cependant une concentration moindre dans le cerveau, aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Il n'y pas ou peu de bioaccumulation.

Cependant, il faut noter que l'absorption cutanée est inférieure chez l'homme que chez le rongeur et le lapin, et que le taux de glucuronoconjugaion du monobutyl-phtalate est inférieure chez le rat que chez les autres espèces comme la souris, le hamster et l'homme.

Les données humaines de toxicocinétique sont moins bien connues et étudiées que les données animales. Hors contexte professionnel, la principale voie d'exposition est la voie orale à partir du DBP contenu dans les aliments. La voie cutanée est à prendre en compte en particulier par le biais des produits cosmétiques chez la femme en âge de procréer et ou en début de grossesse en sachant toutefois que des études *in vitro* sur de la peau humaine ont été menées montrant sa moindre perméabilité par rapport à l'animal (lapin).

Les expositions aériennes semblent les moins importantes, l'exposition domestique étant supérieure à l'exposition environnementale.

Il y a 3 sources de données humaines concernant la toxicité du DBP : une intoxication aiguë par voie orale (10 g de DBP en une seule prise), l'atteinte oculaire avec une kératite érosive régressive en 15 jours fut le phénomène le plus sérieux ; 2 études d'exposition professionnelle rapportent des perturbations neurologiques. La 3^{ème} est une étude épidémiologique déjà évoquée mettant en relation significative l'index anogénital avec le taux de MBP dans les urines de la mère en fin de grossesse.

Sur le plan animal, deux types de données sont à mettre en avant : d'une part, la prolifération des péroxysonomes hépatiques chez le rat exposé témoin d'une spécificité d'espèce non retrouvée chez l'homme ; d'autre part, un taux de glucuronoconjuguaison faible chez le rongeur par rapport aux autres espèces qui expliquerait un taux de lésions testiculaires plus élevées.

Une étude récente de Calafat (2006) portant sur les corrélations entre les concentrations de MEHP et de MBP dans les urines et le liquide amniotique de rates gestantes exposées montre une parfaite corrélation entre les taux pour le DEHP mais une discordance entre les taux urinaires et amniotiques pour le DBP, la seule corrélation positive s'établissant entre le dosage alimentaire et le taux amniotique. Les études sont à poursuivre, une corrélation urinaire avec les taux amniotiques étant un élément de surveillance important.

Aucune donnée humaine ne permet en 2006 d'identifier une dose sans effet, un NOAEL ou un LOAEL directement chez l'homme. L'étude épidémiologique de Swan *et al.* (2005) bien menée focalise l'attention sur la relation à confirmer entre les concentrations de métabolites urinaires du DBP et des anomalies de l'appareil reproducteur mâle. Cette étude montre que les effets décrits au niveau de l'appareil reproducteur mâle chez l'animal sont également observés chez l'homme, particulièrement la diminution de la distance ano-génitale et la persistance des mamelons (Mylchreest *et al.* 2000). On peut donc estimer qu'une bonne cohérence existe entre ces effets reprotoxiques.

La construction d'une VTR reprotoxique devra donc être basée sur les effets retrouvés chez le nouveau-né rongeur mâle exposé *in utero* en fin de gestation qui représente la période de sensibilité maximale.

2.6. Comparaison des indices de toxicité en fonction des effets

Les différents effets retrouvés dans le cadre du DBP montrent que les effets apparaissant aux doses les plus faibles sont reprotoxiques (le plus faible LOAEL est de 2 mg/kg/j, les NOAEL varient de 50 à 100 mg/kg/j et le plus fort LOAEL est de 100 mg/kg/j) alors que les couples LOAEL / NOAEL retenus pour la toxicité générale varient de 752 et 152 mg/kg/j chez le rat et de 812 et 353 mg/kg/j chez la souris pour les plus élevés.

2.7. Conclusion

Les effets sur le développement les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle, à la fois au niveau histologique et fonctionnel. Une énumération non exhaustive rapporte des lésions testiculaires (troubles de la migration, lésions dégénératives des tubes séminifères, diminution des spermatocytes, hyperplasie des cellules interstitielles, voire adénomes), des lésions de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate, une diminution de la distance ano-génitale, l'augmentation du taux d'hypospadias, et enfin des persistances des mamelons.

Les effets indésirables sur la fertilité sont une diminution des indices de fertilité, de la durée de gestation, du nombre de fœtus vivants par portée, du poids des nouveau-nés, mais aussi du poids de la mère, des lésions testiculaires des nouveau-nés, une puberté mâle retardée.

Le marqueur le plus pertinent de ces effets semble être la mesure de la distance anogénitale. Ce paramètre est facilement identifiable et mesurable chez l'homme et chez l'animal. Il peut donc être un lien entre les études toxicologiques et les études épidémiologiques. D'autre part, c'est un indicateur sensible puisque la diminution de la distance anogénitale apparaît à de très faible dose.

3. La construction de la VTR

3.1. Identification d'une dose critique

3.1.1. Présentation des doses repères

3.1.1.1. Effets sur le développement

Il est à noter qu'aucune des études de reprotoxicité expertisées n'a été réalisée selon l'une des lignes directrices de l'OCDE. L'appréciation des études a donc été faite selon les critères de Klimish *et al.* (1997), sachant que les études respectaient d'autres lignes directrices provenant l'organismes nationaux.

| Espèce | Protocole | Résultats |
|---------------------|--|---|
| Rats Sprague-Dawley | Voie orale (sur 2 générations) Durée : 14 semaines 0, 52, 256, 509 mg/kg pc/j chez les mâles 0, 80, 385, 794 mg/kg pc/j chez les femelles | Pas de NOAEL – LOAEL 52 mg/kg pc/j et 80 mg/kg pc/j pour les mâles et les femelles sur des critères embryotoxiques : poids des fœtus F2. La NOAEL pour la toxicité maternelle est de 385 mg/kg pc/j (NTP, 1995 ; Wine <i>et al.</i> 1997) Pas de guidelines OCDE - Klimish <i>et al.</i> classe 1 |

| | | |
|---------------------|---|---|
| Rats Sprague-Dawley | Gavage J 12- 21 de la gestation Durée : 10 jours 0, 0,5, 5, 50, 100, 500 mg/kg pc/j | NOAEL et LOAEL sont de respectivement de 50 et 100 mg/kg pc/j. L'effet critique constaté étant une rétention mamelonaire dose dépendante. Mylchreest <i>et al.</i> 2000 Pas de guidelines OCDE - Klimish <i>et al.</i> classe 1 |
| Rats Sprague-Dawley | Voie orale : J 15 de la gestation jusqu'à la fin de la lactation (J 21 après la mise bas) Durée : 27 jours 0, 20, 200, 2000, 10000 ppm dans la nourriture, ce qui correspond environ à 0 ; 2 ; 24 ; 234 ; 1137 mg/kg pc/j | Pas de NOAEL – LOAEL = 2 mg/kg pc/j sur une diminution des spermatocytes et des lésions dysplasiques mamelonaires chez le mâle et la femelle. Lee <i>et al.</i> 2004 Pas de guidelines OCDE - Klimish <i>et al.</i> classe 1 |

3.1.1.2. Effets sur la reproduction

| Espèce | Protocole | Résultats |
|--------------------------------|--|---|
| Effets testiculaires | | |
| Rat Wistar | Voie orale, par gavage Durée : 15 jours 0, 250, 500, 1000 mg/kg pc/j | NOAEL et LOAEL sont respectivement de 250 et 500 mg/kg pc/j sur le poids testiculaire Srivastava <i>et al.</i> 1990 Pas de guidelines - Klimish <i>et al.</i> classe 1 |
| Effets sur la fertilité | | |
| Rats Sprague-Dawley | Voie orale (sur 2 générations) Durée : 14 semaines 0, 52, 256, 509 mg/kg pc/j chez les mâles 0, 80, 385, 794 mg/kg pc/j chez les femelles | Pas de NOAEL, LOAEL = 66 mg/kg pc/j Sur la réduction de la taille des portées F0 et du poids des nouveau-nés F2 Wine <i>et al.</i> 1997 Pas de guidelines - Klimish <i>et al.</i> classe 1 |

Les risques de deuxième espèce bêta ne sont pas détaillés dans les publications : Ils n'ont pas été calculés par les auteurs.

3.1.2. Choix de la dose critique

L'étude de Lee *et al.* (2004) est plus récente et est, en l'état actuel des connaissances, l'étude qui a mis en évidence le LOAEL le plus faible. Bien qu'aucun NOAEL n'ait été identifié dans l'étude (la première dose testée correspond au LOAEL pour les effets sur les spermatocytes de la progéniture), c'est cette étude qui a été choisie par l'EFSA pour le calcul de la DJT. La durée d'exposition est de 28 jours chez la rate gestante puis allaitante. Le LOAEL est égal à environ 2 mg/kg pc/j sur l'observation d'une diminution spermatocytaire et de dysplasies mamelonaires chez les nouveau-nés (incidence : 4 animaux sur 8 pour la valeur du LOAEL). Le risque de première espèce alpha est de 5 % pour la diminution spermatocytaire et 1 % pour les dysplasies mamelonnaires.

Aucune MAXSD n'a été identifiée dans la littérature.

3.2. Facteurs d'incertitude

L'EFSA a établit une Dose Journalière Tolérable de 10 µg/kg pc/j après application d'un facteur d'incertitude de 200 au LOAEL de l'étude de Lee *et al.* Les facteurs appliqués étaient :

- 10 pour la transposition inter-espèces ;
- 10 pour la variabilité intra-espèce ;
- 2 pour l'utilisation d'un LOAEL plutôt que d'un NOAEL.

3.3. Discussion et présentation de la VTR

Le DBP possède plusieurs VTR pour la voie orale, toutes construites sur des effets reprotoxiques. Il est donc proposé de faire un choix de la VTR considérée comme celle de meilleure qualité, en l'état actuel des connaissances.

La VTR proposée peut être la DJT fixée par l'EFSA en 2005 et reconnue aujourd'hui comme pertinente par les agences internationales (tableau). Les auteurs de ce rapport n'ont pas trouvé de données récentes dans la littérature scientifique qui permettraient soit de l'affiner, soit de la contester.

Tableau : VTR proposée par l'EFSA en 2005

| Organisme (date) | VTR | Voie et durée d'appli- cation | Référence de l'étude source | Espèce | Effets considérés | Voie d'expo- sition | Durée | Dose critique | UF |
|---------------------|------------|--|-----------------------------------|---------------------|---|---------------------------|---|---|------------------------------------|
| EFSA (2005) | 10 µg/kg/j | Voie orale, durée sub- chronique (femme enceinte et allaitante) | Lee et al. 2004 | Animale Rat (SD) | Développement Diminution du nombre des spermatocytes Anomalies mamelonaires | Orale, <i>ad lib</i> | 28 jours (J15-21 gestation puis --> J21 lactation) | Pas de NOAEL LOAEL = 2 mg/kg/j | 200 (10 UFA 10 UFH 2 UFL) |

4. Bibliographie

- Agarwal D.K. (1985). Mutagenicity evaluation of phthalic acid esters and metabolites in *Salmonella typhimurium* cultures. Journal of Toxicology and Environmental Health, 16, 61-69.
- Anderson W.A.C., Castle L., Scotter M.J., Massey R.C., Springall C. (2001). A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. Food Additives & Contaminants, 18, 1068-1074.
- Barlow N.J., McIntyre B.S., Foster P.M. (2004). Male reproductive tract lesions at 6, 12, and 18 months of age following *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate. Toxicologic Pathology, 32, 79-90.
- Barlow N.J., Phillips S.L., Wallace D.G., Sar M., Gaido K.W., Foster P.M.D. (2003). Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. Toxicological Sciences, 73, 431-441.
- Barlow N.J., Foster P.M. (2003). Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate. Toxicologic Pathology, 31, 397-410.
- Barlow N.J., Phillips S.L., Wallace D.G., Sar M., Gaido K.W., Foster P.M. (2003). Fetal testicular gene expression following *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate : alteration of key androgen-related genes. Toxicologist, 72, 276.
- Barlow N.J., McIntyre B.S., Foster P.M. (2002). Permanent alteration of anogenital distance and nipple retention in male rats exposed to di(n-butyl) phthalate *in utero*. Toxicologist, 66, 233 (Abstract).
- Barlow N.J., Phillips S.L., Wallace D.G., Sar M., Gaido K.W., Foster P.M.D. (2003). Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. Toxicological Sciences, 73, 431-441.
- Barrett J.R. (2005). Phthalates and baby boys. Potential disruption of human genital development. Environmental Health Perspectives, 113, A 542.
- BASF. (1958). Confidential data. Palatinol (flüssig) = phthalsäure-di-butyltert uns. Vers. Nummern VIII/117 und VIII/332. Dated 1-12-1958.
- BASF. (1961). Confidential data. Bericht über die toxikologische prüfung von Palatinol C, IC, AH, DN und VII/3-6. IX/418. Dated 1-12-1958.
- BASF. (1990a). Confidential Report. Report on the acute dermal irritation/corrositivity to the intact dorsal skin of dibutylphthalate in white rabbits. Project N°18H0449/892113. Dated 12-02-1990.
- BASF. (1990b). Confidential Report. Report on the acute irritation to the eye of dibutylphthalate in white rabbits. Project N°11H044 9/892114. Dated 12-02-1990.
- BASF. (1990c). Confidential Report. Report on the Maximization Test for sensitizing potential of dibutylphthalate in guinea pigs. Project N°30H04 49/892115. Dated 01 March 1990.

BASF. (1990d). Confidential Report. Departement Toxicology. Cytogenetic study *in vivo* of Dibutylphthalate in Mice Micronucleus test. Single oral administration. Project N°26M0449/894382. Dated 3 April 1990.

BIBRA. (1987). Toxicity profil of Dibutyl Phthalate (DBP). Dated March 1987.

Blount B.C., Silva M.J., Caudill S.P., Needham L.L., Pirkle J.L., Sampson E.J., Lucier G.W., Jackson R.J., Brock J.W. (2000). Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. Environmental Health Perspectives, 108, 972-982.

Bowman C.J., Turner K.J., Sar M., Barlow N.J., Gaido K.W., Foster P.M. (2004). Altered gene expression during rat wolffian duct development following di(n-butyl) phthalate exposure. Birth Defects Research. Part A, Clinical and molecular toxicology, 70, 297.

Brunn., Weller E. et Pfordt J. (2000). Bestimmung von Phthalsäureestern in Lebensmitteln und Frauenmilch. ERNO, 1, 25-28. In European Risk Assessment Report on DBP according Regulation, 739-93. (Existing Substances Regulation). (2004). Joint Research Centre, EUR 19840, Series : 1st Priority. List volume 29, p 64.

Caganiut B. (1954). Keratosis erosiva und Nephritis toxica nach Einnahme von Dibutylphthalat. Schweizerische Medizinich Wochenschrift, 84, 1243-1244.

Calafat A.M., Brock J.W., Silva M.J., Gray L.E. Jr., Reidy J.A., Barr D.B., Needham L.L. (2006). Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. Toxicology, 217, 22-30.

Calley D. (1966). Toxicology of a series of phthalate esters. Journal of Pharmaceutical Sciences, 55, 158-162.

Carruthers C.M., Foster P.M.D. (2005). Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate. Birth Defects Research, 74, 277-285.

Cater B.R. Cook M. W. Gangolli S.D., Grasso P., (1997). Studies on Dibutyl phthalate-induced testicular atrophy in the rat . Effect of zinc metabolism. Toxicology and Applied Pharmacology, 41, 609-618.

Colon I., Caro D., Bourdony C.J., Rosario O. (2000). Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. Environmental Health Perspectives, 108, 895-900.

Corton J.C., Lapinskas P.J. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptors : mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract . Toxicological Sciences, 83, 4-17.

David M. (2000). Exposure to phthalate esters. Environmental Health Perspectives, 108, A 440.

De Rooij D.G. (1998). Stemcells in the testis. International Journal of experimental Pathology, 79, 67-80.

Duty S.M., Singh N.P., Silva M.J., Barr D.B., Brock J.W., Ryan L., Herrick R.F., Christiani D.C., Hauser R. (2003). The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. Environmental Health Perspectives, 111, 1164-1169.

- EI-Gehani F., Zhang F.P., Pakarinen P., Ranniko A., Huhtaniemi I. (1998). V gonadotrophin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biology of Reproduction* 58, 116-123.
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavouring, Processing Aids and Material in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Di-Butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. *The EFSA Journal*, 242, 1-17.
- Ema M., Amano H., Itami T., Kawasaki H. (1993). Teratogenic evaluation of di-n-butyl phthalate in rats. *Toxicology Letters*, 69, 197-203.
- Ema M., Amano H., Agawa Y. (1994). Characterization of the developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in rats. *Toxicology*, 86, 163-174.
- Ema M., Kurosaka R., Amano H., Ogawa Y. (1995). Developmental toxicity evaluation of mono-n-butyl phthalate in rats. *Toxicology Letters*, 78, 101-106.
- Ema M., Kurosaka R., Harazono A., Amano H., Ogawa Y. (1996). Phase specificity of developmental toxicity after oral administration of mono-n-butyl phthalate in rats. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 31, 170-176.
- Ema M., Miyawaki E., Kawashima K. (1998). Further evaluation of developmental toxicity of di-n-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats. *Toxicology Letters*, 98, 87-93.
- Ema M., Miyawaki E., Kawashima K. (2000). Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reproductive Toxicology*, 14, 13-19.
- Ema M., Miyawaki E., Kawashima K. (2000). Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicology Letters*, 111, 271-278.
- Ema M., Miyawaki E. (2001). Effects of dibutyl phthalate on the development of the reproductive system in rat male offspring. *Teratology*, 63, 39 A.
- Ema M., Miyawaki E. (2001). Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBP) during pregnancy. *Toxicologist*, 60, 216-217.
- Ema M., Miyawaki E. (2001). Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. *Reproductive Toxicology*, 15, 189-194.
- Ema M. (2002). Antiandrogenic effects of dibutyl phthalate and its metabolite, monobutyl phthalate. *Congenital Anomaly Kyoto*, 42, 234.
- European Union Risk Assessment Report on DBP according Regulation, 739/93. (Existing Substances Regulation). (2004). Joint Research Centre, EUR 19840, Series : 1st Priority. List volume 29.
- Fisher J.S., Macpherson S., Marchetti N., Sharpe R.M. (2003). Human "testicular dysgenesis syndrome" : a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction*, 18, 1383-1394.
- Fisher J.S. (2004). Environmental anti-androgens and male reproductive health : focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*, 127, 305-315.

Florin I. (1979). Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. *Toxicology*, 15, 219-232.

Foster P.M.D., Cattley R.C., Mylchreest E. (2000). Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat : implications for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 38, S 97-S 99.

Foster P., Turner K., Sar M., Barlow N. (2003). Effects of environmental antiandrogens during fetal reproductive development : consequences for the adult. *Toxicologist*, 72, 57.

Foster P.M., Barlow N.J., Turner J.K. (2003). Disruption of reproductive development by environmental antiandrogens. *Biology of Reproduction*, 68, 103.

Fukuoka M., Tanimoto T., Zhou Y., Kawasaki N., Tanaka A., Ikemoto I., Machida T. (1989). Mechanism of testicular atrophy induce by di-n—butyl phthalate in rats . Part 1. *Journal of Applied Toxicology*, 9, 277-283.

Fukuotka M., Zhowy., Tanaka A., Ikemoto I., Machida T., (1990). Mechanism of testicular atrophie induce by di-n-butyl phthalate in rats. Part 2.The effect on some testicular enzymes. *Journal of Applied Toxicology*, 10, 285-293.

Fukuoka M., Kobayashi T., Zhou y., Hayakawa T. (1993). Mechanisms of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 4. Changes in the activity of succinate deshydrogenase and the levels of transferrin in the sertoli and germs cells. *Journal of Applied Toxicology*, 13, 241-246.

Gamer A.O. (2000). Di-n-butyl Phthalate. Subacute inhalation study in Wistar rats. 20 Exposures as a liquid aerosol. Confidential report from BASF Aktiengesellschaft. *Experimental Toxicology and Ecology*, Ludwigshafen/Rhein, Germany. Project N°4010486/98063. Dated February 09-2000.

Gigioli R et al. (1978). Horizontal and longitudinal study of a population employed in the production of phthalates. *Med. Lav* 69, 620-631. In : IPCS. (1997). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 189. Di-n-butyl Phthalate. World Health Organization, Geneva., 130-131.

Gray T.J.B; et Butterworth K.R. (1980). Testicular atrophy produce by phthalate esters. *Archives of Toxicology* 4, 452-455.

Gray T.J.B., Rowland I.R., Foster P.M.D., Gangolli S.D. (1982). Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicology Letters*, 11, 141-147.

Gray L.E., Ostby J.S., Mylchreest E., Foster P.M.D., Kelce W.R. (1998). Dibutylphthalate induces antiandrogenic but not estrogenic *in vivo* effects in LE hooded rats. *Toxicological Sciences*, 42, 176.

Gray L.E Jr., Ostby J., Furr J., Wolf C.J., Lambright C., Parks L., Veeramachaneni D.N., Wilson V., Price M., Hotchkiss A., Orlando E., Guillette L. (2001). Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Human Reproduction Update*, 7, 248-264.

Gray T., Rowland I., Foster P., Gangolli S. (1982). Species differences in the testicular toxicity of phthalates esters. *Toxicology Letters*, 11, 141-147.

- Gray Jr., Wolf C., Lambright C., Mann P., Price M., Cooper B.L. et al. (1999). Administration of potentially anti-androgenic pesticides and toxic substances (dibutyl and diethylhexyl phthalate PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 15, 94, 118.
- Greenough et al. (1981). Confidential Report from Inveresk Research International to Hüls A.G. Report N°1956. Safety Tests of Vestinol C Dibutyl Phthalate. IRI Project N°416746. Dated February 1981.
- Harris C., Menttu P., Parker M.G., Stumper J.P. (1997). The estrogenic activity of phthalate ester *in vitro*. *Environmental Health Perspectives*, 105, 802-811.
- Higuchi Ty.T., Palmer J.S., Gray L.E Jr., Veeramachaneni D.N.R. (2003). Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicological Sciences*, 72, 301-313.
- Hüls. (1995). Determination of the effects of Vestinol C on the growth of *Scenedesmus subspicatus*. Final Report AW-392.
- IARC. (1995). International Agency for Research on Cancer. Peroxisome proliferation and its role in cancerogenesis, virus and expert opinions of an IARC Working Group Lyon, 7-11 Déc 1994, IARC Technical Report N°24 Lyon, 1995 .
- Ikemo I., Kotera S., Katsurai K., Inaba Y., Machida T., Tanaka A. (1983). Experimental testicular damage induce by Dibutyl Phthalate. *Japan Journal of Fertility and Sterility*, 28, 159-165.
- Imajima T., Shono T., Zakaria O., Fukuoka S.S. (1997). Prenatal phthalate causes cryptorchidism postnatally by inducing transabdominal ascent of the testis in fetal rats. *Journal of Pediatric Surgery*, 32, 18-21.
- Imperato., McGinlcy J., Sanchez R.S., Spencer J.R., Yee B., Vaughan E.D. (1992). Comparaison of the effects of the 5 α reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation : dose-reponse studies. *Endocrinology* 131, 1149-1156.
- INRS. (2003). Fiche toxicologique N°98. Cahier de notes documentaire. Hygiène et Sécurité du Travail, 192, 73-78.
- IPCS. (1997). Environmental Health Criteria, 189 : Di-n-butyl Phthalate. Geneva, World Health Organization. International Programme on Chemical Safety, 99 pp.
- IPCS/WHO. (1997). Di-n-butylphthalate. Environmental Health Criteria, 189. IPCS/WHO.
- IPCS/WHO. (1997). Di-n-butylphthalate. Environmental Health Criteria 189. IPCS/WHO.
- IUCLID Data Set. (2000). Substance ID : 84-74-2.
- Izmerov N.F. (1982). Toxicometric parameters of industrial toxic chemicals under single exposure UNEP/IRPTC. Centre of Intern Project. Moscow 44. In : Mulder D.E. (1986). Review of literature on diethylphthalate, dibutylphthalate and benzylbutylphthalate.
- Jansen E.H.J.M. (1993). Confidential Report from the National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), the Netherlands to the Dutch Chief Inspectorate of Health Protection. Report N°618902013. Toxicological investigation of dibutylphthalate in rats. Dated June 1993.

- Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., Stumper J.P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives*, 103, 582-587.
- Jorgensen N., Carlsen E., Nermoen I., Punab M., Suominen J., Andersen A.G., Andersson A.M., Haugen T.B., Horte A., Jensen T.K., Magnus O., Petersen J.H., Vierula M., Toppari J., Skakkebaek N.E. (2002). East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area : a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Human Reproduction*, 17, 2199-2208.
- Kassim N.M., McDonald S.W., Reid O., Bennett N.K., Gilmore D.P., Payne A.P. (1997). The effects of pre-and post natal exposure to the non steroidial antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *Journal of Anatomy*, 190, 577-588.
- Kavlock R., Boekelheide R., Chapin R., Cunningham Faustman P., Foster. Et al. (2002). NTP Center for the Evaluation of risks of Human Reproduction phthalate expert and panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reproductive Toxicology*, 16, 489-527.
- Kim H.S., Han S.Y., Kim T.S., Shin J.H., Moon H.J., Kang I.H., Kim I.Y. (2004). Neonatal Exposure to di(n-butyl) phthalate alters male reproductive tract development. *Biology of Reproduction*, (special issue) 132.
- Koch H.M., Rossbach B., Drexler H., Angerer J. (2003). Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environmental Research*, 93, 177-185.
- Kohn M.C. (2000). Human exposure estimates for phthalates. *Environmental Health Perspectives*, 108, A 440-A 442.
- Kurata M. (1975). Studies for mutagenic effects of phthalates. Report to Ministry of Health and Welfare (Japan), Scientific Research on Food Hygiene Program. In : Omari Y. (1976). Recent progress in safety evaluation studies on plasticizers and plastics and their controlled use in Japan., 9, 1 *Environmental Health Perspectives*, 9, 1-11.
- Lake B.G., Cook W.M., Worrel N.R., Cunningham M. E., Evans J.G., Price R.J., Young P.J., Carpanini F.M.B. (1991). Dose-response relationships for induction of hepatic peroxisome proliferation and testicular atrophy by phthalate esters in the rats. *Human and Experimental Toxicology*, 10, 67-68. (Abstract).
- Lamb J.C., Chapin R.E., Teague J., Lawton A.D., Reel J.R. (1987). Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 88, 255-269.
- Langonne I., Saillenfait A.M., Payan J.P. (1998). Comparative embryotoxicity of di-n-butyl phthalate and its main metabolite mono-n-butyl phthalate at mid gestation. *Teratology*, 58, 22 A.
- Lee H., Yoon E., Han J., Kim H., Shin J.H., Han S.Y. (2001). Establishing a reference dose for maternal exposure to di(n-butyl) phthalate using a benchmark dose based on male reproductive tract malformation in fetuses. *Environmental Sciences : an International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, 8, 184.
- Lee K.Y., Shibutani M., Tagagi H., Kato N., Tagigami S., Uneyama C., Hirose M. (2004). Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring

after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*, 203, 221-258.

Lehman A.J. (1955). Insect repellents. *Quarterly Bulletin Food off US*, 19, 87-99.

MAAF. (1998). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Survey of plasticizer levels in food contact materials and in foods. *Food Surveillance Papers N°21*.

McKee R.H., Butala J.H., Raymond M.D., Gerhard G. (2004). NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates addressing the data gaps. *Reproductive Toxicology*, 16, 1-22.

McKinnell C., Sharpe R.M., Mahood K., Hallmark N., Scott H., Ivell R., Staub C., Jegou B., Haag F., Koch-Nolte F., Hartung S. (2005). Expression of Insulin-like factor 3 (InsI3) protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate. *Endocrinology*, 146, 4536-4544.

Mahood I.K., Hallmark N., McKinnell C., Walker M., Fisher J.S., Sharpe R.M. (2005). Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di(n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology*, 146, 2613-2623.

Mes J., Coffin D.E., Campbell D.S. (1974). Di-n-butyl and di-2-ethylhexyl phthalate in human adipose tissue. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 12, 721-725.

Milkov LE. et al. (1973). Health status of workers exposed to phthalate plasticizers in the manufacture of artificial leather and films based on PVC resins. *Environmental Health Perspectives*, 3, 175-178.

Mitsuhashi M., Morimura K., Wanibuchi H., Hayashi S., Kiyota A., Wada S., Nakatani T., Fukushima S. (2004). Di-n-butyl phthalate is toxic to the male reproductive system and its toxicity is enhanced by thioacetamide induced liver injury. *Journal of Toxicologic Pathology*, 17, 177-185.

Murature D.A., Tang S.Y., Steinhardt G., Dougherty R.C. (1987). Phthalate esters and semen quality parameters. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 14, 473-477.

Mylchreest E., Cattley R.C., Foster P.M.D. (1998). Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate : an antiandrogenic mechanism. *Toxicological Sciences*, 43, 47-60.

Mylchreest E., Sar M., Cattley R.C., Foster P.M.D. (1999). Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156, 81-95.

Mylchreest E., Wallace D.G., Cattley R.C., Foster P.M.D. (2000). Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicological Sciences*, 55, 143-151.

Mylchreest E., Sar M., Wallace D.G., Foster P.M.D. (2002). Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*, 16, 19-28.

Müller A.M., Nielsen A., Ladefoged O. (2003). Ministeriet for FØderaver, Landburg og Fisheri Veterinaer-og F devaredirektoratet. Huma exposure to selected phthalates in Denmark, rapport 2003 : 15.

Nikonorow M., Mazur H., Piekacz H. (1973). Effect of orally administered plasticizers and polyvinyl chloride stabilizers in the rat. Toxicology and Applied Pharmacology, 26, 253-259.

NTP (National Toxicology Program). (1991). Final Report on the Reproductive Toxicity of Di-n-butyl Phthalate. (CAS N°84-74-2) in Sprague-Dawley rats. NTIS publication N°PB92-111996. National Technical Information Service LNTISS, US. Department of Commerce, Spring Field, VA.

NTP (National Toxicology Program). (1995). Toxicity Report Series Number 30 by D.S. Marsman. N.T.P technical report on toxicity studies of dibutyl phthalate (cas N°84-74-2). Administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. NIH publication 95-3353. US Departement of Health and Human Services. Public Health Service. National Institutes of Health. Dated April 1995.

NTP National Toxicology Program). (1995). NTP technical report on toxicity studies of dibutyl phthalate (cas N°84-74-2) administred in feed to F3 44/N rats and B6C3F1 mice. Research Triangle Park, North Carolina, US Departement of Health and Human Services, National Toxicology Program (Toxicity series N°30).

Oishi S. Et Hiraga K. (1980a). Testicular atrophy induced by phthalic acid esters. Effet on testosterone and zing concentrations. Toxicology and Applied Pharmacology 53, 35-41.

Oishi S. Et Hiraga K. (1980b). Effect of phthalic acid esters on mouse testes. Toxicology Letters 5, 413-416.

Parks L.G., Ostby J.S., Lambright C.R., Abbott B.D., Klinefelter G.R., Barlow N.J., Gray L.E Jr. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. Toxicological Sciences, 58, 339-349.

Patel R., Wolfe G.W., Rouselle S., Cherian G., Ko K., Moore R.W., Bishop J., Chapin R.E. (2001). Reproductive effects of dibutylphthalate in Sprague-Dawley rats when assessed in a multigenerational study. Toxicologist, 60, 385.

Petersen J.H., et Breindhal T. (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. Food Additives and Contaminant 17, 133-141.

Reel J.R., Lawton A.D., Feldman D.B., Lamb J.C. (1984). Di(N-butyl) phthalate reproduction and fertility assessment in CD-1 mice when administered in the feed. NTP-84-411 : National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences.

Richiardi L., Bellocchio R., Adami H.O., Torrang A., Barlow L., Hakulinen T., Rahu M., Stengrevics A., Storm H., Tretli S., Kurtinaitis J., Tyczynski J.E., Akre O. (2004). Testicular cancer incidence in eight northern european countries : secular and recent trends. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 13, 2157-2166.

RTECS. (1993 a). Update code 9301 February 1993. Gigiena Truda i Professional'nye Zabolevaniya 17, 51.

RTECS. (1993 d).Update code 9301 February 1993. Union Carbide Data Sheet 12, 1971, 29.

RTECS. (1993 e). Update code 9301 February 1993. Kanagawa-Ken Eisei Kenkyusho Kenkyu Hokoku 3, 1973, 19.

RTECS. (1993 f). Update code 9301 February 1993. Science Reports of the Research Institutes. Tokohu University, Série C. Medicine 36 (1-4), 1989, 10.

Saillenfait A.M., Payan J.P., Fabry J.P., Beydon D., Langonne I., Gallissot F., Sabate J.P. (1998). Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicological Sciences*, 45, 212-224.

Salazar-Martinez E., Romano-Riquer P., Yanez-Marquez E., Longnecker M.P., Hernandez-Avila M. (2004). Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environmental Health*, 3, 8., d01 : 10. 1186/1476-069X-3-8 (on line september 2004).

Salazar V., Castillo C., Ariznavarreta C., Campon R., Tresguerres J.A. (2004). Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology*, 205, 131-137.

Schilling K. (1998). Confidential Report from BASF, Departement of Toxicology. Study of the oral toxicity of dibutyl phthalate in Wistar rats. Administration via the diet over 3 months. Project N°31S0449/89020. Dated 23-03-1992.

Scientific Committee for Food. Report 42 nd series. (2000). Opinion on phthalic acid, dibutyl ester. National Institute for Public Health and Environmental Protection, 233.

Shahin M.M. and Von Borstel R.C. (1977). Mutagenic and lethal effects of α -benzene hexachloride, dibutyl phthalate and trichloro ethylene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 48, 173-180.

Sharpe R.M., Skakkebaek N.E. (2003). Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 2023-2038.

Sharpe R.M. (2005). Phthalate exposure during pregnancy and lower anogenital index in boys: wider implications for the general population. *Environmental Health Perspectives*, 113, A 504-A 505.

Shiota K., Chou M.J., Nishimura H. (1980). Embryotoxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DBP) in mice. *Environmental Research*, 22, 245-253.

Shiota K., Nishimura H. (1982). Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environmental Health Perspectives*, 45, 65-70.

Shono T., Kai H., Suita S., Nawata H. (2000). Time-specific effects of mono-n-butyl phthalate on the transabdominal descent of the testis in rat fetuses. *BJU International*, 86, 121-125.

Shultz V.D., Phillips S., Sar M., Foster P.M.D., Gaido K.W. (2001). Altered gene profiles in fetal rat testes after *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicological Sciences*, 64, 233-242.

Silva M.J., Barr D.B., Reidy J.A., Malek N.A., Hodge C.C., Caudill S.P., BrockJ.W., Needham L.L., Calafat A.M. (2004). Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S

population from the national health and nutrition examination survey (NHANES) 1999-2000. Environmental Health Perspectives, 112, 331-338.

Singh A.R. (1972). Teratogenicity of phthalate esters in rats. Journal of Pharmaceutical Sciences, 61, 51-60.

Skakkebaek N.E., Rajpert-De-Meyts E., Main K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome : an increasingly common developmental disorder with environmental aspects : opinion. Human Reproduction, 16, 972-978.

Smith C.C. (1953) Toxicity of butylstearate, dibutylsebacate, dibutylphthalate and methoxy ethyloleate. Industrial Hygiene and Occupational Medicine, 7, 310-318.

Sohoni P. Et Stumper. (1998). Several environmental oestrogene are also anti-androgenic. The Journal of Endocrinology 158, pp 327-339.

Srivastava S.P. (1990). Testicular effects of di-n-butyl phthalate (DBP) : biochemical and histopathological alterations. Archives of Toxicology, 64, 148-152.

Srivastava S.P., Srivastava S., Saxena D.K., Ehandra S.V., Seth P.K. (1990a). Testicular effects of di-n-butyl phthalate (DBP) : biochemical and histopathological alterations. Archives of Toxicology, 64, 148-152.

Srivastava S., Singh G.B., Srivastava S.P., Seth P.K. (1990b). Testicular toxicity of di(n-butyl phthalate in adult rats. Effect on marker enzymes of spermatogenesis. The Journal of Experimental Biology, 28, 67-70.

Swan S.H., Main K.M., Liu F., Stewart S.L., Kruse R.L., Calafat A.M., Mao C.S., Redmon J.B., Ternand C.L., Sullivan S., Teague J.L., The Study for Future Families Research Team. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Environmental Health Perspectives, 113, 1056-1061.

Tanaka A., Matsumoto A., Yamaha T. (1978). Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. Toxicology, 9, 109-123.

Thompson C.J., Ross S.M., Gaido K.W. (2004). Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. Endocrinology, 145, 1227-1237.

Tomita I. et al. (1997). Phthalic acid esters in various foodstuffs and biological materials. Ecotoxicol. Environ. Safety, 1, 275-278. In : IPCS. (1997). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, 189. Di-n-butyl Phthalate. World Health Organization, Geneva, p 58.

Toppari J., Rajpert-De-Meyts E., Main K.M., Skakkebaek N.E. (2004). Testicular dysgenesis syndrome and the development of male reproductive disorders. Toxicology and Applied Pharmacology, 197, 173.

Van des Schoot P. (1992). Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide. Journal of Reproductive Fertility, 96, 483-496.

Voronin A.P. (1975). Toxicological and hygienic characteristics of the plastifier dibutyl phthalate. In : Toxicology and Hygiene of the Petrochemical and Oil-Refining Products. (The second All Union Conference). Yaroslav, 1972, 83-88.

- Ward J., Peters J., Perella C., Gonzalez F. (1998). V receptor and non receptor mediated organ-specific toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activateol receptor α - null mice. *Toxicologic Pathology*, 26, 240-246.
- Williams D.T. and Blanchfield B.J. (1975). The retention, distribution and metabolism of Dibutyl Phthalate -7- ^{14}C in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 854-858.
- Wine R.N., Li L.H., Barnes L.H., Gulati D.K., Chapin R.E. (1997). Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in sprague-dawley rats. *Environmental Health Perspectives*, 105, 102-107.
- Zeiger E. (1985). Mutagenicity testing of di(2-ethylhexyl) phthalate and related chemicals in *Salmonella*. *Environmental Mutagenicity*, 7, 213-232.
- Zhang Y., Jiang X., Chen B. (2004). Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL. *Reproductive Toxicology*, 18, 669-676.
- Zhang Y., Liu Z., Chen B.H. (2005). Could phthalate's reproductive toxicity be due to it's disruption of inter-sertoli tight junction in two-compartment sertoli cell culture. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 73, 313.
- Zhou Y., Fukuoka M., Tanaka A. (1990). Mechanisms of testicular atrophy induce by di-n-butyl phthalate in rats. Part 3. Changes in the activity of some enzymes in the sertoli and germcells, and in the levels of metal ions. *Journal of Applied Toxicology*, 10, 447-453.

**Construction/ Choix d'une VTR reprotoxique pour le Linuron,
selon la méthode proposée dans le document de référence**

Rapport final

12 mai 2006

Etude réalisée par :

Organisme d'expertise : Vincent Nedellec Consultant

Contact : Nedellec Vincent,

111 avenue Paul Doumer –91 160 Saul-les-Chartreux.

Tel/fax 01.64.48.07.51. E-mail : vincent.nedelle@vnc-sante.fr

Pour :

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

AFSSET

27-31 avenue du Général Leclerc

94704 Maison Alfort Cedex

Contact : Nathalie Bonvallot (01 56 29 19 33 / nathalie.bonvallot@afsset.fr)

Information sur la propriété et diffusion du document

Les résultats des travaux demeurent la propriété de l'AFSSET, qui se réserve le droit de les rendre publics. Ils ne peuvent être utilisés, ou rendus en tout ou partie publics qu'avec l'accord écrit préalable de l'AFSSET. Les informations communiquées par l'AFSSET à l'occasion de la réalisation des travaux sont confidentielles et ne doivent pas être communiquées à des tiers, sauf accord.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUME | 4 |
| 2. LE PROFIL TOXICOLOGIQUE | 8 |
| 2.1. INFORMATIONS GENERALES | 8 |
| 2.1.1. <i>Identification de la substance.....</i> | 9 |
| 2.1.2. <i>Propriétés physico-chimiques</i> | 10 |
| 2.1.3. <i>Plausibilité d'exposition humaine</i> | 10 |
| 2.2. TOXICOCINETIQUE..... | 11 |
| 2.3. TOXICITE GENERALE..... | 11 |
| 2.3.1. <i>Données chez l'animal</i> | 11 |
| 2.3.1.1. Etudes de toxicité aiguë..... | 11 |
| 2.3.1.2. Etudes de toxicité subchronique | 12 |
| 2.3.1.3. Etudes de toxicité chronique..... | 12 |
| 2.3.1.4. Génotoxicité..... | 13 |
| 2.3.1.5. Etudes de cancérogenèse..... | 14 |
| 2.3.1.6. Irritation et sensibilisation..... | 15 |
| 2.3.2. <i>Données chez l'homme</i> | 15 |
| 2.4. TOXICITE SUR LA REPRODUCTION ET LE DEVELOPPEMENT | 15 |
| 2.4.1. <i>Données humaines</i> | 15 |
| 2.4.1.1. Effets sur le développement | 15 |
| 2.4.1.2. Effets sur la fertilité..... | 15 |
| 2.4.2. <i>Données animales</i> | 15 |
| 2.4.2.1. Effets sur le développement | 15 |
| 2.4.2.2. Effets sur la fertilité..... | 18 |
| 2.4.3. <i>Mécanismes d'action proposés.....</i> | 18 |
| 2.5. ANALYSE DE LA COHERENCE DES DONNEES ANIMALES ET HUMAINES | 21 |
| 2.6. COMPARAISON DES INDICES DE TOXICITE EN FONCTION DES EFFETS..... | 22 |
| 2.7. CONCLUSION..... | 22 |
| 3. LA CONSTRUCTION DE LA VTR POUR LES EFFETS REPROTOXIQUES | 26 |
| 3.1. INTRODUCTION | 26 |
| 3.2. IDENTIFICATION D'UNE DOSE CRITIQUE..... | 26 |
| 3.2.1. <i>Présentation des doses repères</i> | 26 |
| 3.2.2. <i>Dose critique retenue.....</i> | 28 |
| 3.3. FACTEURS D'INCERTITUDE..... | 28 |
| 3.4. DISCUSSION ET PRESENTATION DE LA VTR | 30 |
| 4. BIBLIOGRAPHIE | 31 |
| 5. GLOSSAIRE..... | 33 |

1. Résumé

*Dans ce rapport les termes marqués d'une étoile « * » sont définis au glossaire.*

Le linuron (CASRN 330-55-2) est un herbicide de la famille des urées substituées ($C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$). Il a pour principales caractéristiques chimiques d'être très stable, non volatile, non corrosif, peu soluble dans l'eau [ICSC] et peu毒ique pour les mammifères [HSDB]. Il est homologué par la commission européenne, et placé dans l'annexe 1 de la directive européenne 91/414/EC depuis sa réévaluation en 2002 [CE, 2002], avec comme restriction d'usage : « ne pas épandre sur des sols sablonneux ou à texture grossière ayant moins de 1 % de matière organique ».

Il est utilisé comme **herbicide agricole et ornemental**, homologué pour les cultures de soya, carottes, pommes de terre, maïs grain/fourrager, blé, avoine, orge, asperges, arbres fruitiers, cerises de Virginie et baies de Saskatoon, panais, aneth, maïs sucré et lupin blanc. Les mauvaises herbes sensibles sont : stellaire moyenne, renouées, renouée des oiseaux, chénopode glauque, chénopode blanc, amarante à racine rouge, pourpier potager, petite herbe à poux (incluant les biotypes résistants aux triazines), bourse-à-pasteur, tabouret des champs, renouée liseron, panic capillaire, vélar fausse giroflée, échinochloa, pied-de-coq, abutilon, digitaires et sétaires.

En Europe, la production annuelle est de 500 à 1000 tonnes par an (principalement en France, Italie, Hollande, Espagne, Angleterre) [ECB].

Il a été classé par l'Union Européenne en reprotoxique de catégorie 3 (phrases de risque R62 ; R63) et placé en attente de classe 2 pour ses effets sur le développement [ECB]. Les études motivant cette classification sont présentées dans ce rapport [McIntyre, 2000 ; Gray, 1999]. Dans la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé pour les pesticides, il est jugé « légèrement dangereux » (dernière catégorie de la classification). Il est sur la liste californienne des produits chimiques connus pour causer le cancer ou toxique pour la reproduction : type de toxicité : développement [US-EPA-NCEA, 1999]. L'US-EPA a évalué son potentiel cancérogène et classé le linuron comme possiblement cancérogène chez l'homme (classe C). Il n'y a pas d'évaluation du CIRC.

Chez le rat, le linuron est complètement transformé après son passage hépatique, ce qui le rend non bioaccumulable chez les mammifères. Il n'y a pas de trace de la substance mère dans les urines. On trouve des traces de linuron dans le sang, la graisse, les reins et la rate après deux ans d'exposition chez le rat et le chien à des doses n'ayant pas montré d'effet toxique. Les voies métaboliques sont, chez l'animal, une déméthylation puis hydroxylation

du cycle benzénique. Dans la plante on assiste à la déméthylation puis à la déméthoxylation. Les principaux métabolites du linuron sont les dérivés de l'urée (n-3,4-dichlorophényl-urée, n-(3,4-dichlorophényl)-n'-méthylurée) et des traces de 3,4-dichloroaniline et de 6-acétamido-2,3-dichlorophénol [HSDB].

A forte dose, le linuron est considéré comme légèrement toxique avec des DL₅₀ orales variant de 1000 à 4000 mg/kg/j. En exposition subchronique et chronique, on observe en priorité des effets hématologiques chez le chien, le rat et la souris notamment au niveau des globules rouges (pigmentation anormale du sang, anémie hémolytique). Exposé pendant la période sensible de gestation à 25 mg/kg/j, il n'y a pas d'effet tératogène observé chez les descendants quand bien même le gain de poids maternel était diminué. Chez le rat, la dose de 6,25 mg/kg/j ne produit pas d'effet tératogène. *In vitro*, le linuron a causé des mutations dans une étude sur la bactérie, mais pas dans d'autres études de mutagénicité ou de génotoxicité (test de Ames, test sur *E. Coli*, *Salmonella*, culture de cellules ovariennes de hamster chinois). *In vivo*, chez l'animal, le linuron n'a pas montré d'activité génotoxique ou mutagène. Plusieurs études chez l'animal ont montré que le linuron provoque des tumeurs bénignes du foie (adénome hepatocellulaire à 180 mg/kg/j chez la souris), des testicules (adénome testiculaire à 72,5 mg/kg/j chez le rat), et des cellules de Leydig* (adénomes des cellules interstitielles de Leydig* à 200 mg/kg/j chez le rat).

Les effets reprotoxiques du linuron ont été testés sur les rates en gestation. A des doses supérieures aux doses ayant des effets toxiques hématologiques en exposition chroniques, les effets reprotoxiques du linuron sont principalement : la conservation des mamelons ou aréoles, la réduction de la distance ano-génitale, une réduction significative du poids des organes sexuels masculins, l'hypoplasie des testicules et des épididymes*, des malformations au niveau des organes sexuels internes (épididyme, canal déférent, vésicule séminale*, gubernaculum*) et externes (hypospadias*, cryptorchidie*), enfin une diminution du gain de poids des mères et du nombre de naissance. Le mécanisme toxique responsable de ces effets serait l'action anti-androgénique (compétition avec la testostérone* au niveau des récepteurs androgéniques) responsable d'anomalies dans la différenciation sexuelle au cours de l'embryogenèse. Par ailleurs, l'action anti-androgénique du linuron favoriserait la prolifération d'hormone lutéinique* provoquant les tumeurs des cellules de Leydig*.

Les valeurs toxicologiques de référence (VTR) actuellement disponibles pour les effets à long terme sont fondées sur la toxicité hématologique du linuron (cf. tableau ci-contre).

| Organisme (année) | animal | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR* | Dose critique** | UF*** | Etude toxicologique utilisée |
|------------------------------|---------------|---------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------|---|
| US-EPA, 1993 | Chien | hématologique | Orale, | 2 ans | RfD = 0,002 mg/kg/j | LOAEL = 0,625 mg/kg/j | 300 | EI.. du Pont de Nemours 1962 |
| CE, 2002 | rat | hématologique | orale | 2 ans | DJA = 0,003 mg/kg/j | LOAEL = 1,3 mg/kg/j | 500 | - |
| US-EPA, NCEA | - | - | - | - | HCPF = 0,0098 (mg/kg/j) ⁻¹ | - | - | - |
| US-EPA, NCEA | | | | | ADI = 0,013 mg/kg/j | - | - | - |

* RfD = Reference dose. DJA = dose journalière acceptable. HCPF Human Carcinogen Potency Factor. ADI = Acceptable Daily Intake.

** LOAEL = Lowest observable adverse effect level.

*** UF = uncertainty factor

La VTR de l'US-EPA est fondée sur un LOAEL pour des effets hématologiques (modification de la pigmentation du sang) issu d'une étude chronique chez le chien. Le facteur d'incertitude retenu (en plus du facteur 100 pour la variabilité inter et intra espèce) pour l'absence de NOAEL est seulement de 3 dans la mesure où l'effet toxique est « minimal », conduisant à un facteur global de 300.

La DJA de la Commission Européenne est fondée sur un LOAEL pour des effets hématologiques (anémie hémolytique) issu d'une étude chronique chez le rat. Un facteur d'incertitude de 5 a été retenu pour l'absence de NOAEL. Le rapport de la Commission Européenne ne mentionne pas l'étude de l'US-EPA qui a pourtant identifié un LOAEL plus faible.

Les VTR issues du profil toxicologique de l'US-EPA NCEA manquent de transparence. Il serait nécessaire de se procurer le document original auprès de l'US-EPA ([EPA/600/X-84/126 (NTIS PB88120654)]) afin de rechercher les informations manquantes. Elles sont indispensables pour effectuer un choix raisonné de l'une ou l'autre VTR dans une évaluation des risques sanitaires.

En l'état actuel des connaissances disponibles, considérant les plus récentes publications sur les mécanismes d'effets reprotoxiques du linuron, qui mentionnent le fait que des recherches complémentaires sont en cours pour mieux connaître les mécanismes à l'œuvre ; considérant également que la Commission Européenne attend de nouveaux résultats, il ne semble pas nécessaire de faire des recommandations de recherches toxicologiques complémentaires.

Une **VTR aiguë pour les effets du linuron sur le développement** peut être proposée, à partir de la plus faible dose critique identifiée dans les études disponibles et jugées de qualité suffisante. Il s'agit d'un LOAEL de 12,5 mg/kg/j pour l'hypoplasie des testicules et des épидidymes. Il est issu d'une étude chez des rats exposés pendant les 20 derniers jours de gestation par voie orale (gavage). Après analyse des connaissances disponibles, un facteur d'incertitude de 300 est appliqué (100 pour la variabilité inter et intra espèce, et 3 pour l'utilisation d'un LOAEL à la place d'un NOAEL¹). La VTR aiguë pour les effets du Linuron sur le développement concerne les femmes en âge de procréer. Sa valeur est de **4.10² mg/kg/j**. La confiance est limitée car une seule espèce animale a été testée (rat), les effets sur la fertilité ne sont pas étudiés, les connaissances apportées par les études disponibles sont lacunaires. En revanche, ces études sont de bonne qualité.

¹ D'autres études ont trouvé un NOAEL plus haut pour le même effet et dans des conditions d'étude similaires.

2. Le profil toxicologique

2.1. Informations générales

Les connaissances sur les propriétés physico-chimiques, la toxicocinétique et la toxicité générale du linuron ainsi que les données sur la plausibilité d'une exposition chez l'homme, ont été recherchées dans les documents de synthèse déjà existants, publiés par les organismes nationaux ou internationaux légitimes² suivants :

- l'ATSDR (« *toxicological profiles* »),
- l'OMS (« *environmental health criteria* »),
- Health Canada (« *rapports d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire* »),
- l'US EPA (IRIS « *toxicological review* »),
- l'ECB (« *risk assessment reports* »),
- l'OCDE (UNEP « *chemicals screening information dataset* »),
- l'IARC (« *monographs* »),
- le NCEA (« *risk assessments* »),
- l'Index Merck,
- la base de donnée HSDB (hazardous substance data base)
- Chemfinder
- La Commission Européenne (HCP : Health & Consumer Protection),
- HHRAP (Human Health Risk Assessment Protocole US-EPA)³
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals)
- INRS (Institut National de la Recherche sur les Risques)
- Le RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Institut national de la santé publique et de l'Environnement au Pays-bas)

Le n° CASR et le nom « linuron » ont été successivement « lancés » dans les moteurs de recherche des sites Internet et des bases de données. Le linuron est absent des bases de données suivantes : ATSDR, Merck index, INRS. Tous les autres sites de la précédente liste fournissent des informations concernant le Linuron. Ces informations sont présentées de

² Profils ATSDR : <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html> ; OMS : <http://www.inchem.org/> ; Santé Canada : http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/index_f.html et http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl2-lsp2/index_e.html ; US EPA IRIS : <http://www.epa.gov/iris/search.htm> ; ECB : <http://ecb.jrc.it/existing-chemicals/> ; OCDE : <http://www.inchem.org/pages/sids.html> ; IARC : <http://www.inchem.org/pages/iarc.html> ; NCEA : <http://cfpub.epa.gov/ncea/> Index MERCK : The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Thirteenth edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 2001 ; HSDB : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> ; ChemFinder : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM>

³ Contient des données sur les propriétés physico-chimiques (logKow, Henry's Law Constant, Koc, pression de vapeurs, solubilité dans l'eau, BCF, BAF, biodisponibilité selon la voie d'entrée, etc...) utiles notamment pour estimer les transferts dans et entre les différents milieux de l'environnement (eaux, air, sol, végétaux, animaux)

manière synthétique dans les tableaux suivants. Elles figurent également dans les chapitres d'informations générales concernant l'absorption, les voies métaboliques, la distribution, l'excrétion, le stockage et les mécanismes d'effet toxique du linuron.

Concernant les effets reprotoxiques du linuron chez l'animal et l'homme, les données sont issues d'une recherche dans les publications scientifiques (toxicologie, épidémiologie), essentiellement sur DART et Medline.

Le linuron (CASR Number 330-55-2 ; ICSC : 1300), aussi appelé 3-(3,4-Dichlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée ou N'-(3,4-dichlorophényl)-N-méthoxy-N-méthyl-Méthoxydiuron, est un herbicide de la famille chimique des urées substituées (formule chimique C₉H₁₀Cl₂N₂O₂). Il en possède les principales caractéristiques chimiques : très stable, non volatile, non corrosif, peu毒ique pour les mammifères [HSDB], il est aussi peu soluble [ICSC].

2.1.1. Identification de la substance

| | |
|---------------------------------------|--|
| Numéro CAS, ENEICS, etc. | N°CASR : 330-55-2 ; N°ICSC : 1300 ; N°RTECS : YS9100000 N°CE : 006-021-00-1 ; N°EINECS : 206-356-5 |
| Nom | Linuron |
| Synonymes | Sinuron, sarclex, methoxydiuron, lorox, linurex, linorox, garnitan, cephalon, aphalon, afalon, aflon, inuron [HSDB] 1-Methoxy-1-methyl-3-(3,4-dichlorophenyl)urea; 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea; 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-methoxy(methyl)urea; Afalon; Aflon; Alafon; Cephalon; du Pont Herbicide 326; Garnitan; Hoe 2810; Linex; Linex 4L; Linorox; Linurex; Lorax; Lorox; Lorox 4L; Lorox 50W; Lorox DF; Lorox L; Lorox Plus; Methoxy-1-methyl-3-(3,4-dichlorophenyl)urea; methoxydiuron; N'-(3,4-Dichlorophenyl)-N-methoxy-N-methylurea; N-(3,4-Dichlorophenyl)-N'-methoxy-N'-methylurea; Premalin; Sarclex; Urea, 1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methoxy-3-methyl-; [Chemfinder] |
| Formule brute | C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂ |
| Formule développée | |
| Appartenance à une liste reprotoxique | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Classement reprotoxique de l'UE Cat. 3; R62-63 (provisoire, attente catégorie 2 effets sur le développement) [ECB]⁴. ▪ Liste californienne des produits chimiques connus pour causer le cancer ou toxique pour la reproduction : type de toxicité : développement (1999) [Cal EPA] |

⁴ Etude de référence Barry S. McIntyre et al, Toxicology and Applied Pharmacology 167, 87-99, 2000 Earl Grey et al. Toxicology and industrial health 15, 94-118, 1999 (ECBI/37/99 Add. 6).

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

| | |
|--|--|
| Forme physique | <ul style="list-style-type: none"> Cristaux incolores [ICSC, HSDB] Cristaux solides blancs [HSDB] |
| Poids moléculaire (-) | 249,1 [ICSC, HSDB, Chemfinder, CE] |
| Point d'ébullition (en °C) | 180 - 190 [Chemfinder] |
| Point de fusion (en °C) | 93-94 [ICSC, INERIS, HSDB] |
| Pression de vapeur (var.) | <ul style="list-style-type: none"> 0,0051 Pa (à 20°C) [CE ; INERIS] 0,002 Pa (24°C) [ICSC] 0,0019 Pa (à 25°C) [INERIS] 1,43.10-6 mm Hg (à 25°C) [HSDB] |
| Densité (g/cm ³) | 1,49 [CE ; INERIS] |
| Facteurs de conversion | ND |
| Solubilité | <p>Dans l'eau :</p> <p>0,1g/100ml [ICSC] 52,7 mg/l (pH 5) ; 63,8 (pH 7) ; 74,5 (pH 9) [INERIS] 75mg/l à 25°C [HSDB] 0,0075g/100 mL [Chemfinder]</p> <p>Dans les solvants organiques (à 25 °C) :</p> <p>acétone 500 g/kg, benzène 150 g/kg, éthanol 150 g/kg, xylène 130 g/kg, n-heptane 15 g/kg. [HSDB]</p> |
| LogKow (-) | 3,2 [ICSC, HSDB] ; 3 [INERIS] |
| Koc (L/kg) | 863 [INERIS] |
| BCF (-) | <ul style="list-style-type: none"> 23, après 6 semaines à la concentration de 0,02 mg/l (<i>Cyprinus carpio</i>) [INERIS] 49-34, après 28 jours (« bluegill fish») [HSDB] |
| BAF | ND |
| Produits de dégradation environnementale | <ul style="list-style-type: none"> Hydrolyse par <i>Bacillus sphaericus</i> en : 3,4-dichloroaniline, CO₂, N,O-diméthylhydroxylamine [HSDB] Dégénération par <i>Cunninghamella echinulata</i> : 3-(3,4-dichlorophényl)-1-méthylurée ; 3,4-dichlorophénylurée, desméthyl linuron, 3-(3,4-dichlorophényl)-1-méthoxyl-hydroxyméthylurée [HSDB] Dégénération par les plantes en 3,4-dichloroaniline [HSDB] |

ND = non disponibles dans les sources d'informations exploitées

2.1.3. Plausibilité d'exposition humaine

| | |
|-------------------------------------|---|
| Types d'utilisation | Herbicide agricole et ornemental homologué pour les cultures de soya, carottes, pommes de terre, maïs grain, maïs fourrager, blé, avoine, orge, asperges, arbres fruitiers, cerises de Virginie et baies de Saskatoon, panais, aneth et maïs sucré, lupin blanc |
| Restrictions d'usages | Herbicide classé (en 2002, [EC]) dans l'annexe I de la directive 91/414/CE. Ne pas épandre sur des sols sablonneux ou à texture grossière ayant moins de 1 % de matière organique |
| HPV/ tonnages (Europe, France) | 500 à 1000 tonnes produites par an en Europe (principalement en France, Italie, Hollande, Espagne, Angleterre) [ECB] |
| Médias de l'environnement concernés | Eaux, sols, aliments végétaux et animaux |
| Types de populations concernées | Population générale |

2.2. Toxicocinétique

| | Données chez l'animal | Données chez l'homme |
|-------------------------------------|---|-----------------------------|
| Substance mère | Linuron (nom chimique : 3-(3,4-Dichlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée) | |
| Voies de métabolisation possibles | Déméthoxylation puis hydroxylation du cycle benzénique. Pas de trace de la substance mère dans les urines [HSDB], oxydation et conjugaison phénylique [UE] (dans les plantes, le linuron est démethylé et déméthoxylé [HSDB]) | ND |
| Métabolites principaux | dérivés de l'urée (n-3,4-dichlorophénylurée, n-(3,4-dichlorophényl)-n'-méthylurée) et trace de 3,4-dichloroaniline et de 6-acétamido-2,3-dichlorophénol [HSDB] | ND |
| Absorption (%/ voie) | Chez les mammifères, elle est rapide et pratiquement complète (>90%, selon les données d'excrétion urinaire et leur comparaison à l'excrétion fécale [UE]. (Dans la plante, le linuron est absorbé principalement par les racines et peu par le feuillage [HSDB]) | ND |
| Distribution | Largement distribué | ND |
| Stockage, accumulation (% et cible) | 82 % de la dose en 48h. Faible possibilité d'accumulation dans les graisses cutanées à forte dose [UE]. | ND |
| Transferts BHE | ND | ND |
| Transferts placenta | ND | ND |
| Transferts lait maternel | ND | ND |
| Elimination (demi-vies) | Elimination de 99% de la dose appliquée en 72 h. Après ingestion chronique chez le rat et le chien, des résidus d'aniline sont retrouvés principalement dans le sang et en trace dans les muscles, la graisse, le foie, les reins et la lymphe. [HSDB] | ND |

ND = non disponibles dans les sources d'informations exploitées

2.3. Toxicité générale

2.3.1. Données chez l'animal

2.3.1.1. Etudes de toxicité aiguë

Lors des expositions aiguës, le linuron est peu毒ique. La DL₅₀ par voie orale pour le rat est de 1 146 mg/kg chez le mâle et 1 508 mg/kg chez la femelle. Par voie cutanée la DL₅₀ est de 2 g/kg. Par inhalation la CL₅₀ est de 0,849 mg/L, c'est aussi la concentration maximale atteignable dans l'air.

En 2004, l'OMS a rangé le linuron dans la classe III de la classification des pesticides ; c'est à dire la dernière des 4 catégories existantes : Ia = extrêmement dangereux, Ib = hautement dangereux, II = modérément dangereux, III = légèrement dangereux.

2.3.1.2. Etudes de toxicité subchronique

En exposition subchronique chez le chien (étude de 90 jours), l'effet critique retenu par l'Union Européenne concerne le sang avec divers effets objectivés : un effet hémolytique (anémie hémolytique compensée), la formation de méthémoglobin et le dépôt de l'hemosidérine⁵ dans le foie, la rate, et les reins [UE, 2002]. Les **NOAEL** retenus sont : par voie orale 0,8 mg/kg/j (étude de 90 jours chez le chien⁶), par voie cutanée 30 mg/kg/j (étude de 21 jours chez le rat), par inhalation 0,08 mg/L avec un NOAEL de 0,013 mg/L (étude de 28 jours chez le rat) [UE, 2002].

2.3.1.3. Etudes de toxicité chronique

En 2002, lors de la révision de l'autorisation de mettre sur le marché le linuron comme substance pour la protection des plantes (annexe I de la directive du 15 juillet 1991 91/414/EEC), la commission européenne a considéré, pour les expositions de longues durées au linuron, que les effets critiques sont : l'anémie, les organes reproducteurs et les systèmes endocrinien, hormonaux et hématopoïétique. Il n'y a pas de NOAEL⁷ mais un **LOAEL**⁸ issu d'une étude chez le rat (étude de cancérogenèse 2 ans) à **1,3 mg/kg/j** a été retenu [UE, 2002].

Dans une étude de toxicité chronique, vingt-quatre chiens (beagles) ont été divisés en quatre groupes de six animaux chacun (3 femelles, 3 mâles) et exposés pendant deux ans au linuron par voie orale aux doses suivantes : 0 - 0,625 - 3,125 et 15,63 mg/kg/j. Il n'y a pas d'effet sur le gain de poids. Dans le troisième groupe de dose, les femelles ont montré une diminution significative du nombre de globules rouges. Chez tous les chiens du dernier groupe de dose (15,63 mg/kg/j) et les femelles du premier groupe (0,625 mg/kg/j), les analyses sanguines révèlent une pigmentation anormale de l'hémoglobin. Le **LOAEL** pour la toxicité systémique est donc de **0,625 mg/kg/j**, un NOAEL n'a pas pu être défini [IRIS, 1993]⁹.

Dans une étude d'oncogenèse chez le rat (voie orale, 2 ans), un **NOAEL** pour la toxicité systémique est établi à **6,25 mg/kg/j** (LOAEL à 31,5 mg/kg/j : retard de croissance, changement au niveau de la moelle osseuse, augmentation de la mortalité) [IRIS, 1993]¹⁰. Une autre étude d'oncogenèse chez le rat plus récente (1980) a permis d'établir un **LOAEL**

⁵ Pigment protéique contenant de l'hydroxyde ferrique décelable dans les cellules du système réticulo-endothélial par la coloration bleue qu'il donne avec le ferricyanure de potassium (réaction de Perls). L'hemosidérine participe avec la ferrite à la fixation tissulaire du fer non héminique.

⁶ Dans une étude d'un an chez le chien le NOAEL pour les effets sur le sang était de 0,9 mg/kg/j [Agritox, 1998]

⁷ NOAEL = No Observed adverse effect level.

⁸ LOAEL = Lowest Observable adverse effect level

⁹ E.I. du Pont de Nemours, 1962. Disponible auprès de l'US-EPA

systémique (diminution du nombre de globules rouges, réticulose possible) à **2,5 mg/kg/j**, il n'y a pas de dose sans effet donc pas de NOAEL [IRIS, 1993]¹¹.

Dans une étude sur la reproduction (3 générations) chez le rat exposé in utero du 1^{er} au 21^{ème} jour de gestation, un **NOAEL** a été établi à **1,25 mg/kg/j** (LOAEL = 6,25 mg/kg/j pour une réduction du poids de naissance et du gain de poids corporel) [IRIS, 1993]¹².

Dans une étude sur la tératogénicité du linuron, des rates Wistar étaient exposées par gavage oral pendant la gestation (jour 6 à 15) aux doses 0 - 12,5 – 25 – 50 et 100 mg/kg/j de linuron pur (95%) ou en formulation commerciale (50% de linuron, les doses sont donc doublées). On observe une diminution significative du poids des mères à 100 mg/kg/j, il n'y a pas de différence pour le poids et le nombre de naissances pour le groupe exposé au linuron pur. Seul le groupe de dose le plus élevé avec la formulation commerciale montre une augmentation significative des malformations (corps du sternum « sternebrae », côtes, os des membres antérieurs) et une diminution du nombre de naissances. Les adjuvants de la formulation commerciale peuvent être responsables des effets observés. On peut en déduire un **NOAEL à 50 mg/kg/j** pour la toxicité systémique (LOAEL = 100 mg/kg/j pour la diminution du poids des mères) [Khera, 1978]

Dans une étude de tératogénicité chez le rat, le **NOAEL** est de **2,5 mg/kg/j** pour la toxicité maternelle (LOAEL : 6,25 mg/kg/j : diminution du gain de poids et de la consommation d'aliments) alors que le NOAEL pour la toxicité fœtale est à 6,25 mg/kg/j (LOAEL = 31,5 mg/kg/j pour une augmentation du nombre de fœtus résorbés) [IRIS, 1993]¹³. Chez le lapin (étude de tératogénicité), le **NOAEL** pour la toxicité maternelle est de **5 mg/kg/j** (LOAEL = 25 mg/kg/j pour une diminution du poids). Il n'y a pas de NOAEL pour les effets sur le développement ; le **LOAEL** est de **5 mg/kg/j** (diminution du poids et du nombre des fœtus) [IRIS, 1993]¹⁴.

2.3.1.4. Génotoxicité

Dans une étude de génotoxicité, le linuron a été testé *in vitro* (*S. typhimurium*, et fraction hépatique S9) et *in vivo* (rats Wistar, 5 par groupe). Les rats étaient exposés par gavage pendant 2 semaines (5j/7) à du linuron pur (98,5 %) ou une formulation commerciale (à 47,5 %) aux doses 0 – 150 – 300 et 400 mg/kg/j (doses doublées pour la formulation commerciale). Les résultats montrent :

¹⁰ E.I. du Pont de Nemours, 1962a. Disponible auprès de l'US-EPA

¹¹ E.I. du Pont de Nemours, 1980. Disponible auprès de l'US-EPA

¹² E.I. du Pont de Nemours, 1984. Disponible auprès de l'US-EPA

¹³ E.I. du Pont de Nemours, 1979. Disponible auprès de l'US-EPA

¹⁴ E.I. du Pont de Nemours, 1986. Disponible auprès de l'US-EPA

1. Pas de métabolites mutagènes dans les selles et les urines ;
2. Pas d'aberration chromosomique dans la moelle osseuse (testé des micro-noyaux) ;
3. Pas d'activité mutagène sur *S. typhimurium* (4 souches testées) ;
4. Pas de dommage à l'ADN des cellules testiculaires ;
5. Une excrétion urinaire d'acide D-glucarique augmentée uniquement pour la formulation commerciale (équivalent linuron = 300 mg/kg/j) ;
6. Des dommages à l'ADN des cellules hépatiques à la limite de la signification statistique (linuron pur et commercial) ;
7. Une cytotoxicité hépatique et testiculaire.

Les auteurs concluent que le linuron n'est pas un génotoxique systémique, ni mutagène chez la bactérie, mais qu'il y a une différence entre la toxicité du linuron pur et celle des formulations commerciales.

Le linuron est négatif aux différents tests standards de génotoxicité tant *in vitro* qu'*in vivo* [UE, 2002].

L'US-EPA a classé le linuron dans la catégorie C (possiblement cancérogène chez l'homme). Les preuves de génotoxicité sont limitées. Le monuron, un analogue structurel du linuron, produit des tumeurs du rein et du foie chez le rat, mais d'autres analogues (diuron, propanil, et dimilan) n'ont pas produit de cancers chez les rats et les souris testées. Le linuron contient deux impuretés 3,3',4,4'-tétrachloroazobenzène (TCAB) et 3,3',4,4'-tétrachloroazoxybenzène (TCAOB), qui sont des analogues de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxin, laquelle est classée cancérogène pour l'homme par le CIRC et l'US-EPA [IRIS, 1993].

Il n'y a pas de classement CIRC pour le linuron.

2.3.1.5. *Etudes de cancérogenèse*

Une étude de cancérogenèse chez la souris (18 mois par voie orale) a montré l'absence d'effet à 50 ppm soit un **NOAEL à 6,5 mg/kg/j**. Chez le rat une étude de cancérogenèse sur deux ans a montré l'absence d'effet à 25 ppm soit un **NOAEL à 1,3 mg/kg/j**, (les effets ne sont pas précisés, les LOAEL ne sont pas présentés) [Agritox, 1998]. La commission européenne mentionne des tumeurs (adénomes) des cellules interstitielles de Leydig, des adénocarcinomes utérins et tumeurs ovariennes chez le rat suite à des effets hormonaux, ainsi que des adénomes hépatocellulaires chez la souris sans plus de précision quant aux études d'origines [UE, 2002].

Trois études séparées chez le rat ont montré une augmentation de l'incidence des adénomes testiculaires à la plus forte dose testée (125 et 625 ppm). Ces tumeurs bénignes n'ont pas évolué en tumeurs malignes. La durée de survie n'était pas affectée. Une étude chez la souris a montré une augmentation de l'incidence des adénomes hépatiques à la plus forte dose chez la femelle (1 500 ppm) et à la plus faible dose chez le mâle (50 ppm). Les tumeurs bénignes ne dégénèrent pas, aucun carcinome hépatique n'est détecté. La survie des souris n'est pas altérée [IRIS, 1993].

2.3.1.6. *Irritation et sensibilisation*

Le linuron est considéré comme légèrement irritant pour la peau et les yeux (tests chez le lapin). Il est négatif aux tests de sensibilisation cutanée (test de Buehler) [EC, 2002].

2.3.2. *Données chez l'homme*

Il n'y a pas de données disponibles.

2.4. Toxicité sur la reproduction et le développement

2.4.1. *Données humaines*

2.4.1.1. *Effets sur le développement*

Il n'y a pas d'études disponibles chez l'homme

2.4.1.2. *Effets sur la fertilité*

Il n'y a pas d'études disponibles chez l'homme

2.4.2. *Données animales*

2.4.2.1. *Effets sur le développement*

Des rates CRL:CD(SD)Br traitées par gavage entre le 12^{ème} et le 21^{ème} jour de gestation aux doses de 0 - 12,5 - 25 et 50 mg/kg/j (n = 11 animaux par groupes) ont montré chez les descendants :

- i) la conservation de mamelons ou d'aréoles chez les mâles¹⁵ pour tous les groupes de doses avec une fréquence dose dépendante, (NOAEL = ND ; LOAEL = 12,5mg/kg/j) ;
- ii) l'hypoplasie des testicules et des épидidymes ainsi que des lésions tissulaires significatives (NOAEL = 12,5 mg/kg/j; LOAEL = 25 mg/kg/j) ;

- iii) des malformations de l'épididyme ou absence de canal déférent (NOAEL = 25mg/kg/j ; LOAEL = 50 mg/kg/j) ;
- iv) une absence de modification de la distance ano-génitale, de malformation externe de l'appareil reproducteur, de non-descente testiculaire, de retard à la puberté à tous les groupes de dose (NOAEL = 50 mg/kg/j, LOAEL = ND) ;
- v) une absence d'effet sur l'appareil reproducteur des femelles.

Cette étude est complétée par des tests d'affinité du linuron pour les récepteurs androgènes humain. *In vitro*, le linuron est antagoniste de la déshydrotestostérone (DHT) de manière dose dépendante. D'autre part, les auteurs précisent qu'un quatrième groupe de dose à 100 mg/kg/j était testé. Ayant induit une toxicité maternelle les résultats de ce groupe de dose ne sont pas présentés. Dans la mesure où les malformations de l'épididyme* et du vase déférent associées à des hypoplasies ou des lésions sont extrêmement rares dans les groupes de contrôles (base de données du laboratoire comportant plusieurs centaines de gestations et plusieurs milliers de descendants), les lésions des epididymes et des testicules induites par le linuron doivent être considérées comme un effet biologiquement significatif. *In vivo*, le linuron agirait préférentiellement sur le développement des organes reproducteurs induit par la testostérone* plutôt que ceux induit par la déshydrotestotéronne. En cela, les effets reprotoxiques du linuron diffère des effets du flutamide (antagoniste connu des récepteurs androgènes) qui induit d'autres perturbations du développement de l'appareil reproducteur comme la une non-descente des testicules (atrophie du gubernaculum*), des malformations de la prostate et des organes externes (hypospadias) [McIntyre, 2000].

Dans une étude publiée en 2002, les auteurs cherchent à connaître le moment, pendant la période périnatale, où se produisent les effets du linuron sur l'épididyme, et à déterminer si les fœtus de rats mâles exposés *in utero* au linuron avaient un taux de testostérone* testiculaire et/ou sérique diminué. Les descendants mâles des rates CRL:CD(SD)Br exposées au linuron par gavage à 0 et 50 mg/kg/j (contrôles n=3 ; traités n=5 à 11) entre le 12^{ème} et le 21^{ème} jour de gestation ont montré :

- i) des épидidymes normales au 17^{ème}, 19^{ème} et 21^{ème} jour de gestation mais des lésions apparaissant au 7^{ème} jour après la naissance ;
- ii) une diminution (-10 %) de la distance ano-génitale significative au 19^{ème} jour de gestation ;

¹⁵ Marqueur spécifique d'un retard de différenciation sexuelle dépendant des hormones androgènes

- iii) un léger retard de développement marqué par une réduction du poids de naissance ;
- iv) aucune lésion testiculaire, ni gonocyte multinoyau, ni prolifération anormale de cellules de Leydig, quelle que soit la période d'observation ;
- v) pas modification du niveau de testostérone* sérique ou testiculaire.

Malgré des effets sur le développement du canal Wolfian (épididyme* et canal déférent) comparable à ceux du DBP et DEHP, l'absence d'effets sur les taux de testostérone* suggère un mécanisme d'action différent pour le linuron. Des études sont encore nécessaires pour déterminer si les effets reprotoxiques du linuron sont de nature anti-androgénique et si les testicules et les épididymes sont bien les cibles primaires [McIntyre, 2002].

La même équipe a cherché à savoir : i) si les indicateurs d'effets reprotoxiques précoces (distance ano-génitale, conservation des mamelons/aréoles) sont permanents, ii) si le linuron est directement toxique pour les testicules, iii) et si les effets précoces sont prédictifs de malformations de l'appareil reproducteur. Les descendants mâles des rates CRL:CD(SD)Br exposées au linuron par gavage entre le 12^{ème} et le 21^{ème} jour de gestation aux doses 0 et 50 mg/kg/j (n=8 témoins et 20 exposés) ont montré :

- i) une absence de différence entre les témoins et les traités pour le nombre de descendant et leur poids de naissance ;
- ii) à la naissance, une diminution de 8 % de la distance ano-génitale chez les descendants mâles, persistante 56 jours après (diminution de 5 %) ;
- iii) 13 jours après la naissance, le nombre de mamelons chez les mâles exposés (moy. = 3,3) était plus important que chez les mâles témoins (moy. < 1). Cette différence persiste 56 jours après la naissance (témoins = 0,04 / exposés = 1,7). En revanche cette anomalie de la différenciation sexuelle n'est pas corrélée à la présence des autres malformations observées dans l'étude ;
- iv) 13 jours après la naissance, un mâle avait l'urètre non fermé, à 56 jours cet animal montrait une hypospadias* (surface ventrale du pénis ouverte laissant voir l'os pénien) deux autres mâles traités avaient une cryptorchidie*) ;
- v) 35 jours après la naissance des mâles traités, 8 % avaient des atrophies testiculaires, 40 % une malformation de l'épididyme* et 22 % une malformation du canal déférent et de l'épididyme. Ces malformations étaient complètement absentes dans le groupe témoin. 56 jours après la naissance, ces taux restent identiques sauf celui des testicules anormaux qui augmente (36%).

- vi) 25 et 60 % des mâles ayant une malformation de l'épididyme* et du canal déférent ne montraient pas un nombre anormal de mamelons/aréoles conservés.

Les auteurs concluent que la réduction de la distance ano-génitale et l'augmentation du nombre de mamelons sont des altérations permanentes causées par une exposition au linuron *in utero* à 50 mg/kg/j, qu'elles ne sont pas prédictives mais seulement suggestives d'autres malformations plus graves de l'appareil reproducteur (principalement : épididyme* et canal déférent) également causé par le linuron. Les résultats indiquent aussi que les malformations du conduit Wolffian apparaissent avant les atrophies testiculaires observées à l'âge adulte. Elles pourraient résulter d'une augmentation de la pression intra-tubulaire par rétention des fluides testiculaires due aux malformations de l'épididyme. Les résultats prouvent que les troubles du développement du canal wolffian sont la première cible toxique de l'exposition *in utero* au linuron. Des recherches sont nécessaires pour savoir si l'exposition *in utero* au linuron diminue le compte spermatique à l'âge adulte [McIntyre, 2002a].

2.4.2.2. *Effets sur la fertilité*

Il n'y a pas d'étude disponible chez l'animal ou chez l'homme concernant les effets du linuron sur la fertilité.

2.4.3. **Mécanismes d'action proposés**

Les mécanismes de formation de tumeurs ont été étudiés chez le rat CD mâle immature (32-45 jours) et adulte (93-107 jours). Ils étaient exposés par gavage pendant 14 jours (doses ajustées quotidiennement) aux doses 0 et 200 mg/kg/j plus un groupe témoin positif exposé à 10 mg/kg/j de flutamide (anti-androgène connu). Une étude multi-générationnelle a également été mise en œuvre (30 mâles et 30 femelles). On observe une diminution significative du poids des organes sexuels des rats immatures et adultes, une augmentation significative du taux d'estradiol* et de l'hormone lutéinique* chez les rats adultes. Les mêmes résultats sont observés à la 2^{ème} génération. Les résultats sont comparables à ceux du groupe témoin positif sauf pour l'élévation du taux de testostérone* observée uniquement pour le groupe exposé au flutamide. *In vitro*, le pouvoir compétitif du linuron sur la testostérone au niveau des récepteurs androgéniques est 3,5 fois moins puissant que celui de la flutamide. En conclusion, le linuron serait tumorigène par un mécanisme anti-androgénique où l'hyper sécrétion d'hormone lutéinique semble responsable des hyperplasies et adénomes au niveau des cellules de Leydig* [Cook, 1993].

Dans une étude cherchant à clarifier les différents mécanismes d'action toxique liés aux substances anti-androgéniques, une dizaine de substances ont été testées : éthane diméthane sulphonate (EDS = 50 mg/kg/j), linuron (L = 100 mg/kg/j), p,p'-dichlorodiphényl dichloroéthylène (p,p'-DDE = 100 mg/kg/j), kétoconazole (12-50 mg/kg/j), procymidone (P = 100 mg/kg/j), chlozolinate (100 mg/kg/j), iprodione (100 mg/kg/j), dibutyle phthalate (DBP = 500 mg/kg/j) diéthylhéxyl phthalate (DEHP = 750 mg/kg/j), polychlorobiphényle (PCB169 = 1 dose de 1,8 mg/kg). Les résultats expérimentaux permettent de classer ces substances en trois ou quatre groupes selon le profil de toxicité sur la reproduction observé. Le premier groupe inclus la vinclozoline, la procymidone et le p,p'-dichlorodiphényl dichloroéthylène, tous les trois liguant des récepteurs androgène AR (p,p'-DDE étant le moins « fort » des trois). Dans le second groupe DBP et DEHP induisent une toxicité différente avec, chez les mâles exposés *in utero*, une incidence supérieure de malformation des épididymes* et des lésions testiculaires. Le linuron produit des effets en rapport avec une certaine affinité pour le récepteur androgénique (réduction de la distance ano-génitale, mamelons conservés et incidence faible d'hypospadias*), mais il induit également des atrophies testiculaires et des malformations des épididymes*, ce qui est très proche des effets observés pour le DBP. Le linuron aurait donc plusieurs mécanismes d'effets toxiques sur la reproduction dont une partie d'entre eux seraient liée à une certaine affinité pour les récepteurs androgéniques. Cette étude comporte une expérimentation multigénérationnelle nichée pour le linuron et le DBP. Chez les rats exposés à 0 – 10 – 20 - 40 mg/kg/j pendant 80 jours après le sevrage, on observe une réduction significative du poids des épididymes et un retard à la puberté (jour de séparation du prépuce) pour le plus fort groupe de dose. La génération F1 (exposition *in utero* et pendant la lactation) montre une réduction significative du nombre de petit par porté jusqu'à douze cycles de reproduction. Le **NOAEL** est de **20 mg/kg/j** et le **LOAEL** est de **40 mg/kg/j** [Gray, 1999]

Chez le rat mâle Sprague Dawley, exposé *in utero* à partir du 14^{ème} jour de gestation jusqu'au 18^{ème} jour, aux doses de A = 75 mg/kg/j de linuron, B = 500 mg/kg/j de BBP, C = 75+500 mg/kg/ de Linuron+BBP, on observe :

- i) dans les groupes A, B et C, une diminution du taux de testostérone testiculaire et corporelle à la naissance ;
- ii) dans les groupes A, B et C, des altérations typiquement dépendantes de l'organisation androgène (réduction de la distance ano-génitale, et conservation de mamelons chez le mâle) de manière additive (groupe C) ;

- iii) une corrélation entre les effets observés à la naissance (typiquement anti-androgénique : réduction de la distance ano-génitale, conservation de mamelons chez le mâle) et les malformations observées à l'âge adulte, malformations et poids des organes reproducteurs (uniquement groupe C) : prostate ventrale, vésicule séminale, agénésie des épididymes, poids des testicules ;
- iv) contrairement au linuron, le BBP ne montre pas de toxicité maternelle (diminution du gain de poids de la mère et des descendants pendant la gestation).

Les résultats concernant la prédictivité des malformations internes par la mesure de la distance ano-génitale et du nombre de mamelons apparents s'avèrent partiellement compatibles avec ceux de McIntyre [McIntyre, 2002a]. Les auteurs concluent que les deux effets précoces sont de bons indicateurs pour les malformations internes à l'âge adulte, étant permanents, ils sont aussi le signe d'une toxicité sur la reproduction [Hotchkiss, 2004].

Une étude *in vitro* à permis de confirmer l'affinité du linuron pour les récepteurs androgènes murin (AR) et humain (AhR). Il agit comme antagoniste des récepteurs androgènes. Il inhibe la production de déshydrotestostérone par les cellules CV-1 et MDA-MB-453-KB2 ($EC_{50} = 10 \mu\text{M}$) à des concentrations non cytotoxiques. Les effets montrés *in vivo* dans les autres études sont également retrouvés ici [Lambright, 2000].

Chez le rat Sprague-Dawley exposé *in utero* à 50 mg/kg/j du 12^{ème} au 21^{ème} jour de gestation on observe, à la naissance et 7 jours après, une diminution significative dans l'expression génique (test « cDNA microarrays », confirmé par PCR en temps réel) des récepteurs androgéniques de l'épididyme, et des modifications significatives de l'expression génétique de certains facteurs : des facteurs de croissance épidermique, le facteur de croissance insuline 1 (IGF-1), le facteur de croissance fibroblastique (FGF), les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), et également de la voie de signalisation Notch (interactions cellulaires entre cellules voisines, participant entre autres à l'identité cellulaire). Ces derniers sont impliqués dans la genèse, commandé par l'intermédiaire de la testostérone, du canal Wolffian (épididyme et urètre) [Turner, 2003].

Dans une étude, basée sur le nouveau protocole de l'OCDE pour détecter les effets anti-androgéniques (teste de Hershberger¹⁶), des rats immatures castrés à l'âge de 6 semaines ayant subit dix jours d'injection sous-cutanée de propionate de testostérone sont exposés par gavage oral au linuron aux doses suivantes : 0 – 25 – 50 - 100 mg/kg/j. Les injections de propionate de testostérone seules augmentent significativement le poids des organes sexuels (notamment la vésicule séminale* à la dose de 0,1 mg/kg/j) et le taux de testostérone sérique (à la dose de 0,4 mg/kg/j). Le linuron, aux doses de 50 et 100 mg/kg/j inhibe la croissance pondérale de la vésicule séminale* (respectivement 72 et 53 % comparé au groupe témoin = uniquement testostérone), de la prostate ventrale (75 et 62 %) et des glandes de Cowper (74 et 61 %). Le poids des muscles élévateurs anaux et bulbocaverneux ainsi que le gland pénien sont diminués significativement uniquement dans le groupe exposé à 100 mg/kg/j. Même s'il n'est pas le plus puissant des produits testés dans l'étude (procymidone, vinclozoline, linuron et pp-DDE), le linuron agit clairement comme antagoniste des récepteurs androgéniques [Kang, 2004].

2.5. Analyse de la cohérence des données animales et humaines

Il n'y a pas de données humaines à comparer avec les données animales présentées dans les chapitres précédents.

Les effets toxiques systémiques du linuron observé chez les rats, les souris, les lapins, et les chiens sont possibles chez l'homme (anémie hémolytique, diminution du poids corporel, diminution du nombre de globules rouges, etc.). Il en va de même pour les autres effets : effets sur le développement et cancérogenèse.

Concernant les effets reprotoxiques observés dans les études chez le rat, tous ne sont pas forcément pertinents chez l'homme. Parmi les effets précoces, survenant aux plus faibles doses, le maintien des mamelons ou des aréoles, observées chez les rats mâles, n'est pas pertinent chez l'homme, mais il dénote une perturbation de la différenciation sexuel induite par la testostérone lors de l'embryogenèse qui pourrait prendre d'autre forme chez l'homme. En revanche, la réduction de la distance ano-génitale peut-être un effet pertinent chez l'homme. Cette disparité pose un problème pour interpréter les résultats expérimentaux chez le rat puisque les auteurs de ces études précisent qu'il faut l'association des deux effets : réduction de la distance ano-génitale et conservation des mamelons ou aréoles pour signer un effet anti-androgène pendant l'embryogenèse.

¹⁶ Des rats mâles immatures castrés à l'âge de 6 semaines subissent des injection sous cutanée de propionate de testostérone pendant 10 jours consécutif (doses = 0,1/0,2/0,4/ 0,8/1,6 mg/kg/j). Pour comparé les effets anti androgénique de la substance on expose par gavage orale des groupes témoins à la flutamide (doses = 1/5/10/20 mg/kg/j).

Les autres effets reprotoxiques observés sont pertinents chez l'homme (hypoplasie et malformation de l'épididyme et/ou du canal déférent et/ou des testicules, hypospadias, tumeurs des cellules de Leydig, etc.). Ces effets sont liés à la compétition du linuron avec la testostérone au niveau des récepteurs androgéniques. Ils apparaissent en cas d'exposition fœtale (pendant la deuxième partie de la gestation) à des niveaux de doses supérieures à celles responsables d'effets toxiques chroniques, mais pour des expositions qui peuvent être plus courtes (période de gestation).

2.6. Comparaison des indices de toxicité en fonction des effets

Dans le Tableau 1 (page suivante) sont présentés les différents NOAEL et LOAEL identifiés dans la littérature. Seuls les résultats d'études comportant plusieurs groupe de doses ou les valeurs « estampillées » NOAEL ou LOAEL dans un profil toxicologique (Union Européenne, US-EPA, Agritox, etc...) sont présentées dans le tableau. Les résultats d'études ayant testées une seule dose, notamment celles étudiant les mécanismes d'action reprotoxique, ne sont pas présentés dans le tableau.

2.7. Conclusion

La comparaison des résultats disponibles montre que la toxicité du linuron sur le système hématopoïétique notamment au niveau des globules rouges (diminution de leur nombre, hémolyse ou modification de la coloration sanguine) est l'effet le plus sensible. Il apparaît au plus faible niveau d'exposition orale avec un NOAEL chez le chien de 0,8 mg/kg/j (LOAEL non présenté pour l'anémie hémolytique) et un LOAEL de 0,625 mg/kg/j pour une modification de la coloration sanguine (pas de NOAEL). Ce LOAEL, utilisé par l'US-EPA pour dériver une VTR orale chronique pour le linuron, est issu d'une étude non publiée [E.I. du Pont de Nemours] dans les revues scientifiques mais disponibles auprès de l'US-EPA.

Concernant la toxicité du linuron pendant l'embryogenèse, l'effet le plus sensible chez le rat est l'hypoplasie des testicules et des épидidymes (LOAEL = 12,5 mg/kg/j ; pas de NOAEL). Cet peut être considéré comme l'effet critique pertinent chez l'homme pour la reprotoxicité du linuron.

Tableau 1 : Synthèse des NOAEL et LOAEL identifiés dans les études disponibles

| Animal | Type d'étude | Voie d'expo | durée | NOAEL | LOAEL | Effet néfaste observé | Source |
|--------|----------------------------------|-------------|----------------|--------------------|----------------------|---|----------------|
| Chien | Subchronique | Orale | 90 j | 0,8 mg/kg/j | NP | Anémie hémolytique compensée | UE, 2002 |
| Rat | Subchronique | Cutanée | 21 j | 30 mg/kg/j | NP | Anémie hémolytique compensée | UE, 2002 |
| Rat | Subchronique | Inhalation | 28 j | 0,08 mg/litre | NP | Anémie hémolytique compensée | UE, 2002 |
| Chien | Chronique | Orale | 2 ans | ND | 0,625 mg/kg/j | Coloration sanguine anormale | IRIS, 1993 |
| Rat | Cancérogénèse | Orale | 2 ans | ND | 1,3 mg/kg/j | Cellule rouge, hémolyse, organe reproducteur | UE, 2002 |
| Rat | Oncogénèse | Orale | 2 ans | 6,25 mg/kg/j | 31,5 mg/kg/j | Retard croissance, mortalité, hémolyse | IRIS, 1993 |
| Rat | Oncogénèse | Orale | 2 ans | ND | 2,5 mg/kg/j | Diminution du nombre de globule rouge | IRIS, 1993 |
| Rat | Tératogénicité | orale | 9 j | 50 mg/kg/j | 100 mg/kg/j | diminution du poids de la mère | Khera, 1978 |
| Rat | Tératogénicité | Orale | ? | 2,5 mg/kg/j | 6,25 mg/kg/j | Diminution du gain de poids maternelle | IRIS, 1993 |
| Rat | Tératogénicité | Orale | ? | 6,25 mg/kg/j | 31,5 mg/kg/j | Augmentation du nombre de fœtus résorbés | IRIS, 1993 |
| Lapin | Tératogénicité | Orale | ? | 5 mg/kg/j | 25 mg/kg/j | Diminution du poids de la mère | IRIS, 1993 |
| | | | | ND | 5 mg/kg/j | Diminution du poids et du nombre de naissance | IRIS, 1993 |
| Rat | Reproduction (3 générations) | Orale | 20 j gestation | 1,25 mg/kg/j | 6,25 mg/kg/j | Réduction du poids de naissance | IRIS, 1993 |
| Rat | Développement embryofoetal | orale | 20 j gestation | 12,5 mg/kg/j | 25 mg/kg/j | Hypoplasie des testicules et des épididymes | McIntyre, 2000 |
| | | | | 25 mg/kg/j | 50 mg/kg/j | conservation des mamelons ou aréoles | McIntyre, 2000 |
| | | | | 25 mg/kg/j | 50 mg/kg/j | Malformations épididymes | McIntyre, 2000 |
| Rat | Reproduction (multi générations) | orale | 80 j | 20 mg/kg/j | 40 mg/kg/j | Atrophie épididymes, nombre de naissance | Gray, 1999 |
| Rat | Reproduction (Teste Hershberger) | orale | 10 j gestation | 25 mg/kg/j | 50 mg/kg/j | Atrophie dans l'appareil sexuel interne des mâles | Kang, 2004 |

NP : non présenté dans la source bibliographique.

ND : non déterminé, NOAEL = effet observé dès le premier groupe de dose, LOAEL = effet observé uniquement au dernier groupe de dose

Tableau 2 : Synthèse des VTR disponibles

| Organisme (année) | animal | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR* | Dose critique** | UF*** | Etude toxicolo-gique utilisée |
|------------------------------|---------------|---------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------|--|
| US-EPA, 1993 | Chien | hématologique | Orale | intermédiaire | RfD = 0,002 mg/kg/j | LOAEL = 0,625 mg/kg/j | 300 | EI.. du Pont de Nemours 1962 |
| CE, 2002 | rat | hématologique | Orale | 2 ans | DJA = 0,003 mg/kg/j | LOAEL = 1,3 mg/kg/j | 500 | - |
| US-EPA, NCEA | - | - | - | - | HCPF = 0,0098 (mg/kg/j) ⁻¹ | - | - | - |
| US-EPA, NCEA | | | | | ADI = 0,013 mg/kg/j | - | - | - |

* RfD = Reference dose. DJA = dose journalière acceptable. HCPF = Human Carcinogen Potency Factor. ADI = Acceptable Daily Intake.

** LOAEL = Lowest observable adverse effect level.

*** UF = uncertainty factor

3. La construction de la VTR pour les effets reprotoxiques

3.1. Introduction

Les connaissances sur la toxicité du Linuron vis à vis de la reproduction humaine ne sont pas complètes. Les effets sur la fertilité n'ont pas été étudiés (effet des expositions hors période de gestation). De plus il n'y a pas d'étude en population humaine. Une seule espèce animale (rat) a été testée pour les effets sur le développement (exposition des mères pendant la gestation, étude des effets chez les descendants). Pour les expositions chroniques et subchroniques, seule la voie orale a été expérimentée. Par ailleurs, les études disponibles montrent que l'effet toxique le plus sensible pour une exposition chronique au Linuron est l'anémie hémolytique observée chez toutes les espèces animales testées (chien, rat, souris, lapin). Au regard des doses critiques relevées dans les études, il semble que le chien soit l'espèce animale la plus sensible aux effets toxiques chroniques du Linuron.

En revanche, le mécanisme d'action toxique du Linuron sur le développement est assez bien connu chez le rat. En compétition avec la testostérone au niveau des récepteurs androgénique la présence du Linuron pendant l'embryogenèse peut altérer la formation et le développement des organes sexuels internes du mâle commandé par la testostérone (retrait des mamelons/aréoles, formation des épидidymes, du canal déférent, des testicules, du ligament gubernaculum, autres) et induire, à plus forte doses, des tumeurs (cellule de Leydig, testicules, foie) via l'hyper production d'hormone lutéinique.

Malgré les lacunes de connaissances et les incertitudes quant l'extrapolation à l'homme des effets observés chez le rat, il a été décidé de dériver une VTR aiguë pour les effets reprotoxique du Linuron.

3.2. Identification d'une dose critique

3.2.1. Présentation des doses repères

Dans la mesure où il existe des études expérimentales chez l'animal ayant testées plusieurs groupes de doses, nous avons exclus, pour le choix d'une dose critique (NOAEL ou LOAEL) les études ayant utilisées une seule dose de linuron. Ces études « mono dose » sont généralement destinées à l'investigation des mécanismes d'actions. Les doses choisies sont donc connues pour provoquer l'effet dont on cherche à élucider le mécanisme. Elles sont très importantes comme preuve de causalité et font partie, à ce titre, des connaissances nécessaires pour dériver une VTR, mais par définition elles ne permettent pas de connaître le niveau de dose minimal à partir duquel l'effet peut survenir.

Selon le tableau de synthèse (Tableau 1) il y a 4 études ayant testé plusieurs doses candidates pour la dérivation d'une VTR (IRIS, 1993 ; Gray, 1999 ; McIntyre 2000 ; Kang, 2004).

La première étude n'a pas été publiée dans une revue scientifique mais un rapport est disponible auprès de l'US-EPA. Elle respecte les bonnes pratiques de l'US-EPA qui lui accorde une confiance élevée (Klimish = non évaluable en l'état). Les NOAEL et LOAEL pour les effets reprotoxiques sont présentés dans le résumé d'IRIS (<http://www.epa.gov/>). Suite à l'exposition par voie orale des mères pendant les 20 derniers jours de la gestation, l'effet le plus sensible observé est une réduction du poids de naissance (NOAEL = 1,25 mg/kg/j ; LOAEL = 6,25 mg/kg/j). Le résumé disponible sous IRIS ne donne pas les taux d'incidence des effets observés. L'utilisation des résultats pour dériver une VTR (classique ou benchmark dose) n'est pas possible en l'état, il faudrait obtenir le rapport d'étude auprès de l'US-EPA.

La seconde est une étude conduite directement au sein du laboratoire National de l'US-EPA (Gray 1999). Elle respecte les lignes directrices de bonne pratique édictées par cette instance fédérale nord américaine (Klimish = 1c/d). Chez les rats exposés (10, 20 et 40 mg/kg/j) pendant 80 jours depuis le 20ème jours après la naissance, on observe une diminution significative du poids de la vésicule séminale et des épидidymes ainsi qu'un augmentation significative de l'âge à la puberté à la dose de 40 mg/kg/j (NOAEL = 20 mg/kg/j). Les descendants (F1) des rates femelles (P0 à la dose de 40 mg/kg/j), sont donc exposés pendant la gestation puis la lactation. Ils produisent moins de nouveaux nés par porté. Le poids des testicules et des épидidymes des mâles issus de ces portées diminue de manière significative. Ces effets étant objectivés par des variables continues (poids des organes et nombre de jours), il n'y a pas de taux d'incidence associés aux doses critiques mais des comparaisons de moyennes entre les différents groupes de dose et le groupe témoin.

La troisième étude (McIntyre, 2000) est également d'excellente qualité scientifique même si aucune référence aux lignes directrices n'est mentionnée (Klimish = 1d). Des rates en gestation sont exposées par gavage du 12^{ème} au 21^{ème} jour à 0, 12,5, 25 et 50 mg Linuron/kg/j. Chez les descendants mâles l'incidence d'hypoplasie des testicules et des épидidymes augmente dès le premier groupe de dose : 0 % dans le groupe témoins et respectivement 3,6 % et 1,8% dans le premier groupe de dose (12,5 mg/kg/j). Ces taux d'incidence passe respectivement à 11,3 % et 9 % dans le dernier groupe de dose. On observe une augmentation dose dépendante du nombre de mamelon conservés mais la différence n'est significative qu'à la plus forte dose (variable continue : pas d'incidence). Sont également en augmentation significative mais uniquement à la plus forte dose: des malformations des épидidymes (6,8 %) et l'absence de canal déférent (4,5 %).

La quatrième étude (Kang, 2004) est réalisée selon le protocole standardisé de l'OCDE (Hershberger assay) elle obtient donc la catégorie 1a dans la cotation de Klimish. Des rats males immatures et castrés sont exposés par gavage pendant 10 jours à 25, 50 ou 100 mg Linuron /kg/j, après 10 jours d'injection quotidienne de testostérone (0,4 mg/kg/j). On observe une diminution significative du poids : des vésicules séminales, de la prostate ventrale, et des glandes de Cowper dans le deuxième groupe de dose (50 mg/kg/j). Une diminution du poids de la prostate ventrale et des muscles bulbocaverneux et ano-élévateurs est mise en évidence dans le dernier groupe de dose (100 mg/kg/j).

3.2.2. Dose critique retenue

Les résultats de la première étude ne sont pas retenus pour le moment faute de pouvoir en évaluer la qualité et surtout de connaître les conditions dans lesquelles est observée la diminution du poids de naissance.

L'effet critique observé à la plus faible dose est l'hypoplasie des testicules et des épидidymes avec un LOAEL établi à 12,5 mg/kg/j dans l'étude de McIntyre (2000). Cet effet est observé dans pratiquement toutes les études et dans la même gamme de dose. Par ailleurs, l'incidence de cet effet est nulle, hors exposition au linuron. On considère donc qu'il peut être retenu en tant qu'effet critique reprotoxique pour dériver une VTR orale aiguë.

3.3. Facteurs d'incertitude

Variabilité inter-espèce (FI_A). En l'absence de données humaines il est difficile d'évaluer la concordance entre la toxicocinétique et la toxicodynamie du Linuron chez l'animal et chez l'homme. Le facteur d'incertitude choisi est de 10 (**FE_A = 10**).

Variabilité inter-individuelle (FI_H). Il existe peu d'éléments scientifiques permettant d'évaluer précisément ce facteur d'incertitude. A défaut d'information spécifique, un facteur d'incertitude de 10 est choisi (**FE_H = 10**).

Absence de NOAEL (FI_L). L'effet critique étant apparu au premier groupe de dose expérimentale, il n'y a pas de NOAEL mis en évidence dans l'étude. Celle de Gray (1999) a aussi mis en évidence une réduction significative du poids des épидidymes mais avec un NOAEL à 20 mg/kg/j. De plus, dans l'étude de McIntyre, les taux d'incidences sont faibles (2 à 3 %) même s'ils sont significatifs. Ils sont multipliés par trois et cinq pour un doublement de la dose. Il est donc probable que le LOAEL mis en évidence dans l'étude de McIntyre ne soit pas très éloigné d'un NOAEL. En conséquence un facteur d'incertitude de 3 est choisi (**FE_L = 3**).

Incertitude temporelle (FI_S). La durée d'exposition dans l'étude de McIntyre est de 20 jours pendant la gestation. La VTR dérivée du LOAEL issu de cette étude sera donc de type aiguë

et applicable uniquement pour les femmes en âge de procréer. De ce fait il n'y a pas besoin d'appliquer un facteur d'incertitude pour l'inadéquation de la durée d'exposition de l'étude expérimentale utilisée ($FE_s = 1$).

Tableau 3 : VTR aiguë pour les effets du Linuron sur le développement

| Effet critique | Doses expérimentales | FI ⁽¹⁾ | VTR _{aiguë reprotoxique} |
|--|--|-------------------|--|
| Hypoplasie des testicules et épидidymes. | NOAEL = ND | | |
| Etude sur le développement chez le rat, 20 jours, voie orale, gavage (McIntyre 2000) | LOAEL = 12,5 mg/kg/j $LOAEL_{HEC} = 3,3 \text{ mg/kg}/^*$ | 300 | $4.10^{-2} \text{ mg/kg/j}$ $1.10^{-2} \text{ mg/kg/j}$ |

(1) FI = Facteurs d'incertitudes : 10 pour la variabilité inter-espèce ; 10 pour la variabilité intra-espèce ; 3 pour l'utilisation d'un LOAEL à la place d'un NOAEL. L'incertitude quant au véritable NOAEL est limitée car une autre étude a mis en évidence un NOAEL pour le même effet à une dose supérieure (20 mg/kg/j) et que le taux d'incidence dans l'étude princeps à la dose critique est faible (3 %).

* Dose équivalente humaine = $D_{animal}/(P_{homme}/P_{animal})^{1/4} = 12,5/(70/0,35)^{1/4} = 12,5/3,8 = 3,3 \text{ mg/kg/j}$.

Se pose la question de transformer le LOAEL en dose équivalente humaine. Cette transformation se fait de manière systématique lors de la construction de VTR cancérogènes, très souvent lors de la construction de VTR respiratoires à seuil, alors qu'elle est peu effectuée pour les VTR orales à seuil, sans qu'il soit expliqué pourquoi.

Cependant, certaines publications tendent à montrer que l'ajustement allométrique devrait se faire également pour les VTR orales à seuil. En effet, Rhomberg et Lewandowski (2004) ont préparé un document sur les facteurs d'ajustements pour l'US EPA. Ils précisent que les éléments cités dans les lignes directrices pour l'évaluation des risques cancérogènes chez l'homme, concernant la notion de dose équivalente humaine, fondée sur un rapport des surfaces corporelles, devrait être appliquée également pour les VTR chroniques à seuil¹⁷.

La question posée est cependant plus difficile à résoudre dans le cadre des études citées, où la population regroupe des femelles gestantes. Dans l'attente de discussions plus approfondies sur ce thème, la VTR sans dose équivalente humaine pourrait être retenue.

¹⁷ « In the absence of chemical-specific information sufficient to do otherwise, the guidance of the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) for carcinogen risk assessment is to apply a default animal-to-human oral dose extrapolation based on presumed toxicological equivalence of daily doses scaled by the $^{3/4}$ -power of body weight... "When such doses are reexpressed in the traditional units of mg/kg/day, it is seen that a human dose about 7-fold less than a mouse dose or 4-fold less than a rat dose are being presumed to be equivalently carcinogenic. For these reasons, an examination of animal-to-human dose extrapolation for presumed equitoxicity with respect to non-cancer effects is in order. We note that much of the reasoning, rationale, and empirical evidence cited for cancer risk assessment's use of mg/kg $^{3/4}$ /day scaling (US EPA, 1992) would seem to apply equally well to chronic oral exposures for non-cancer effects. In the present analysis, we examine the basis for deriving a default approach to dose extrapolation for non-cancer effects..." "Studies of the empirically derived data on cross-species differences in chemical potency suggest that scaling to BW $^{3/4}$ represents a reasonably well-supported approach for scaling ongoing oral doses across species. It should nonetheless be noted that support for this approach is not entirely robust. The data have also been largely obtained from acute or subacute exposure scenarios, involving endpoints that could be more closely related to the peak dose than to the AUC." (Rhomberg, 2004).

3.4. Discussion et présentation de la VTR

Le Linuron possède une VTR pour les expositions chroniques. L'effet critique n'est pas sur le développement mais une toxicité hématologique. L'espèce animale la plus sensible vis à vis de cet effet est le chien. Le linuron n'est pas mutagène ni cancérogène génotoxique, ni tératogène. A plus forte dose il peut être tumorigène via une perturbation endocrinienne (hyper production d'hormone lutéinique, tumeur des cellules de Leydig, tumeur des testicules et adénome hépatique). L'hémolyse due au Linuron se manifeste à des doses inférieures à celles pouvant générer des effets sur la reproduction, mais pour des expositions chroniques.

Néanmoins, les expositions chroniques peuvent connaître des fluctuations au cours du temps dépassant ponctuellement la dose critique tout en lui restant inférieure en moyenne annuelle. C'est pourquoi il a paru nécessaire d'établir une VTR aiguë spécifique des effets du Linuron sur le développement. Sa validité pourrait être de quelques heures à quelques semaines. C'est pendant l'embryogenèse que cette toxicité s'exprime de la manière la plus marquée. Cependant, dans une étude très récente les atteintes des organes reproducteurs internes des mâles sont également observées lors d'une exposition subchronique (80 jours) commençant avant la puberté (Kang, 2004). Dans ce cas les doses critiques sont supérieures à celles misent en évidence lors des expositions *in utero*. Finalement, la VTR présentée ici s'applique aux expositions de type aiguës chez la femme en âge de procréer.

Les facteurs d'incertitudes sont peu élevés ce qui reflète la qualité des connaissances disponibles. Néanmoins, ces connaissances sont lacunaires : i) une seule espèce animale a été testée, ii) l'atteinte de la fertilité n'a pas été étudiée, iii) bien que son pouvoir anti-androgénique soit clairement démontré, ses manifestations ne sont pas complètement identiques à d'autre anti-androgènes mieux connus. Enfin, certains résultats expérimentaux sont contradictoires notamment concernant la modification du taux de testostérone sérique et testiculaire. De nouvelles études sur les mécanismes reprotoxiques du Linuron sont attendues, aussi la VTR pourra être considérée comme provisoire et réévaluée dans un délai de deux ans à partir de sa publication.

4. Bibliographie

- AGRITOX. Linuron. Dans : AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques; 1998.
- Cook JC, Mullin LS, Frame SR, Biegel LB. Investigation of a mechanism for Leydig cell tumorigenesis by linuron in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;119(2):195-204.
- European Commission. Review report for the active substance **linuron**: European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General; 2002 December. Report No.: 7595/VI/97-final.
- Gray LE, Jr., Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health* 1999;15(1-2):94-118.
- Gray LE, Hotchkiss AK, Price M, Wolf CJ, Furr J, Ostby J, et al. Adverse effects of antiandrogenic pesticides and toxic substances on reproductive development in the male. *Biol Reprod* 2001;64(Suppl 1):87-8.
- Hotchkiss AK, Parks-Salducci LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberghe JG, et al. A mixture of the "antiandrogens" linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Biol Reprod* 2004;71(6):1852-61. Epub 2004 Jul 30.
- IRIS. Toxicological profile for Linuron (CASRN 330-55-2). In: United-States Environmental Protection Agency; 1993.
- Khera KS, Whalen C, Trivett G. Teratogenicity studies on linuron, malathion, and methoxychlor in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978;45(2):435-44.
- Kang IH, Kim HS, Shin JH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, et al. Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology*. 2004;199(2-3):145-59.
- Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci* 2000;56(2):389-99.
- McIntyre BS, Barlow NJ, Wallace DG, Maness SC, Gaido KW, Foster PM. Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl:CD(SD)BR rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;167(2):87-99.
- McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Male rats exposed to linuron in utero exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retention, and epididymal malformations that result in subsequent testicular atrophy. *Toxicol Sci* 2002;65(1):62-70.

McIntyre BS, Barlow NJ, Sar M, Wallace DG, Foster PM. Effects of in utero linuron exposure on rat Wolffian duct development. *Reprod Toxicol* 2002;16(2):131-9.

Rhomberg, LR and Lewandowski, TA. 2004. Methods for identifying a default cross-species scaling factor. Submitted to USEPA Under Contract No. 3W-0477-NASX.

Scassellati-Sforzolini G, Pasquini R, Moretti M, Villarini M, Fatigoni C, Dolara P, et al. *In vivo* studies on genotoxicity of pure and commercial linuron. *Mutat Res* 1997;390(3):207-21.

Turner KJ, McIntyre BS, Phillips SL, Barlow NJ, Bowman CJ, Foster PM. Altered gene expression during rat Wolffian duct development in response to in utero exposure to the antiandrogen linuron. *Toxicol Sci* 2003;74(1):114-28. Epub 2003 May 2.

5. Glossaire

Cellules de Leydig : cellules présentent dans les testicules et fabricant la testostérone (voir testostérone). [<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Cryptorchidie : Absence du testicule dans sa bourse, d'un côté ou des deux côtés à la fois.

La cryptorchidie touche environ 3 à 4 % des nouveau-nés, et le plus souvent du côté droit. Elle est bilatérale dans environ 20 à 25 % des cas. Ce terme est habituellement confondu avec celui d'ectopie qui caractérise un testicule en situation aberrante, en dehors de sa position normale, due à une migration (déplacement) anormale elle aussi.

Causes

La raison de la cryptorchidie n'est pas connue avec exactitude, elle semble due à une insuffisance de libération d'hormone hypophysaire, elle-même secondaire à une absence de stimulation par l'hypothalamus. Dans ces conditions, le testicule reste dans la cavité abdominale ou dans le canal inguinal (60 % des cas). L'arrêt de migration (le testicule n'est pas descendu en suivant le trajet normal) de l'abdomen vers la bourse a lieu pendant la vie intra-utérine. Sa descente s'arrête à un niveau plus ou moins bas dans l'abdomen lui-même ou à la racine de la bourse.

Symptômes

Absence de testicules dans les bourses à la palpation, lors des premiers examens faits par le pédiatre. Testicule oscillant (mobile) : dans ce cas, la palpation permet de percevoir le testicule dans certaines situations, et le diagnostic se fait parfois plus tardivement. Le testicule oscillant est descendu dans le scrotum et se retire dans le canal inguinal. Ceci est la raison pour laquelle le médecin examine l'enfant à plusieurs reprises en position debout avant de conclure à cette anomalie. Le reste de l'examen vérifie la position du méat du méat urétral, dont l'anomalie constitue l'hypospadias. Position du testicule à l'entrée de la bourse. Anomalie du pénis. Présence d'une hernie inguinale (masse formée par un organe ou une partie d'organe, généralement l'intestin, sorti de la cavité qui le contient habituellement). Il existe quelques cas d'atrophie d'un seul testicule, due à un traumatisme ou à une orchite (inflammation testiculaire). La non-palpation des testicules des deux cotés doit faire penser à un hypogonadisme (diminution du taux d'hormones androgéniques dans le sang). Enfin, il existe des cas d'agénésie testiculaire (absence congénitale de testicules). [<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Epididyme : Organe cylindrique situé derrière chaque testicule et s'étalant en "embrassant" celui-ci, faisant suite aux canaux efférents qui sont des sortes de petits tubes sortant du testicule. L'épididyme se prolonge par le canal déférent ou canal spermatique, qui débouche dans l'urètre et qui est destiné à évacuer à la fois les urines et le sperme. Le canal de l'épididyme est microscopique et très long. Sa forme anatomique le maintient pelotonné sur lui-même. C'est à l'intérieur de celui-ci que les cellules spermatiques, c'est-à-dire les précurseurs des spermatozoïdes produits dans le testicule, progressent lentement en achevant leur maturation. Les pathologies habituellement rencontrées au niveau de l'épididyme sont, dans l'ordre de fréquence :

1. l'agénésie épididymaire, qui est un développement incomplet de l'épididyme, de nature congénitale. Elle peut entraîner une stérilité lorsqu'elle concerne les deux épididymes.
2. l'inflammation de l'épididyme, appelée également épididymite, qui est presque toujours associée à une inflammation du testicule dans le cadre d'une orchiépididymite. Parfois, les deux épididymes sont atteints, ce qui provoque une obstruction des canaux évacuateurs et donc une hypofertilité (fertilité plus faible que la normale).
3. le kyste de l'épididyme, qui se présente sous la forme d'un nodule rempli de liquide. Le chirurgien devra intervenir uniquement si celui-ci est gênant par son volume, car il n'a aucune conséquence sur la fertilité.

[<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Estradiol : Hormone considérée comme la véritable hormone femelle, voisine de l'estrone mais plus active qu'elle, principalement sécrétée chez la femme par l'ovaire et dont le taux augmente lors de l'ovulation (libération de l'ovule par l'ovaire).

L'estradiol est la plus active des trois hormones oestrogènes dans l'organisme. Elle est libérée après la stimulation par d'autres hormones (les hormones folliculostimulante et lutéinisante : FSH et LH) sécrétée par l'hypophyse. Son taux est variable au cours de la vie d'un individu : jusqu'à la puberté, il est relativement bas puis s'élève dès l'arrivée du cycle menstruel. Au cours du cycle menstruel lui-même, il est élevé durant la première moitié puis diminue dans la seconde moitié. Au cours de la ménopause, ce taux est à nouveau très bas. Durant cette période, l'hormone est fabriquée en petite quantité à partir des androgènes (hormone mâle) à l'intérieur du tissu adipeux.

Rôle

Il est en relation directe avec l'apparition des caractères sexuels secondaires : tissu adipeux

et sa répartition, libido, développement des organes génitaux externes (vagin, vulve), internes (utérus et trompes) et des seins. Lors de la grossesse, le taux d'estradiol s'élève et reste important jusqu'à l'accouchement. Chez l'homme, le taux d'estradiol est relativement bas et s'élève quelquefois en cas d'affections du foie. L'estradiol est utilisé en thérapeutique comme composant des médicaments anticonceptionnels (pilule contraceptive) associé avec la progestérone. Il est également utilisé comme traitement substitutif (mis en place à la suite d'une carence hormonale) dans l'insuffisance ovarienne (insuffisance de sécrétion des hormones par l'ovaire). Le dosage de l'estradiol se fait dans les cas suivants :

- Suivi du bon déroulement d'une grossesse et donc de l'activité du fœtus dans l'utérus maternel. La chute du taux d'estradiol indique quelquefois une souffrance du fœtus.
- Surveillance des ovaires en cas d'induction de grossesse.
- Dans le diagnostic d'aménorrhée (absence de règles)
- Dans le diagnostic des tumeurs de l'ovaire.

[<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Gubernaculum : ligament servant à descendre les testicules au fond du scrotum.

[http://urologie-chu-mondor.aphp.fr/_enseignement/Externes/cryptorchidie.pdf]

Hormone lutéinique LH (angl., abrév. pour luteinizing hormone). Syn. hormone lutéinisante, ICSH (interstitial cell stimulating hormone), lutropine. Hormone glycoprotéique de poids moléculaire de 29 000 daltons, sécrétée par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. La sécrétion de LH est permanente chez l'homme, cyclique chez la femme, avec une augmentation en fin de phase folliculaire, un pic préovulatoire puis une décroissance en phase lutéale. La LH agit sur de nombreuses cellules gonadiques, en favorisant la synthèse des stéroïdes sexuels; chez la femme elle intervient de façon privilégiée dans l'ovulation. La sécrétion de LH est stimulée par la gonadolibérine, et modulée par les stéroïdes sexuels.
[http://www.gfmer.ch/Cours/Cycle_menstruel_normal.html]

Hypospadias: Malformation de l'urètre de l'homme (conduit amenant l'urine de la vessie à l'extérieur) se caractérisant par la division d'une plus ou moins grande partie associée à la présence d'un orifice urétral (méat urétral) anormalement situé par rapport à l'extrémité du gland, sur la face inférieure de la verge. L'hypospadias est toujours associé avec une

malformation du prépuce (repli de peau recouvrant le gland). On distingue plusieurs variétés d'hypospadias :

1. L'hypospadias balanique se caractérise par une ouverture du méat urétral sous le gland
2. L'hypospadias pénien se caractérise par une ouverture du méat urétral au milieu du pénis
3. L'hypospadias pénoscrotal se caractérise par une ouverture du méat urétral à l'angle du pénis et du scrotum (enveloppe de peau des testicules).

[<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Spermatide : Cellule précurseur du spermatozoïde. Avant de devenir un spermatozoïde, un gamète mâle se trouve tout d'abord au stade appelé spermatogonie, puis spermatocyte, puis spermatide, avant de devenir un spermatozoïde. [<http://www.imr-marseille.com/glossaire.htm>]

Testostérone : Hormone mâle (androgène) fabriquée et sécrétée par les testicules (cellules de Leydig), mais également par les ovaires et les glandes surrénales (glandes situées au-dessus de chaque rein et sécrétant également la cortisone naturelle) chez la femme. Grâce à la stimulation de l'hormone lutéinisante (LH), qui est une hormone fabriquée par la glande hypophyse située à la base du cerveau, la testostérone est sécrétée dans le sang en quantité plus ou moins importante. Cette fabrication se fait seulement pendant la vie intra-utérine et au moment de la puberté. La testostérone est nécessaire :

- à la production des spermatozoïdes
- au développement des organes génitaux nécessaires à la fertilité
- à l'apparition et au maintien des caractères sexuels secondaires masculins (musculature, pilosité, libido, changement de la voix)
- à la fabrication des œstrogènes (la testostérone est un précurseur des œstrogènes)
- à la fabrication des protéines (métabolisme)
- au développement musculaire
- au fonctionnement des glucides (sucres)
- au développement de certains tissus de l'organisme (lipides, os)

Pour circuler, cette hormone a besoin d'une protéine porteuse, la sex binding protein (SBP).

Vésicule séminale : L'adjectif séminal désigne ce qui est relatif à la semence, au sperme. Le sperme est un liquide normalement stérile (sans microbes), de consistance visqueuse, légèrement filant, collant et de coloration blanchâtre, sécrété par les testicules et la prostate et contenant des éléments fabriqués par les glandes de Cowper. La caractéristique principale du sperme est de contenir les spermatozoïdes, qui sont les cellules reproductrices mâles. Le sperme est produit lors de l'éjaculation pendant l'accouplement. La vésicule séminale est le réservoir de nature musculaire et membraneux qui contient le sperme.

L'éjection du sperme en dehors de l'urètre (canal transportant l'urine et le sperme vers l'extérieur) se fait grâce à l'action des vésicules séminales. Celle-ci a lieu après les stimulations répétitives du pénis au moment des rapports sexuels ou lors de la masturbation qui sont à l'origine du réflexe éjaculatoire. Plus précisément au moment de l'éjaculation, les deux vésicules séminales se contractent et éjectent leur contenu dans les canaux déférents où il se mélange aux spermatozoïdes (provenant des testicules) pour donner le sperme.

Anatomie Les vésicules séminales au nombre de deux et la prostate reposent sur la paroi postérieure (arrière) de la vessie. Ce sont des glandes ayant chacune une longueur allant de 5 à 7 centimètres environ. Elles ont la forme de l'extrémité d'un petit doigt de gant. La vésicule séminale est incluse dans une épaisse gaine fibreuse, l'aponévrose prostato-péritonéale de Denonvilliers, tendue du cul-de-sac de Douglas au périnée. Il est possible de palper la vésicule séminale par le toucher rectal.

Rôle : Les vésicules séminales ont pour rôle de sécréter un liquide alcalin (contraire d'acide) de nature visqueuse et de coloration jaunâtre renfermant du fructose (variété de sucre) ainsi que de l'acide ascorbique (vitamine C), des protéines jouant un rôle dans la coagulation (spécifiquement la séminogéline et des prostaglandines. Les prostaglandines sont des substances dérivées d'acides gras non saturés (ou acides gras insaturés, c'est-à-dire dont les atomes de carbone sont reliés par 2 ponts) ayant une structure biochimique appelée prostanoïde, et dont il existe 20 variétés réparties en neuf classes, dénommées de A à I : PGA, PFE, PGF, PGI etc...selon leur structure. Le canal de chaque vésicule séminale rejoint le conduit déférent du même côté pour former ensuite le conduit éjaculateur. Le canal déférent faisant suite à l'épididyme en prenant la forme d'une épingle à cheveux. Sa longueur est de 35 cm environ et son diamètre augmente progressivement au fur et à mesure qu'il s'éloigne du testicule. Les spermatozoïdes et le liquide séminale se mélangent dans le conduit éjaculateur puis pénètrent dans l'urètre et plus précisément dans sa partie prostatique à l'instant de l'éjaculation. [<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Construction de VTR reprotoxiques selon le document de référence de l'Afsset

- Ether éthylique de l'éthylène glycol (EGEE) -

Expertise toxicologique des substances chimiques (ETSC)
Direction des risques chroniques (DRC)

Client : AFSSET

Liste des personnes ayant participé à l'étude : B. DOORNAERT

RAPPORT D'ÉTUDE 06/11/2006
N°INERIS-DRC-06-70355/ETSC/BDo-06DR135.doc

**Construction de VTR reprotoxique selon le
document de référence de l'Afsset**
**- Ether éthylique de l'éthylène glycol
(EGEE) -**

« Logo afsset »

Substances toxiques sur la reproduction et le développement

**Cahier des charges pour la construction de VTR
reprotoxiques pour les substances tests**

25 septembre 2006

PREAMBULE

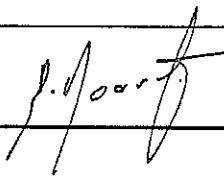
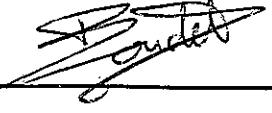
Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

| | Rédaction | Vérification | Approbation |
|---------|---|---|---|
| NOM | Blandine Doornaert | Frédéric Bois | Céline Boudet |
| Qualité | Ingénieur de l'unité ETSC | Délégué scientifique | Responsable de l'unité ETSC |
| Visa |  |  |  |

Intitulé

**Construction de VTR reprotoxique pour
L'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEF) (N°CAS : 110-80-5),
selon la méthode proposée dans le document de référence
(VERSION 2)**

Le 25 septembre 2006

Etude réalisée par :

Organisme d'expertise : INERIS, parc ALATA BP 2 F-60550 Verneuil-en-Halatte

*Contact : Blandine Doornaert, TEL: 03-44-55-64-03, FAX : 03-44-55-68-00
mail : blandine.doornaert@ineris.fr*

Pour :

*L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AFSSET*

*27-31 avenue du Général Leclerc
94704 Maison Alfort Cedex*

Contact : Nathalie Bonvallot (01 56 29 19 33 / nathalie.bonvallot@afsset.fr)

Information sur la propriété et diffusion du document

Les résultats des travaux demeurent la propriété de l'AFSSET, qui se réserve le droit de les rendre publics. Ils ne peuvent être utilisés, ou rendus en tout ou partie publics qu'avec l'accord écrit préalable de l'AFSSET. Les informations communiquées par l'AFSSET à l'occasion de la réalisation des travaux sont confidentielles et ne doivent pas être communiquées à des tiers, sauf accord.

Préambule à ces travaux

A la suite de la rédaction par l'Afsset et par le groupe de travail Afsset sur les VTR reprotoxiques, d'un guide méthodologie sur la construction de VTR pour les effets reprotoxiques, une phase pilote de construction de VTR reprotoxiques a été réalisée sur plusieurs substances tests.

Cette phase pilote avait pour objectifs :

- De mettre en évidence la possibilité ou non de construire des VTR reprotoxiques en suivant le cahier des charges et la méthodologie proposés par l'Afsset.
- De valider la méthode de construction développée dans le document de référence de l'Afsset et de la faire évoluer, si cela était nécessaire, en fonction des difficultés rencontrées.

L'INERIS a travaillé sur deux substances, une substance pour laquelle des VTR pour des effets reprotoxiques étaient déjà disponibles dans la littérature : l'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE) et une substance pour laquelle aucune VTR reprotoxique n'a été établie : le toluène.

Ce présent document réalise, en accord avec les recommandations du cahier des charges et du document méthodologique de l'Afsset, une revue des généralités et des effets toxiques de l'EGGE disponibles dans la littérature, les effets reprotoxiques étant examinés de façon approfondie. A partir de ces dernières données, deux VTR reprotoxiques ont été construites et proposées.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| 1. RÉSUMÉ | 10 |
| 2. LE PROFIL TOXICOLOGIQUE..... | 13 |
| 2.1. INFORMATIONS GÉNÉRALES | 13 |
| 2.1.1. IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE..... | 13 |
| 2.1.2. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES | 13 |
| 2.1.3. PLAUSIBILITÉ D'EXPOSITION HUMAINE | 14 |
| 2.2. TOXICOCINÉTIQUE | 14 |
| 2.3. TOXICITÉ GÉNÉRALE | 15 |
| 2.3.1. DONNÉES CHEZ L'HOMME | 15 |
| 2.3.2. DONNÉES CHEZ L'ANIMAL..... | 15 |
| 2.3.2.1. Toxicité aiguë | 15 |
| 2.3.2.2. Toxicité à doses répétées | 16 |
| 2.3.2.3. Génotoxicité et cancérogénicité | 16 |
| 2.4. TOXICITÉ SUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT..... | 17 |
| 2.4.1. DONNÉES HUMAINES | 17 |
| 2.4.1.1. Effets sur le développement | 17 |
| 2.4.1.2. Effets sur la fertilité | 17 |
| 2.4.2. DONNÉES ANIMALES..... | 18 |
| 2.4.2.1. Effets sur le développement | 18 |
| 2.4.2.2. Effets sur la fertilité | 24 |
| 2.4.3. MÉCANISMES D'ACTION PROPOSÉS | 29 |
| 2.5. ANALYSE DE LA COHÉRENCE DES DONNÉES ANIMALES ET HUMAINES | 29 |
| 2.5.1. COHÉRENCE DE LA TOXICOCINÉTIQUE..... | 29 |
| 2.5.2. COHÉRENCE DES EFFETS ET DE LA TOXICODYNAMIE..... | 30 |
| 2.5.3. BILAN DE LA COHÉRENCE | 30 |
| 2.6. COMPARAISON DES INDICES DE TOXICITÉ EN FONCTION DES EFFETS ET VTR EXISTANTES | 30 |
| 2.6.1. PRÉSENTATION DES NOAEL ET LOAEL..... | 31 |
| 2.6.2. PRÉSENTATION DES VTR EXISTANTES | 32 |
| 2.6.2.1. Présentation de l'étude critique prise en compte | 33 |
| 2.6.2.2. Justification scientifique de l'US-EPA et de l'OEHHA | 33 |
| 2.7. CONCLUSION..... | 34 |
| 3. LA CONSTRUCTION DE LA VTR | 35 |
| 3.1. IDENTIFICATION D'UNE DOSE CRITIQUE..... | 35 |
| 3.1.1. PRÉSENTATION DES DOSES REPÈRES | 35 |
| 3.1.2. DOSE CRITIQUE RETENUE | 37 |
| 3.2. FACTEURS D'INCERTITUDE | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1. VTR POUR LES EFFETS SUR LA FERTILITÉ..... | 37 |
| 3.2.2. VTR POUR LES EFFETS SUR LE DÉVELOPPEMENT | 38 |
| 3.3. DISCUSSION ET PRÉSENTATION DES VTR..... | 38 |
| 3.3.1. ELABORATION DE LA VTR POUR LES EFFETS SUR LA FERTILITÉ PAR INHALATION..... | 39 |
| 3.3.2. ELABORATION DE LA VTR POUR LES EFFETS SUR LE DÉVELOPPEMENT | 40 |
| 4. CONCLUSION | 41 |
| 5. BIBLIOGRAPHIE | 42 |

1. Résumé

Les principaux symptômes induits **chez les animaux** après une exposition aiguë à l'EGEE, sont les suivants : dyspnée, somnolence, ataxie, prostration, hémoglobinurie et hématurie. Les observations histologiques ont mis en évidence, chez les animaux testés, des dégénérescences tubulaires rénales et des congestions. Une exposition à doses répétées à des concentrations élevées (1450 mg/m³, 7 à 90 jours) chez le rat et le lapin provoque des effets néfastes sur le système hématopoïétique, le système nerveux central, le foie, les reins, le thymus, les poumons et les testicules. A de plus faibles doses (< 1450 mg/m³), les effets délétères observés concernent particulièrement le système hématopoïétique et les testicules. Aucune étude à long terme (> 3 mois) n'est disponible. L'EGEE est également tératogène chez le rat (250 ppm) et le lapin (175 ppm), mais aucune donnée n'étudiant ce type d'effet n'est disponible chez l'homme. L'EGEE n'est pas mutagène, la majorité des tests de mutagenèse *in vitro* réalisés sur des bactéries ou des cellules de mammifères ont donné des résultats négatifs. Très peu d'études de cancérogenèses sont disponibles. Les expérimentations à long terme chez le rat Fischer 344/N et la souris B6C3F1, traités par gavage avec l'EGEE pendant deux ans n'ont pas révélé de potentiel cancérogène.

Chez l'homme, peu d'informations sont disponibles. Les effets néfastes observés sont semblables à ceux identifiés chez l'animal. Les principaux effets toxiques observés sont des effets sur les testicules se manifestant par une diminution du volume du liquide séminal et de la concentration en spermatozoïde ainsi que par une augmentation des oligospermies et des spermatozoïdes anormaux pour des concentrations comprises entre 2,6 et 21,5 ppm ; ou des modifications hématologiques. D'autres effets peuvent être observés tels que : vertiges, pertes de connaissance, acidose métabolique et insuffisance rénale, ainsi que des effets délétères sur le système nerveux central et le foie. La plupart de ces symptômes s'observent aussi bien après une exposition de courte durée qu'une exposition de longue durée et sont réversibles.

Les effets critiques apparaissent clairement comme étant **des effets sur la reproduction chez l'homme** et des effets sur la reproduction et le développement chez l'animal. L'organe cible après une exposition par inhalation chez l'homme est le testicule (Ratcliffe *et al.*, 1989 et Welch *et al.*, 1988). De plus, des données d'exposition montrent que l'exposition majoritaire chez l'homme se fait par l'inhalation (64 % pour les hommes sédentaires). Ces différentes informations ont mis en évidence qu'il est pertinent de proposer des VTR reprotoxiques pour l'EGEE après une exposition par inhalation.

La recherche bibliographique menée dans ce rapport et l'analyse des études disponibles chez l'homme et chez l'animal concernant les effets reprotoxiques nous a conduits à retenir

deux effets critiques : **Un effet sur la fertilité masculine** observé et démontré aussi bien chez l'animal que chez l'homme **et un effet sur le développement**, uniquement constaté chez l'animal. Il a été décidé de retenir ce dernier effet par précaution, en raison du manque d'études chez l'homme et afin de protéger la femme enceinte. Deux études ont été sélectionnées pour établir les deux VTR. L'étude de Barbee *et al.* (1984) a permis d'établir la VTR pour les effets sur la fertilité et l'étude de Doe *et al.* (1984) la VTR pour les effets sur le développement. Il a été décidé, conformément au document méthodologique de l'Afsset et aux données disponibles, que la VTR construite pour les effets sur la reproduction soit applicable pour une exposition sub-chronique et que la VTR élaborée pour les effets sur le développement soit valide pour une exposition aiguë de 24 heures.

Les deux VTR proposées ainsi que leur méthode d'élaboration sont indiquées dans le tableau de la page suivante :

Tableau récapitulatif : VTR reprotoxiques proposées pour l'EGEE (exposition par inhalation) :

| Etude critique retenue | Effet critique retenu | Espèces étudiées | Durée d'exposition Dans l'étude | Dose critique | Facteur d'incertitude | VTR proposée |
|------------------------|---|----------------------------|---|--|--|---|
| Barbee et al., 1984 | <p>Effet sur la fertilité : Diminution significative du poids testiculaire et dégénérescence focale minime à légère de l'épithélium des tubules séminifères sans altération de la spermatogénèse.</p> <p>Autres effets : Anémie périphérique avec augmentation de l'élimination des érythrocytes circulants</p> | Lapins (New Zealand White) | 6h/j, 5j par semaine pendant 13 semaines | NOAEL = 380 mg/m ³ (103 ppm) NOAEL _{ADJ} = 68 mg/m ³ | 100 10 (inter-espèce) × 10 (intra-espèce) | VTR = 0,7 mg/m ³ Valide pour une exposition sub-chronique |
| Doe et al., 1984 | <p>Effet sur le développement - Fœtotoxicité : Défaut cardiovasculaire, défaut de la paroi abdominale, défauts squelettiques mineurs, côtes rudimentaires surnuméraires et apparition de côtes d'une longueur supérieure à la normale.</p> | Lapins (Dutch) | Du 6 ^{ème} au 19 ^{ème} jour de gestation (14 j) | NOAEL = 184 mg/m ³ (50 ppm) | 100 10 (Inter-espèce) × 10 (intra-espèce) | VTR = 1,84 mg/m ³ Valide pour une exposition aiguë de 24 h |

2. Le profil toxicologique

2.1. Informations générales

2.1.1. Identification de la substance

| | |
|---------------------------------------|---|
| Numéro CAS, ENEICS, etc. | CAS :110-80-5 / EC :203-804-1 |
| Nom | Ether éthylique de l'éthylène glycol (EGEE) |
| Synonymes | 2-éthoxyéthanol (2-EE) , éthyl glycol d'éther éthylique de l'éthylène glycol. |
| Formule brute | C ₄ H ₁₀ O ₂ |
| Formule développée | CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH |
| Appartenance à une liste reprotoxique | Reprotox. Cat. 2 |

Sources : ECB – ESIS : http://ecb.jrc.it/esis-pgm/esis_reponse.php

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

| | |
|--|--|
| Forme physique | Liquide incolore |
| Poids moléculaire | 90,1 g/M |
| Point d'ébullition | 135 °C |
| Point de fusion | - 70°C |
| Pression de vapeur | 3,8 (20°C) 5,3 (25°C) mm Hg |
| Densité | 0,93 g/mL (20°C) |
| Facteurs de conversion | 1 ppm = 3,69 mg/m ³ / 1 mg/m ³ = 0,272 ppm |
| Solubilité | Miscible dans l'eau et dans de nombreux solvants organiques |
| LogKow | - 0,32 |
| Koc | ND |
| BCF | ND |
| BAF | ND |
| Produits de dégradation environnementale | Photolyse rapide, dégradation aérobiose rapide, dégradation anaérobiose lente avec formation de produits de dégradation (éthane et dioxyde de carbone) |
| Autres | Incolore, odeur de l'éther, inflammable, explosif à température > 40°C |

Sources : NIOSH pocket <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0258.html>, IPCS INCHEM <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0060.html> et IPCS INCHEM (1990), HSDB, 1996, 1999.

2.1.3. Plausibilité d'exposition humaine

| | |
|-------------------------------------|--|
| Types d'utilisation | Revêtements (peintures, colorants, laques), solvants (encres, résines, teintures), microélectronique |
| Restrictions d'usages | Liées à sa classification CMR2 |
| HPV/ tonnages (Europe, France) | Production globale (Europe de l'ouest, Japon et Etats-Unis) 205.10^3 t/an |
| Médias de l'environnement concernés | Eau, émissions atmosphériques |
| Types de populations concernées | Travailleurs (industries, ateliers), population générale (usage domestique) |

2.2. Toxicocinétique

| | Données chez l'animal | Données chez l'homme |
|--|---|--|
| Substance mère | EGEE (Ether éthylique de l'éthylène glycol) ou 2-EAA (acide 2-éthoxyacétique) | 2-EAA (acide 2-éthoxyacétique) |
| Voies de métabolisation possibles | Oxydation en acide 2-éthoxyacétique (2-EAA) puis conjugaison avec la glysine en N-éthoxy-acéthylglycine. | Oxydation en acide 2-éthoxyacétique (2-EAA) puis conjugaison avec la glysine en N-éthoxy-acéthylglycine. Chez l'homme 23-35 % de 2-EAA est excrété en N-éthoxy-acéthylglycine sous forme de AEA |
| Métabolites principaux | Acide 2-éthoxyacétique (2-EAA) et N-éthoxyacéthylglycine, 2-EAA est le métabolite majoritaire (> 76 %) | Acide 2-éthoxyacétique (2-EAA) métabolite majoritaire (23-35 %) |
| Absorption (%/ voie) | Cutanée : 2,3 mg de 2-EAA /cm ² /h à travers la peau de chien Beagle ; Taux de pénétration cutanée de 22 % <i>in vitro</i> et de 25 % <i>in vivo</i> à travers la peau des rats. Gastro-intestinale : 76-80 % de 230 mg d'EGEE sont retrouvés dans les urines en 96 h. Inhalation : ND | Absorption rapide quelle que soit la voie d'exposition. Cutanée : 0,8 mg d'EGEE /cm ² /h et 0,8 mg de 2-EAA /cm ² /h à travers de l'épiderme humain isolé. 8 % <i>in vitro</i> à travers la peau d'origine humaine |
| Distribution | Les éthers de glycol accèdent à tous les compartiments dans les minutes qui suivent l'absorption, quelle que soit la voie d'administration. Présence de fortes concentrations dans le foie, les reins et les graisses. | Les éthers de glycol accèdent à tous les compartiments dans les minutes qui suivent l'absorption, quelle que soit la voie d'administration. Présence de fortes concentrations dans le foie, les reins et les graisses. |
| Stockage, accumulation (% et cible) | Organe cible : testicules | Organe cible : testicules |
| Transferts BHE | ND | ND |
| Transferts placenta | ND | ND |
| Transferts lait maternel | ND | ND |
| Temps d'élimination de l'acide 2-éthoxyacétique (demi-vie) | 7 h chez le rat | 50 - 60 h |

Sources : IPCS INCHEM (1990), Expertise collective de l'Inserm, 1999 et 2006.

2.3. Toxicité générale

Monographies et documents disponibles : IPCS INCHEM, 1990 ; Expertise collective de l'Inserm sur les éthers de glycol, 1999 et 2006; OEHHA, 2005 ; US EPA/IRIS, 1991.

Recherches : toxnet et medline (pubmed).

2.3.1. Données chez l'homme

Peu d'informations sur les effets de l'EGEE **chez l'homme** sont disponibles. Elles proviennent principalement de cas rapportés dans la littérature concernant des empoisonnements accidentels lors d'expositions professionnelles ou volontaires lors de conduites suicidaires. Les effets néfastes observés sont semblables à ceux identifiés chez l'animal. Les principaux effets toxiques observés sont des effets sur les testicules ou des modifications hématologiques. Les altérations hématologiques se caractérisent par une légère anémie ainsi qu'une granulocytopénie minime, observées chez des travailleurs exposés jusqu'à 18 ans à différents composants de peintures dont le 2-ME (2-Methoxyethanol) (0 à 17.7 mg/m³) et l' EGEE (0 à 80 mg/m³) (Welch *et al.*, 1988).

Une femme de 44 ans ayant absorbée accidentellement 40 ml d'EGEE a perdu connaissance avec apparition d'une cyanose et d'un œdème pulmonaire. Tout trouble a disparu au bout de 44 jours (Fucik, 1969).

D'autres effets peuvent être observés après une exposition à l'EGEE : vertiges, pertes de connaissance, acidose métabolique et insuffisance rénale, ainsi que des effets délétères sur le système nerveux central et le foie. La plupart de ces symptômes qui s'observent aussi bien après une courte qu'une longue durée d'exposition sont réversibles. Chez l'homme, aucune irritation ou sensibilisation de la peau a été rapportée malgré les expositions intensives à l' EGEE. Il est difficile, à partir de ces données, d'établir une relation dose-effet car il s'agit principalement d'expositions à plusieurs solvants et en milieu professionnel.

2.3.2. Données chez l'animal

2.3.2.1. Toxicité aiguë

Pour de nombreuses espèces (rat, souris, cobaye, lapin), les DL₅₀ par voie orale sont comprises entre 1,4 et 5,5 g d'EGEE par kg de masse corporelle. et entre 1,3 et 5,1 g de 2-EEA par kg de masse corporelle. Par inhalation, la CL₅₀ est de 6698 mg/m³ pour la souris et par voie cutanée la DL₅₀ est de 3,3 – 15,2 g d'EGEE par kg de masse corporelle. chez le lapin. La DL₅₀ par injection intra-péritonéale chez les rongeurs est de 1,7 – 2 g d'EGEE par kg de p.c.. Aux doses avoisinant les DL₅₀ et CL₅₀, les symptômes les plus souvent observés

chez les animaux exposés sont les suivants : dyspnée, somnolence, ataxie, prostration, convulsions, hémoglobinurie et hématurie. Les observations histologiques ont mis en évidence des dégénérescences tubulaires rénales et des congestions hépatiques et spléniques chez ces animaux.

2.3.2.2. Toxicité à doses répétées

Une exposition à doses répétées à des concentrations élevées (1450 mg/m³, 7 - 90 jours) chez le rat et le lapin, provoque des effets néfastes sur les systèmes hématopoïétique et lymphatique, le système nerveux central, le foie, les reins, le thymus, les poumons et les testicules. A de plus faibles doses (< 1450 mg/m³), les effets délétères sont observés uniquement sur le système hématopoïétique et les testicules. Aucune donnée n'est disponible sur les études à long terme (> 3 mois). L'EGEE n'est pas irritant pour la peau mais peut causer une irritation oculaire (tests chez le lapin).

2.3.2.3. Génotoxicité et cancérogénicité

Très peu d'informations sur le potentiel mutagénique de l'EGEE sont disponibles. La majorité des tests *in vitro* réalisés sur des bactéries ou des cellules de mammifères ont donné des résultats négatifs. Cependant, des aberrations chromosomiques sur des cellules CHO exposées à l'EGEE (4780-9510 µg/mL en absence d'activation métabolique) ainsi que des échanges de chromatides sœurs sur des cellules CHO exposées à l'EGEE (3170-9510 µg/mL en absence et en présence d'activateur métabolique) ont été observées. Les conclusions de l'expertise collective de l'Inserm, 1999 et 2006 sont que l'EGEE et ses métabolites ne sont pas intrinsèquement mutagènes sur les systèmes cellulaires, bactéries ou cellules de mammifères, utilisés classiquement dans les essais standardisés. Ils induisent cependant des effets d'aneuploïdie, la formation de micronoyaux *in vitro* et les échanges entre chromatides sœurs et interfèrent avec les systèmes d'agrégation de la tubuline.

Très peu d'études de cancérogenèses sont disponibles. Les expérimentations à long terme chez le rat Fischer 344/N et la souris B6C3F1, traités par gavage avec l'EGEE pendant deux ans n'ont pas révélé de potentiel cancérogène. L'étude a uniquement confirmé les effets d'atrophie testiculaire chez les mâles et mis en évidence des ulcérations stomacales (Melnick, 1984 dans l'expertise collective de l'Inserm, 1999).

2.4. Toxicité sur la reproduction et le développement

Monographies et documents disponibles : IPCS INCHEM, 1990, Expertise Inserm sur les éther de glycol, 1999 et 2006, OEHHA, 2005, US EPA/IRIS, 1991.

Recherche : Toxnet et medline (pubmed, DART).

2.4.1. Données humaines

2.4.1.1. Effets sur le développement

Dans les bases de données consultées, aucune étude concernant l'effet de l'EGEE sur le développement chez l'homme n'a été publiée quelle que soit la voie d'exposition.

2.4.1.2. Effets sur la fertilité

Les principaux effets sur la fertilité observés chez des populations exposées à l'EGEE sont représentatif d'une toxicité testiculaire : diminution du volume du liquide séminal et de la concentration en spermatozoïdes, augmentation des oligospermies et des spermatozoïdes anormaux (Ratcliffe *et al.*, 1989 et Welch *et al.*, 1988). Les études disponibles chez l'homme ne traitent que des effets reprotoxiques après une exposition par inhalation. Aucune donnée par voie orale n'est disponible concernant l'effet reprotoxique de l'EGEE. Les études disponibles sont détaillées ci-dessous :

Ratcliffe *et al.*, 1989 :

- **Type d'étude** : cas témoin.
- **Lieu** : industrie (métal moulé).
- **Nombre de personnes exposées** : 80 personnes exposées dans trois sites différents ; 37 d'entre elles ont participé à l'étude, population caucasienne, 30 ans en moyenne.
- **Voie d'exposition** : inhalation et cutanée (pour les personnes ne portant pas de gants).
- **Durée d'exposition** : travailleur de plus d'un an.
- **Niveau d'exposition** : le niveau d'exposition est de 4,8 à 16,9 ppm (17,67 à 62,2 mg/m³) (la moyenne géométrique étant de 6,5 ppm soit 23,9 mg/m³) pour une journée de 8 heures, ce niveau varie en fonction des équipements de protection utilisés par le personnel et peut diminuer jusqu'à 1,6 ppm (5,9 mg/m³).
- **Groupe témoins** : 39 personnes, population caucasienne, 30 ans en moyenne.
- **Effets observés** : diminution non significative du volume du liquide séminal et diminution significative de la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat chez les travailleurs exposés. La proportion de personnes ayant une oligozoospermie (≤ 20 millions de spermatozoïdes par ml de sperme) augmente chez le groupe exposé de façon non significative. Les spermatozoïdes anormaux présentant une forme immature sont augmentés de façon significative chez les travailleurs exposés.

Dans cette étude, il est suggéré que des effets sur le liquide séminal et sur la concentration de spermatozoïdes par éjaculât ont été observés suite à une exposition à l'EGEE à des concentrations qui sont inférieures la PEL-TWA (Permissible exposure level – time weighted average) déterminée par l'OSHA qui est de 200 ppm (736 mg/m³).

➤ **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL**

Aucun NOAEL ne peut être proposé.

LOAEL reprotoxique : 4,8 ppm (pour une diminution significative de la concentration de spermatozoïde par éjaculât). Ce résultat est à prendre avec précaution car les individus ont été exposés à d'autres substances pouvant induire des effets reprotoxiques.

Welch et al., 1988 :

- **Type d'étude** : cas témoin.
- **Lieu** : industrie (construction navale), nord-est des Etats-Unis.
- **Nombre de personnes exposées** : 94 peintres pour l'étude de fertilité et seulement 73 d'entre eux pour l'étude du liquide séminal.
- **Voie d'exposition** : inhalation et cutanée.
- **Durée d'exposition** : de 6 mois à 33 ans.
- **Niveau d'exposition** : le niveau d'exposition est de 0 à 80,5 mg/m³ soit 0 à 21,5 ppm (moyenne étant de 9,9 mg/m³ ou 2,6 ppm) pour une journée de 8 heures. Dans l'air ambiant sont aussi enregistrés différents niveaux de substances comme le 2-méthoxyéthanol et le plomb connus pour avoir des effets reprotoxiques.
- **Groupe témoins** : 55 personnes pour l'étude de fertilité et 40 personnes pour l'étude du liquide séminal.
- **Effets observés** : augmentation significative du pH du liquide séminal. La concentration du liquide séminal ($p = 0,1$) et la quantité de spermatozoïdes par éjaculât ($p = 0,11$) sont plus faibles chez les travailleurs exposés à l'EGEE. La proportion d'hommes ayant une concentration de spermatozoïdes par ml ≤ 20 millions est plus importante chez les sujets exposés à l'EGEE (13,5 %) que chez les témoins (5 %) ($p = 0,12$). De plus, la proportion de personnes ayant une quantité ≤ 100 millions de spermatozoïdes par éjaculât est plus importante chez les sujets exposés à l'EGEE (33 %) que chez les témoins (20 %) ($p = 0,20$).

L'EGEE provoque une diminution du nombre de spermatozoïdes par éjaculât et du volume de liquide séminal qui peuvent avoir un effet sur la fertilité masculine.

➤ **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** :

Aucun NOAEL ne peut être déterminé.

LOAEL reprotoxique : **2,6 ppm** (concentration moyenne d'exposition) (pour une diminution du nombre de spermatozoïdes par éjaculât et du volume de liquide séminal qui peuvent avoir un effet sur la fertilité masculine).

2.4.2. Données animales

2.4.2.1. *Effets sur le développement*

L'EGEE et le 2-EAA sont tératogènes chez le rat et le lapin quelle que soit la voie d'exposition. Une toxicité fœtale marquée accompagnée d'une forte incidence de

malformations et de retard de développement a été observée malgré une absence de toxicité maternelle chez des rates soumises à une application dermique d'EGEE ou de 2-EAA. Les études disponibles chez l'animal montrant un effet de l'EGEE sur développement ont été détaillées ci-dessous en fonction de la voie d'exposition.

Exposition par inhalation

Andrew et Hardin, 1984

- **Espèce étudiée :** lapins femelles (New Zealand White, 3.5 kg) et rats femelles (Wistar, 150 g)
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 29 à 38 femelles pour les 2 espèces.
- **Voie d'exposition :** inhalation
- **Temps et fréquence d'exposition :** lapins : 7 h/jour du 1^{er} au 18^{ème} jour de gestation. Rats : rates vierges 1^{ère} exposition 7 h/jour, 5 jour/semaine pendant 3 semaines, accouplement puis 2^{ème} exposition 7 h/jour du 1^{er} au 19^{ème} jour de gestation.
- **Doses ou concentrations d'expositions :** Lapins : 160 ou 617 ppm. Rats : 1^{ère} exposition 150 ou 649 ppm, 2^{ème} exposition : 202 ou 767 ppm.
- **Groupe témoin :** oui, exposé à de l'air.
- **Effet(s) observé(s) :** *Lapins* : toxicité maternelle pour les 2 doses testées, 160 et 617 ppm (diminution de la prise de nourriture et du gain de poids, augmentation du poids du foie et des reins, effets au niveau des ovaires – corps jaune et de l'utérus et mortalité maternelle à 617 ppm). Embryotoxicité (augmentation du nombre de résorption par portée) et tératogénicité (augmentation de l'incidence des malformations majeures et mineures) pour les 2 doses. *Rats* : à 202 ppm (2^{ème} exposition), retard de croissance intra-utérine chez les rats et augmentation des anomalies squelettiques. A 767 ppm (2^{ème} exposition) toxicité maternelle (diminution du gain de poids) et haute mortalité embryonnaire.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL :** *Lapins* : aucun NOAEL reprotoxique ne peut être déterminé car des effets apparaissent pour les 2 concentrations testées. LOAEL reprotoxique (embryotoxicité et tératogénèse) = 160 ppm. Attention, à cette concentration, une toxicité maternelle a été observée chez le lapin.
- Rats* : aucun NOAEL ni LOAEL ne peut être proposé car les rats sont exposés deux fois avant et après l'accouplement et à des concentrations différentes.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch) :** Cotation de Klimisch : 2. e.

Doe et al., 1984 :

- **Espèce étudiée :** rats femelles Alpk/AP (200-280 g, âgées de 11 à 13 semaines), lapins femelles Dutch (1.7-2.8 kg, âgées de 5 à 7 mois).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 24 rats ou lapins femelles par groupe.
- **Voie d'exposition :** inhalation.

- **Temps et fréquence d'exposition** : 6 h/jour, à partir du 6^{ème} jour de gestation jusqu'au 15^{ème} (rats femelles) ou jusqu'au 19^{ème} jour (lapins femelles).
- **Doses ou concentrations d'exposition** : 10, 50 et 250 ppm (36,6 – 184 - 920 mg/m³) pour les rats et 10, 50 et 175 ppm (36,8 – 184 - 644 mg/m³) pour les lapins.
- **Groupe témoin** : 24 rats femelles et 24 lapins femelles.
- **Effet(s) observés(s)** :

Effets sur les rats femelles et leurs portées : Toxicité maternelle : diminution significative de l'hémoglobine, de l'hématocrite et du volume de globules rouges à 250 ppm. Effets reprotoxiques : augmentation marquée du taux de mort intra-utérine tardive (augmentation significative à la concentration de 250 ppm) et des pertes pré-implantatoires pour tous les groupes exposés (augmentation significative pour 10 et 50 ppm et non significative pour 250 ppm car le nombre de femelles gravides est inférieure chez les ratten exposées à 250 ppm par rapport aux ratten exposées à 10 et à 50 ppm). Portée : le nombre de fœtus en vie dans la portée a diminué, cette diminution est significative à 10 et 50 ppm mais pas à 250 ppm, retard de croissance fœtale, diminution du poids fœtal moyen (lié au retard de croissance), réduction de l'ossification et anomalies mineurs notamment au niveau du squelette (effet significatif à 250 ppm).

Effets sur les lapins femelles et leurs portées : aucun effet maternel observé chez la lapine aux concentrations d'exposition. Fœtotoxicité : défaut cardiovasculaire, défaut de la paroi abdominale, défauts squelettiques mineurs, côtes rudimentaires surnuméraires et apparition de côtes d'une longueur supérieure à la normale. Ces effets sont significatifs à 175 ppm.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** :

LOAEL maternel (**rat**) : 250 ppm, NOAEL maternel (**rat**) : 50 ppm.

LOAEL reprotoxique (**rat**) : 10 ppm (pas très clair car l'augmentation des pertes pré-implantatoires et la diminution du nombre de fœtus par portée sont significatives à 10 et 50 ppm mais pas à 250 ppm).

LOAEL reprotoxique (**lapin**) : 175 ppm, NOAEL reprotoxique (**lapin**) : 50 ppm.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue : 2. e.

Nelson et al., 1981

- **Espèce étudiée** : rats mâles et femelles (vierges) Sprague-Dawley
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : mâles (300g) et femelles (200-300g), 14 ou 15 femelles. Un mâle pour 2 à 3 femelles pour l'accouplement.
- **Voie d'exposition** : inhalation
- **Temps et fréquence d'exposition** : uniquement pour les rats femelles : 7h/jour du 7^{ème} au 13^{ème} ou du 14^{ème} au 20^{ème} jour de gestation.
- **Doses ou concentrations d'expositions** : **étude pilote** : 1200-900-600-300-200-100 ppm administré à un petit nombre de rats ; **étude principale** : 100 ppm.
- **Groupe témoin** : un groupe témoin pour chacune des 2 périodes d'exposition testées.
- **Effet(s) observé(s)** : **étude pilote** : mort de toutes les progénitures aux plus fortes concentrations, augmentation de la mortalité néonatale de 34 % à 200 ppm ; **étude principale (100 ppm)** : impact sur le comportement des nouveaux-nés lors des tests comportementaux réalisés et sur les niveaux de neurotransmetteurs dans les différentes parties de cerveau étudiées.

- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL :**
Aucun NOAEL ne peut être proposé.
LOAEL reprotoxique : 100 ppm (attention une seule concentration a été testée)
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch) :** Cotation de Klimisch retenue : 2. e.

Nelson et al., 1982a :

- **Espèce étudiée :** rats Sprague-Dawley (200-300 g).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 14-16 femelles par groupe.
- **Voie d'exposition :** inhalation.
- **Temps et fréquence d'exposition :** 3 groupes : 15 femelles exposées 7 h/j à 100 ppm d'EGEE avec 10 % d'éthanol (du 7^{ème} au 13^{ème} jour de gestation), 14 femelles exposées 7h/j à 100 ppm d'EGEE avec 10 % d'éthanol (du 14^{ème} jour au 20^{ème} jour de gestation), 16 femelles exposées 7h/j à 200 ppm d'EGEE (du 7^{ème} au 13^{ème} jour de gestation).
- **Doses ou concentrations d'expositions :** 100 ou 200 ppm d'EGEE. Les 100 ppm d'EGEE étant administrés en présence de 10 % d'éthanol.
- **Groupe témoin :** 4 groupes : 21 femelles gestantes (du 7^{ème} au 13^{ème} jour), 22 femelles gestantes (du 14^{ème} au 20^{ème} jour), 16 femelles gestantes (du 7^{ème} au 13^{ème} jour) exposées à 10 % d'éthanol, 15 femelles gestantes (du 14^{ème} au 20^{ème} jour) exposées à 10 % d'éthanol.
- **Effet(s) observé(s) :** Le but de cette étude est principalement d'analyser l'effet d'une double exposition EGEE et éthanol.

Pour 200 ppm d'EGEE seul : Durée de gestation augmentée, gain de poids maternel diminué, consommation d'eau maternel diminuée (toxicité maternelle), score diminué au test comportementaux et/ou psychomoteurs chez les nouveau-nés (test rotarod, test de conditionnement aversif, test de la piscine sèche).

- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL**

Aucun NOAEL ne peut être proposé.

LOAEL reprotoxique : 200 ppm (attention, une seule concentration a été testée et une toxicité maternelle a été constatée à cette concentration).

Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch) : Cotation de Klimisch retenue : 2. d.

Nelson et al., 1982b :

- **Espèce étudiée :** rats Sprague-Dawley (200-300 g).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 14-22 femelles par groupe, 10 nouveaux-nés (pas plus de deux par portée).
- **Voie d'exposition :** inhalation.
- **Temps et fréquence d'exposition :** 3 groupes : 15 femelles exposées 7h/j à 100 ppm d'EGEE avec 10 % d'éthanol (du 7^{ème} au 13^{ème} jour de gestation), 14 femelles exposées 7h/j à 100 ppm d'EGEE avec 10 % d'éthanol (du 14^{ème} jour au 20^{ème} jour de gestation), 16 femelles exposées 7h/j à 200 ppm d'EGEE (du 7^{ème} au 13^{ème} jour de gestation).
- **Doses ou concentrations d'expositions :** 100 ou 200 ppm d'EGEE. Les 100 ppm d'EGEE sont testés en présence de 10 % d'éthanol.
- **Groupe témoin :** 4 groupes : 21 femelles gestantes (du 7^{ème} au 13^{ème} jour), 22 femelles gestantes (du 14^{ème} au 20^{ème} jour), 16 femelles gestantes (du 7^{ème} au 13^{ème}

jour) exposées à 10 % d'éthanol, 15 femelles gestantes (du 14^{ème} au 20^{ème} jour) exposées à 10 % d'éthanol.

- **Effet(s) observé(s)** : Comme dans l'étude précédente, le but de ce travail est de mettre en évidence l'effet de la double exposition EGEE/éthanol.

Une diminution transitoire des niveaux de sérotonine, de norépinéphrine et de dopamine a été observée chez les nouveaux-nés dont les mères ont été exposées à la combinaison d'éthanol et d'EGEE (100 ppm). Le niveau d'acétylcholine dans le système nerveux central notamment le cervelet (sauf le tronc cérébral) des rats (âgés de 21 jours) dont les mères ont été exposées à 200 ppm d'EGEE est significativement plus élevé que celui des rats témoins.

- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL**

Aucun NOAEL ne peut être proposé.

LOAEL reprotoxique : 200 ppm (attention, une seule concentration a été testée).

- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue : 2. d.

Nelson et Brightwell, 1984

- **Espèce étudiée** : rats Sprague-Dawley.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 15 à 20 femelles fécondes.
- **Voie d'exposition** : inhalation.
- **Temps et fréquence d'exposition** : du 7^{ème} au 13^{ème} jour de gestation ou du 14^{ème} au 20^{ème} jour de gestation.
- **Doses ou concentrations d'expositions** : 100 ppm.
- **Groupe témoin** : 2 groupes pour chacune des périodes d'exposition (exposition du 7^{ème} au 13^{ème} ou du 14^{ème} au 20^{ème} jour de gestation).
- **Effet(s) observé(s)** : impact sur le comportement des nouveaux nés pour les 2 périodes d'exposition. Pour l'exposition du 7^{ème} au 13^{ème} jour de gestation : diminution des performances au Rotorod test et lors du conditionnement aversif, activité exploratoire accrue. Pour l'exposition du 14^{ème} au 20^{ème} jour de gestation : diminution de l'activité circadienne et performances accrues lors du conditionnement aversif plus impact sur les niveaux des neurotransmetteurs dans les différentes parties du cerveau étudiées (acétylcholine, dopamine, norepinéphrine, 5 hydroxytryptamine).

Rq : 7 au 13^{ème} jour comprend l'organogenèse (effets tératogènes visibles), du 14 au 20^{ème} jour comprend la première période de développement et de croissance du cerveau (déficits fonctionnels).

- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** :

Aucun NOAEL ne peut être proposé.

LOAEL reprotoxique : 100 ppm (attention une seule concentration a été testée).

- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue 3. a.

Nelson et al., 1984

- **Espèce étudiée** : rats Sprague-Dawley.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : femelles vierges (200-300g), 15 à 20/groupe.
- **Voie d'exposition** : inhalation, dans chambre individuelles d'exposition de 0,5 m³
- **Temps et fréquence d'exposition** : 7 heures par jour du 7^{ème} au 13^{ème} jour de gestation ou du 14^{ème} au 20^{ème} jour de gestation.
- **Doses ou concentrations d'expositions** : 100 ppm.

- **Groupe témoin** : 2 groupes en fonction de la période d'exposition (exposition du 7^{ème} au 13^{ème} ou du 14^{ème} au 20^{ème} jour de gestation).
- **Effet(s) observé(s)** : impact sur le comportement des nouveaux-nés (diminution des performances au Rotorod test, activité exploratrice diminuée, diminution de l'activité circadienne et des performances lors du conditionnement opérant) et sur les niveaux de protéines cérébrales et des neurotransmetteurs (acétylcholine, dopamine, norepinéphrine, 5 hydroxytryptamine) pour les 2 périodes d'expositions.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** :
 - Aucun NOAEL ne peut être proposé.
 - LOAEL reprotoxique : 100 ppm (attention une seule concentration a été testée).
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue : 3.a.

Exposition par voie orale

Schuler et al., 1984 :

- **Espèce étudiée** : souris femelles gravides CD-1 âgées de 6 à 8 semaines.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 10 femelles.
- **Voie d'exposition** : voie orale.
- **Temps et fréquence d'exposition** : une fois par jour, 8 jours consécutifs, entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour de gestation.
- **Doses ou concentrations d'expositions** : 5 doses comprises entre la DL₅ et la DL₅₀ identifier pour l'EGEE chez les mères. La DL₁₀ maternelle est de 40,1 mmole/kg (3605 mg/kg) pour l'EGEE. La valeur des autres doses testées n'est pas précisée.
- **Groupe témoin** : 10 rats femelles.
- **Effet(s) observé(s)** : pas de portées viables à 40,1 mmole/kg d'EGEE. Aucun renseignement sur les effets induits par les autres doses n'a été donné.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** : aucun NOAEL ni LOAEL ne peut être proposé car toutes les doses testées ne sont pas renseignées ainsi que les effets correspondant.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenu : 3.a.

Exposition par voie cutanée

Hardin et al., 1982 :

- **Espèce étudiée** : rats femelles Sprague-Dawley vierges (200-225 g) et leurs portées.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 25 femelles.
- **Voie d'exposition** : voie cutanée, sur la peau inter-scapulaire rasée.
- **Temps et fréquence d'exposition** : un dépôt cutané, 4 fois par jour (intervalle de 2,5 heures entre deux dépôts) du 7^{ème} au 16^{ème} jour de gestation.
- **Doses ou concentrations d'exposition** : 2 concentrations : 0,25 mL et 0,5 mL de solution de 2-éthoxyéthanol par dépôt (Fisher Scientific, catalogue N°E-180, Lot 701071). 2 séries : toxicité maternelle, tératogénicité.

- **Groupe témoin** : 25 femelles, application d'eau sur la peau.
- **Effet(s) observé(s)** : à 0,25 mL : augmentations significatives du nombre de femelles ayant 100 % d'implants morts, de malformations squelettiques et de malformations cardiovasculaires ; diminutions significatives du nombre de fœtus vivants par portée, et du poids des fœtus. A 0,5 mL : 100 % de mort intra-utérine.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** :
 - Aucun NOAEL reprotoxique ne peut être établi.
 - LOAEL reprotoxique : 0,25 mL.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue : 2. e.

Hardin et al., 1984 :

- **Espèce étudiée** : rates Sprague-Dawley (1^{ère} parturition) et leurs portées.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 18 femelles.
- **Voie d'exposition** : voie cutanée, sur la peau inter-scapulaire rasée.
- **Temps et fréquence d'exposition** : un dépôt cutané, 4 fois par jour (intervalle de 2,5 heures entre deux dépôts) du 7^{ème} au 16^{ème} jour de gestation.
- **Doses ou concentrations d'expositions** : 0,25 mL de solution d'EGEE par dépôt (Fisher Scientific, catalogue N°E-180, Lot 70107).
- **Groupe témoin** : 17 animaux, application d'eau sur la peau.
- **Effet(s) observé(s)** : Observations de malformation fœtale : défauts cardiovasculaires, anus non-formé, acaudie, malformations vertébrales, faible ossification.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** :
 - Aucun NOAEL ne peut être défini à partir de cette étude.
 - LOAEL reprotoxique : 0,25 mL.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue : 2. e.

2.4.2.2. Effets sur la fertilité

Une diminution de la fertilité est observée chez les rongeurs. Une augmentation de mort intra-utérine est observée chez les femelles. Chez les mâles les principaux effets observés sont une toxicité testiculaire qui se manifeste par : une dégénérescence des tubules séminifères et une diminution du poids testiculaire, une augmentation des spermatozoïdes anormaux et des azoospermies. L'étude de Yoon et al., 2001 suggère que l'effet de l'EGEE par gavage sur la fonction testiculaire apparaît moins prononcé chez les rats en puberté que chez les rats adultes.

Les études disponibles sont présentées et détaillées ci-dessous en fonction de la voie d'exposition.

Exposition par inhalation

Barbee et al., 1984 :

- **Espèces étudiées** : lapins New Zealand White (2,1-3,3 kg), rats Sprague-Dawley CD (149-275 g).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 10 lapins par sexe et par groupe, 15 rats par sexe et par groupe.
- **Voie d'exposition** : inhalation.
- **Temps et fréquence d'exposition** : 6 h/jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines.
- **Doses ou concentrations d'exposition** : sous forme de vapeur. Concentrations nominales de 25, 100 et 400 ppm (92,5 - 390 et 1480 mg/m³), concentrations analytiques de 25 - 103 et 403 ppm.
- **Groupe témoin** : 10 lapins par sexe, 15 rats par sexe (exposés à de l'air).
- **Effet(s) observé(s)** : les 2 espèces présentent une augmentation de l'incidence de larmoiement, mais cette réponse n'est pas considérée par les auteurs comme proportionnelle à la concentration d'exposition. Le lapin est l'espèce la plus sensible.

Lapins : diminution significative du poids corporel chez les 2 sexes à 25 et à 403 ppm mais pas à 103 ppm ; diminution significative du poids testiculaire à 403 ppm. Observations histopathologiques : dégénérescence focale minime à légère de l'épithélium des tubules séminifères (3/10) sans altération de la spermatogénèse à 403 ppm. **Autres effets** : chez le lapin, anémie périphérique sans altération centrale (absence d'atteinte de l'érythropoïèse), avec augmentation de l'élimination des érythrocytes circulants à 403 ppm.

Rats : effets observés non significatifs aux 3 doses d'exposition, non spécifique de l'exposition.

- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL :**

Lapins : NOAEL reprotoxique (diminution du poids des testicules et dégénérescence focale légère de l'épithélium des tubules séminifères) : 103 ppm (\approx 380 mg/m³).

LOAEL reprotoxique : 403 ppm

Rats : NOAEL reprotoxique : 403 ppm.

- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : cette étude présente des données de qualité acceptable. Bien que, cette étude ait permis de mettre en évidence un effet sur les organes reproducteurs, elle n'a pas été mise en œuvre pour étudier la reprotoxicité de l'EGEE donc il n'y a aucune donnée concernant la fertilité, la gestation, les portées et la lactation.

Cotation de Klimisch retenue : 2. e.

Exposition par voie orale

Foster et al., 1984 :

- **Espèce étudiée** : rats.

- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : rats mâles, 36 par groupe de concentration.
- **Voie d'exposition** : voie orale (gavage).
- **Temps et fréquence d'exposition** : Expérience I : une dose unique et sacrifice des animaux 6 h et 24 h après l'exposition. Expérience II : une dose par jour pendant 2, 4, 7 et 11 jours.
- **Doses ou concentrations d'exposition** : 250, 500 et 1 000 mg/kg/j.
- **Groupe témoin** : 36 rats mâles, administration du véhicule une fois par jour, à savoir : 5 mL/kg d'eau.
- **Effet(s) observé(s)** :

Diminution significative du poids relatif des testicules chez les rats exposés 11 jours à une dose quotidienne de 500 ou 1 000 mg/kg. Les effets pour la dose de 500 mg/kg/j sont plus marqués que ceux pour la dose de 1 000 mg/kg/j. Une diminution progressive du taux des spermatozoïdes est observée, due à une dégénérescence par nécrose des cellules du premier stade de développement des spermatocytes et spermatides.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL** :

NOAEL reprotoxique (diminution du poids des testicules et du taux de spermatozoïdes) : 250 mg/kg/j.

LOAEL reprotoxique (diminution du poids des testicules et du taux de spermatozoïdes) : 500 mg/kg/j.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue : 2. e.

Lamb et al., 1984 :

- **Espèce étudiée** : souris CD-1, âgées de 11 semaines au début de l'expérience.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 20 mâles et 20 femelles par dose.
- **Voie d'exposition** : voie orale (eau de boisson).
- **Temps et fréquence d'exposition** : exposition séparée souris femelles et souris mâles, une fois par jour pendant 7 jours, puis période de cohabitation en couple de 14 semaines (98 jours) suivi de 21 jours en isolement. Les souris sont exposées également pendant les périodes de cohabitation et d'isolement.
- **Doses ou concentrations d'expositions** : 0,5 - 1 et 2 % d'EGEE dans l'eau de boisson.
- **Groupe témoin** : 40 mâles et 40 femelles, eau pure.
- **Effet(s) observé(s)** : infertilité des couples exposées à 2 % d'EGEE dans l'eau de boisson, diminution de la fertilité des couples exposées à 1 % d'EGEE (diminution significative du nombre de portée par couples fertiles, diminution significative du nombre de nouveaux-nés vivants par portée, diminution significative du poids des nouveaux-nés), diminution de l'index de fertilité des couples exposées à 1 % d'EGEE dans l'eau de boisson, infertilité des femelles exposées à 2 % d'EGEE dans l'eau de boisson en accouplement avec des mâles témoins, diminution de l'index de fertilité des rats mâles exposés à 2 % d'EGEE dans l'eau de boisson en accouplement avec des femelles témoins et diminution du nombre de nouveaux nés vivants par portée de ces couples, diminution de la fertilité des femelles exposées à 1 % d'EGEE dans l'eau de boisson (diminution significative du nombre de nouveaux-nés vivants par portée). Effets sur la spermatogénèse (à 2 % d'EGEE : diminution significative de la motilité spermatogénique, augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes

anormaux, diminution du poids des testicules ; à 1 % d'EGEE : augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes anormaux). Aucune lésion n'a été observée chez les femelles malgré les problèmes de fertilité rencontrés.

➤ **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL**

NOAEL reprotoxicité : 0,5 % d'EGEE dans l'eau de boisson.

LOAEL reprotoxicité (diminution de la fertilité, du nombre de nouveaux-nés vivants au sein de la portée et du poids des nouveaux-nés) : 1 % d'EGEE dans l'eau de boisson.

➤ **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de Klimisch retenue : 2. e.

Melnick et al., 1984 :

➤ **Espèce étudiée** : rats mâles et femelles Fischer 344/N (âgés de 7 semaines au début de l'expérience), souris mâles et femelles B6C3F₁ (âgées de 8 semaines au début de l'expérience).

➤ **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 50 animaux par sexe et par espèce pour chaque dose.

➤ **Voie d'exposition** : voie orale (gavage).

➤ **Temps et fréquence d'exposition** : une exposition par jour, 5 jours par semaine pendant 103 semaines (environ 2 ans).

➤ **Doses ou concentrations d'expositions** : 0,5 - 1,0 et 2,0 g/kg de p.c. d'EGEE dilué dans de l'eau déionisée.

➤ **Groupe témoin** : 50 animaux par sexe et par espèce, eau déionisée administrée.

➤ **Effet(s) observé(s)** :

Diminution du poids testiculaire chez les rats et les souris exposés à 2,0 g d'EGEE par kg de p.c.. Accroissement du nombre de lésions macroscopiques au niveau testiculaire à toutes les concentrations même aux plus faibles. Ces lésions provoquent la mort prématurée des rats exposés à 2,0 g d'EGEE par kg de p.c. et des souris exposées aux concentrations de 2,0 et 1,0 g d'EGEE par kg de p.c.. Diminution de la survenue de lésions sous-cutanées chez les rates Fischer 344 âgées.

➤ **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL**

Aucun NOAEL n'a peu être déterminé.

LOAEL reprotoxique (lésions testiculaires) : 0,5 g d'EGEE par Kg de p.c..

➤ **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de klimisch retenue : 2. e.

Zenick et al., 1984 :

➤ **Espèce étudiée** : rats Long-Evans âgées de 70 à 80 jours.

➤ **Sexe et nombre d'animaux par lot** : **Expérience I** : 4 mâles/groupe, **Expérience II** : 9 mâles/groupe pour l'observation des semences et 12 mâles pour l'histopathologie.

➤ **Voie d'exposition** : **Expériences I et II** : voie orale, intubation.

➤ **Temps et fréquence d'exposition** : **Expérience I** : une fois par jour pendant 5 jours consécutifs, accouplement puis observations (comportement sexuel et échantillons de semences récoltés dans le vagin des femelles 15 minutes après l'accouplement) les 1^{ère}, 4^{ème}, 7^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} semaines à compter du lendemain du 5^{ème} jour d'exposition. **Expérience II** : une fois par jour pendant 5 jours consécutifs par semaine pendant 6 semaines, observations des semences chaque semaine. Plus observation histopathologiques.

- **Doses ou concentrations d'expositions :** *Expérience I* : 3 doses : 936, 1972 et 2808 mg/kg p.c.. *Expérience II* : 1 dose : 936 mg/kg p.c..
- **Groupe témoin :** *Expérience I* : 4 mâles. *Expérience II* : 9 mâles pour l'étude des semences et 2 mâles de plus pour l'histopathologie.
- **Effet(s) observé(s) :** *Expérience I* : pas d'effet sur le comportement sexuel. Diminution significative du nombre de spermatozoïdes par éjaculât à toutes les concentrations. C'est à la 7^{ème} semaine (à partir du début du traitement) que les diminutions les plus drastiques sont observées : les mâles exposés à la moyenne et à la forte dose présentent une azoospermie et une diminution significative des formes normales des spermatozoïdes pour la plus faible dose. A la 10^{ème} semaine, récupération quasi-totale, quelques lésions résiduelles au niveau des tubules séminifères. *Expérience II* : diminutions significatives du nombre de spermatozoïdes et du pourcentage de spermatozoïdes normaux aux semaines 5 et 6, diminution significative de la mobilité des spermatozoïdes la 6^{ème} semaine. Diminution significative du poids des testicules et de l'épididyme. Au niveau histologique : des altérations ont été observées dès la 1^{ère} semaine : vacuolisation des tubules directement sous le noyau des cellules de Sertoli et spermatocytes avec des noyaux pycnotiques ; à partir de la 2^{ème} et de la 3^{ème} semaine les tubules séminifères sont affectés avec une exfoliation des cellules germinales. Absence totale de spermatocytes du stade leptotène-zygote.
- **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL :**
Expérience I : aucun NOAEL n'a pu être déterminé, LOAEL reprotoxique : 936 mg/kg.
Expérience II : LOAEL reprotoxique : 936 mg/kg (attention une seule dose a été testée).
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch) :** Cotation de Klimisch retenue : 2.e.

Yoon et al., 2001 :

- **Espèce étudiée :** rats.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** rats mâles en puberté et rats mâles adultes, 5 par groupe de dose.
- **Voie d'exposition :** voie orale (gavage).
- **Temps et fréquence d'exposition :** 1 fois par jour, 6 fois par semaine pendant 4 semaines.
- **Doses ou concentrations d'exposition :** 50, 100, 200 et 400 mg/kg/j.
- **Groupe témoin :** 5 rats en puberté et 5 rats adultes.
- **Effet(s) observé(s) :**
 Diminution du poids testiculaire et augmentation du poids de l'épididyme chez les rats en puberté et chez les rats adultes quelle que soit la dose. La diminution du poids des testicules est significative quelle que soit la dose chez le rat adulte et chez le rat en puberté. A la dose de 400 mg/kg, la diminution est davantage significative chez les rats adultes que chez les rats en puberté. Il en est de même pour l'augmentation du poids de l'épididyme. L'EGEE n'affecte pas les 4 types de population cellulaires des testicules chez le rat en puberté quelle que soit la dose, montrant aucun effet de l'EGEE sur la spermatogenèse chez les rats en puberté. Chez les rats adultes, à la dose de 400 mg/kg, l'EGEE induit une diminution significative de la proportion relative

des cellules haploïdes matures et immatures et une augmentation significative de la proportion relative des cellules diploïdes et triploïdes.

➤ **Possibilité de déterminer un NOAEL ou un LOAEL**

Pour le changement du poids des testicules et de l'épididyme : aucun NOAEL reprotoxique n'a pu être déterminé.

LOAEL reprotoxique : 50 mg/kg/j chez le rat en puberté et chez le rat adulte.

Pour l'atteinte de la spermatogénèse : NOAEL reprotoxique : 400 mg/kg/j chez le rat en puberté.

NOAEL reprotoxique : 200 mg/kg/j chez le rat adulte.

LOAEL reprotoxique : 400 mg/kg/j chez le rat adulte.

➤ **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : Cotation de klimisch retenue : 2. e.

2.4.3. Mécanismes d'action proposés

Les études mécanistiques chez l'homme indiquent que la toxicité sur la fertilité (toxicité testiculaires) est due au principal métabolite de l'EGEE produit par l'alcool déhydrogénase puis par l'aldéhyde déshydrogénase qui est l'acide 2-éthoxyacétique (2-EAA) (IPCS INCHEM, 1990).

Chez l'animal, les mécanismes d'action sont imparfaitement connus. Les études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que la toxicité de l'EGEE est due à ses métabolites dont le principal est le 2-EAA. Concernant l'effet sur la fertilité, Foster *et al.*, 1983 ont montré que la première lésion visible au niveau des spermatozoïdes pachytènes se situait au niveau des mitochondries. Le 2-EAA agit lors de la maturation méiotique des spermatocytes (Inserm, 1999, 2006).

2.5. Analyse de la cohérence des données animales et humaines

2.5.1. Cohérence de la toxicocinétique

Chez l'homme, l'EGEE est rapidement absorbé quelle que soit la voie d'exposition et se distribue largement et sans accumulation dans l'organisme. Chez l'animal, le taux d'absorption de l'EGEE par voie orale, le seul connu, est compris entre 76 et 80 %.

Le métabolisme du EGEE est identique chez l'homme et l'animal et se fait par deux voies oxydatives principales : en présence de mono-oxygénase à cytochrome P-450 et par action de déshydrogénases. Ces secondes étapes conduisent à la formation et à l'excrétion d'acide 2-éthoxyacétique, responsable des effets toxiques : hématologiques, testiculaires et fœtotoxiques.

Une étude de toxicocinétique sur l'EGEE a été menée chez les rates en gestation et chez les femmes enceintes en utilisant un modèle PBPK (Gargas *et al.*, 2000). Il a été calculé que les femmes enceintes devraient être exposées à 12 ppm et à 60 ppm d'EGEE, 8 heures par jour, 5 jours par semaine pendant toute la durée de la grossesse pour que la concentration en acide 2-éthoxyacétique (2-EAA – métabolite principal de l'EGEE) dans le sang maternel

soit équivalente à celle chez les rats exposés 6 heures par jour du 11^{ème} au 15^{ème} jour de gestation respectivement à 10 ppm (NOEL) et à 50 ppm (LOEL) d'EGEE.

2.5.2. Cohérence des effets et de la toxicodynamie

L'acide 2-éthoxyacétique, produit au cours de la métabolisation oxydative, affecte les cellules cibles en interférant au niveau de leur production énergétique (inhibiteur compétitif du cycle de Krebs) et de leur biodisponibilité des unités carbonées nécessaires à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques. Ces deux mécanismes toxiques cellulaires entraînent un arrêt de la prolifération cellulaire et de la différenciation de l'épithélium séminifère. Ces effets sont aussi bien décrits chez l'homme que chez l'animal (IPCS INCHEM, 1990).

2.5.3. Bilan de la cohérence

En l'absence de données humaines permettant de définir un NOAEL ou LOAEL sans co-exposition, les données expérimentales animales vont être utilisées et transposées à l'homme. Les mécanismes d'action de l'EGEE entre l'animal et l'homme sont relativement similaires et la toxicocinétique entre ces deux espèces semble être proche.

De plus, la formation d'acide 2-éthoxyacétique est responsable des effets toxiques (altération de la prolifération cellulaire) sur le fœtus (animal) et le testicule (animal et homme).

2.6. Comparaison des indices de toxicité en fonction des effets et VTR existantes

L'effet reprotoxique, par rapport aux autres effets systémiques, apparaît comme un effet critique aussi bien chez l'homme que chez l'animal (voir chapitre 2.3 et 2.4).

D'après les données sur l'exposition (IPCS/INCHEM, 1990), l'homme est exposé à l'EGEE majoritairement par inhalation et par voie cutanée. L'exposition par voie orale est très minime et aucune donnée n'est disponible sur les effets reprotoxiques induits chez l'homme après une exposition par voie orale à l'EGEE. Les données résultant d'expositions **par inhalation** à l'EGEE sont donc à privilégier par rapport aux données de toxicité par voie orale pour l'élaboration d'une VTR. Seules des VTR pour une exposition par **inhalation** seront construite et proposées dans ce document.

Concernant les données disponibles chez l'homme, le principal inconvénient résulte des co-expositions à différents composés toxiques pouvant être responsables d'effets sur la reproduction. Pour cette raison, notamment, aucun NOAEL ni LOAEL n'a pu être identifié à partir de ces études. Par contre, ces études ont mis en évidence qu'une exposition à **4,6 et à**

2,6 ppm d'EGEE induit des effets sur la fertilité masculine (diminution du volume du liquide séminal et de la concentration de spermatozoïdes par éjaculât).

2.6.1. Présentation des NOAEL et LOAEL

Les données expérimentales par inhalation disponibles et détaillées précédemment dans le chapitre 2.4.2 sont toutes de qualité plus ou moins équivalentes sans qu'une étude soit clairement meilleure que les autres. Parmi ces études, certaines ont permis de définir un NOAEL ou un LOAEL reprotoxique.

Le tableau ci-après présente les études ayant permis de proposer un NOAEL ou un LOAEL pour les effets reprotoxiques de l'EGEE. Sont également indiqués, les effets critiques à partir desquels les NOAEL ou LOAEL ont été établis et les animaux qui ont été testés dans les études.

Tableau 1 : NOAEL et LOAEL pouvant être définis pour les effets reprotoxiques de l'EGEE.

| Etude retenue | NOAEL / LOAEL établis | Effet critique | Espèces animales |
|-----------------------------|---|---|--|
| Doe <i>et al.</i> , 1984 | NOAEL : 50 ppm (184 mg/m³) | Effet sur le développement - Fœtotoxicité : Défaut cardiovasculaire, défaut de la paroi abdominale, défauts squelettiques mineurs, côtes rudimentaires surnuméraires et apparition de côtes d'une longueur supérieure à la normale. (effets significatifs à 175 ppm.) | Lapins femelles (Dutch) |
| Barbee <i>et al.</i> , 1984 | NOAEL : 103 ppm (380 mg/m³) | Effet sur la reproduction : fertilité : Diminution significative du poids testiculaire et dégénérescence focale minime à légère de l'épithélium des tubules séminifères sans altération de la spermatogénèse. Autres effets : anémie périphérique sans altération centrale (absence d'atteinte de l'érythropoïèse), avec augmentation de l'élimination des erythrocytes circulants à 403 ppm. | Lapins mâles et femelles (New Zealand White) |

En ce qui concerne les effets sur le développement, les autres études expérimentales citées dans le chapitre 2.4.2 n'ont pas permis d'établir de NOAEL ni de LOAEL fiables. En effet, à partir de certaines études des LOAEL ont pu être établis, mais dans ce cas, soit ce LOAEL est la seule concentration qui a été testée dans l'étude (Nelson *et al.*, 1981, 1982a, 1982b, 1984 et Nelson et Brightwell, 1984), soit au niveau de ce LOAEL, une toxicité maternelle a

été également constatée (Andrew et Hardin, 1984). L'étude de Doe *et al.*, 1984 ayant permis de déterminer un NOAEL pour des effets sur le développement chez les lapins (voir tableau ci-dessus) a été également menée chez les rats, mais dans ce cas, l'établissement de NOAEL ou de LOAEL est difficile car l'augmentation des pertes pré-implantatoires et la diminution du nombre de fœtus par portée sont significatives à 10 et 50 ppm mais pas à 250 ppm (phénomène qui s'explique par le fait que le nombre de femelles gravides est plus faible à 250 ppm). De plus, le retard de croissance fœtale, la diminution du poids fœtal moyen (lié au retard de croissance), la réduction de l'ossification et l'existence d'anomalies mineures notamment au niveau du squelette sont des effets uniquement significatifs à 250 ppm. Enfin, L'étude de Barbee *et al.*, 1984 est la seule étude disponible qui a étudié après une exposition par inhalation les effets sur la reproduction et plus précisément les effets sur la fertilité masculine (voir chapitre 2.4.2.2).

2.6.2. Présentation des VTR existantes

Les différents organismes proposant des VTR ont été consultés, notamment les organismes les plus reconnus (OMS, ATSDR, US-EPA / IRIS, Santé Canada, RIVM et OEHHA) pour une revue des valeurs existantes. Il apparaît que seuls l'US-EPA (IRIS) et l'OEHHA ont proposé une VTR pour l'EGEE. L'US EPA a établi une RfC de 2.10^{-1} mg/m³ en 1991 pour les effets reprotoxiques induits par l'EGEE et l'OEHHA a déterminé un REL de 7.10^{-2} mg/m³ en 2005 (voir tableau ci-dessous). Aucune VTR pour les autres effets systémiques n'a été proposée.

Tableau 2 : Valeurs toxicologiques de référence disponibles dans la littérature

| Organisme (année) | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR | Dose critique | UF | Etude toxicologique utilisée |
|------------------------------------|--|----------------------|-----------------------|---|---|------|------------------------------------|
| US EPA/ IRIS (1991) | Reproduction (testicules) et effet systémique (sang) | Respiratoire | Chronique | RfC = $2 \cdot 10^{-1}$ mg/m ³ | NOAEL = 380 mg/m ³ (103 ppm) NOAEL (HEC) = 68 mg/m ³ | 300 | Barbee <i>et al.</i> , 1984 |
| OEHHA (2005) | Reproduction (testicules) et effet systémique (sang) | Respiratoire | Chronique | REL = $7 \cdot 10^{-2}$ mg/m ³ | NOAEL = 380 mg/m ³ (103 ppm) NOAEL (HEC) = 68 mg/m ³ | 1000 | Barbee <i>et al.</i> , 1984 |

2.6.2.1. Présentation de l'étude critique prise en compte

L'US-EPA et l'OEHHA retiennent la même étude critique soit, l'étude de Barbee *et al.*, 1984 réalisée par inhalation chez le lapin et le rat. Voir la description de cette étude page 25.

2.6.2.2. Justification scientifique de l'US-EPA et de l'OEHHA

L'US-EPA se base sur les données de l'étude de Barbee *et al.* (1984) et en a déduit un NOAEL de 380 mg/m³ (103 ppm). Un NOAEL_{ADJ} et un NOAEL_{HEC}¹ ont ensuite été calculés de la façon suivante :

$$\text{NOAEL}_{\text{ADJ}} = \text{NOAEL} \times 6\text{h}/24\text{h} \times 5j/7j = 68 \text{ mg/m}^3$$

NOAEL_{HEC} = NOAEL_{ADJ} × λ animal / λ homme = 68 mg/m³. λ étant le coefficient de partage sang / air. Ces paramètres n'étant pas connus pour l'EGEE, le rapport des coefficients de partage sang / air animal / homme a été considéré par défaut égal à 1.

Un facteur d'incertitude de 300 a été ensuite appliqué au NOAEL_{HEC}. Un facteur 10 pour les variations intra-espèces, un facteur 3 pour les variations inter-espèces et un facteur 10 pour l'utilisation de données de toxicité sub-chroniques.

¹ HEC = Human equivalent concentration

Calcul : $68 \text{ mg/m}^3 (\text{NOAEL}_{\text{HEC}}) \times 1/10 \times 1/3 \times 1/10 = 2.10^{-1} \text{ mg/m}^3$

En parallèle de cette étude, l'US EPA a également résumé les études par inhalation chez le rat de Doe (1984) et Nelson *et al.* (1981, 1982a, b). Ces études sont des études de toxicité de la reproduction *sensus stricto* qui montrent des modifications hématologiques chez les mères (Doe, 1984), des pertes fœtales (mortalité intra-utérine) (Doe, 1984 ; Nelson *et al.* 1981) ou des modifications neurologiques au cours du développement des portées (Nelson *et al.*, 1981, 1982 a,b).

Selon l'US EPA, le choix de leur étude est conforté par les données disponibles chez l'homme qui sont des atteintes testiculaires reportées dans les études de Welch *et al.* (1988) et Ratcliffe *et al.* (1989). Les résultats des études chez le rat par inhalation sont contre-balancés par les résultats d'études *per os* chez le rat pour lesquelles les effets tératogènes (résorption fœtale) ne sont pas aussi évidents.

L'OEHHA a suivi le même raisonnement que l'US EPA, il s'est basé sur la même étude critique (Barbee *et al.* 1984) et a retenu un NOAEL de 380 mg/m^3 (103 ppm). Un NOAEL_{ADJ} de 68 mg/m^3 et un NOAEL_{HEC} de 68 mg/m^3 ont ensuite été calculés. La différence entre les VTR proposées par l'US EPA et par l'OEHHA réside dans la valeur du facteur d'incertitude global appliqué au NOAEL_{HEC}. Ce facteur est de 1 000 (un facteur 10 pour les variations intra-espèces, un facteur 10 pour les variations inter-espèces et un facteur 10 pour l'utilisation de données de toxicité sub-chronique) pour l'OEHHA au lieu de 300 pour l'US EPA. L'OEHHA décide d'appliquer un facteur de 10 pour les variations inter-espèces au lieu de 3 (US EPA) car les coefficients de partage sang-air utilisés dans le calcul du NOAEL_{HEC} ne sont pas disponibles pour l'EGEE et rapport de ces coefficients animal/homme a été considéré par défaut égal à 1.

2.7. Conclusion

Par rapport aux données disponibles deux types d'effet reprotoxiques peuvent être retenus pour l'EGEE, des effets sur la **reproduction et plus précisément sur la fertilité masculine** et des effets sur le **développement**. Ces deux types d'effets peuvent être pris en compte pour établir des VTR reprotoxiques.

Après analyse des études disponibles, deux études expérimentales permettent d'établir des doses critiques pour les effets sur la fertilité et pour les effets sur le développement induits par l'EGEE après inhalation. Ces études sont respectivement l'étude de Barbee *et al.*, 1984 et celle de Doe *et al.*, 1984. Ces deux études sont de qualité acceptable et égale. La cotation de Klimisch réalisée pour ces deux études est identique, soit 2.e.

Bien que l'étude de Barbee *et al.*, 1984 ait permis de mettre en évidence un effet sur les organes reproducteurs, elle n'a pas été mise en œuvre pour étudier la reprotoxicité induite par l' EGEE. Aucune donnée n'est donc disponible concernant la fertilité, la gestation, les portées et la lactation. Cette étude relate des effets de l'EGEE sur les testicules qui sont connus pour être un des organes cibles de cette substance. Toutefois, la diminution du poids testiculaire est à nuancer en raison d'une altération de l'état général des mâles exposés à 403 ppm. Les atteintes histologiques sont minimes et uniquement observées chez 30 % des animaux. Toutefois, l'effet critique retenu est pertinent au regard des données de toxicocinétique et toxicodynamie et en accord avec les données humaines.

Les données de l'étude de Doe *et al.* (1984) concernent les effets sur le développement de l'EGEE chez le lapin et le rat, le lapin étant l'espèce de choix pour les études sur la reproduction et surtout des effets tératogènes. Cette étude est également de qualité acceptable et permet d'établir un NOAEL pour des effets sur le développement chez le lapin. Toutefois, ces effets n'ont pas été clairement mis en évidence chez l'homme.

3. La construction de la VTR

3.1. Identification d'une dose critique

3.1.1. Présentation des doses repères

Deux NOAEL peuvent être établis pour une exposition par inhalation :

- Un NOAEL de 103 ppm (380 mg/m³), déduit de l'étude de Barbee *et al.*, 1984, pour des effets sur **les testicules de lapins mâles** après une exposition **sub-chronique**
- et un NOAEL de 50 ppm (184 mg/m³) élaboré à partir de l'étude de Doe *et al.*, 1984 pour des effets de l'EGEE sur **le développement chez le lapin** après une exposition **aiguë** (14 jours) (voir tableau ci-après).

Tableau 3 : Doses repères définies pour les effets reprotoxiques de l'EGGE et pouvant être retenues pour l'élaboration de VTR reprotoxiques

| Etude retenue | NOAEL / LOAEL établis | Durée d'exposition | Effet critique | Espèces animales |
|-----------------------------|---|--|---|--|
| Barbee <i>et al.</i> , 1984 | NOAEL : 103 ppm (380 mg/m³) | 6h/j, 5 jours par semaine pendant 13 semaines | <u>Effet sur la reproduction :</u> fertilité : Diminution significative du poids testiculaire et dégénérescence focale minime à légère de l'épithélium des tubules séminifères sans altération de la spermatogénèse. Autres effets : anémie périphérique sans altération centrale (absence d'atteinte de l'erythropoïèse), avec augmentation de l'élimination des erythrocytes circulants à 403 ppm. | Lapins mâles et femelles (New Zealand White) |
| Doe <i>et al.</i> , 1984 | NOAEL : 50 ppm (184 mg/m³) | 6h/j du 6 ^{ème} au 19 ^{ème} jour | <u>Effet sur le développement - Fœtotoxicité :</u> Défaut cardiovasculaire, défaut de la paroi abdominale, défauts squelettiques mineurs, côtes rudimentaires surnuméraires et apparition de côtes d'une longueur supérieure à la normale. (effets significatifs à 175 ppm.) | Lapins femelles (Dutch) |

Il n'apparaît pas pertinent de déterminer de VTR pour les effets induits par l'EGEE par voie orale car l'inhalation est la voie d'exposition majoritaire chez l'homme (voir chapitre 2.6).

Les études de Barbee *et al.*, 1984 et de Doe *et al.*, 1984 ont été transmises à l'Unité TOXI de l'INERIS (équipe modélisation) afin de savoir s'il est possible d'établir une BMD (Benchmark dose) à partir de ces études. Les différences pharmacocinétiques entre le lapin et l'homme seront également prise en compte, si cela est possible, avec intégration d'un modèle PBPK 'Physiologically Based Pharmacokinetic' ou d'un autre type de modèle. Les BMD ainsi calculées seront comparées aux NOAEL/LOAEL identifiés à partir de ces études et une discussion aura lieu au sein du groupe 'Afssset' afin de mettre en évidence s'il est

préférable d'établir les VTR à partir des NOAEL ou à partir des BMD qui seront ainsi calculées (travail prévu pour l'année 2007).

3.1.2. Dose critique retenue

Les deux NOAEL présentés ci-dessus, le NOAEL de 103 ppm élaboré pour les effets sur la fertilité masculine et pour une durée d'exposition sub-chronique et celui de 50 ppm établi pour les effets sur le développement et pour une durée d'exposition aiguë (14 jours) sont retenus pour élaborer deux types de VTR reprotoxiques. Une VTR pour protéger des effets sur la fertilité masculine et une pour protéger des effets sur le développement.

L'effet de l'EGEE sur la fertilité masculine observé dans l'étude de Barbee *et al.*, 1984 chez le lapin a été également bien identifié et décrit chez l'homme. Dans ce cas, il apparaît justifié de retenir le NOAEL de 103 ppm établi à partir de l'étude de Barbee *et al.*, 1984 et pour une durée d'exposition sub-chronique afin d'élaborer une VTR reprotoxique. Cette VTR ainsi établie sera valide pour une durée d'exposition sub-chronique.

Il peut être, également, envisagé de retenir comme effet critique de l'EGEE, l'effet sur le développement. Cet effet a été mis en évidence chez l'animal (lapin) mais aucune étude n'est disponible concernant l'induction de ce type d'effet chez l'homme. Toutefois, par précaution en raison du manque d'information chez l'homme, il est proposé de retenir le NOAEL de 50 ppm identifié dans l'étude de Doe *et al.*, 1984 pour établir une VTR 'développement'. Cette VTR permettra de protéger les femmes enceintes après une exposition aiguë à l'EGEE.

3.2. Facteurs d'incertitude

3.2.1. VTR pour les effets sur la fertilité

Les deux VTR reprotoxiques actuellement proposées par l'US EPA (IRIS) et par l'OEHHA pour une exposition chronique ont été élaborées pour les effets de l'EGEE sur la fertilité à partir de l'étude de Barbee *et al.*, 1984, étude que nous avons également retenue.

La différence entre les deux VTR proposées par ces organismes (US EPA : 2.10^{-1} mg/m³ et OEHHA : 7.10^{-2} mg/m³) résulte dans l'application de facteurs d'incertitude différents. L'US EPA applique un facteur d'incertitude de 300 et l'OEHHA un facteur de 1 000. L'US EPA décide de prendre un facteur 3 pour les variations inter-espèces en justifiant par le fait qu'il a calculé un NOAEL_{ADJ} et un NOAEL_{HEC}. Or, les coefficients de partage sang-air utilisés dans le calcul du NOAEL_{HEC} ne sont pas disponibles pour l'EGEE et le rapport de ces coefficients

animal/homme a été considéré par défaut égal à 1 ce qui, selon nous, justifie l'application d'un facteur 10 (principe de précaution) pour la variation inter-espèce comme le propose l'OEHHA et non d'un facteur 3.

Nous proposons d'élaborer une VTR pour les effets sur la fertilité de l'EGEE qui soit valide pour une exposition sub-chronique (temps de l'exposition dans l'étude) à partir du NOAEL de 103 ppm identifié dans l'étude de Barbee *et al.*, 1984 et ceci conformément à la méthode décrite dans le document de l'Afsset.

En raison du manque de données concernant la variabilité de la population humaine vis à vis de l'EGGE et du manque de données sur les différences pharmacocinétiques et dynamiques de l'EGEE entre le lapin et l'homme, les facteurs d'incertitude appliqués par défaut sont les suivants :

Variation Inter-espèce : 10

Variation intra-espèce : 10

Les facteurs d'incertitude inter-espèce et intra-espèce respectivement de 10 et de 10 pourront être modifiés en fonction des résultats obtenus par le modèle PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetic) ou par un autre type de modèle réalisé par l'équipe modélisation de l'unité TOXI de l'INERIS, si cela est possible.

3.2.2. VTR pour les effets sur le développement

Aucune VTR pour les effets de l'EGEE sur le développement n'a été proposée par les organismes reconnus.

Nous proposons d'élaborer une VTR pour les effets sur le développement et qui sera valide pour une exposition aiguë (temps de l'exposition dans l'étude) à partir du NOAEL de 50 ppm (Doe *et al.*, 1984).

Comme pour la construction de la VTR pour les effets sur la fertilité masculine, les facteurs d'incertitude par défaut qui sont appliqués sont les suivants :

Variation inter-espèce : 10

Variation intra-espèce : 10

3.3. Discussion et présentation des VTR

Deux VTR reprotoxiques peuvent être proposées pour l'EGEE après une exposition par inhalation, une VTR pour les effets sur la fertilité masculine qui sera valide pour une

exposition sub-chronique et une VTR pour les effets sur le développement, applicable pour une exposition aiguë (24 heures).

3.3.1. Elaboration de la VTR pour les effets sur la fertilité par inhalation

Tableau 4 : Proposition de VTR pour les effets de l'EGEE sur la fertilité

| Etude critique retenue | Effet critique retenu | Espèces étudiées | Durée d'exposition dans l'étude | Dose critique | UF | VTR proposée |
|------------------------|---|----------------------------------|--|---|--|--|
| Barbee et al., 1984 | <u>Effet : fertilité :</u> Diminution significative du poids testiculaire et dégénérescence focale minime à légère de l'épithélium des tubules séminifères sans altération de la spermatogénèse. <u>Autres effets :</u> anémie périphérique avec augmentation de l'élimination des érythrocytes circulants | Lapins mâles (New Zealand White) | 6h/j, 5j par semaine pendant 13 semaines | NOAEL = 380 mg/m ³ (103 ppm) [*] NOAEL _{ADJ} = 68 mg/m ³ | 100 10 Inter-espèce, 10 intra-espèce | VTR = 0,7 mg/m ³ (sub-chronique) |

* NOAEL_{ADJ} = ce calcul a été réalisé par prudence en raison des données par voie orale qui ont montré que l'effet de l'EGEE sur la fertilité augmente en fonction du temps d'exposition (Foster et al., 1984) Aucune donnée par inhalation est disponible, ni aucune donnée sur la différence entre une exposition discontinue et une exposition continue.

Remarques concernant l'élaboration de la VTR pour les effets sur la fertilité :

Etude critique : l'étude de Barbee et al., 1984 n'a pas été mise en œuvre pour étudier la reprotoxicité de l'EGEE bien qu'elle ait permis de mettre en évidence un effet sur les organes reproducteurs. Ainsi, aucune donnée n'est disponible sur la fertilité, la gestation, les portées et la lactation. La diminution du poids testiculaire observée est à nuancer en raison d'une altération de l'état général des mâles exposés à 403 ppm. Les atteintes histologiques sont minimes et uniquement observées chez 30 % des animaux.

Durée d'exposition pour laquelle la VTR est applicable : dans l'étude de Barbee et al., 1984 les lapins mâles ont été exposés pendant 13 semaines (90 jours), soit une exposition sub-

chronique. Il a alors été décidé, en accord avec la méthode de construction des VTR reprotoxiques présentée dans le document de référence de l'Afsset, que la VTR établie pour les effets de l'EGEE sur la fertilité masculine soit applicable pour une durée d'exposition sub-chronique. La moyenne de la concentration d'EGEE pour une exposition sub-chronique ne doit pas dépasser 0,7 mg/m³.

Facteurs d'incertitude : en raison du manque de données sur les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'EGEE chez le lapin et chez l'homme et du manque de données concernant la variabilité au sein de la population humaine face à une exposition par inhalation à l'EGEE, des facteurs d'ordre conventionnel ont été appliqués au NOAEL. Un travail au sein de l'équipe modélisation de l'INERIS (Unité TOXI) est en cours afin d'établir un modèle pharmacocinétique et pharmacodynamique. Ce modèle pourra sans doute nous aider à ajuster le facteur d'incertitude proposé pour les variations inter-espèce et peut-être celui pour les variations intra-espèce.

3.3.2. Elaboration de la VTR pour les effets sur le développement

Tableau 5 : Proposition de VTR pour les effets de l'EGEE sur le développement

| Etude critique retenue | Effet critique retenu | Espèces étudiées | Durée d'exposition dans l'étude | Dose critique | UF | VTR proposée |
|------------------------|---|-------------------------|--|--|--|--|
| Doe et al., 1984 | <u>Effet sur le développement - Fœtotoxicité :</u> Défaut cardiovasculaire, défaut de la paroi abdominale, défauts squelettiques mineurs, côtes rudimentaires surnuméraires et apparition de côtes d'une longueur supérieure à la normale. | Lapins femelles (Dutch) | Du 6 ^{ème} au 19 ^{ème} jour de gestation | NOAEL = 184 mg/m ³ (50 ppm) | 100 10 inter-espèce, 10 intra-espèce | VTR = 1,84 mg/m³ (0,5 ppm) (Aiguë, 24 h) |

Remarques concernant l'élaboration de la VTR pour les effets sur le développement :

Etude critique : l'étude de Doe et al., 1984 est de qualité acceptable, elle a été cotée 2.e. dans la cotation de Klimisch et al., 1997.

Effet critique : ce type d'effet (développement) n'a été constaté que chez l'animal, aucune donnée n'est disponible chez l'homme.

Durée d'exposition pour laquelle la VTR est applicable : dans l'étude de Doe et al., 1984, les lapins femelles ont été exposés à l'EGEE du 6^{ème} au 19^{ème} jour de gestation, soit pendant 14 jours. Le document de référence de l'Afsset présentant la méthode de construction des VTR reprotoxiques indique qu'en absence de données précises sur le moment exact de l'organogénèse auquel agit la substance étudiée, la VTR établie pour les effets sur le développement sera applicable pour une exposition aiguë de 24 heures.

Facteurs d'incertitude : Comme pour l'élaboration de la VTR pour les effets sur la fertilité, des facteurs conventionnels ont été appliqués au NOAEL en raison du manque de données sur les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'EGEE chez l'animal et chez l'homme et sur la variabilité au sein de la population humaine. Le travail en cours au sein de l'équipe modélisation de l'INERIS (Unité TOXI) pourra sans doute nous aider à ajuster les facteurs d'incertitude proposés ci-dessus.

4. Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence qu'il était possible d'établir des VTR pour les effets reprotoxiques induits par l'EGEE et ceci en suivant le cahier des charges et le document de référence sur la méthode de construction des VTR reprotoxiques proposé par l'Afsset.

Après une revue exhaustive des effets reprotoxiques induits par l'EGEE, nous avons élaboré une VTR de 7.10^{-1} mg/m³ pour les effets de l'EGEE sur la fertilité masculine. Cette valeur est valide pour une exposition sub-chronique. L'US EPA (1991) et l'OEHHA ont respectivement établi une VTR de 2.10^{-1} mg/m³ (RfC) et de 7.10^{-2} mg/m³ (REL) pour les effets de l'EGEE sur la fertilité masculine, mais ces valeurs sont applicables pour une exposition chronique. Les trois VTR citées ci-dessus ont été élaborées à partir de la même étude source, la différence entre ces valeurs résidant dans la durée d'exposition pour laquelle la VTR est valide et dans les facteurs d'incertitude appliqués.

Notre travail a également permis d'élaborer une VTR pour les effets de l'EGEE sur le développement. Cette valeur de 1,84 mg/m³ est valide pour une exposition aiguë de 24 h.

Cette étude a également mis en évidence les points pour lesquels un travail plus approfondi et des discussions au sein d'un groupe d'experts sont nécessaires. C'est le cas notamment du calcul et de l'utilisation d'une BMD/BMC et des facteurs d'incertitude. Le document sur la méthode de construction des VTR reprotoxiques proposé par l'Afsset est encore en modification par le groupe d'experts et il est prévu, en 2007, de constituer des groupes de travail sur des thèmes plus précis tels que les BMD/BMC, l'ajustement allométrique et les facteurs d'incertitude.

5. Bibliographie

Andrew F.D. et Hardin B.D. (1984) Developmental effects after inhalation exposure of gravid rabbits and rats to ethylene glycol monoethyl ether. Environmental Health Perspectives, **57**, 13-23.

Barbee S.J., Terrill J.B., DeSousa D.J. et Conaway C.C. (1984) Subchronic inhalation toxicology of ethylene glycol monoethyl ether in the rat and the rabbit. Environmental Health Perspectives, **57**, 157-163.

Doe J.E. (1984) Ethylene glycol monoethyl ether and ethylene glycol monoethyl ether acetate teratology studies. Environmental Health Perspectives, **57**, 33-41.

INSERM (1999). Ethers de Glycol : Quels risques pour la santé ? Collection expertise collective Inserm, Edition Inserm, Paris.

INSERM (2006). Ethers de Glycol : Nouvelles données toxicologiques. Collection expertise collective Inserm, Edition Inserm, Paris.

Foster P.M.D., Creasy D.M., Foster J.R. et Gray T.J.B. (1984) Testicular toxicity produced by ethylene glycol monoethyl and monoethyl ethers in the rat. Environmental Health Perspectives, **57**, 207-217.

Fucik J. (1969) Poisoning by ethylene glycol monoethyl ether. Prac. Lek., **21**, 116-118.

Gargas M.L., Tyler, T.R., Sweeney L.M., Corley, R.A., Weitz, K.K., Mast, T.J., Paustenbach D.J., Hays, S.M. (2000) A toxicokinetic study of inhaled ethylene glycol monomethyl ether (2-ME) and validation of a physiologically based pharmacokinetic model for the pregnant rat and human. Toxicology and Applied Pharmacology **165**, 53-62 (2000)

Hardin B.D., Niemeier R.W., Smith R.J., Kuczuk M.H., Mathinos P.R. et Weaver T.F. (1982) Teratogenicity of 2-ethoxyethanol by dermal application. Drug and Chemical Toxicology, **5** (3), 277-294.

Hardin B.D., Goad P.T. et Burg J.R. (1984) Developmental toxicity of four glycol ethers applied cutaneously to rats. Environmental Health Perspectives, **57**, 69-74.

Johnson E.M., Gabel B.E.G. et Larson J. (1984) Developmental toxicity and structure/activity correlates of glycols and glycol ethers. Environmental Health Perspectives, **57**, 135-139.

Lamb J.C., Gulati D.K., Russell V.S., Hommel L. et Sabharwal P.S. (1984) Reproductive toxicity of ethylene glycol monoethyl ether tested by continuous breeding of CD-1 mice. Environmental Health Perspectives, **57**, 85-90.

Melnick R.L. (1984) Toxicities of ethylene glycol and ethylene glycol monoethyl ether in Fischer 344/N rats and B6C3F₁ mice. Environmental Health Perspectives, **57**, 147-155.

Nelson B.K et Brightwell W.S. (1984) Behavioral teratology of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers. Environmental Health Perspectives, **57**, 43-46.

Nelson B.K., Brightwell W.S. et Setzer J.V. (1982) Prenatal interactions between ethanol and the industrial solvent 2-ethoxyethanol in rats : maternal and behavioral teratogenic effects. Neurobehavioral Toxicology and Teratology, **4**, 387-394.

Nelson, B.K., Brightwell W.S., Setzer J.V. et O'Donohue T.L. (1982) Prenatal interactions between ethanol and the industrial solvent 2-ethoxyethanol in rats : neurochemical effects in the offspring. Neurobehavioral Toxicology and Teratology, **4**, 395-401.

Nelson, B.K., Brightwell W.S., Setzer J.V. et O'Donohue T.L. (1984) Reproductive toxicity of the industrial solvent 2-ethoxyethanol in rats and interactive effects of ethanol, **57**, 255-259.

Nelson, B.K., Brightwell W.S., Setzer J.V., Taylor B. J. et Hornung R.W. (1981) Ethoxyethanol behavioral teratology in rats. Neurotoxicology, **2**, 231-249.

Ratcliffe J., Schrader, S.M., Clapp D.E., Halperin W.E., Turner T.W. et Hornung R.W. (1989) Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. Bristish Journal of Industrial Medecine, **46**, 399-406.

Schuler R.L., Hardin B.D., Niemeier G.B., Hazelden K., Piccirillo V. et Smith K. (1984) Results of testing fifteen glycol ethers in a short-term in vivo reproductive toxicity assay. Environmental Health Perspectives, **57**, 141-146.

Welch L.S., Schrader S.M., Turner T.W. et Cullen M.R. (1988) - Effects of exposure to ethylene glycol ethers on skipyard painters : II. Male reproduction. American Journal of Industrial Medecine, **14**, 509-526.

Yoon C.Y., Hong, C.M., Song, J.Y., Cho, Y-Y, Choi, K.S, Lee, B.J et Kim, C.K. (2001)- Effect of ethylene glycol monoethyl ether on the spermatogenesis in pubertal and adult rats.

Zenivk H., Oudiz D. et Niewenhuis R.J. (1984) Spermatotoxicity associated with acute and subchronic ethoxyethanol treatment. Environmental Health Perspectives, **57**, 225-231.

Construction d'une VTR reprotoxique pour le BBP (benzyle butyle phtalate), selon la méthode proposée dans le document de référence

Rapport final

juin 2006

Etude réalisée par :

Organisme d'expertise : Vincent Nedellec Consultant

Contact : Nedellec Vincent,

111 avenue Paul Doumer –91 160 Saulx-les-Chartreux.

Tel/fax 01.64.48.07.51. E-mail : vincent.nedellec@vnc-sante.fr

Pour :

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

AFSSET

27-31 avenue du Général Leclerc

94704 Maison Alfort Cedex

Contact : Nathalie Bonvallot (01 56 29 19 33 / nathalie.bonvallot@afsset.fr)

Information sur la propriété et diffusion du document

Les résultats des travaux demeurent la propriété de l'AFSSET, qui se réserve le droit de les rendre publics. Ils ne peuvent être utilisés, ou rendus en tout ou partie publics qu'avec l'accord écrit préalable de l'AFSSET. Les informations communiquées par l'AFSSET à l'occasion de la réalisation des travaux sont confidentielles et ne doivent pas être communiquées à des tiers, sauf accord.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| RESUME | 5 |
| 1. LE PROFIL TOXICOLOGIQUE | 12 |
| 1.1. INFORMATIONS GENERALES | 12 |
| 1.1.1. <i>Identification de la substance</i> | 13 |
| 1.1.2. <i>Propriétés physico-chimiques</i> | 13 |
| 1.1.3. <i>Plausibilité d'exposition humaine</i> | 14 |
| 1.2. TOXICOCINETIQUE..... | 14 |
| 1.3. TOXICITE GENERALE | 16 |
| 1.3.1. <i>Données chez l'homme</i> | 16 |
| 1.3.2. <i>Données chez l'animal</i> | 16 |
| 1.3.2.1. Etudes de toxicité aiguë | 16 |
| 1.3.2.2. Etudes de toxicité subchronique et chronique..... | 17 |
| 1.3.2.3. Mutagénicité et/ou génotoxicité..... | 23 |
| 1.3.2.4. Cancérogénicité | 24 |
| 1.3.2.5. Irritation et sensibilisation..... | 26 |
| 1.4. TOXICITE SUR LA REPRODUCTION ET LE DEVELOPPEMENT | 27 |
| 1.4.1. <i>Données chez l'homme</i> | 27 |
| 1.4.1.1. Effets sur le développement..... | 27 |
| 1.4.1.2. Effets sur la fertilité | 27 |
| 1.4.2. <i>Données chez l'animal</i> | 27 |
| 1.4.2.1. Effets sur le développement..... | 27 |
| 1.4.2.2. Effets sur la fertilité | 36 |
| 1.4.3. <i>Mécanismes d'action proposés</i> | 41 |
| 1.5. ANALYSE DE LA COHERENCE DES DONNEES ANIMALES ET HUMAINES..... | 44 |
| 1.6. COMPARAISON DES INDICES DE TOXICITE EN FONCTION DES EFFETS | 44 |
| 1.7. CONCLUSION | 44 |
| 2. LA CONSTRUCTION DE LA VTR POUR LES EFFETS REPROTOXIQUES..... | 46 |
| 2.1. IDENTIFICATION D'UNE DOSE CRITIQUE | 46 |
| 2.1.1. <i>Présentation des doses repères</i> | 46 |
| 2.1.1.1. Effet sur le développement | 46 |
| 2.1.1.2. Effet sur la fertilité | 47 |
| 2.1.2. <i>Dose critique retenue</i> | 47 |
| 2.1.2.1. Effet sur le développement | 47 |
| 2.1.2.2. Effet sur la fertilité | 47 |
| 2.1.2.3. Benchmark doses | 48 |
| 2.2. FACTEURS D'INCERTITUDE..... | 48 |
| 2.2.1. <i>Effet sur le développement</i> | 48 |
| 2.2.2. <i>Effet sur la fertilité</i> | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3. DISCUSSION ET PRESENTATION DE LA VTR | 48 |
| 3. BIBLIOGRAPHIE | 50 |
| 4. GLOSSAIRE | 54 |

Résumé

Le Benzyle Butyle Phtalate (BBP) (N° CASR : 85-68-7) est un plastifiant de la famille des esters de phtalates. Il est produit par des réactions sérielles entre le butanol et le chlorure de benzyle avec l'anhydride phtalique. Aux Etats-Unis, le BBP est principalement utilisé comme assouplissant du PVC¹ dans : les bandes de convoyeur alimentaire, les sols plastiques, les cuirs artificiels, les cônes de signalisation routière [CERHR, 2003]. En Europe il est utilisé à plus de 90 % de la production pour le PVC et d'autres polymères dans : les revêtements de sol, les joints/colles (double vitrage) et les peintures. Il est également présent dans les emballages alimentaires. Il est parfois retrouvé à l'état de trace dans les jouets en plastique probablement comme impureté d'autres produits chimiques. Il n'est pas chimiquement lié aux polymères dans lesquels il est incorporé. Ainsi, il peut facilement migrer vers la nourriture et les milieux de l'environnement (air, eau, poussières et sols) pendant l'utilisation de produits ou le stockage de déchets contenant du BBP [EC, 2004]. En 1997, la « consommation » européenne de BBP était de 20 à 50 000 tonnes par an [RIVM, 1998].

Il a été classé par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'homme de catégorie 2 pour le développement (phrase de risque R61 : « risque pendant la grossesse d'effet néfaste pour l'enfant ») et de catégorie 3 pour la reproduction (phrase de risque R62 : « risque possible d'altération de la fertilité »). Pour l'environnement il est classé R50-53 (« Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique »). Peu toxique chez l'animal ($LD_{50} > 2\text{g/kg}$), il est en revanche très toxique pour les espèces aquatiques [IPCS-CEC, 2005]. En 1999, l'expertise du CIRC concluait que le BBP ne pouvait être classé comme cancérogène chez l'homme (groupe 3 « *not classifiable as to its carcinogenicity to human* ») en raison de l'absence de donnée chez l'homme et de l'insuffisance des données animales [IARC, 1999]. L'US-EPA a évalué le potentiel cancérogène et classé le BBP comme possiblement cancérogène chez l'homme (classe C) [US-EPA, 2003].

Chez l'animal, la métabolisation du BBP passe par une hydrolyse intestinale et hépatique plus rapide au niveau intestinal qu'au niveau hépatique, puis une glucurononconjugaion avant l'excrétion urinaire ou fécale [EC, 2004]. Les métabolites chez le rongeur sont : d'abord le mono butyle phtalate (MBuP) puis le mono benzyle phtalate (MBeP), l'acide hippurique, l'alcool benzylique, et enfin le n-butanol. L'hydrolyse des esters de benzyle est

préférentielle, ainsi le mono butyle phtalate domine les autres métabolites urinaires (ratio 3:1) [Agarwal 1985]. Leur présence dans la bile signe une réabsorption par la lumière intestinale. Il n'y a pas de trace de la substance mère dans les urines. La demi-vie du BBP et de ses deux mono esters est très courte dans tous les tissus (environ 6h). L'excrétion est majoritairement urinaire (70%) puis fécale (10%) mais ce rapport s'inverse à forte dose (> 2000 mg/kg/j). Chez l'homme les voies de métabolisation sont identiques mais la proportion des métabolites en mono esters s'inverse. En premier on trouve le MBeP (>70%), ensuite le MBuP (environ 6 %) et enfin les autres métabolites. Une étude expérimentale chez 7 volontaires établit un modèle permettant de calculer une exposition externe à partir des concentrations urinaires de MBeP [EC, 2004].

Plusieurs estimations des expositions humaines au BBP en population générale ou chez les travailleurs ont été réalisées. L'OMS, à partir de l'analyse d'une centaine de produits alimentaires canadiens en 1985-1988, estimait une exposition moyenne au BBP via l'alimentation d'environ 2 µg/kg/j chez l'adulte et 12 µg/kg/j chez l'enfant [IPCS, 1999]. A partir d'une enquête alimentaire, le ministère anglais chargé de l'agriculture évaluait l'exposition en population générale entre 0,11 et 0,29 µg/kg/j [CERHR, 2003]. Dans l'industrie de production des phtalates et de fabrication de PVC souples on considère des concentrations atmosphériques moyennes de l'ordre de 1 mg/m³ et 2 mg/m³. Ces concentrations correspondent à des expositions de 143 et 286 µg/kg/j [CERHR, 2003]. Selon la Commission européenne en 2004, les expositions en population générale via l'alimentation sont : adulte = 0,3 µg/kg/j ; enfants = 1,02 µg/kg/j ; via l'inhalation (habitation avec sols plastiques), elles sont de 0,083 µg/kg/j ; via les jouets en plastique pour les jeunes enfants, elles sont de 0,95 µg/kg/j [EC, 2004]. Les milieux de l'environnement peuvent être pollués par les émissions industrielles ou les déchets contenant du BBP. Les expositions environnementales, estimés en population générale à partir de mesure des métabolites urinaires du BBP, sont au maximum de 18,2 µg/kg/j (enfants de 1 à 2 ans), 5,4 µg/kg/j (enfants de 6 à 11 ans), et 3,5 µg/kg/j pour les adultes [EC, 2004].

A forte dose le BBP est faiblement毒ique avec des DL₅₀orale de 2 à 20 g/kg chez le rat et de 4 à 6 g/kg chez la souris et une DL₅₀cutanée chez le rat de 10g/kg.

Lors des expositions subchroniques chez l'animal (cf. Tableau 2) les principaux effets observés aux faibles doses (150 à 300 mg/kg/j) sont : une réduction du gain de poids corporel, l'augmentation du poids relatif de certains organes (principalement reins et foie), des lésions pathologiques au niveau du pancréas et des reins. A plus fortes doses

¹ Le PVC peut contenir jusqu'à 60% d'assouplissant (plasticizer) [RIVM, 1998]

(≥ 500 mg/kg/j), on observe des effets hématologiques, des lésions au niveau des testicules, des épидidymes, de la prostate, du foie, des reins, de la rate et du pancréas. Chez la souris et le chien, seule la décroissance du gain de poids corporel a été observée. Le rat² semble l'espèce animale la plus sensible aux effets toxiques systémiques du BBP. Les rares études chroniques disponibles montrent que l'allongement de la durée d'exposition ne majore pas les effets ni abaisse le niveau de dose auquel ils apparaissent dans les études subchroniques. Ceci est cohérent avec les connaissances pharmacocinétiques montrant une métabolisation complète et une demi-vie très courte sans stockage dans les différents tissus. C'est pourquoi, certains organismes comme le RIVM, l'OMS ou Health Canada ne tiennent pas compte d'une durée inappropriée (étude subchronique) dans la dérivation d'une VTR chronique pour le BBP (cf. Tableau 1). Il y a peu de donnée concernant la toxicité par voie respiratoire et aucune VTR n'a été dérivée pour cette voie. Chez l'homme les études en milieux professionnels exposés aux phtalates (multi expositions) ont trouvé une augmentation des maladies respiratoires et neurologiques ainsi que des cancers. En population générale, une étude cas témoins norvégienne a trouvé un excès de risques significatif d'obstruction bronchique dans les deux premières années de vie en relation avec la présence de revêtements de sol en PVC dans l'habitation.

Les études *in vitro* et *in vivo* sont suffisamment complètes pour écarter tout potentiel génotoxique ou mutagène du BBP. On note cependant une possible mais faible clastogénicité sur les cellules de moelle osseuse de souris testées *in vivo*. Toutefois, certains résultats d'étude demandent des vérifications expérimentales.

Il n'y a pas d'étude chez l'homme pour les effets du BBP sur le développement ou la fertilité. Chez l'animal, une quinzaine d'études récentes concernent les effets du BBP ou des ses deux mono esters sur le développement fœtal et/ou sa tératogénicité (cf. Tableau 3). Moins de la moitié est disponible pour les effets sur la fertilité. Ces études sont d'excellentes qualités et trois d'entre elles respectent les lignes directrices de l'OCDE ou de l'US-EPA. Les études sur les mécanismes d'actions reprotoxiques ont permis d'élucider la plupart des phénomènes sous jacents aux effets observés.

La toxicité sur le développement survient dans une gamme de doses comparable aux effets systémiques (cf. Tableau 3). Une étude récente du RIVM obtient une DEC_{5%}³ pour des variations chez les descendants (13^e vertèbre lombaire) à 180-220 mg/kg/j [Piersma, 2004 ; RIVM, 1999]. Le plus bas NOAEL pour la mortalité fœtale est de 0 mg/kg/j (LOAEL = 500 mg/kg/j). Cette expérimentation a également permis d'étudier la période d'exposition la

² Notamment le rat Wistar

plus sensible pour la mortalité fœtale et les malformations. Elle se situe du 13^{ème} au 15^{ème} jour de gestation chez la rate [CERHR, 2003 ref. n°36]. Les expositions allant de 200 à 500 mg/kg/j provoquent chez le rat Wistar, le rat Sprague-Dawley et la souris OF1 : la diminution du poids corporel à la naissance, une augmentation de la mortalité périnatale et du taux de résorptions, la diminution du poids absolu et relatif des testicules et des épididymes, des malformations notamment du sternum, des ex-encéphalies et des fentes palatines. Le MBuP produit les mêmes effets à peu près aux même niveaux de doses. Avec le MBeP un NOAEL est établi chez le rat Wistar à 167 mgMBeP/kg/j (LOAEL = 250 mgMBeP/kg/j) pour l'augmentation de l'incidence des testicules non descendues et la réduction de la distance ano-génitale des mâles [Ema, 2003]. D'autres effets comparables à ceux du BBP sont observés lors des expositions au seul MBeP.

Les malformations du squelette semblent dues à une modification des cellules ostéoblastes⁴ Py1a chez le rat. La morphologie des cellules exposées au BBP est modifiée au niveau des micro-filaments. Cette modification du cytosquelette compromet la bonne adhésion ultérieure des ostéocytes. En l'absence de mort cellulaire, le BBP doit agir en perturbant l'organisation des protéines du cytosquelette [Marchetti, 2002].

La testostérone joue un rôle déterminant lors de l'embryogenèse dans la descente testiculaire. La deshydrotestostérone (métabolite de la testostérone) est plus impliquée dans l'apparence externe des organes génitaux (réception des mamelons, distance ano-génitale). Le MBuP n'étant pas liant des récepteurs androgéniques, les effets anti-androgéniques du BBP seraient indirects via la réduction des taux de testostérone fœtale [Ema, 2002]. Dans une seconde étude, les effets anti-androgéniques du BBP résultent d'une inactivation de l'expression génétique des hormones insulino-mimétiques 3. Il semble qu'elle soit due à un retard de maturité des cellules de Leydig qui conduit également à des hyperplasies car ces cellules continuent à proliférer au lieu de se différencier [Wilson, 2004]. *In vitro*, le BBP montre une très faible activité oestrogénique ce qui n'est pas le cas de ses métabolites mono esters. *In vivo* le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la protéine CaBP-9k⁵ n'est pas modifié chez les rates exposées au BBP. Il semble donc que le BBP perde son pouvoir oestrogénique après ingestion chez les mammifères [Hong, 2005].

³ DEC = Dose d'effet critique à 5%

⁴ Cellule osseuse jeune, cuboïde ou prismatique, à grand noyau, observée dans la moelle osseuse et la couche ostéogène du périoste et présente dans le tissu conjonctif ou cartilagineux en voie d'ossification (source : Grand dictionnaire terminologique).

⁵ Calbindin-D_{9k} est une protéine dépendante de la vitamine D. Elle fait partie d'un groupe de protéine intra cellulaire qui ont une forte affinité de liaison au calcium et qui sont localisées dans l'intestin et l'utérus. Les gènes codants pour CalBP-9k sont connus chez le rat comme chez l'homme. Dans l'utérus cette protéine est régulée par le 17 β -estradiol et fluctue au cours du cycle oestral de la même manière que le 17 β -estradiol (absence pendant la phase di-oestrus, présence en phase pro-oestrus) [Hong, 2005].

Cinq études concernent les effets toxiques du BBP pour la reproduction (fertilité) (cf. Tableau 4). Les NOAEL pour la fertilité des mâles et des femelles parents (F0) sont à peu près identiques à 500 mg/kg/j. C'est à dire au-dessus des niveaux de doses ayant des effets toxiques systémiques ou développementaux. Une étude établit un NOAEL à 200 mg/kg/j pour la fertilité des mâles mais l'écart avec la dose suivante est trop importante (LOAEL = 2 200 mg/kg/j) pour être retenu comme un véritable NOAEL [CERHR, 2003]. Dans une étude chez le rat Sprague-Dawley, Nagano *et Al.* observent un NOAEL de 100 mg/kg/j pour une diminution du poids des ovaires chez les rates F0 mais les performances reproductives (taux d'accouplement, taux de fertilité, durée de la gestation, et nombre de naissances vivantes) restent identiques au groupe témoin. Les descendants F1, exposé *in utero*, pendant la lactation puis par la nourriture (10 semaines), à la dose de 500 mg/kg/j conservent également des performances reproductives normales. Les effets systémiques et développementaux (augmentation du poids des reins chez les femelles, diminution transitoire du poids de naissance chez les mâles et les femelles) sont observés à partir de 100 mg/kg/j (NOAEL = 20 mg/kg/j). Aucun effet toxique systémique, développemental et reproductif n'est observé à la deuxième génération F2 [Nagano, 2003]. Enfin, dans l'étude la plus récente sur deux générations chez le rat Charles river selon les lignes directrices de l'US-EPA, on note une baisse des indices de fertilité (taux d'accouplement et taux de fertilité) des mâles F1 exposés à 750 mg/kg/j (NOAEL = 250 mg/kg/j), *in utero*, pendant l'allaitement, puis par la nourriture jusqu'à l'accouplement pour la génération suivante, ainsi qu'une augmentation du nombre de mamelons conservés et une diminution du poids absolu mais pas relatif des testicules et des épидidymes. La fertilité dans la génération F2 n'est pas étudiée.

Les valeurs toxicologiques de référence (VTR) actuellement disponibles pour les effets des expositions chroniques au BBP sont fondées sur la toxicité systémique au niveau des organes internes : lésions pancréatiques, poids du foie et des reins (cf. Tableau 1).

Concernant les effets reprotoxiques du BBP les données disponibles permettent la dérivation de VTR du même ordre de grandeur que les précédentes. Pour les effets sur le développement (VTR apparentées aux VTR aiguës) la dose critique retenue est un NOAEL à 185 mg/kg/j (LOAEL à 375 mg/kg/j pour une diminution du poids corporel des fœtus) observé chez le rat Wistar [CERHR (8)]. Deux facteurs d'incertitudes sont retenus (variabilité inter espèce, variabilité intra espèce), pour dériver **la VTR développement de 1,85 mg/kg/j**. Pour les effets sur la fertilité la dose critique retenue est un NOAEL à 250 mg/kg/j observé chez le rat Charles Rivers (LOAEL à 750 mg/kg/j pour la baisse de l'indice de fertilité des mâles F1) [Tyl, 2004]. Trois facteurs d'incertitudes sont retenus (variabilité inter (10) et intra espèce

(10) et durée inapproprié de l'étude (3)) pour dériver **la VTR fertilité de 0,83 mg/kg/j.** L'ensemble des données disponibles pour la voie orale ne plaide pas en faveur d'une transposition des connaissances toxicologiques vers la voie respiratoire.

Tableau 1 : Description des Valeurs Toxicologiques de Références recensées en mai 2006

| Organisme (année) | Animal | Effet | Voie d'expositio n | Durée d'expositio n | VTR* | Dose critique** | UF*** | Etude toxicologique utilisée |
|------------------------|------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|-------|---------------------------------|
| OMS, 1999 | Rat Wistar | 5% lésions pancréatiques | orale | 90 j | DJA = 1,32 mg/kg/j | BMDL = 132 mg/kg/j | 100 | Hammond, 1987 |
| Health Canada, 2000 | Rat Wistar | 5% lésions pancréatiques | orale | 90 j | DJA = 1,32 mg/kg/j | BMDL = 132 mg/kg/j | 100 | Hammond, 1987 |
| RIVM, 2001 | Rat Wistar | ↑ du poids des reins (+8%) | orale | 90 j | TDI = 0,5 mg/kg/j | NOAEL = 151 mg/kg/j | 300 | Hammond, 1987 |
| US-EPA, 2003 | F344/N | ↑ du poids du foie (+8%) | orale | 90 j | RfD = 0,2 mg/kg/j | NOAEL = 159 mg/kg/j | 1 000 | NTP, 1985 |

« ↑ » = augmentation statistiquement significative

* RfD = Reference dose. DJA = Dose journalière admissible. TDI = Tolerable Daily Intake.

** Dose critique = NOAEL = No observable adverse effect level ; LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level ; BMDL : Benchmark dose (limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95%)

*** UF = uncertainty factor

1. Le profil toxicologique

1.1. Informations générales

Les connaissances sur les propriétés physico-chimiques, la toxicocinétique et la toxicité générale du BBP ainsi que les données sur la plausibilité d'une exposition chez l'homme, ont été recherchées dans les documents de synthèse déjà existants, publiés par les organismes nationaux ou internationaux légitimes⁶ suivants :

- l'ATSDR (« *toxicological profiles* »),
- l'OMS (« *environmental health criteria* »),
- Health Canada (« *rapports d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire* »),
- l'US EPA (IRIS « *toxicological review* »),
- l'ECB (« *risk assessment reports* »),
- l'OCDE (UNEP « *chemicals screening information dataset* »),
- l'IARC (« *monographs* »),
- le NCEA (« *risk assessments* »),
- l'Index Merck,
- la base de donnée HSDB (hazardous substance data base)
- Chemfinder
- La Commission Européenne (HCP : Health & Consumer Protection),
- HHRAP (Human Health Risk Assessment Protocole US-EPA)⁷
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals)
- INRS (Institut National de la Recherche sur les Risques)
- INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques)
- Le RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Institut national de la santé publique et de l'Environnement Hollandais)

Les requêtes ont été effectuées successivement avec le n° CASR et le nom « benzyl butyl phthalate » dans les moteurs de recherche des sites Internet et des bases de données. Le BBP est absent des bases de données suivantes : ATSDR, Merck index, INRS, INERIS, ECETOC, NCEA, OCDE. Tous les autres sites de la précédente liste fournissent des

⁶ Profils ATSDR : <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html> ; OMS : <http://www.inchem.org/> ; Santé Canada : http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/index_f.html et http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl2-lsp2/index_e.html ; US EPA IRIS : <http://www.epa.gov/iris/search.htm> ; ECB : <http://ecb.jrc.it/existing-chemicals/> ; OCDE : <http://www.inchem.org/pages/sids.html> ; IARC : <http://www.inchem.org/pages/iarc.html> ; NCEA : <http://cfpub.epa.gov/ncea/> Index MERCK : The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Thirteenth edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 2001 ; HSDB : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> ; ChemFinder : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM>

informations concernant le BBP. Ces informations sont présentées de manière synthétique dans les tableaux suivants. Elles figurent également dans les informations générales concernant l'absorption, les voies métaboliques, la distribution, l'excrétion, le stockage et les mécanismes d'effet toxique du BBP.

1.1.1. Identification de la substance

| | |
|---------------------------------------|--|
| Numéro CAS, ENEICS, etc. | N°CASR : 85-68-7 ; N°ICSC : ; N°RTECS : ; N°CE : 607-430-00-3 N°EINECS : 201-622-7 |
| Nom | Benzyle butyle phthalate |
| Synonymes | EC = 1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl phenylmethyl ester; benzyl-n-butyl phthalate; phthalic acid, butyl benzyl ester; Santicizer 160; Sicol 160; Unimoll BB. IRIS = 1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, BUTYL PHENYLMETHYL ESTER, BENZYL-BUTYLESTER KYSELINY FTALOVE, BENZYL BUTYL PHTHALATE, BENZYL n-BUTYL PHTHALATE, Butyl benzyl phthalate, n-BUTYL BENZYL PHTHALATE, BUTYL PHENYLMETHYL 1,2-BENZENEDICARBOXYLATE, NCI-C54375, PALATINOL BB, PHTHALIC ACID, BENZYL BUTYL ESTER, SANTICIZER 160, SICOL 160, UNIMOLL BB |
| Formule brute | C ₁₉ H ₂₀ O ₄ Ou : 1,2-C ₆ H ₄ (COOCH ₂ C ₆ H ₅)(COOC ₄ H ₉) |
| Formule développée | |
| Appartenance à une liste reprotoxique | Catégorie 2 R-phrase 61 et catégorie 3 R-phrase 62 [EC] |

1.1.2. Propriétés physico-chimiques

| | |
|------------------------------|---|
| Forme physique | Liquide huileux clair ayant une faible odeur et un goût amer caractéristique [EC] |
| | 312,35 [CERHR] |
| Point d'ébullition (en °C) | 370 [CERHR] |
| Pression de vapeur (var.) | <ul style="list-style-type: none"> ■ 6 x 10⁻⁷ mmHg (à 25°C) [CERHR, 2003] ■ 4 x 10⁻⁵ Pa (à 20°C) [EC, 2004] |
| Densité (g/cm ³) | 1,12 [CERHR] 1,116 [EC] |
| Facteurs de conversion | 1 ppm = 12,75 mg/m ³ [EC, 2004] |
| Solubilité | Dans l'eau : 2,7mg/l [CERHR] |

⁷ Contient des données sur les propriétés physico-chimiques (logK_{ow}, Henry's Law Constant, K_{oc}, pression de vapeurs, solubilité dans l'eau, BCF, BAF, biodisponibilité selon la voie d'entrée, etc...) utiles notamment pour estimer les transferts dans et entre les différents milieux de l'environnement (eaux, air, sol, végétaux, animaux)

| | |
|--|---------------------------|
| | 2,8 mg/l [EC] |
| LogKow (-) | 4,59 [CERHR] 4,84 [EC] |
| Koc (L/kg) | ND |
| BCF (-) | ND |
| BAF | ND |
| Produits de dégradation environnementale | ND |

ND = non disponibles dans les sources d'informations exploitées

1.1.3. Plausibilité d'exposition humaine

| | |
|-------------------------------------|--|
| Types d'utilisation | Utilisé principalement (>90 %) comme assouplissant du PVC et autres polymères, dans les revêtements de sol, les colles (double vitrage) et les peintures. Il est aussi présent dans les emballages alimentaires. Il est également retrouvé à l'état de trace dans les jouets en plastique probablement comme impureté d'autres produits chimiques. Il n'est pas attaché chimiquement aux polymères dans lesquels il est incorporé. Ainsi, il peut facilement migrer vers la nourriture et les milieux de l'environnement (air, eau, poussières et sols) pendant l'utilisation ou le stockage des déchets contenant du BBP |
| Restrictions d'usages | ND |
| HPV/ tonnages (Europe, France) | ND |
| Médias de l'environnement concernés | ND |
| Types de populations concernées | Les travailleurs qui fabriquent le BBP et ceux qui incorporent cette substance dans les produits manufacturés et ceux qui les utilisent. La population générale en contact avec l'eau, l'air, le sol et les aliments contaminés par le BBP |

1.2. Toxicocinétique

| | Données chez l'animal | Données chez l'homme |
|--|---|--|
| Substance mère | Benzyle Butyle Phtalate | |
| Voies de métabolisation possibles | Hydrolyse par les estérasées intestinales et hépatiques plus rapide au niveau intestinal (1 640 µmole/h/g-intestin, soit 3 à 15 fois plus que le di-n-butyle phtalate) qu'au niveau hépatique (45 µmole/h/g-foie, soit 2 fois moins que le di-n-butyle phtalate) [EC, 2004]. | A priori comme chez l'animal mais données limitées [EC, 2004]. |
| Métabolites principaux | En premier le monobutyle phtalate (MBuP) puis le monobenzyle phtalate (MBeP), l'acide hippurique l'alcool benzyle, et le n-butanol. L'hydrolyse des esters de benzyle est préférentielle, ainsi le monobutyle phtalate domine les autres métabolites urinaires (ratio 3:1). [Agarwal 1985]. Leur présence dans la bile signe une réabsorption par la lumière intestinale. | En premier le MBeP (>70%) puis MBuP (6 %), autres [EC, 2004]. Une étude expérimentale chez 7 volontaires établit un modèle permettant de calculer une exposition externe à partir des taux urinaires de MBeP [EC, 2004]. |
| Absorption (%/ voie) | Orale : ND Inhalation : ND Cutanée : 5 % (30-40 % de la dose dans les urines 7 jours après application soit 0,15-0,3 µg/cm²xmin [EC, 2004]) | Orale 100 % [EC, 2004] Inhalation : 100 % [EC, 2004] Cutanée : plus lente que chez le rat [EC, 2004] |
| Distribution | ND | ND |

| | | |
|--|---|----|
| Stockage, accumulation (% et cible) | Pas d'accumulation dans les tissus | ND |
| Transferts BHE | ND | ND |
| Transferts placenta | oui | ND |
| Transferts lait maternel | oui | ND |
| Elimination (demi-vies) | Après 24 h, 70% de la dose est éliminée via les urines 15 % via les fèces. Le rapport s'inverse en cas de forte dose (\geq 2000 mg/kgPC/j). La demi vie du BBP et de ses monoesters (monobutyle, monobenzyle) est de 6h dans tous les tissus [EC, 2004]. | ND |

ND = non disponibles dans les sources d'informations exploitées

1.3. Toxicité générale

1.3.1. Données chez l'homme

Il n'y a pas de données humaines sur la toxicité du BBP seul (expérimentation) [EC, 2004].

En population générale, une étude cas témoins (500 personnes) norvégienne a mis en évidence un excès de risque significatif d'obstruction bronchique dans les deux premières années de vie en relation avec la présence de revêtements de sol en PVC ($OR_{ajusté} = 1,89$) [Jaakkola, 1999].

Les expositions professionnelles à des mélanges de phtalates (expositions minoritaires) pouvant contenir du BBP ont été associées à des effets respiratoires et/ou neurologiques ainsi qu'à des cancers [IPCS, 1999].

Il n'y a pas d'étude disponible sur les effets génotoxique du BBP chez l'homme [IARC, 1999 ; EC, 2004].

Il n'y a pas d'études disponibles sur un éventuel lien entre l'exposition au BBP seul et l'apparition de cancers au moment de la rédaction de ce document (mai 2006). Seule l'étude en milieu professionnel pour lequel les populations ont été exposées à des mélanges de phtalates, et détaillée précédemment, est disponible. Dans une étude épidémiologique de type cas témoin, un excès de risques significatif de myélomes multiples a été observé pour les travailleurs de la fabrication de PVC depuis au moins cinq ans, exposés à un mélange de phtalate [Heineman, 1992].

1.3.2. Données chez l'animal

1.3.2.1. Etudes de toxicité aiguë

La toxicité aiguë du BBP a été testée chez le rat, la souris, et le lapin (une seule étude). Les voies orale, dermale et intra péritonéale ont été investiguées, mais pas la voie respiratoire [EC, 2004].

La toxicité aiguë du BBP est faible. Les signes d'intoxication sont : diminution de l'appétit et de l'activité, perte de poids, apathie, leucocytose, collapsus, mort. Les examens histologiques *post mortem* révèlent des hémorragies pulmonaires, des inflammations gastro-intestinales aiguës et des dégénérescences du système nerveux central [EC, 2004]. Les doses létales dans 50 % des cas (DL_{50}) issues des expérimentations chez l'animal sont :

DL₅₀ orale

Rat : 2 330 mg/kg dilué dans l'huile de maïs et 20 400 mg/kg administré pur

Souris : 4 170 – 6 160 mg/kg

DL₅₀ cutanée

Lapin : > 10 000 mg/kg

1.3.2.2. *Etudes de toxicité subchronique et chronique*

Les études concernant la toxicité du BBP à dose répétées (subchronique et chronique) étant assez nombreuses et la toxicité systémique n'étant pas l'objectif central de ce document, ne seront présentées que les principales conclusions des différentes monographies réalisées par des organisations internationales (IPCS, 1999 ; Health Canada 2000 ; RIVM, 2001; US-EPA, 2003 ; EC, 2004). Un tableau de synthèse (Tableau 2) présente l'ensemble des études citées ainsi que les informations clés (espèces, voie d'exposition, durée, nombre d'animaux par groupe, NOAEL / LOAEL, taux d'incidence ou de variation au LOAEL, effets toxiques, sources).

L'OMS en 1999 a publié une monographie sur l'évaluation des risques pour l'homme liés au BBP [IPCS, 1999]. Les données chez l'homme sont insuffisantes. Les données concernant les effets à doses répétées (études subchroniques et chroniques) chez l'animal, notamment le rat, sont complètes et de bonne qualité. Les principaux effets avérés survenant aux plus faibles doses (de 120 à 300 mg/kg/j) sont : l'augmentation du poids relatif de certains organes (notamment reins et foie), des lésions pathologiques au niveau du pancréas et des reins. A plus forte dose, une dégénérescence testiculaire et des lésions au niveau du foie ont été observées. Dans des études dédiées, la prolifération des péroxyosomes hépatiques a été mise en évidence pour des niveaux de dose supérieurs aux autres effets toxiques et avec une efficience inférieure à celle du DEHP. L'IPCS a dérivé une Benchmark dose (BMD) pour une augmentation de l'incidence des lésions pancréatiques chez le rat Wistar avec un LOAEL de 381 mg/kg/j (taux d'incidence 53%) (cf. tableau 1). La BMD pour une augmentation de 5 % du taux de lésion pancréatique est de 167 mg/kg/j avec une limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % située à 132 mg/kg/j. Le TDI⁸ de 1,32 mg/kg/j, dérivée de cette BMD inclut un facteur 100 pour la variabilité intra et inter espèce. Il n'y a pas de facteur d'incertitude pour l'utilisation de données subchroniques. D'une part, le BBP est rapidement métabolisé (hydrolyse intestinale et hépatique) puis éliminé via les urines et les

fèces et sans stockage dans l'organisme. D'autre part, les données toxicologiques sont assez complètes et montrent que les études chroniques n'ont pas indiqué de toxicité en dessous des doses ayant des effets dans les études subchroniques [IPCS, 1999].

Health Canada a produit la même expertise que l'IPCS et retenu la même BMD de 132 mg/kg/j pour une augmentation de 5 % des lésions pathologiques du pancréas. Les facteurs d'incertitudes retenus sont également 100 pour la variabilité inter et intra espèce [Health Canada, 2000].

L'expertise des études disponibles par le RIVM conclut que le BBP n'est pas génotoxique, et que ses effets toxiques les plus sensibles concernent les reins et le foie. Le NOAEL retenu est de 151 mg/kg/j pour l'augmentation du poids des reins et les lésions pancréatiques (cf. tableau 1). Les effets sur le développement et la fertilité étant observés à des doses généralement toxiques pour la mère et toujours supérieures à celles provoquant une toxicité hépatique ou rénale, ils ne sont pas retenus pour dériver une TDI. Notant que les effets sur les reins, le foie ou le pancréas, sont observés à des niveaux de doses comparables pour des durées d'exposition différentes (rat Wistar, durée 3 mois, NOAEL = 151 mg/kg/j [Hammond, 1987] et rat F/344/N durée 6 mois, NOAEL = 181 mg/kg/j [NTP, 1997]) un facteur d'incertitude de 3 seulement est retenu pour l'inadéquation temporelle de l'étude. Un facteur d'incertitude de 100 pour la variabilité inter et intra espèce est retenu. La TDI du RIVM est donc de 0,5 mg/kg/j [RIVM, 2001].

L'US-EPA a révisé le profil toxicologique du BBP en 2003. L'étude jugée la plus pertinente est celle du NTP en 1985 (cf. tableau 1). Des rats F344/N (15/groupe) ont été exposés par voie orale au BBP aux doses suivantes : 0, 17, 51, 159, 470, et 1417 mg/kg/j. Aucun effet toxique n'est observé dans les trois premiers groupes de doses. A 470 mg/kg/j, on observe une augmentation absolue et relative (poids du foie rapporté au poids corporel ou au poids du cerveau) du poids du foie et une augmentation du taux d'hémoglobine corpusculaire. A la dose de 1417 mg/kg/j on observe une diminution significative du poids du cœur, des reins, des poumons, des vésicules séminales et des testicules. Des effets hématologiques sont également constatés avec une diminution de la masse des globules rouges, indiquant selon les auteurs une déficience de la synthèse de l'hème. De plus, les lésions testiculaires sont accompagnées d'une atrophie des tubules séminifères et une aspermie. Le NOAEL choisi est donc de 159 mg/kg/j pour une augmentation du poids du foie auquel l'US-EPA applique

⁸ Tolerable Daily Intake

un facteur d'incertitude de 1000 (100 pour la variabilité intra et inter espèce et 10 pour la durée inappropriée de l'étude) [US-EPA, 2003].

Selon les conclusions du groupe d'experts ayant réalisé l'évaluation des risques du BBP pour la commission européenne [EC, 2004], les études les plus pertinentes concernant la toxicité subchronique du BBP chez le rat sont celles d'Hammond, 1987 (orale 90 jours) et NTP 1997 (orale, 182 jours). Dans la première étude le NOAEL chez le rat Wistar mâle était de 151 mg/kg/j (LOAEL = 382 mg/kg/j) basé sur des changements histopathologiques au niveau du pancréas, du foie et des testicules, une modification pathologique du foie et l'augmentation du poids des reins. D'autres effets comme : une faible anémie, une baisse du pH urinaire, et un léger changement du poids relatif de certains organes ont également été observés. Chez le rat Sprague-Dawley, le NOAEL était de 375 mg/kg/j (LOAEL = 750 mg/kg/j) pour une augmentation du poids du foie et des reins mais les examens histopathologiques *post-mortem* n'ont relevé aucune lésion. Dans la seconde étude, le NOAEL chez le rat Fisher était de 180 mg/kg/j (LOAEL = 550 mg/kg/j) pour une diminution du poids du foie, une augmentation de la concentration sanguine en globules rouges et l'apparition sporadique d'érythrocytes.

Chez le chien Beagle le seul effet observé était une diminution du poids corporel à 1852 mg/kg/j. L'importante différence de niveau de dose ayant un effet toxique d'une espèce animal à l'autre peut être dû à des différences de pharmacocinétique. Chez le chien, environ 90 % de la dose de BBP est retrouvée inchangée dans les fèces [EC, 2004].

Concernant l'inhalation, l'étude la plus pertinente a été réalisée sur 90 jours chez le rat mâle et femelle Sprague-Dawley, en respectant les lignes directrices actuelles et les Bonnes Pratiques de Laboratoire. Le NOAEC était de 218 mg/m³ (LOAEC = 789 mg/m³) pour des changements du poids relatif du foie et des reins dans les deux sexes. Cependant, aucune lésion n'était observable à l'examen histopathologique [EC, 2004].

Le BBP induit également chez le rat une prolifération des péroxyosomes hépatiques sans distinction de sexe. Comparé au DEHP, le BBP semble moins efficient. Il est noté que la prolifération des péroxyosomes hépatiques est témoin d'une spécificité d'espèce (rat) non retrouvée chez l'homme [EC, 2004 ; IPCS, 1999].

Dans l'évaluation des risques de la commission européenne, le NOAEL de 151 mg/kg/j pour la voie orale (rats Wistar, trois mois, augmentation du poids des reins et lésion pathologiques du pancréas) et le NOAEC de 218 mg/m³ pour la voie respiratoire (Rat Sprague-Dawley,

trois mois, augmentation du poids du foie et des reins) ont été retenus comme données les plus pertinentes concernant les effets toxiques chroniques du BBP. En raison de faiblesses méthodologiques identifiées dans la seule étude disponible en 2004, il n'y a pas de NOAEL ou LOAEL pour la voie cutanée [EC, 2004].

Au total, la base de données disponible en 2004, concernant les effets toxiques du BBP à dose répétées chez l'animal, est considérée comme suffisamment complète (études subchronique, chronique, développement, fertilité sur plusieurs espèces animales) et jugée de bonne qualité par les différents organismes internationaux. Les expositions répétées au BBP chez le rat conduisent, aux plus faibles doses (120 à 300 mg/kg/j), à une réduction du gain de poids corporel, une augmentation du poids relatif de certains organes (notamment le foie et les reins), des lésions pathologiques au niveau du pancréas. A plus fortes doses, on observe des effets hématologiques, des dégénérescences ou des lésions au niveau des testicules, des epididymes, de la prostate, du foie, des reins, de la rate et du pancréas, une prolifération des peroxyxsomes hépatiques, des effets sur la fertilité (lésions testiculaires, compte spermatique) et le développement (réduction du poids de naissance), généralement à des niveaux de dose toxiques pour la mère. Chez la souris et le chien, seule la décroissance du gain de poids corporel a été observée.

Tableau 2 : Synthèse des résultats d'études expérimentales sub chroniques et chroniques chez l'animal

| Animal | Type d'étude | Voie | durée | animaux /groupe | NOAEL | LOAEL | Effet | incidence (LOAEL) | Variation (LOAEL) | relation dose réponse | Source |
|---------------------|------------------------------|-------|-------|-----------------|--------------|--------------|--|-------------------|-------------------|-----------------------|----------------|
| Rat Sprague-Dawley | sub aiguë | orale | 14 j | 6 | 160 mg/kg/j | 480 mg/kg/j | Malformations tubulaires | 1 sur 6 | | | Lake, 1978 |
| Souris B6C3F1 | Sub chronique | orale | 90 j | ? | nd | 240 mg/kg/j | ↓ du gain de poids corporel (mâles) | | -14 % | oui | NTP, 1982 |
| | | | | | 946 mg/kg/j | 1875 mg/kg/j | ↓ du gain de poids corporel (femelles) | | -22 % | oui | NTP, 1982 |
| Rat Fisher F344 | Chronique (cancérogenèse) | orale | 2 ans | 50 | 0 mg/kg/j | 360 mg/kg/j | ↓ du poids corporel (femelles) | | nd | non | NTP, 1982 |
| Rat Fisher F344 | | oral | 14 j | ? | 0 mg/kg/j | 375 mg/kg/j | ↑ du poids du foie et des reins | | | | Agarwal, 1985 |
| Rat Fisher F344 | | oral | 180 j | ? | 159 mg/kg/j | 470 mg/kg/j | ↑ relative et absolue du poids du foie | | nd | non | NTP, 1985 |
| Rat Sprague-Dawley | sub aiguë | orale | 14 j | 6 | 480 mg/kg/j | 1600 mg/kg/j | Retard de croissance | | | | Hammond, 1987 |
| | | | | | 480 mg/kg/j | 1600 mg/kg/j | ↑ du poids du foie | | +20 % | | Hammond, 1987 |
| | | | | | 480 mg/kg/j | 1600 mg/kg/j | Atrophie testiculaire | | | | Hammond, 1987 |
| Rat Sprague-Dawley | Sub chronique | orale | 90 j | 20 | 375 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↑ poids du foie des femelles | | +16 % | oui | Hammond, 1987 |
| | | | | | 750 mg/kg/j | 1125 mg/kg/j | ↑ poids du foie des mâles | | +19 % | oui | Hammond, 1987 |
| Rat Wistar | Sub chronique | orale | 90 j | 54 à 90 | 151 mg/kg/j | 381 mg/kg/j | ↑ du poids des reins | | +8 % | oui | Hammond, 1987 |
| | | | | | 151 mg/kg/j | 381 mg/kg/j | Lésions pathologiques pancréas | du 8 sur 15 | | | Hammond, 1987 |
| | | | | | 0 mg/kg/j | 151 mg/kg/j | ↑ du poids du foie (femelles) | | +4 % | oui | Hammond, 1987 |
| Chien Beagle | Sub chronique | orale | 90 j | 6 | 1852 mg/kg/j | nd | Pas d'effets chez les mâles | | | | Hammond, 1987 |
| | | | | | 1973 mg/kg/j | nd | Pas d'effets chez les femelles | | | | Hammond, 1987 |
| Rat CharlesRiver CD | Sub chronique (neurologique) | orale | 42 j | 10 | 1500 mg/kg/j | 300 mg/kg/j | Altération motricité (stiffness) | | nd | | Robinson, 1991 |
| Rat mâle Cpb-WU | Sub aiguë | orale | 28 j | 3 | 580 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↑ du poids du foie | | +24 % | oui | Piersma, 2000 |
| | | | | | 580 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | Atrophie testiculaire | | -20 % | oui | Piersma, 2000 |

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------------|------------|-------|----|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|-----------|--------------------|-----|--------------------------------|
| | | | | | | 580 mg/kg/j 350 mg/kg/j | 750 mg/kg/j 450 mg/kg/j | ↑ du poids des reins (NS) ↓ du taux de testostérone | | NS divisé par 4 | | Piersma, 2000 Piersma, 2000 |
| Rat Fisher F334/N | Sub chronique (développement) | orale | 182 j | 15 | 180 mg/kg/j | 550 mg/kg/j | | ↑ du taux d'hémoglobine | | nd | nd | NTP, 1997 |
| Rat Fisher F334/N | Sub chronique (fertilité) | orale | 70 j | 15 | 200 mg/kg/j | 2200 mg/kg/j | Modification sanguins | des paramètres | | Disponible | | NTP, 1997 |
| Rat Fisher F334/N | Chronique (cancérogenèse) | orale | 2 ans | 60 | 240 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↑ du poids des reins | | | +10 % | oui | NTP, 1997 |
| | | | | | 0 mg/kg/j | 300 mg/kg/j | Néphropathie | | 47 sur 50 | | non | NTP, 1997 |
| Rat Sprague-Dawley | Sub chronique | Inhalation | 42 j | 20 | 1000 mg/m ³ | 2100 mg/m ³ | ↓ du gain de poids corporel | | | -33 % | non | Monsanto, 1981 |
| | | | | | 1000 mg/m ³ | 2100 mg/m ³ | Décès | | 4 sur 20 | | | Monsanto, 1981 |
| Rat Sprague-Dawley | Sub chronique | Inhalation | 42 j | 5 | 144 mg/m ³ | 526 mg/m ³ | ↓ du gain de poids corporel | | | -17 à -19% | non | Hammond, 1987 |
| Rat Sprague-Dawley | Sub chronique | Inhalation | 90 j | 25 | 218 mg/m³ | 729 mg/m³ | ↑ du poids du foie et des reins | | | +20 à +15% | non | Monsanto, 1982 |

« nd » = non disponibles dans les documents utilisés

1.3.2.3. Mutagénicité et/ou génotoxicité

Le pouvoir mutagène du BBP a été testé au cours de plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Les études *in vitro* concernent les mutations génétiques, la cytotoxicité et les transformations cellulaires. Les études *in vivo* concernent les mutations létales sexuellement récessives chez *Drosophila melanogaster* et, chez la souris, l'induction de mutations létales dominantes ou les échanges de chromatides sœurs et les aberrations chromosomiques.

Etudes *in vitro*

Le BBP n'induit pas de mutations sur les cellules procaryotes et eucaryotes. Quatre études sur *Salmonella typhimurium* sont négatives, ainsi qu'une étude sur *E. coli* [EC, 2004].

Le BBP n'est pas responsable de mutation génique sur les cellules de mammifères. Deux études sur des cellules de souris sont négatives [EC, 2004].

Testé sur des cellules ovariennes d'Hamster Chinois, le BBP n'induit pas d'échange de chromatides sœurs ni d'aberrations chromosomiques [EC, 2004].

L'induction de transformations cellulaires par le BBP a été testée sur des cellules embryonnaires d'hamster Syrien. Les résultats sont négatifs après 24 h d'exposition. L'exposition pendant 7 jours donne des résultats positifs. Cette disparité d'effet selon la durée d'exposition laisse penser que le mécanisme d'action du BBP n'est pas un phénomène mutagène. Une étude sur des cellules BALB/3T3 est également négative pour les transformations cellulaires [EC, 2004].

Etudes *in vivo*

Testé sur *Drosophila melanogaster*, le BBP n'a pas induit de mutation létale sexuellement récessives [EC, 2004].

Dans une expérimentation du NTP, des échanges de chromatides sœurs (ECS) ont été observés dans les cellules de moelle osseuse de souris B6C3F1 mâles traités par injection intra péritonéale (doses : 0, 1250, 2500, et 5000 mg/kg). Le taux d'ECS comparé au groupe témoins montre une tendance à l'augmentation statistiquement significative uniquement si l'on exclut de l'analyse le groupe de la plus forte dose. Ce résultat est difficilement interprétable d'autant que l'expérimentation n'a pas été répétée.

Dans la même étude, le NTP a testé l'induction d'aberration chromosomique (AC) dans les cellules de moelle osseuse de souris B6C3F1 traitées par injection intra péritonéale (doses : 0, 1250, 2500, et 5000 mg/kg). Le taux d'AC (% de cellules métaphases⁹ aberrantes) est significativement plus élevé dans le plus fort groupe de dose comparé au groupe témoin 17 h après l'injection. Cependant, 36 h après l'injection il n'y a plus de différence statistiquement significative. Ces résultats contradictoires sont difficilement interprétables.

Le BBP a également été testé pour sa capacité à induire des mutations dominantes létales. Dans une étude publiée en 1987, 24 souris mâles CD-1 et 36 souris mâles B6C3F1 ont été exposées au BBP par injection intra péritonéale aux doses de 400-600, 1280-1840, et 3200-4560 mg/kg. Les portées conçues après l'exposition ne révèle aucune baisse de fertilité ni aucune augmentation de mort fœtale. Le BBP n'induit pas de mutations dominantes létales [EC, 2004].

Dans une étude concernant la toxicité du BBP sur le développement, 19 rats femelles Alpk:AP_fSD ont été exposés à 182 µg/kg/j via l'eau de boisson. La recherche de micronoyaux (micronucleated polychromatic erythrocytes) dans les prélèvements de moelle osseuse s'est avérée négative. On remarque toutefois que la dose d'exposition est très faible [EC, 2004].

A partir de ces résultats, le CIRC¹⁰ a conclu en 1999 que le BBP n'était pas génotoxique, à l'exception d'une faible clastogénicité sur les cellules de moelle osseuse de souris testées *in vivo* [IARC, 1999].

1.3.2.4. Cancérogénicité

La cancérogénicité du BBP par voie orale (pas d'étude respiratoire ou cutanée) a été testée chez la souris et chez le rat.

Aucune augmentation d'incidence de tumeurs n'a été observée dans l'étude chez la souris.

⁹ Métaphase : deuxième stade de la division cellulaire où chaque chromosome se place sur la plaque équatoriale. A ce stade, les chromosomes se présentent sous l'aspect de deux chromatides parallèles reliées par le centromère. On parle parfois de prométaphase pour désigner le stade, intermédiaire entre la prophase et la métaphase, où se forme le fuseau. (Grand dictionnaire terminologique disponible sur Internet à l'adresse : http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index1024_1.asp)

¹⁰ CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer, Organisation Mondiale de la Santé.

Une augmentation de l'incidence des leucémies (leucémie ou lymphome des cellules mononucléaires) chez les rats femelles F344 exposées à 720 mg/kg/j a été observée au cours d'une étude conventionnelle du NTP en 1982. Dans cette étude, les rats mâles ont été sacrifiés à 30 semaines en raison de décès par saignements inexplicables. Il n'est donc pas possible de savoir si les leucémies observées chez les femelles peuvent aussi se produirent chez les mâles. Dans une étude ultérieure (1997), avec la même souche de rat mais un protocole incluant la restriction alimentaire, le NTP n'a pas retrouvé cette augmentation d'incidence y compris avec des doses plus élevées. Une augmentation d'incidence de tumeurs bénignes du pancréas a été observée dans l'étude conventionnelle mais pas dans l'étude avec restriction du régime alimentaire. Il en va de même pour une augmentation d'incidence des adénomes pancréatiques chez les rats femelles. En revanche, des papillomes de la vessie ont été observés chez les rats y compris dans l'étude avec restriction du régime alimentaire. Cependant, ces résultats sont difficilement interprétables en l'absence de données historiques dans les groupes témoins [EC, 2004].

Enfin, dans une étude, le BBP donnée par voie orale (gavage) avant du 7,12-dimethylbenz(a)anthracène a montré un pouvoir inhibiteur pour les cancers mammaires et les adénocarcinomes [IARC, 1999].

En 1999, le CIRC a expertisé les mêmes études dans le cadre de l'évaluation des risques cancérogènes pour l'homme. Les experts en concluent que le BBP ne pouvait être classé comme cancérogène chez l'homme (groupe 3 « *not classifiable as to its carcinogenicity to humans* ») en raison de l'absence de donnée chez l'homme et de l'insuffisance des données animales [IARC, 1999].

Selon l'IPCS, le BBP n'est pas génotoxique même si un léger pouvoir clastogène ne peut être complètement écarté. Il n'est pas cancérogène chez la souris. Chez le rat, les résultats sont contradictoires, l'augmentation des leucémies (cellules mononucléaires) dans une étude n'est pas confirmée par une répétition, l'augmentation des tumeurs de la vessie et du pancréas observée dans les études classiques, sont évitées dans les études avec restriction des régimes alimentaires [IPCS, 1999].

L'US-EPA a également expertisé ces études. Les experts ont estimé que le BBP devait être considéré comme possiblement cancérogène chez l'homme (classe C « *possible human carcinogen* »). Ils observent cependant que, malgré une augmentation significative de l'incidence comparée au groupe témoin ainsi qu'aux données historiques dans les groupes témoins, les leucémies chez les rats exposées sont identiques à celles des rats témoins (leucémie ou lymphome des cellules mononucléaires) et sont survenues après une même

durée de latence (83 semaines). Ajouté au fait que le BBP n'a pas montré d'activité mutagène ou génotoxique, les experts concluent à la possibilité d'un rôle de promotion des tumeurs d'origines génétiques. L'US-EPA n'a pas dérivé de VTR pour les effets cancérigènes du BBP car les données concernant les leucémies chez la rate sont jugées inadéquates pour cet usage. Le NTP aurait lancé de nouvelles études (non disponibles au moment de la rédaction de ce document) [US-EPA, 2003].

1.3.2.5. *Irritation et sensibilisation*

Le potentiel irritant pour la peau du BBP a été testé chez le rat, le lapin et l'humain. Son potentiel irritant pour les yeux a été testé uniquement chez le lapin.

Selon les résultats d'études de bonne qualité (protocole Draize), le BBP n'est pas irritant cutané chez le lapin ni chez l'homme. Un léger effet irritant pour l'œil chez le lapin a été observé mais jugé non significatif. Selon les critères de l'Union Européenne le BBP ne doit pas être classé comme irritant de la peau ou des yeux [EC, 2004].

Une étude ancienne (protocole non standardisé) a montré un léger effet de sensibilisation cutanée chez le lapin. Chez la souris et le cobaye, les tests « ear swelling » sont négatifs mais ils n'ont pas été évalués. Deux études chez l'homme ne rapportent pas de sensibilisation cutanée par le BBP. Selon les critères de l'union européenne le BBP ne doit pas être classé comme sensibilisateur cutanée [EC, 2004].

1.4. Toxicité sur la reproduction et le développement

1.4.1. Données chez l'homme

1.4.1.1. Effets sur le développement

Il n'y a pas d'études disponibles chez l'homme

1.4.1.2. Effets sur la fertilité

Il n'y a pas d'études disponibles chez l'homme

1.4.2. Données chez l'animal

Ce chapitre est basé sur la monographie du CERHR¹¹ concernant les effets du BBP sur la reproduction ou la fertilité publiée en 2003 [CERHR, 2003] puis sur une analyse des études publiées après le rapport du CERHR c'est à dire entre 2003 et avril 2006. Les informations provenant du CERHR sont référencées avec la même numérotation que celle figurant dans le rapport du CERHR. Ces références bibliographiques sont listées à part dans le présent rapport. Les références postérieures sont présentées classiquement (nom et date) puis listées dans la bibliographie par ordre alphabétique.

1.4.2.1. Effets sur le développement

Expertise du CERHR

Le CERHR a examiné douze études : deux études du NTP selon les protocoles standards d'évaluation prénatale où le BBP est administré par voie orale dans la nourriture de rats et de souris, 5 études, publiées par le même auteur, concernent le rat Wistar exposé par gavage ou par le régime alimentaire, 1 étude par gavage chez le lapin, 3 études où le BBP est administré par l'eau de boisson pendant la gestation et la lactation avec un suivi des descendants F1 mâles, 1 étude sur deux souches de souris mâles (B6C3F1 et CD-1) exposés par injection intra péritoneales puis évaluation de la descendance issue de femelles non exposées (évaluation des mutations létales dominantes).

Les études montrent uniformément que le BBP est embryo-toxique (mortalité et morbidité) et tératogène après exposition orale entre le 6^{ème} et le 15^{ème} jour de gestation chez les rats comme chez les souris. L'incidence de la mortalité pré-natale est dose dépendante. Un

¹¹ CERHR : Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction.

NOAEL maternel et développement chez la souris CD-1 a été observé à 182 mg/kg./j [30]. Dans cette étude l'écart entre le NOAEL et le LOAEL à 910 mg/kg/j est très important. A la dose LOAEL on observe des résorptions, des morts fœtales tardives, une diminution du nombre de naissance par portée et des malformations externes (fente palatine), internes (augmentation du volume de la plèvre rénale) et squelettiques (fusion du sternum) (cf. Tableau 3) [30]. Chez les rats Sprague-Dawley et Wistar, le NOAEL développement va de 420 à 500 mg/kg/j (cf. Tableau 3). Les effets observés au LOAEL de 750 mg/kg/j comprennent : l'augmentation de la mortalité prénatale, la diminution du développement fœtal et des variations ou des malformations externes, internes et du squelette. Lorsque l'exposition commence le jour de la conception chez la rate Wistar, on observe un NOAEL de 185 mg/kg/j (LOAEL à 375 mg/kg/j pour une réduction du nombre de fœtus par portée). Dans une étude chez le lapin aucun effet sur le développement n'a été observé à la dose maximale de 10 mg/kg/j. L'intérêt de ce résultat est limité par le fait qu'aucune dose testée n'a produit d'effet toxique dans cette étude.

Les mono esters MBuP et MBeP¹² ont été également testés selon le même protocole que celui utilisé pour le BBP. Les effets observés sur le développement sont identiques à ceux du BBP. Pour le MBuP, un NOAEL maternel et développement est identifié à 250 mg/kg/j (LOAEL 500 mg/kg/j : diminution du poids et du nombre de naissance, malformations internes, externes et squelettique) [36]. Dans une autre étude [38] avec des groupes de dose similaires, trois fenêtres d'exposition *in utero* ont été testées (du 7^e au 9^e jour, du 10^e au 12^e jours et du 13^e au 15^e jour de gestation). Il n'y a pas d'effet sur le développement pour les expositions au BBP du 10^e au 12^e jour de gestation (NOAEL = 750 mg/kg/j, pas de LOAEL). Un LOAEL à 500 mg/kg/j (pas de NOAEL) pour les malformations du squelette (déformation des vertèbres cervicales) a été observé pour les expositions du 7^e au 9^e jours de gestation. Le même LOAEL est observé pour les expositions du 13^e au 15^e jour de gestation (malformations du sternum et fente palatine) [38]. Le même protocole d'étude a été utilisé pour comparer les effets du BBP et du DBP. Les résultats des deux phtalates sont identiques et parfaitement en accord avec les résultats de l'étude précédente (absence de malformation pour les expositions entre le 10^e et 12^e jour de gestation, malformations spécifiques aux deux autres fenêtre d'expositions). Les auteurs concluent que la dépendance des effets par rapport à la période d'exposition *in utero* et la similarité des malformations générées indiquent que le DBP et le BBP agissent via le même mécanisme probablement initié par les métabolites communs MBeP et MBuP aux deux phtalates [37]. Avec le MBeP, il n'y a pas de NOAEL maternel puisqu'à la première dose testée on observe déjà un effet toxique marqué

¹² Ils ont été testé car ce sont les métabolites principales du DBP et du BBP.

par la réduction de la consommation alimentaire (LOAEL 250 mg/kg/j). Le NOAEL pour les effets sur le développement est fixé à 250 mg/kg/j (LOAEL : 313 mg/kg/j = malformations du squelette, 375 mg/kg/j = malformations internes, 438 mg/kg/j = malformations externes et augmentation du taux de mortalité fœtale « *post implantation loss* ») [39].

L'exposition par l'eau de boisson chez le rat Wistar avant accouplement, pendant la gestation et la lactation, donne une augmentation de la mortalité postnatale (0 à 4 jours après délivrance) aux dose 1 et 3 mg/L (0,14 et 0,385 mg/kg/j). L'étude a été répétée et seule la plus haute dose a reproduit ce résultat [45]. Toutefois les experts du CERHR notent que les différences de mortalité avec le groupe témoins ne sont plus statistiquement significatives si l'on analyse les données par portée et non par groupe, et que la mortalité post-néonatale dans le groupe témoin des deux études excède la valeur historique pour ce laboratoire. De plus, d'autres études réalisées par ce même laboratoire à la même période dépassent les taux d'incidence habituels même pour les groupes témoins. Enfin, deux autres études similaires chez le rat Wistar [26, 43, 46] exposé à 1 mg/L n'ont pas retrouvé cet effet à ce niveau de dose via l'eau de boisson. Dans la troisième [46], les doses étaient légèrement plus élevées (0,17 et 0,540 mg/kg/j). Pour ces raisons, la confiance dans les résultats (NOAEL et LOAEL trois ordres de grandeur en dessous des autres études par voie orale) de cette étude [45] est donc très limitée.

Conclusions des experts du CERHR

Les données chez le rat et la souris sont adéquates pour évaluer les effets du BBP sur le développement prénatal, la mortalité fœtale et la tératogénicité. Toutefois, aucune des études n'évaluent les effets androgéniques (conservation des mamelons, descente testiculaire, retard de maturité sexuelle) qui sont des indicateurs plus sensibles de la toxicité sur le développement observée pour le DBP. Le BBP et le DBP possèdent les mêmes métabolites (MBeP et MBuP) et les études disponibles sont suffisantes pour démontrer que ces deux mono esters contribuent à la toxicité du développement observée. En raison de gammes de doses différentes, il n'a pas été possible de comparer la sensibilité respective des deux espèces testées (souris et rats).

Etudes publiées après le rapport du CERHR

Les effets du BBP sur le développement ont été étudiés chez le rat Harlan Cpb-WU, exposé par gavage (huile de maïs + BBP) aux doses 0, 270, 350, 450, 580, 750, 970, 1250, 1600, 2100 mg/kg/j avec deux périodes d'exposition : du 6^e au 15^e jours de gestation (exposition courte : EC) et du 6^e au 20^e jour de gestation (exposition longue : EL) [Piersma, 2000]. Chez les mères on observe : une diminution du poids corporel dose dépendante uniquement à

partir des deux plus fortes doses ($DEC_{5\%} \approx 1000$ à 1500 mg/kg/j)¹³; une augmentation du poids relatif du foie avec une relation dose-réponse presque linéaire et plus marquée pour les expositions longues ($DEC_{5\%} \approx 330$ à 600 mg/kg/j). Il en va de même pour le poids des reins ($DEC_{5\%} \approx 360$ à 630 mg/kg/j). Le taux de résorption fœtale est aussi linéairement dépendant de la dose et atteint 100 % dans les deux derniers groupes de dose indépendamment de la durée d'exposition ($DEC_{1\%} \approx 200$ mg/kg/j). Les poids de naissance sont aussi dose-dépendants quelque soit la durée d'exposition ($DEC_{5\%} \approx 460$ mg/kg/j), mais le traitement par gavage montre un effet sur le poids de naissance indépendamment du niveau de dose (plus faible poids dans le groupe des longues expositions que dans le groupe des courtes expositions à tous les niveaux de dose). L'apparition d'une 13^e vertèbre lombaire est la variation squelettique la plus sensible, avec une relation dose-réponse linéaire plus marquée pour les longues expositions ($DEC_{5\%} \approx 180$ à 220 mg/kg/j). D'autres malformations sont observées généralement à partir de 750 mg/kg/j. Le poids des testicules est inversement proportionnel à la dose dans le groupe des longues expositions mais pas dans l'autre ($DEC_{5\%} \approx 180$ à 600 mg/kg/j). La non descente testiculaire est également dose-dépendante ($DEC_{1\%} \approx 180$ à 260 mg/kg/j) [Piersma, 2000].

La capacité de différents phtalate à altérer la différenciation sexuelle mâle selon un mécanisme anti-androgénique a été testée chez le rat Sprague-Dawley [Gray, 2000]. L'hypothèse des auteurs est que les phtalates qui altère les fonctions testiculaires des mâles pubères doivent aussi provoquer des malformations des tissus androgéno-dépendants chez le fœtus mâle exposé *in utero*. Le BBP et le DEHP sont les deux candidats positifs, le DINP un candidat intermédiaire (mélange de plusieurs esters) et le DOTP, le DEP, le DMP des candidats négatifs. Les rates étaient exposées à 750 mg/kg/j (même dose pour tous les phtalates testés) du 14^e jours de gestation au 3^e jours après la délivrance. Aucune toxicité maternelle ni réduction du nombre de naissance ne sont observées. Le BBP et DEHP ont diminué les poids de naissance d'environ 15 %. La distance ano-génitale des mâles (mais pas des femelles) est réduite de 30 % et le poids des testicules de 35 %. Avec le BBP, 70 % des mâles montrent des aréoles ou mamelons conservés (DEHP = 87 % ; DINP = 22 %), alors que l'incidence est de 0 % dans les autres groupes. Le taux de malformations chez les mâles était de 84 % dans le groupe exposé au BBP (82% pour les groupe exposé au DEHP et 7,7% dans le groupe exposé au DINP). L'effet des faibles doses de BBP sur la différenciation sexuelle reste discuté. Les auteurs recommandent des études multi-générationnelles afin d'établir un NOAEL pour la reproduction [Gray, 2000].

¹³ $DEC_{5\%}$ = dose d'effets critiques à 5 %, le signe « ≈ » indique que les valeurs sont lues sur un graphe, la première est pour les longues expositions la seconde pour les courtes.

L'embryotoxicité du BBP et d'autres esters de phtalates a été testée dans une étude *in vitro* [Seek Rhee, 2002]. Appliqué à des cultures d'embryons entiers ou des cellules cérébrales ou de bourgeons de membres, les doses sont exprimées en µg/mL. Les résultats confirment l'embryotoxicité du BBP mais sont difficilement interprétables quantitativement.

La toxicité du BBP pour le développement du système reproducteur lors des expositions maternelles a été étudiée chez le rat Wistar [Ema, 2002]. Du 15^e au 17^e jours de gestation les rates (16/groupes) étaient exposées aux doses : 0, 250, 500 ou 1000 mg/kg/j. Dans les deux derniers groupes de dose, le gain de poids des mères était significativement diminué (NOAEL = 250 mg/kg/j). A 1000 mg/kg/j, le nombre de naissances vivantes par portée est diminué ainsi que le poids des fœtus mâles et femelles. L'incidence des mâles ayant les testicules non descendus est significativement augmentée dans les deux derniers groupes de dose (respectivement 54/111 et 97/108). La distance ano-génitale des mâles est diminuée à partir de 500 mg/kg/j. Celle des femelles reste inchangée dans tous les groupes de doses.

La toxicité embryonnaire du BBP et de ses deux métabolites (MBuP et MBeP) a été testée dans une étude comparative chez le rat (Sprague-Dawley) et la souris (OF1). Le BBP, le MBuP et le MBeP étaient administrés par voie orale en une seule fois (respectivement 0, 280, 560, 1 120, 1 690 mg/kg ; 0, 200, 400, 800, 1200 mg/kg ; 0, 230, 460, 920, 1 380 mg/kg) chez les souris gravides (15 à 23 / groupes) le 8^e jour de gestation et chez les rates gravides (7 à 13 / groupes) le 10^e jour de gestation. Les effets observés sont cohérents avec tous les résultats d'étude présentés précédemment. Chez la souris, le système nerveux central est le lieu d'expression toxique pour l'exposition *in utero* au MBuP et MBeP. Le BBP et ses deux métabolites sont embryotoxiques et tératogènes. Les trois sont toxiques à plus faibles doses chez la souris. Dans une partie de l'étude réalisée *in vitro*, les auteurs ont montré que la différence inter espèce observée *in vivo* n'est pas due à une sensibilité accrue chez les souris mais probablement à des facteurs maternels (métabolisme et distribution) [Saillenfait, 2003]

Les effets du MBeP (métabolite du BBP) sur le système reproducteur mâle pendant l'embryogenèse ont été testés chez la rate Wistar. Les rates étaient exposées par gavage à 0, 167, 250 et 375 mg/kg/j du 15^e au 17^e jour de gestation. Les fœtus étaient examinés le 21^e jours de gestation. Le gain de poids maternel et la consommation alimentaire de la mère était significativement réduit à partir de la première dose (LOAEL 167 mgMBeP/kg/j pas de NOAEL). Une augmentation significative de l'incidence des testicules non descendus et une

réduction de la distance ano-génitale apparaissaient à partir de la deuxième dose (NOAEL = 167 mgMBeP/kg/j ; LOAEL = 250 mgMBeP/kg/j). La distance ano-génitale des femelles est inchangée dans tous les groupes de dose comparés au groupe témoin. Ces résultats suggèrent que le MBeP est responsable des effets anti-androgéniques du BBP [Ema, 2003].

Tableau 3 : Synthèse des études expérimentales sur les effets du BBP, du MBeP et du MBuP sur le développement fœtal

| Espèce (nbr/groupes) (groupe de dose) | Type d'étude (respect BPL et protocole) | Voie exposition | Période exposition | NOAEL | LOAEL | Effet | incidence (LOAEL) | Variation (LOAEL) | dose réponse | Source |
|---|---|-----------------|--------------------|--|--------------|--|-------------------|-------------------|--------------|-----------------------------|
| Rat Sprague-Dawley (30F/grp) (0, 420, 1100, 1640 mg/kg/j) (nd) | Développement (In utero) | nourriture | g6-à g15 | 420 mg/kg/j | 1100 mg/kg/j | ↓ du poids corporel des mères ↑ du poids du foie et des reins des mères Variations au niveau des fœtus | nd | nd | nd | CERHR [27] |
| | | | | 420 mg/kg/j | 1100 mg/kg/j | | nd | nd | nd | |
| | | | | 1100 mg/kg/j | 1640 mg/kg/j | Malformations et mortalité fœtale | nd | nd | nd | |
| Rat Wistar (15-18F/grp) (0, 185, 375, 654, 974 mg/kg/j) | Développement (oui) | nourriture | g0-à g20 | 375 mg/kg/j | 654 mg/kg/j | ↓ du poids corporel des mères | | | nd | CERHR [28] |
| | | | | 654 mg/kg/j | 974 mg/kg/j | Portée totalement résorbée | | | nd | |
| | | | | 185 mg/kg/j | 375 mg/kg/j | ↓ du poids corporel des fœtus | | | nd | |
| Rat Wistar (10F/grp) (0, 500, 750, 1000 mg/kg/j) | Développement (oui) | nourriture | g7-à g15 | 500 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↓ consommation alimentaire des mères ↓ NS du gain de poids corporel | nd | nd | nd | CERHR [29] |
| | | | | | | Porté totalement résorbé | | 3/10 | | |
| | | | | 500 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | Malformations : sternum, fente palatine, plèvre rénale | nd | nd | nd | |
| Souris CD-1 (30F/grp) (0, 182, 910, 2330 mg/kg/j) | Développement (oui) | nourriture | In utero | 182 mg/kg/j | 910 mg/kg/j | ↓ du poids corporel des mères | nd | | | CERHR [30] |
| | | | | 182 mg/kg/j | 910 mg/kg/j | ↑ du poids du foie et des reins des mères | | | | |
| | | | | | | ↑ Incidence résorption Mortalité fœtale Malformations (ex-encéphale, squelette) | nd | | | |
| Rat Harlan Cpb-WU (10F/grp) (0, 270, 350, 450, 580, 750, 970, 1250, 1600, 2100 mg/kg/j) | Développement (nd) | gavage | In utero | DEC ₅ % ≈ 1000-1500 mg/kg/j | | ↓ du poids corporel des mères | - | - | Oui | Piersma, 2000 et RIVM, 1999 |
| | | | | DEC ₅ % ≈ 330-600 mg/kg/j | | ↑ du poids du foie des mères | | | Oui | |
| | | | | DEC ₅ % ≈ 360-630 mg/kg/j | | ↑ du poids des reins des mères | | | Oui | |
| | | | g6 à g15-20 | DEC ₁ % ≈ 200-200 mg/kg/j | | ↑ taux de résorption fœtale | | | Oui | |
| | | | | DEC ₅ % ≈ 460-460 mg/kg/j | | ↓ du poids corporel des fœtus | - | - | Oui | |
| | | | | DEC ₅ % ≈ 180-220 mg/kg/j | | apparition d'une 13 ^e vertèbre lombaire | | | Oui | |
| | | | | DEC ₅ % ≈ 180-600 mg/kg/j | | ↓ du poids des testicules | | | Oui | |
| | | | | DEC ₁ % ≈ 180-260 mg/kg/j | | ↑ incidence de testicules non descendues | | | Oui | |
| Rat Wistar (16/grp) (0, 250, 500, 1000 mg/kg/j) | Développement (nd) | Gavage | In utero | 750 mg/kg/j | 970 mg/kg/j | Autres malformations internes ou externes | nd | | | Ema, 2002 |
| | | | | 250 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↓ du gain de poids corporel des mères | nd | | oui | |
| | | | | 250 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↑ incidence de testicules non descendues | 54/111 | | | |
| | | | | 500 mg/kg/j | 1000 mg/kg/j | ↓ du poids corporel des fœtus ↓ du nb de naissances vivantes/portée | nd | | | |

Tableau 3 : suite

| Espèce (nbr/groupes) (groupe de dose) | Type d'étude (respect BPL et protocole) | Voie exposition | Période exposition | NOAEL | LOAEL | Effet | incidence (LOAEL) | Variation (LOAEL) | dose réponse | Source | | |
|--|--|---------------------------|-----------------------|--------------|--------------|---|----------------------|----------------------|-----------------|-------------------|--|--|
| Rat Rat Sprague-Dawley (7 à 13 /grp) (0, 560, 1120, 1690 mg/kg/j) | Développement (nd) | gavage <i>In utero</i> | g10 | 1120 mg/kg/j | 1690 mg/kg/j | ↑NS Mortalité des mères | 1/9 | 16% | -9% | Saillenfait, 2003 | | |
| | | | | 1120 mg/kg/j | 1690 mg/kg/j | ↑NS taux de résorptions | | | | | | |
| | | | | 1120 mg/kg/j | 1690 mg/kg/j | ↓NS nombre de fœtus vivants / portée | | | | | | |
| | | | | 1120 mg/kg/j | 1690 mg/kg/j | ↑NS Malformations : exencéphalie, faciale | 0,9 | | | | | |
| Souris OF1 (15 à 23/grp) (0, 280, 560, 1120, 1690 mg/kg/j) | Développement (nd) | gavage <i>In utero</i> | g8 | 560 mg/kg/j | 1120 mg/kg/j | ↓ du gain de poids corporel des mères | -43 % | Oui | oui | Saillenfait, 2003 | | |
| | | | | 280 mg/kg/j | 560 mg/kg/j | ↑ taux de résorptions et mortalité foetale | | 19 et 22% | | | | |
| | | | | 560 mg/kg/j | 1120 mg/kg/j | ↓ nombre de fœtus vivants / portée | | | | | | |
| | | | | 280 mg/kg/j | 560 mg/kg/j | ↑ Malformations : exencéphalie, faciale | 2,1 % | | | | | |
| MBuP | | | | | | | | | | | | |
| Rat Wistar (10F/grp) (0, 250, 500, 625 mgMBuP/kg/j) | Développement (nd) | gavage <i>In utero</i> | g7-à g15 | 250 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↓ du poids corporel des mères | nd | nd | nd | CERHR [38] | | |
| | | | | | | ↓ consommation alimentaire des mères | | | | | | |
| | | | | | | ↑ taux de résorptions et de mortalité foetale | | | | | | |
| | | | | | | ↓ du poids des fœtus vivants | | | | | | |
| Rat Wistar (10F/grp) (0, 500, 625, 750 mgMBuP/kg/j) | Développement (oui) | <i>In utero</i> | g7-à g9 | 0 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↑ Malformations sternum, fente palatine, plèvre rénale | nd | nd | nd | CERHR [36] | | |
| | | | | | | ↑ Mortalité foetale | | | | | | |
| | | | | | | ↑ Malformations : vertèbre cervicale | | | | | | |
| | | | | | | ↑ Mortalité foetale | | | | | | |
| Rat Sprague-Dawley (7 à 13 /grp) (0, 400, 800, 1200 mgMBuP/kg/j) | Développement (nd) | gavage <i>In utero</i> | g10 | 1200 mg/kg/j | nd | Mortalité des mères | 0 | 6% | -5% | Saillenfait, 2003 | | |
| | | | | | | ↑NS taux de résorptions | | | | | | |
| | | | | | | ↓NS nombre de fœtus vivants / portée | | | | | | |
| | | | | | | Malformations : exencéphalie, faciale | 0 | | | | | |
| Souris OF1 (15 à 23/grp) (0, 200, 400, 800, 1200 mgMBuP/kg/j) | Développement (nd) | gavage <i>In utero</i> | g8 | 200 mg/kg/j | 400 mg/kg/j | ↓ du gain de poids corporel des mères | -41% | 40 et 40% | -47% | Saillenfait, 2003 | | |
| | | | | | | ↑ taux de résorptions et de fausse couches | | | | | | |
| | | | | | | ↓ nombre de fœtus vivants / portée | | | | | | |
| | | | | | | ↑ Malformations : exencéphalie, faciale | 2 % | | | | | |

Tableau 3 : suite

| Espèce (nbr/groupes) (groupe de dose) | Type d'étude (respect BPL et protocole) | Voie exposition | Période exposition | NOAEL | LOAEL | Effet | incidence (LOAEL) | Variation (LOAEL) | dose | Source |
|--|--|--|-----------------------|--|--|---|------------------------------------|----------------------|------|--------------------------|
| MBeP | | | | | | | | | | |
| Rat Wistar (nd) (0, 250, 313, 375, 438, 500 mgMBeP/kg/j) | Développement (nd) | gavage <u>In utero</u> | g7 à g15 | 0 mg/kg/j 250 mg/kg/j 250 mg/kg/j 313 mg/kg/j | 250 mg/kg/j 313 mg/kg/j 313 mg/kg/j 375 mg/kg/j | ↓ consommation alimentaire des mères ↓ du poids corporel des mères Malformation squelette (cervicale) ↑ résorptions et malformation autres | | | | CERHR [39] |
| Rate Wistar (?) (0, 167, 250, 375 mgMBeP/kg/j) | Développement (nd) | gavage In utero | g15 à g17 | 0 mg/kg/j 167 mg/kg/j | 167 mg/kg/j 250 mg/kg/j | ↓ consommation alimentaire des mères ↓ du poids corporel des mères ↑ incidence de testicules non descendues ↓ distance ano-génitale uniquement mâles | nd | | nd | Ema, 2003 |
| Rat Sprague-Dawley (7 à 13 /grp) (0, 460, 920, 1380 mgMBeP/kg/j) | Développement (nd) | gavage <u>In utero</u> | g10 | 460 mg/kg/j 920 mg/kg/j 1380 mg/kg/j 1380 mg/kg/j | 920 mg/kg/j 1380 mg/kg/j nd nd | Mortalité des mères ↑ NS taux de résorptions Nombre de fœtus vivants / portée Malformations (exencéphalie) | 1/13 9% +0% | | | Saillenfait, 2003 |
| Souris OF1 (15 à 23/grp) (0, 230, 460, 920, 1380 mgMBeP/kg/j) | Développement (nd) | gavage <u>In utero</u> | g8 | 460 mg/kg/j 230 mg/kg/j 1380 mg/kg/j 460 mg/kg/j | 920 mg/kg/j 460 mg/kg/j nd 920 mg/kg/j | Mortalité des mères ↑ taux de résorptions et de fausse couches ↓ nombre de fœtus vivants / portée ↑ Malformations (exencéphalie) | 2/19 46 et 47% -33% 3,2 % | | | Saillenfait, 2003 oui |
| « ↓ » diminution statistiquement significative | | « g6 à g15 » exposition des mères du 6 ^e jour au 15 ^e jour de gestation DEC _{5%} = Doses effective critique, pour une incidence de l'effet à 5% | | | | | | | | |
| « ↓NS » diminution non significative | | « xF/grp » x femelles par groupe | | | | | | | | |
| « ↑ » augmentation statistiquement significative | | « xM/grp » x mâles par groupe | | | | | | | | |
| « ↑NS » augmentation non significative | | « nd » = données non disponibles dans les documents utilisés | | | | | | | | |

1.4.2.2. *Effets sur la fertilité*

Expertise du CERHR

Il n'y a pas d'étude chez l'homme exposé spécifiquement au BBP. Une étude épidémiologique chez les travailleurs de la production du PVC, montre une augmentation de l'incidence des désordres menstruels et des avortements spontanés [49].

Chez l'animal, six études ont été expertisées. Elles concernent la fertilité des mâles, la fertilité des femelles et les mécanismes d'actions.

Toxicité pour la reproduction chez les mâles

Trois études ont investigué ce domaine [17, 48, 50]. Chez le rat F344 mâle exposé pendant 10 semaines avant accouplement avec des femelles non exposées, on observe une diminution du compte spermatique à 200 mg/kg/j [17]. Cependant cette observation n'est pas considérée comme un NOAEL car d'une part la fertilité dans ce groupe de dose n'était pas différente des témoins et d'autre part le temps pour la régénération des spermatozoïdes dans l'épididyme après accouplement n'a pas été respecté. Chez le rat WU exposé à 500 mg/kg/j par gavage pendant deux semaines avant accouplement, aucune baisse de fertilité n'est observée [48]. Une baisse significative de la fertilité et des lésions testiculaires sont observées à 1000 mg/kg/j [48]. Chez le rat Wistar, aucune baisse de fertilité ni autres effets néfastes ne sont observés pour des expositions pendant 10 semaines avant l'accouplement jusqu'à la naissance d'une deuxième portée à la dose de 418 mg/kg/j (NOAEL = 418 mg/kg/j pas de LOAEL) [50].

Les examens histopathologiques dans les études classiques de toxicité subchronique ou chronique montrent que la plus petite dose ayant provoqué des lésions testiculaires chez le rats F344 est de 1 338 mg/kg/j [15]. Chez la souris B6C3F1 aucun effet sur les organes reproducteurs mâles n'est observé jusqu'à une dose de 2 058 mg/kg/j de même que chez le chien Beagle jusqu'à 1 852 mg/kg/j. Enfin, aucune des études disponibles [17, 48, 50] n'a examiné l'appareil reproducteur des descendants mâles à la période critique. Cette constatation aurait pourtant pu identifier un NOAEL pour la fertilité des mâles plus bas que celui sélectionné par les experts du CERHR , à 500 mg/kg/j (LOAEL = 1 000 mg/kg/j pour des lésions testiculaires, une baisse de la fertilité et du nombre de naissances) [48].

Toxicité pour la reproduction chez les femelles

Dans une étude sur la reproduction chez le rat WU, le nombre de femelles fécondées et le nombre de naissance par portée était diminué dans le groupe de dose à 1000 mg/kg/j [48].

Le NOAEL est de 500 mg/kg/j dans cette étude mais, les mâles également exposés avant l'accouplement ayant montré des lésions testiculaires, il est possible que les effets observés chez les femelles soient dus à la toxicité sur les organes reproducteurs des mâles. Dans une étude chez le rat Wistar aucun effet sur la fertilité, la fécondité et les organes reproducteurs femelles n'a été observé chez les rates exposées par le régime alimentaire avant l'accouplement à 446 mg/kg/j (pas de LOAEL) [50]. Le CERHR a sélectionné le NOAEL de 500 mg/kg/j pour la fertilité des femelles.

Conclusions des experts du CERHR

Les données chez le rat sont adéquates pour évaluer la toxicité sur la fertilité des adultes. Elles démontrent que les testicules sont l'organe cible de l'expression toxique du BBP pour la reproduction. Toutefois on ne sait pas quel est l'âge le plus sensible aux effets reprotoxiques du BBP.

Etudes publiées après le rapport du CERHR

Les effets du BBP sur le développement ont été testés dans une étude sur deux générations (parents F0 et descendants F1 et F2) chez le rat Sprague-Dawley [Nagao, 2000]. Les mâles et les femelles (25 par groupe de doses) étaient exposés par gavage aux doses : 0, 20, 100, 500 mg/kg/j, trois semaines avant l'accouplement et jusqu'au 21^e jour après délivrance (environ 9 semaines). Seuls les parents mâles exposés à 500 mg/kg/j ont montré une diminution du gain de poids corporel sans baisse significative de la consommation alimentaire. Aucun changement de cycle hormonal, de fertilité ou de lactation des femelles n'a été observé. Il n'y a pas de lésions observables au niveau des organes reproducteurs mâles ou femelles mais une diminution du taux de testostérone est notée chez les mâles. Chez les descendants, les poids corporels à la naissance (mâles et femelles) étaient diminués à partir de la dose de 100 mg/kg/j (NOAEL = 20 mg/kg/j), diminution persistante 21 jours après sans atteinte de la viabilité des mâles dans le groupe exposé à 500 mg/kg/j. La distance ano-génitale était diminuée chez les mâles et augmentée chez les femelles du groupe exposé à 500 mg/kg/j (NOAEL = 100 mg/kg/j). Dans ce même groupe, l'âge à la puberté était retardé chez les mâles mais pas chez les femelles. Egalement dans ce groupe, les mâles avaient des lésions testiculaires et une baisse du taux de testostérone après la puberté. Les auteurs proposent une NOAEL de 20 mg/kg/j pour les effets du BBP sur la reproduction [Nagao, 2000].

La toxicité du BBP pour la reproduction a été testée chez le rat Charles Rivers sur trois générations (F0, F1, F2) selon les lignes directrices de l'US-EPA (OPPTS 837.3800). Les

parents F0 et F1 étaient exposés par le régime alimentaire aux doses 0, 50, 250, 750 mg/kg/j pendant 10 semaines avant l'accouplement jusqu'à la fin de la lactation. Aucun effet toxique systémique ou sur la reproduction n'est observé chez les mâles et les femelles des trois générations du premier groupe de dose (50 mg/kg/j). Dans le groupe de dose suivant (250 mg/kg/j) on observe une réduction de la distance ano-génitale chez les mâles F1 et F2 mais elle ne s'accompagne pas d'altération de la reproduction tant fonctionnelle que structurelle. Dans le dernier groupe de dose (à 750 mg/kg/j), on observe une toxicité systémique chez les parents F0 (augmentation du poids du foie et des reins), une toxicité systémique et reproductive chez les parents F1 (augmentation du poids du cerveau et du pancréas). A ce niveau de dose, on observe chez les mâles F1 et F2 : une distance ano-génitale réduite, la persistance d'aréoles ou de mamelons, des malformations au niveau de l'appareil reproducteur et un retard d'âge à la puberté chez les mâles et les femelles. Le NOAEL pour la toxicité systémique et reproductive chez les parents est de 250 mg/kg/j. Chez les descendants (F1 et F2) un NOEL est établit à 250 mg/kg/j avec un NOAEL à 750 mg/kg/j car la réduction de la distance ano-génitale observée à ce niveau de dose n'est pas accompagnée de troubles fonctionnels ou structurels de la reproduction [Tyl, 2004].

Tableau 4 : Synthèse des études expérimentales sur les effets du BBP sur la fertilité

| Espèce (nbr/groupes) (groupe de dose) | Type d'étude (BPL et protocole) | Voie | génération | période | NOAEL | LOAEL | Effet | incidence (LOAEL) | Variation (LOAEL) | dose réponse | Source |
|--|--|--------------------|-------------------------|-------------|-------------|--------------|---|--------------------------------|----------------------|-----------------|-------------|
| Rat WU (10/sexe/groupe) (0, 250, 500, 1000 mg/kg/j) | Fertilité 2 générations gavage (OCDE 421) | gavage | FO femelles | g-14 à g+29 | 500 mg/kg/j | 1000 mg/kg/j | ↓ Fertilité (fécondité) | oui | | oui | |
| | | | FO mâles | g-14 à g+29 | 500 mg/kg/j | 1000 mg/kg/j | Dégénérescence testiculaires (ovaires intactes) | nd | | nd | CERHR [48] |
| | | in utero | F1 | g0 à g6 | 250 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↓ du poids de naissance (dev.) pas d'examens de la fertilité | - 7 % | | oui | |
| Rat Wistar (12M+24F/grp) (M = 0, 108, 206, 418 F = 0, 106, 217, 446 mg/kg/j) | Fertilité 2 générations nourriture (OCDE 415) | F0 mâles | 70j AA | 418 mg/kg/j | nd | | Fertilité normales des mâles | - | | | |
| | | F0 femelles | 14j AA + gl | 446 mg/kg/j | nd | | Fertilité normales des femelles | - | | | CERHR [50] |
| Rat F344 (15M/grp) (0, 20, 200, 2 200 mg/kg/j) | Fertilité (nd) | nourriture | F0 mâles | 70j AA | 200 mg/kg/j | 2 200mg/kg/j | ↓ du nombre de spermatozoïdes ↓ de la fertilité ↓ du poids prostate et testicules Lésions testicules, épидidymes | nd nd nd nd | | | CERHR [17] |
| Rat Sprague-Dawley (25/sexe/grp) 0, 20, 100, 500 mg/kg/j | Fertilité 2 générations + allaitement (nd) | in utero+ F1 mâles | gavage | F0 mâles | 84j AA | 100 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↓ poids corporel | | -9 % | |
| | | | | | | | | ↑ poids : foie, cerveau, reins | | +8 +19 +7 % | |
| | | | F0 femelles | 14j AA + gl | 500 mg/kg/j | nd | | Perf. reproduction normales | - | | |
| | | | | | 500 mg/kg/j | nd | | Perf. reproduction normales | - | | |
| | | | | | 100 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↓ poids des ovaires | | -11 % | | |
| | | F1 femelles | g0 à g21 + 0 à 22jpn | 20 mg/kg/j | 20 mg/kg/j | 100 mg/kg/j | ↑ poids des reins | | +8 % | | |
| | | | | | 500 mg/kg/j | nd | | Perf. reproduction normales | - | | |
| | | | +22jpn à A | 500 mg/kg/j | 100 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↓ distance ano-génitale | | -6 % | | |
| | | | | | 20 mg/kg/j | 100 mg/kg/j | ↓ poids testicules et épididymes | | -12 et -9% | | |
| | | | | | 500 mg/kg/j | nd | ↓ transitoire poids de naissance | | -6 % | | Nagao, 2000 |
| | | in utero | F2 mâles | g0 à g21 | 100 mg/kg/j | 500 mg/kg/j | ↑ poids de l'utérus | | +13 % | | |
| | | | | | 0 à 22jpn | | ↓ poids des ovaires | | -15 % | | |
| | | | F2 femelles | +22jpn à F2 | 20 mg/kg/j | 100 mg/kg/j | ↓ transitoire poids de naissance | | -6 % | | |
| | | | | | 500 mg/kg/j | nd | Perf. reproduction normales | | | | |
| | | | | | 500 mg/kg/j | nd | Absence d'effet | | | | |
| | | | F2 femelles | g0 à g21 | 500 mg/kg/j | nd | Absence d'effet | | | | |
| | | | | | 500 mg/kg/j | nd | | | | | |

« ↓ » diminution statistiquement significative

« ↓NS » diminution non significative

« ↑ » augmentation statistiquement significative

« ↑NS » augmentation non significative

« xF/grp » x femelles par groupe

« xM/grp » x mâles par groupe

« nd » = données non disponibles dans les documents utilisés

« 70j AA » = 70 jours avant accouplement

« 70j AA+gl » = 70 jours avant accouplement + période de gestation et d'allaitement

« 70j AN » = 70 j après la naissance

« g0 » premier jour de gestation « g21 » 21ème jours de gestation (naissance)

« 22jpn à A » = 22 jours post nataux (sevrage) jusqu'à l'accouplement

Tableau 4 : suite

| Espèce (nbr/groupes) (groupe de dose) | Type d'étude (BPL Voie et protocole) | génération | période | NOAEL | LOAEL | Effet | incidence (LOAEL) | Variation (LOAEL) | dose réponse | Source |
|--|---|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|----------------------|-----------------|-----------|
| Rat Charles Rivers (30/sexe/grp) (0, 50, 250, 750 mg/kg/j) | Fertilité 2 générations (US-EPA OPPTS837.3800) | nourriture | F0 mâles | 70j AA | 750 mg/kg/j | nd | Poids corporel et alim. normal | - | | |
| | | | | | 250 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | Fertilité structurelle et fonctionnelle normale | - | | |
| | | | | | | | ↑ du poids du foie et des reins | +16 et +10% | | |
| | | nourriture | F0 femelles | 70j AA + gl | 250 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | Poids corporel et alim. normal | - | | |
| | | | | | | | Fertilité structurelle et fonctionnelle normale | - | | |
| | | | | | 250 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↑ du poids du foie et des reins | +19 et +9% | | |
| | | | | | | | ↓ du poids ovaires et utérus | -20 et -17% | | |
| | | <i>in utero</i> | + F1 mâles | g0 +70j AN | 250 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↓ poids corporel | -10% | | |
| | | allaitement | | | | | ↓ consommation alimentaire | nd | | |
| | | + nourriture | | | | | ↑ poids : foie, cerveau, pancréas | +16, 7, 25% | | |
| | | | | | | | ↓ ind. fertilité et d'accouplement | -16% et -27% | | |
| | | | | | | | ↓ poids testicules, prostates | -21% et -18% | | |
| | | | | | 50 mg/kg/j | 250 mg/kg/j | ↓ distance ano-génitale | -9% | oui | Tyl, 2004 |
| | | | | | 250 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↑ nbr de mamelons conservés | 19-32% | | |
| | | | | | | | Retard à la puberté | -5j | | |
| | | | F1 femelles | g0 +70j AN | 250 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↓ poids corporel | -6% | | |
| | | | | | | | ↓ consommation alimentaire | nd | | |
| | | | | | | | ↑ du poids de l'utérus | +9 et +28% | | |
| | | | | | | | Retard à la puberté | -3j | | |
| | | | | | 750 mg/kg/j | nd | distance ano-génitale normale | - | | |
| | | | | | | | poids du foie et des reins normal | - | | |
| | | <i>in utero</i> | F2 mâles | g0 à g28 | 250 mg/kg/j | 750 mg/kg/j | ↓ distance ano-génitale | - | -14% | oui |
| | | | | | | | ↑ nbr de mamelons conservés | 17-72% | | |
| | | | | | | | Retard à la puberté non mesuré | - | | |
| | | | F2 femelles | g0 à g28 | 750 mg/kg/j | nd | distance ano-génitale normale | - | - | |
| | | | | | | | Retard à la puberté non mesuré | - | | |

« ↓ » diminution statistiquement significative

« ↓NS » diminution non significative

« ↑ » diminution statistiquement significative

« ↑NS » diminution non significative

« xF/grp » x femelles par groupe

« xM/grp » x mâles par groupe

« nd » = données non disponibles dans les documents utilisés

« 70j AA » = 70 jours avant accouplement

« 70j AA+gl » = 70 jours avant accouplement + période de gestation et d'allaitement

« 70j AN » = 70 j après la naissance

« g0 » premier jour de gestation

1.4.3. Mécanismes d'action proposés

La plupart des études sur les mécanismes d'action toxique du BBP ont été réalisées à partir des années 2000.

Les études chez le rats montrent que les effets sur le développement prénatal sont bien attribuables au BBP et non pas à la réduction de la consommation alimentaire [32, 33]. Le mécanisme d'action proposé est une réduction du taux de progestérone sanguin due à une altération de la phase lutéale¹⁴ [35].

Le mécanisme d'action tératogène du BBP a été étudié chez le rat Wistar [Uriu-Adams, 2001]. L'objectif était de vérifier si le BBP pouvait bloquer le métabolisme du zinc chez la mère par hyper production de métallothionéine hépatique ayant pour conséquence une réduction du zinc délivré au fœtus. Les rates exposées par gavage à 0, 250, 1 000, 1 500, ou 2 000 mg/kg/j montrent des effets toxiques classiques à partir du deuxième groupe de dose. Dans les deux derniers groupes la mortalité fœtale apparaît ainsi que des malformations prononcées des fœtus. Les taux de métallothionéine hépatique chez les mères sont légèrement augmentés à 1 500 et 2 000 mg/kg/j. Une répétition de l'expérimentation en administrant du zinc radio marqué aux mères 18 h avant d'être sacrifiées ne montre pas de séquestration du zinc au niveau hépatique. L'hypothèse initiale est rejetée : la tératogénicité du BBP ne proviendrait pas d'une interférence avec le métabolisme du zinc.

Dans une étude *in vitro* le mécanisme d'action du BBP pour les malformations du squelette a été investigué [Marchetti, 2002]. Cette étude montre que le BBP agit rapidement et de manière dose dépendante sur le cytosquelette¹⁵ des cellules ostéoblastes¹⁶ Py1a des rats. La morphologie des cellules exposées est modifiée au niveau des micros filaments. On observe une modification de la forme en axe vers une forme ronde et de fins paquets autour de la membrane cellulaire. Les micro filaments jouent un rôle crucial dans le maintien de la forme des cellules. Cette perturbation peut compromettre la bonne adhésion

¹⁴ Partie du cycle menstruel qui débute avec l'ovulation, caractérisée par la transformation du follicule ovarien rompu en corps jaune et la sécrétion de progestérone par ce dernier, et qui se termine avec la menstruation si l'ovule n'est pas fécondé. [Source : Grand dictionnaire terminologique : <http://www.granddictionnaire.com/>].

¹⁵ Ensemble des constituants organisés d'une cellule [Source : Grand dictionnaire terminologique].

¹⁶ Cellule osseuse jeune, cuboïde ou prismatique, à grand noyau, observée dans la moelle osseuse et la couche ostéogène du périoste et présente dans le tissu conjonctif ou cartilagineux en voie d'ossification [Source : Grand dictionnaire terminologique].

des ostéocytes¹⁷. En l'absence de mort cellulaire le BBP doit agir en perturbant l'organisation des protéines du cytosquelette [Marchetti, 2002].

La testostérone joue un rôle déterminant dans la descente testiculaire et la deshydrotestostérone (métabolite de la testostérone) dans l'apparence externe des organes génitaux (réception des mamelons, distance ano-génitale). Les deux effets ayant été observés dans l'étude d'Ema en 2002 (décrite au chapitre des effets sur le développement), le BBP peut-être considéré comme perturbateur androgénique. Puisque le MBuP n'est pas un liant des récepteurs androgéniques, l'effet anti-androgénique du BBP serait indirect via la réduction des taux de testostérone fœtale. Le potentiel liant du MBeP (second métabolite du BBP) sur les récepteurs androgéniques doit encore être étudié pour confirmer cette hypothèse [Ema, 2002].

Pendant l'embryogenèse, les testicules produisent trois hormones indispensables à la bonne différenciation sexuelle. Deux d'entre elles sont bien connues : l'hormone anti-müllérienne (« *Anti Mullerian Hormone* ») produite par les cellules de Sertoli et la testostérone produite par les cellules de Leydig. Il a récemment été démontré que l'inactivation génétique des hormones insulino-mimétiques 3 (insl3) au niveau des testicules fœtaux est responsable d'une altération de la différenciation sexuelle chez la souris mâle. Elle provoque spécifiquement des atrophies du gubernaculum¹⁸, l'absence de descente testiculaire et des cryptorchidies¹⁹. Dans une étude récente chez le rat Sprague-Dawley, les auteurs cherchaient à savoir si les effets des esters de phtalates sur le système reproducteur masculin pouvaient être dus à l'inactivation génétique des insl3. Trois phtalates ont été testés dont le BBP (1000 mg/kg/j) et comparés à trois substances (vinclozoline, linuron, prochloraz) antagonistes des récepteurs androgéniques et/ou inhibitrices de la production de testostérone par les cellules de Leydig. Les rats étaient exposés du 14 au 18^e jours de gestation par voie orale. Les testicules des fœtus mâles ont été examinés le 18^e jour de gestation pour les effets sur le taux d'hormones stéroïdes et l'expression génétique de insl3. Parmi les six produits testés, seules les trois phtalates produisent une diminution de l'expression génétique de l'insl3 (DBP > BBP > DEHP). Tous ont provoqué une diminution du taux de testostérone testiculaire. Les auteurs pensent que les effets des trois phtalates

¹⁷ Cellule adulte fusiforme du tissu osseux incluse dans la substance fondamentale. Sans activité sécrétrice, les ostéocytes s'anastomosent entre eux par de fins prolongements contenus dans les canalicules. Grand dictionnaire terminologique

¹⁸ Ligament reliant le pôle inférieur du testicule fœtal au fond de la fossette vaginale (recessus le plus caudal du cœlome). Avant le début de la différenciation sexuelle, il était le ligament inguinal (qui, dans la différenciation féminine devient le ligament utéro-ovarien et le ligament rond). Son rôle dans la descente du testicule est incertain, sauf qu'il en guide le trajet. Après cette descente il devient le ligament scrotal. Grand dictionnaire terminologique

¹⁹ Migration incomplète du testicule; celui-ci se trouve en dehors du scrotum en un point situé sur le trajet de descente normale. On distingue les cryptorchidies inguinoscrotales, inguinales et abdominales. Ce terme ne doit pas être confondu avec celui d'ectopie testiculaire. Grand dictionnaire terminologique

sur l'expression génétique de l'insl3 et la testostérone sont le résultat d'un retard de maturité des cellules de Leydig qui conduit à des hyperplasies car elles continuent à proliférer au lieu de se différencier [Wilson, 2004].

Deux études ont évalué la capacité du BBP à se lier aux récepteurs œstrogéniques chez le rat et la truite [57, 58]. L'affinité de liaison est 10^4 à 10^5 fois plus faible que celle du 17 β -estradiol. Dans les tests *in vitro* pour l'expression des gènes commandés par l'œstrogène, le BBP induit une faible activité à 10 μM [57]. Cette capacité est 10^6 à 10^7 fois inférieure à celle du 17 β -estradiol [57] mais les métabolites MBuP et MBeP ne montrent aucune activité œstrogénique [63]. Aucun effet du BBP sur le poids de l'utérus ou sur les cellules épithéliales du vagin n'a été observé chez la rate Sprague-Dawley exposée par gavage aux doses 20, 200 et 2 000 mg/kg/j pendant 4 jours. Une revue de la littérature sur les effets œstrogéniques des phtalates conclut que ces effets observés *in vitro* ne sont pas pertinents pour l'espèce humaine [64].

En raison de leur structure chimique (présence d'un cycle phénolique) les phtalates sont candidats pour les tests d'activités œstrogénique. Dans une étude très récente [Hong 2005] les effets du BBP (et d'autres phtalates) *in vitro* sont comparés au effets *in vivo*. Le BBP, le DEHP, le DCHP et le DBP augmentent significativement la croissance des cellules MCF-7 signant ainsi une activité œstrogénique, ce qui n'est pas le cas du DEP. Les phtalates on été administrés par gavage (600 mg/kg/j) à des rates (5/phtalates) immatures Sprague-Dawley pendant trois jours (groupe témoin positif : 17 α -estradiol 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ et DES 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$; groupe témoin négatif : huile de maïs utilisée pour le gavage). Le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la protéine CaBP-9k²⁰ n'est pas modifiée chez les rates exposées aux phtalates alors qu'il est multiplié par 21 dans le groupe exposé au 17 α -estradiol. L'absence d'activité œstrogénique du BBP *in vivo* s'oppose aux résultats *in vitro*. Après ingestion le BBP est rapidement hydrolysé en MBeP et MBuP, il n'y a par ailleurs aucun stockage ni excrétion urinaire de la molécule mère. Ces métabolites (MBeP et MBuP) n'ont pas montré d'activité œstrogénique *in vitro* selon plusieurs types de tests. Il semble donc que le BBP perde son pouvoir œstrogénique après ingestion par des mammifères.

²⁰ Calbindin-D_{9k} est une protéine dépendante de la vitamine D. Elle fait parti d'un groupe de protéine intra cellulaire qui ont une forte affinité de liaison au calcium et qui sont localisé dans l'intestin et l'utérus. Les gènes codants pour CalBP-9k sont connus chez le rat comme chez l'homme. Dans l'utérus cette protéine est régulée par la 17 β -estradiol et fluctue au cours du cycle œstral comme la 17 β -estradiol (absence pendant la phase di-oestrus, présence en phase pro-oestrus) [Hong, 2005].

1.5. Analyse de la cohérence des données animales et humaines

Selon le rapport d'évaluation des risques rédigé par la commission européenne [EC, 2004], la métabolisation du BBP chez l'homme est similaire à celle décrite chez l'animal²¹. Cependant, les études humaines disponibles mettent en évidence la formation préférentielle du mono benzyle phtalate (MBeP) chez l'homme contrairement au mono butyle phtalate (MBuP) chez l'animal. Dans la mesure où les effets toxiques du BBP semblent largement déterminés par les métabolites et non la substance mère, l'extrapolation des données animales à l'homme devrait tenir compte de cette différence lorsque les effets du MBeP et du MBuP sont clairement dissociés.

On note également que la prolifération des péroxyosomes hépatiques est témoin d'une spécificité d'espèce non retrouvée chez l'homme.

1.6. Comparaison des indices de toxicité en fonction des effets

Dans les Tableau 3 et Tableau 4 sont présentés les différents NOAEL et LOAEL identifiés dans la littérature pour les effets sur la reproduction ou le développement. Seuls les résultats d'études comportant plusieurs groupes de doses ou les valeurs considérées comme des NOAEL ou LOAEL dans un profil toxicologique (Union Européenne, US-EPA, NTP-CERHR, etc...) sont présentées dans le tableau. Les résultats d'études ayant testé une seule dose, notamment celle étudiant les mécanismes d'action, ne sont pas présentés dans les tableaux.

1.7. Conclusion

Les études disponibles concernant la toxicité du BBP sont assez complètes tant du point de vue de la toxicité systémique, que des effets sur le développement et la reproduction. Les effets critiques systémiques (augmentation du poids des organes internes, lésions pancréatiques) apparaissent aux même niveaux de doses (150 à 200 mg/kg/j) que les effets critiques sur le développement (mortalité fœtale, tératogénicité, embryogenèse des organes reproducteurs mâles). Les effets critiques pour la reproduction comme la baisse de la fertilité et du taux d'accouplement chez les mâles exposés avant la conception jusqu'à d'accouplement, se situent à des niveaux de doses plus élevées (250 à 500 mg/kg/j).

²¹ Rappel : absorption par voie orale et respiratoire pratiquement complète, hydrolysis au niveau entéro-hépatique, métabolites majeurs mono benzyle phtalate (MBeP) et mono butyle phtalate MBuP, absence de stockage, élimination rapide majoritairement via les urines sauf en cas de forte exposition alors excréption majoritaire via les fèces.

Les mécanismes d'actions anti-androgénique et tératogène sont partiellement connus. Le BBP et ses deux métabolites mono esters ne sont pas des liants des récepteurs androgéniques. Le BBP agit donc indirectement sur les taux de testostérone notamment en bloquant l'expression génique des hormones insulino-mimétiques 3, ce qui entraînerait un dysfonctionnement des cellules de Leydig (prolifération sans différenciation), réduisant la production de testostérone testiculaire. Concernant les malformations ou variations du squelette, une étude à permis de montrer que le BBP agit rapidement et de manière dose dépendante sur le cytosquelette des cellules ostéoblastes Py1a des rats. En modifiant la forme des ostéoblastes il compromet la capacité de liaison des ostéocytes. Toutefois, cet effet ayant été démontré *in vitro*, il n'est pas certain qu'il se reproduira *in vivo* en raison des transformations métaboliques du BBP au niveau intestinal et hépatique.

In vitro le BBP est aussi oestrogénique, ce qui est conforme à la présence d'un cycle phénolique. En revanche, les études *in vivo* chez le rat ou la souris n'ont pas mis en évidence d'activité oestrogénique. Les deux métabolites du BBP (MbeP et MbuP) n'étant pas oestrogéniques, il semble que le passage entéro-hépatique supprime le pouvoir oestrogénique du BBP. En conséquence et malgré une faible volatilisation, les expositions respiratoires au BBP pourraient générer des effets reprotoxiques différents des expositions par voie orale. L'inhalation n'a pas été suffisamment étudiée probablement en raison du fait que les expositions aux BBP sont généralement considérées comme exclusivement orales (en population générale).

Enfin, certains des effets toxiques sur le développement fœtal concernent les organes reproducteurs des mâles. Aux plus faibles doses, ces atteintes bien qu'objectives n'altèrent pas les capacités reproductive.

2. La construction de la VTR pour les effets reprotoxiques

2.1. Identification d'une dose critique

2.1.1. Présentation des doses repères

2.1.1.1. Effet sur le développement

Trois études (une chez la souris et deux chez le rat) ont identifié les plus basses doses sans effet néfaste observée pour le développement. Chez la souris CD1, le NOAEL est de 182 mg/kg/j (LOAEL 910 mg/kg/j pour les malformations et la mortalité fœtale), toutefois la toxicité maternelle est observée au même niveau de dose (910 mg/kg/j). Chez le rat Wistar le niveau de dose sans effet néfaste sur le développement est de 185 mg/kg/j, il n'y a pas de toxicité maternelle à ce niveau. Chez le rat Harlan Cpb WU, l'étude hollandaise a calculé une dose critique montrant 5% d'incidence (variation du squelette) à 180 à 220 mg/kg/j selon la période d'exposition.

| Espèce | Protocole | Résultats |
|--------------------|--|--|
| Souris CD-1 | Alimentation pendant gestation Durée : 6 ^{ème} au 15 ^{ème} jours Doses : 0, 182, 910, 2 330 mg/kg/j (30 femelles /groupes) | NOAEL à 182 mg/kg/j pour la mortalité fœtale et les malformations (squelette cerveau), LOAEL 910 mg/kg/j. Le NOAEL pour la toxicité maternelle est de 182 mg/kg/j pour l'augmentation du poids du foie et des reins [CEHR, 2003, ref 30] Respect des guidelines |
| Rats Wistar | Alimentation pendant gestation Durée : 1 ^{er} au 15 ^{ème} jours Doses : 0, 185, 375, 654, 974 mg/kg/j (15 femelles /groupes) | NOAEL à 185 mg/kg/j et LOAEL à 375 mg/kg/j pour une diminution du poids corporel des fœtus. Le NOAEL pour la toxicité maternelle est de 375 mg/kg/j pour la réduction du gain de poids corporel. [CEHR, 2003, ref 30] Respect des guidelines |
| Rats Harlan Cpb WU | Gavage pendant la gestation Durée : 6 ^{ème} au 15 ou 20 ^{ème} j Doses : 0, 270, 350, 450, 580, 750, 970, 1250, 1600, 2100 mg/kg/ (10 femelles / groupes) | Calcul de dose d'effet critique à 5% d'incidence (DEC _{5%}), variations squelettes fœtus (apparition d'une 13 ^e vertèbre lombaire) diminution du poids des testicules et augmentation de l'incidence des testicules non descendus : DEC _{5%} = 180-220 mg/kg/j (variation squelette). DEC _{5%} = 180-600 mg/kg/ (poids testicules). DEC _{5%} = 180-260 mg/kg/j (descente testicules). Piersma, 2000 et RIVM, 1999 Pas de guidelines OCDE - Klimish et al. classe 1 |

2.1.1.2. Effet sur la fertilité

L'étude ayant identifié le plus faible NOAEL pour les effets sur la fertilité est celle de Tyl en 2004, si l'on exclut les effets plutôt considérés comme marqueurs d'une activité anti-androgénique précoces (réduction de la distance ano-génitale, non rétention des mamelons chez les mâles ou faible poids des organes reproducteurs internes) que comme une altération objective et définitive de la fertilité.

| Espèce | Protocole | Résultats |
|---------------------|--|--|
| Rats Charles Rivers | Gavage voie orale Durée : 90 j (dont 10 semaines avant accouplement) Doses : 0, 50, 250, 750 mg/kg/j | NOAEL et LOAEL sont respectivement de 250 et 750 mg/kg/j pour la baisse de l'indice de fertilité et d'accouplement des mâles F1 Tyl, 2004 Guidelines US-EPA OPPT8373800 |

2.1.2. Dose critique retenue

2.1.2.1. Effet sur le développement

La dose critique retenue est le NOAEL à 185 mg/kg/j (LOAEL à 375 mg/kg/j pour une diminution du poids corporel des fœtus) observé chez le rat Wistar [CERHR (8)]. L'étude chez la souris est exclue en raison du fait que la première dose ayant un effet sur le développement est également toxique pour la mère. L'étude hollandaise est de bonne qualité mais la DEC_{5%} varie selon la période d'exposition au cours de la gestation. Notamment la dose est plus élevée lorsque les mères sont exposées uniquement pendant les deux premiers tiers de la gestation. La DEC_{5%} est alors de 200 mg/kg/j soit un peu plus que le NOAEL précédent.

2.1.2.2. Effet sur la fertilité

La dose critique retenue est le NOAEL à 250 mg/kg/j (LOAEL à 750 mg/kg/j pour la baisse de l'indice de fertilité des mâles F1 [Tyl, 2004]). Cette étude respecte les guidelines de l'US-EPA. Elle mesure des indices de fertilité sur plusieurs générations et permet une analyse détaillée des expositions. Elle donne des résultats très complets et cohérents avec les résultats des autres d'études. C'est le NOAEL le plus bas, si l'on exclut certains effets plutôt considérés comme marqueurs d'une activité anti-androgénique précoces (réduction de la distance ano-génitale, non rétention de mamelon chez les mâles ou faible poids des organes reproducteurs internes) que comme une altération objective et définitive de la fertilité.

2.1.2.3. Benchmark doses

Les dose correspondant à 5% d'incidence concernant les effets sur le développement, proposées dans l'étude hollandaise sont satisfaisantes en l'état. Pour les effets sur la fertilité, une BMD pourrait être dérivée à partir des données de l'étude de Tyl (2004). A 750 mg/kg/j l'indice de fertilité est diminué de 16% et le taux d'accouplement de 27%. Une BMD à 5 % d'effet serait donc dans le meilleur des cas (relation linéaire proportionnelle) comprise entre 100 et 250 mg/kg/j.

2.2. Facteurs d'incertitude

2.2.1. Effet sur le développement

S'agissant d'une étude chez l'animal en petit groupe, on choisit classiquement un facteur d'incertitude de 10 pour la variabilité inter espèce et un autre facteur d'incertitude de 10 pour la variabilité intra espèce (individus plus sensibles). Il n'y a pas de facteur d'incertitude pour la durée inappropriée de l'étude pour que les effets sur le développement corresponde à des exposition de type « aiguës » (moins de 14 jours). La qualité des étude disponibles, la bonne connaissance des mécanismes sous-jacents malgré quelques lacunes non fondamentales ne plaident pas pour l'utilisation d'autres facteurs d'incertitude.

2.2.2. Effet sur la fertilité

Pour les mêmes raisons que précédemment on appliquera les deux facteurs d'incertitude pour la variabilité inter et intra espèce. On pourrait considérer la durée de l'étude comme étant appropriée car les individus ayant subi les effets du BBP étaient exposés en tant que gamètes (mâles et femelles), puis pendant l'embryogenèse jusqu'à la maturité sexuelle et reproductive. Chez l'homme cette période de temps est supérieure à 10 ans. Toutefois elle est de quelque semaine chez le rat, aussi un facteur d'incertitude de 3 pourrait être appliqué pour dériver la VTR à partir du NOAEL défini chez l'animal. La qualité des études disponibles, la bonne connaissance des mécanismes sous-jacents malgré quelques lacunes non fondamentales ne plaident pas pour l'utilisation d'autres facteurs d'incertitude.

2.3. Discussion et présentation de la VTR

Les études disponibles concernent uniquement les expositions par voie orale. Le BBP est peu volatil et principalement utilisé comme plastifiant et assouplissant des PVC, la voie orale semble donc la voie d'exposition majoritaire en population générale. Cependant les expositions respiratoires et cutanées ne peuvent pas être complètement exclues notamment

dans un contexte professionnel. La transposition des connaissances toxicologiques de la voie orale à la voie respiratoire ou cutanée n'est pas recommandée dans le cas du BBP. En effet, on sait que les métabolites principaux (MBuP et MBeP) sont responsables des effets reprotoxiques. *In vitro*, le BBP a montré des effets sensiblement différents de ceux de ses métabolites. Produits dans le cycle entéro-hépatique, ces deux métabolites ne seront donc pas présents dans les mêmes proportions lors des expositions respiratoires et cutanées. Le BBP par voie respiratoire pourrait donc avoir des effets différents et à des niveaux de doses non équivalents aux doses par voie orale.

La VTR orale pour les effets sur le développement s'établi donc comme suit :

NOAEL = 185 mg/kg/j (diminution du poids corporel à la naissance)

Facteur d'Incertitude pour la variabilité inter espèce (FI_A) = 10

Facteur d'Incertitude pour la variabilité intra espèce (FI_H) = 10

Facteurs d'Incertitude pour la durée de l'étude (FI_S) = 1

VTR = 1,85 mg/kg/j

La VTR orale pour les effets sur la fertilité s'établi donc comme suit :

NOAEL = 250 mg/kg/j (diminution de l'indice de fertilité et du taux d'accouplement)

Facteurs d'Incertitude pour la variabilité inter espèce (FI_A) = 10

Facteurs d'Incertitude pour la variabilité intra espèce (FI_H) = 10

Facteurs d'Incertitude pour la durée inappropriée de l'étude (FI_S) = 3

VTR = 0,83 mg/kg/j

3. Bibliographie

- Agarwal DK, Maronpot RR, Lamb JCt, Kluwe WM. Adverse effects of butyl benzyl phthalate on the reproductive and hematopoietic systems of male rats. *Toxicology*. 1985;35(3):189-206.
- CERHR. NTP-CERHR Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of butyl benzyl phthalate (BBP). final. Research Triangle Park: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction; 2003 March. Report No.: NIH publication n°03-4487.
- EC. Risk assessment Benzyl Butyl Phthalate, CASRN 85-68-7. Draft: European Commission, Scientific Committee on Toxicity, Eco-toxicity and the Environment (SCTEE); 2004 March.
- Ema M, Miyawaki E. Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. *Reprod Toxicol* 2002;16(1):71-6.
- Ema M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2003;17(4):407-12.
- Gray LE, Jr., Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN, Parks L. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000;58(2):350-65.
- Hammond BG, Levinskas GJ, Robinson EC, Johannsen FR. A review of the subchronic toxicity of butyl benzyl phthalate. *Toxicol Ind Health*. 1987;3(2):79-98.
- Health Canada, Environment Canada. Priority substances list assessment report: butylbenzylphthalate. final. Ottawa: Ministry of Public Works and Government Services; 2000.
- Heineman EF, Olsen JH, Pottern LM, Gomez M, Raffn E, Blair A. Occupational risk factors for multiple myeloma among Danish men. *Cancer Causes Control* 1992;3:555-568.
- Hong EJ, Ji YK, Choi KC, Manabe N, Jeung EB. Conflict of estrogenic activity by various phthalates between in vitro and in vivo models related to the expression of Calbindin-D9k. *J Reprod Dev* 2005;51(2):253-63.
- Hotchkiss AK, Parks-Salducci LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberghe JG, et al. A mixture of the "antiandrogens" linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Biol Reprod* 2004;71(6):1852-61. Epub 2004 Jul 30.
- IARC. Some Chemicals that Cause Tumours of the Kidney or Urinary Bladder in Rodents and Some Other Substances. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer ed. Geneva: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 1999; :
- IPCS. Concise international chemical assessment document 17 -Butyl benzyl phthalate. Geneva: World Health Organisation; 1999; (92 4 153017 0 : 92 4 153017 0)
- IPCS-CEC. Butyl Benzyl Phthalate. final. Geneva: International Programme for Chemical Safety and Commission for the European Communities; 2005 october. Report No.: ICSC 0834.
- Jaakkola JJ, Oie L, Nafstad P, Botten G, Samuelson SO, Magnus P. Interior surface materials in the home and the development of bronchial obstruction in young children in Oslo, Norway. *Am J Public Health* 1999;89:188-192.

- Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16(5):453-87.
- Marchetti L, Sabbieti MG, Menghi M, Materazzi S, Hurley MM, Menghi G. Effects of phthalate esters on actin cytoskeleton of Py1a rat osteoblasts. *Histol Histopathol* 2002;17(4):1061-6.
- Nagao T, Ohta R, Marumo H, Shindo T, Yoshimura S, Ono H. Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod Toxicol* 2000;14(6):513-32.
- Piersma AH, Verhoef A, te Biesebeek JD, Pieters MN, Slob W. Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design. *Reprod Toxicol* 2000;14(5):417-25.
- RIVM. Human exposure to Butylbenzyl Phthalate a source-effect chain approach. final. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment, The Netherland; 1998 July. Report No.: 630040 002.
- RIVM. Developmental and testicular toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat and the impact of study design. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment, The Netherland; 1999 october. Report No.: RIVM report 650040 001.
- RIVM. Re-evaluation of human toxicological maximum permissible risk levels. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment, The Netherland; 2001 mars. Report No.: RIVM report 711701025.
- Saillenfait AM, Sabate JP, Gallissot F. Comparative embryotoxicities of butyl benzyl phthalate, mono-n-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats: in vivo and in vitro observations. *Reprod Toxicol* 2003;17(5):575-83.
- Seek Rhee G, Hee Kim S, Sun Kim S, Hee Sohn K, Jun Kwack S, Ho Kim B, et al. Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system. *Toxicol In Vitro* 2002;16(4):443-8.
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Fail PA, Seely JC, Brine DR, et al. Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol* 2004;18(2):241-64.
- Uriu-Adams JY, Kevin Reece C, Nguyen LK, Horvath BJ, Nair R, Barter RA, et al. Effect of butyl benzyl phthalate on reproduction and zinc metabolism. *Toxicology* 2001;159(1-2):55-68.
- US-EPA. Butyl benzyl phthalate (CASRN 85-68-7). In:: Integrated Risk Information System (IRIS); 2003.
- Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, et al. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett* 2004;146(3):207-15.

Références issues du rapport du CERHR

27. Field EA, Price CJ, Marr MC, Myers CB. Developmental toxicity evaluation of butyl benzylphthalate (CAS No. 85-68-7) administered in feed to CD rats on gestational days 6 to 15 NTP-89-246. Research Triangle Park: National Toxicology Program, 1989.
28. Ema M, Murai T, Itami R, Kawasaki H. Evaluation of the teratogenic potential of the plasticizer butyl benzyl phthalate in rats. *J Appl Toxicol* 10:339-43(1990).
29. Ema M, Itami T, Kawasaki H. Teratogenic evaluation of butyl benzyl phthalate in rats by gastric entubation. *Toxicol Lett* 61:1-7(1992).

30. Price CJ, Field EA, Marr MC, Myers CB. Final report on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate (CAS No. 85-68-7) in CD-1-Swiss mice. NTP-90-114. Research Triangle Park: National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, 1990.
31. Monsanto MC-j. Teratogenic study with sanitizer 160 in albino rabbits IBT No. 8580-09859. Decatur: Monsanto Company, 1978.
32. Ema M, Itami T, Kawasaki H. Evaluation of the embryo lethality of butyl benzyl phthalate by conventional and pair-feeding studies in rats. *J Appl Toxicol* 11:39-42(1991).
33. Ema M, Itami T, Kawasaki H. Embryo lethality and teratogenicity of butyl benzyl phthalate in rats. *J Appl Toxicol* 12:179-183(1992).
34. Ema M, Itami T, Kawasaki H. Effect of period of exposure on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in rats. *J Appl Toxicol* 12:57-61(1992).
35. Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogawa Y. Embryo lethality of butyl benzyl phthalate during early pregnancy in rats. *Reprod Toxicol* 8:231-236(1994).
36. Ema M, Kurosaka R, Harazono A, Amano H, Ogawa Y. Phase specificity of developmental toxicity after oral administration of mono-n-butyl phthalate in rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:170-176(1996).
37. Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogawa Y. Comparative developmental toxicity of n-butyl benzyl phthalate and di-n-butyl phthalate in rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:223-228(1995).
38. Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogawa Y. Developmental toxicity evaluation of mono-nbutyl phthalate in rats. *Toxicol Lett* 78:101-106(1995).
39. Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y. Developmental toxicity of mono-n-benzyl phthalate, one of the major metabolites of the plasticizer n-butyl benzyl phthalate, in rats. *Toxicol Lett* 86:19-25(1996).
40. Imajima T, Shono T, Zakaria O, Suita S. Prenatal phthalate causes cryptorchidism postnatally by inducing transabdominal ascent of the testis in fetal rats. *J Pediatr Surg* 32:18-21(1997).
41. Gray LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DNR, Parks L. Perinatal exposure to the phthalates in DEHP, BBP and DINP but not DEP, DMP or DOTP alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* (in press)(2000).
42. Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster P. Dose-dependent alterations in androgenregulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl)phthalate during late
43. Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP. Gestational and lactational expsoure of rats to xenoestrogens results in reduced testicualr size and sperm production. *Environ Health Perspect* 103:1136-1143(1995).
44. Sharpe RM, Turner KJ. Endocrine disruptors and testis development. *Environ Health Perspect* 106:A221(1998).
45. TNO NaFRI. Oral developmental reproduction study with butyl benzyl phthalate in Wistar rats. Volume 1 of 3: European Council for Plasticizers and Intermediates, 1998.
46. Bayer AG. Butyl benzyl phthalate (BBP) -Developmental reproduction study in Wistar rats with application in the diet or drinking water 28215: Bayer AG, Institute of Toxicology, Carcinogenicity and Genotoxicity, 1998.
47. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Gray LE, Jr. Perinatal butyl benzyl phthalate (BBP) and bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposures induce antiandrogenic effects in Sprague-Dawley (SD) rats. *Biol Reprod* 60:153(1999).
48. Piersma AH, Verhoef A, Dortant PM. Evaluation of the OECD 421 reproductive toxicity screening test protocol using butyl benzyl phthalate. *Toxicology* 99:191-197(1995).

49. Aldyreva MV, Klimova TS, Izumova AS, Timofievskaya LA. The influence of phthalate plasticizers on the generative function (translation). Gig Tr Prof Zabol 19:25(1975).
50. TNO NaFRI. Dietary one-generation reproduction study with butyl benzyl phthalate in rats: Monsanto, 1993.

4. Glossaire

Cellules de Leydig : cellules présentent dans les testicules et fabricant la testostérone (voir testostérone). [<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Cryptorchidie : Absence du testicule dans sa bourse, d'un côté ou des deux côtés à la fois. La cryptorchidie touche environ 3 à 4 % des nouveau-nés, et le plus souvent du côté droit. Elle est bilatérale dans environ 20 à 25 % des cas. Ce terme est habituellement confondu avec celui d'ectopie qui caractérise un testicule en situation aberrante, en dehors de sa position normale, due à une migration (déplacement) anormale elle aussi.

Causes

La raison de la cryptorchidie n'est pas connue avec exactitude, elle semble due à une insuffisance de libération d'hormone hypophysaire, elle-même secondaire à une absence de stimulation par l'hypothalamus. Dans ces conditions, le testicule reste dans la cavité abdominale ou dans le canal inguinal (60 % des cas). L'arrêt de migration (le testicule n'est pas descendu en suivant le trajet normal) de l'abdomen vers la bourse a lieu pendant la vie intra-utérine. Sa descente s'arrête à un niveau plus ou moins bas dans l'abdomen lui-même ou à la racine de la bourse.

Symptômes

Absence de testicules dans les bourses à la palpation, lors des premiers examens faits par le pédiatre. Testicule oscillant (mobile) : dans ce cas, la palpation permet de percevoir le testicule dans certaines situations, et le diagnostic se fait parfois plus tardivement. Le testicule oscillant est descendu dans le scrotum et se retire dans le canal inguinal. Ceci est la raison pour laquelle le médecin examine l'enfant à plusieurs reprises en position debout avant de conclure à cette anomalie. Le reste de l'examen vérifie la position du méat du méat urétral, dont l'anomalie constitue l'hypospadias. Position du testicule à l'entrée de la bourse. Anomalie du pénis. Présence d'une hernie inguinale (masse formée par un organe ou une partie d'organe, généralement l'intestin, sorti de la cavité qui le contient habituellement). Il existe quelques cas d'atrophie d'un seul testicule, due à un traumatisme ou à une orchite (inflammation testiculaire). La non-palpation des testicules des deux cotés doit faire penser à un hypogonadisme (diminution du taux d'hormones androgéniques dans le sang). Enfin, il existe des cas d'agénésie testiculaire (absence congénitale de testicules). [<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Epididyme : Organe cylindrique situé derrière chaque testicule et s'étalant en "embrassant" celui-ci, faisant suite aux canaux efférents qui sont des sortes de petits tubes sortant du testicule. L'épididyme se prolonge par le canal déférent ou canal spermatique, qui débouche dans l'urètre et qui est destiné à évacuer à la fois les urines et le sperme. Le canal de l'épididyme est microscopique et très long. Sa forme anatomique le maintient pelotonné sur lui-même. C'est à l'intérieur de celui-ci que les cellules spermatiques, c'est-à-dire les précurseurs des spermatozoïdes produits dans le testicule, progressent lentement en achevant leur maturation. Les pathologies habituellement rencontrées au niveau de l'épididyme sont, dans l'ordre de fréquence :

1. l'agénésie épидidymaire, qui est un développement incomplet de l'épididyme, de nature congénitale. Elle peut entraîner une stérilité lorsqu'elle concerne les deux épидidymes.
2. l'inflammation de l'épididyme, appelée également épидidymite, qui est presque toujours associée à une inflammation du testicule dans le cadre d'une orchiépididymite. Parfois, les deux épидidymes sont atteints, ce qui provoque une obstruction des canaux évacuateurs et donc une hypofertilité (fertilité plus faible que la normale).
3. le kyste de l'épididyme, qui se présente sous la forme d'un nodule rempli de liquide. Le chirurgien devra intervenir uniquement si celui-ci est gênant par son volume, car il n'a aucune conséquence sur la fertilité.

[<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Estradiol : Hormone considérée comme la véritable hormone femelle, voisine de l'estrone mais plus active qu'elle, principalement sécrétée chez la femme par l'ovaire et dont le taux augmente lors de l'ovulation (libération de l'ovule par l'ovaire).

L'estradiol est la plus active des trois hormones oestrogènes dans l'organisme. Elle est libérée après la stimulation par d'autres hormones (les hormones folliculostimulante et lutéinisante : FSH et LH) sécrétée par l'hypophyse. Son taux est variable au cours de la vie d'un individu : jusqu'à la puberté, il est relativement bas puis s'élève dès l'arrivée du cycle menstrual. Au cours du cycle menstrual lui-même, il est élevé durant la première moitié puis diminue dans la seconde moitié. Au cours de la ménopause, ce taux est à nouveau très bas. Durant cette période, l'hormone est fabriquée en petite quantité à partir des androgènes (hormone mâle) à l'intérieur du tissu adipeux.

Rôle

Il est en relation directe avec l'apparition des caractères sexuels secondaires : tissu adipeux et sa répartition, libido, développement des organes génitaux externes (vagin, vulve), internes (utérus et trompes) et des seins. Lors de la grossesse, le taux d'estradiol s'élève et reste important jusqu'à l'accouchement. Chez l'homme, le taux d'estradiol est relativement bas et s'élève quelquefois en cas d'affections du foie. L'estradiol est utilisé en thérapeutique comme composant des médicaments anticonceptionnels (pilule contraceptive) associé avec la progestérone. Il est également utilisé comme traitement substitutif (mis en place à la suite d'une carence hormonale) dans l'insuffisance ovarienne (insuffisance de sécrétion des hormones par l'ovaire). Le dosage de l'estradiol se fait dans les cas suivants :

- Suivi du bon déroulement d'une grossesse et donc de l'activité du fœtus dans l'utérus maternel. La chute du taux d'estradiol indique quelquefois une souffrance du fœtus.
- Surveillance des ovaires en cas d'induction de grossesse.
- Dans le diagnostic d'aménorrhée (absence de règles)
- Dans le diagnostic des tumeurs de l'ovaire.

[<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Gubernaculum : ligament servant à descendre les testicules au fond du scrotum.

[http://urologie-chu-mondor.aphp.fr/_enseignement/Externes/cryptorchidie.pdf]

Hormone lutéinique LH (angl., abrév. pour luteinizing hormone). Syn. hormone lutéinisante, ICSH (interstitial cell stimulating hormone), lutropine. Hormone glycoprotéique de poids moléculaire de 29 000 daltons, sécrétée par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. La sécrétion de LH est permanente chez l'homme, cyclique chez la femme, avec une augmentation en fin de phase folliculaire, un pic préovulatoire puis une décroissance en phase lutéale. La LH agit sur de nombreuses cellules gonadiques, en favorisant la synthèse des stéroïdes sexuels; chez la femme elle intervient de façon privilégiée dans l'ovulation. La sécrétion de LH est stimulée par la gonadolibérine, et modulée par les stéroïdes sexuels.

[http://www.gfmer.ch/Cours/Cycle_menstruel_normal.html]

Testostérone : Hormone mâle (androgène) fabriquée et sécrétée par les testicules (cellules de Leydig), mais également par les ovaires et les glandes surrénales (glandes situées au-dessus de chaque rein et sécrétant également la cortisone naturelle) chez la femme. Grâce à la stimulation de l'hormone lutéinisante (LH), qui est une hormone fabriquée par la glande hypophyse située à la base du cerveau, la testostérone est sécrétée dans le sang en quantité plus ou moins importante. Cette fabrication se fait seulement pendant la vie intra-utérine et au moment de la puberté. La testostérone est nécessaire :

- à la production des spermatozoïdes
- au développement des organes génitaux nécessaires à la fertilité
- à l'apparition et au maintien des caractères sexuels secondaires masculins (musculature, pilosité, libido, changement de la voix)

- à la fabrication des œstrogènes (la testostérone est un précurseur des œstrogènes)
- à la fabrication des protéines (métabolisme)
- au développement musculaire
- au fonctionnement des glucides (sucres)
- au développement de certains tissus de l'organisme (lipides, os)

Pour circuler, cette hormone a besoin d'une protéine porteuse, la sex binding protein (SBP).

Vésicule séminale : L'adjectif séminal désigne ce qui est relatif à la semence, au sperme. Le sperme est un liquide normalement stérile (sans microbes), de consistance visqueuse, légèrement filant, collant et de coloration blanchâtre, sécrété par les testicules et la prostate et contenant des éléments fabriqués par les glandes de Cowper. La caractéristique principale du sperme est de contenir les spermatozoïdes, qui sont les cellules reproductrices mâles. Le sperme est produit lors de l'éjaculation pendant l'accouplement. La vésicule séminale est le réservoir de nature musculaire et membraneux qui contient le sperme.

L'éjection du sperme en dehors de l'urètre (canal transportant l'urine et le sperme vers l'extérieur) se fait grâce à l'action des vésicules séminales. Celle-ci a lieu après les stimulations répétitives du pénis au moment des rapports sexuels ou lors de la masturbation qui sont à l'origine du réflexe éjaculatoire. Plus précisément au moment de l'éjaculation, les deux vésicules séminales se contractent et éjectent leur contenu dans les canaux déférents où il se mélange aux spermatozoïdes (provenant des testicules) pour donner le sperme.

Anatomie Les vésicules séminales au nombre de deux et la prostate reposent sur la paroi postérieure (arrière) de la vessie. Ce sont des glandes ayant chacune une longueur allant de 5 à 7 centimètres environ. Elles ont la forme de l'extrémité d'un petit doigt de gant. La vésicule séminale est incluse dans une épaisse gaine fibreuse, l'aponévrose prostato-péritonéale de Denonvilliers, tendue du cul-de-sac de Douglas au périnée. Il est possible de palper la vésicule séminale par le toucher rectal.

Rôle : Les vésicules séminales ont pour rôle de sécréter un liquide alcalin (contraire d'acide) de nature visqueuse et de coloration jaunâtre renfermant du fructose (variété de sucre) ainsi que de l'acide ascorbique (vitamine C), des protéines jouant un rôle dans la coagulation (spécifiquement la séminogéline et des prostaglandines. Les prostaglandines sont des substances dérivées d'acides gras non saturés (ou acides gras insaturés, c'est-à-dire dont les atomes de carbone sont reliés par 2 ponts) ayant une structure biochimique appelée prostanoïde, et dont il existe 20 variétés réparties en neuf classes, dénommées de A à I : PGA, PGE, PGF, PGI etc...selon leur structure. Le canal de chaque vésicule séminale rejoint le conduit déférent du même côté pour former ensuite le conduit éjaculateur. Le canal déférent faisant suite à l'épididyme en prenant la forme d'une épingle à cheveux. Sa longueur est de 35 cm environ et son diamètre augmente progressivement au fur et à mesure qu'il s'éloigne du testicule. Les spermatozoïdes et le liquide séminale se mélangent dans le conduit éjaculateur puis pénètrent dans l'urètre et plus précisément dans sa partie prostatique à l'instant de l'éjaculation. [<http://www.vulgaris-medical.com/>]

Intitulé

**Construction d'une VTR reprotoxique
pour le Nonylphenol (4NP, CAS 84852-15-3) selon la méthode
proposée dans le document de référence**

Organisation des connaissances

27 juin 2006

Etude réalisée par :

*Organisme d'expertise : LTA EA 3880, ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise
29280 PLOUZANE*

*Contact : Pr D. Parent-Massin, ESMISAB/UBO ,Technopôle Brest-Iroise 29280
Plouzané Tel 33 2 98 05 61 41 Fax : 33 2 98 05 61 01 E-mail : parentm@univ-
brest.fr*

Pour :

*L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AFSSET*

253 avenue du Général Leclerc

94701 Maison Alfort Cedex

Contact : Nathalie Bonvallot (01 56 29 19 33 / nathalie.bonvallot@afsset.fr)

Information sur la propriété et la diffusion du document

Les résultats des travaux demeurent la propriété de l'AFSSET, qui se réserve le droit de les rendre publics. Ils ne peuvent être utilisés, ou rendus en tout ou partie publics qu'avec l'accord écrit préalable de l'AFSSET. Les informations communiquées par l'AFSSET à l'occasion de la réalisation des travaux sont confidentielles et ne doivent pas être communiquées à des tiers, sauf accord.

Table des matières

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | RESUME..... | 4 |
| 2. | LE PROFIL TOXICOLOGIQUE..... | 7 |
| 2.1. | INFORMATIONS GENERALES | 7 |
| 2.1.1 | <i>Identification de la substance</i> | 7 |
| 2.1.2 | <i>Propriétés physico-chimiques.....</i> | 7 |
| 2.1.3 | <i>Plausibilité d'exposition humaine.....</i> | 7 |
| 2.2. | TOXICOCINETIQUE | 8 |
| 2.3. | TOXICITE GENERALE | 9 |
| 2.3.1 | <i>Etudes de toxicité aiguë.....</i> | 9 |
| 2.3.2 | <i>Etudes de toxicité subaiguë.....</i> | 9 |
| 2.3.3 | <i>Etudes de toxicité subchronique.....</i> | 10 |
| 2.3.4 | <i>Etudes de toxicité chronique.....</i> | 10 |
| 2.3.5 | <i>Génotoxicité</i> | 11 |
| 2.3.6 | <i>Etudes de cancérogenèse</i> | 11 |
| 2.3.7 | <i>Irritation et sensibilisation</i> | 11 |
| 2.4. | TOXICITE SUR LA REPRODUCTION ET LE DEVELOPPEMENT..... | 12 |
| 2.4.1 | <i>Données humaines.....</i> | 12 |
| 2.4.1.1. | <i>Effets sur la fertilité et la reproduction.....</i> | 12 |
| 2.4.1.2. | <i>Effets sur le développement</i> | 13 |
| 2.4.1.3 | <i>Mécanismes d'action proposés</i> | 14 |
| 2.5. | ANALYSE DE LA COHERENCE DES DONNEES ANIMALE ET HUMAINE | 15 |
| 2.6. | COMPARAISON DES INDICES DE TOXICITE EN FONCTION DES EFFETS | 16 |
| 2.7. | CONCLUSION..... | 16 |
| 3. | LA CONSTRUCTION DE LA VTR..... | 17 |
| 3.1. | IDENTIFICATION D'UNE DOSE CRITIQUE | 17 |
| 3.1.1 | <i>Présentation des doses repères.....</i> | 17 |
| 3.1.1.1. | <i>Toxicité générale</i> | 17 |
| 3.1.1.2. | <i>Reprotoxicité</i> | 18 |
| 3.1.2 | <i>Choix de la dose critique</i> | 18 |
| 3.2. | FACTEURS D'INCERTITUDE | 19 |
| 3.3. | DISCUSSION ET PRESENTATION DE LA VTR..... | 19 |
| 4. | BIBLIOGRAPHIE | 20 |

1. Résumé

Le nonylphénol (NP), produit anthropique, est utilisé dans la fabrication d'éthoxylates de nonylphénol et retrouvé comme produit de dégradation de ces mêmes substances.

Son utilisation est large dans les détergents, peintures, résines, plastiques, stabilisants des polymères, agents tensio-actifs, oximes phénoliques, pesticides, biocides, médicaments vétérinaires, cosmétiques (teintures de cheveux). Son utilisation dans la vie courante est ubiquitaire comme en témoigne sa présence dans les emballages alimentaires et dans les cosmétiques.

La population humaine peut être exposée sur son lieu de travail (production, incorporation dans les éthoxylates, utilisation des peintures en spray), au travers des produits de consommation ou via l'environnement. Pour la population générale, la voie d'exposition qui domine est la voie orale. Les études de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* sont négatives, il n'y a pas d'étude de cancerogénicité disponible. Les principaux effets toxiques identifiés sont reprotoxiques et néphrotoxiques. Aucune donnée humaine sur d'éventuels effets reprotoxiques n'est disponible. Des études tant *in vitro* qu'*in vivo* ont permis d'établir que le NP présente une activité oestrogénique 10^3 à 10^6 fois inférieure à celle de l'oestradiol. Les effets sur la **reproduction** et la **fertilité** du nonylphénol énoncés dans ce document ont été obtenus à partir de la revue de la littérature effectuée, et sur la base de trois études récentes retenues. Elles apparaissent représentatives d'effets reprotoxiques pertinents observés lors des expérimentations animales.

Les deux premières études sont des études multigénérationnelles. La plus ancienne (Chapin *et al*, 1999) expose par voie orale des rats Sprague Dawley pendant trois générations. Conduite selon les lignes directrices de l'OCDE et les bonnes pratiques de laboratoire, cette étude montre que l'exposition du NP sur plusieurs générations peut entraîner des perturbations mineures dans le système reproducteur des nouveau-nés, à savoir une augmentation de la durée du cycle oestral, une ouverture vaginale précoce, une diminution du poids des ovaires et une diminution du compte spermatique épидidymaire, mais sans retentissement fonctionnel sur la reproduction aux doses testées. Le NOAEL observé dans cette étude est à 15 mg/kg pc/j pour ces effets.

La deuxième étude multigénérationnelle (Nagao *et al*, 2001) a été réalisée sur deux générations de rats Sprague Dawley par gavage. Une diminution du taux de LH, dose dépendante et une accélération de l'ouverture vaginale chez les animaux F1 ont été observées. Le NOAEL est à 10 mg/kg pc/j.

La preuve d'une toxicité testiculaire est apportée par la troisième étude (de Jager *et al.*, 1999) chez des rats Sprague Dawley nourris par gavage, réalisée selon la ligne directrice 415 de l'OCDE. A partir de 100mg/kg pc/j, des lésions histologiques des tubes séminifères, des perturbations de la spermatogenèse (vacuolisation, nécrose cellulaire, décollement épithéial), une diminution du poids des testicules et des épididymes, mais aussi une mortalité sont constatées dans cette étude à dose répétée. Le LOAEL pour la toxicité testiculaire est égal à 100 mg/kg pc/j. La toxicité du NP semble augmentée par le mode d'alimentation utilisé, probablement par augmentation des pics sériques à chaque gavage.

Sur le **plan développemental**, deux études réalisées selon les lignes directrices 414 et 415 de l'OCDE sont disponibles. La première (Initiative Umweltrelevante Aftsoffe., 1992) utilise des rats Wistar exposés au NP par gavage de 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation. Une toxicité maternelle est observée, mais aucun trouble développemental n'est décrit. Le NOAEL maternel est égal à 75 mg/kg pc/j et le NOAEL fœtal est égal à 300 mg/kg pc/j. Dans la seconde étude (de Jager *et al.*, 1999b), des rats Sprague Dawley sont exposés par gavage du 7^{ème} jour de la gestation à la 10^{ème} semaine de vie. Il est mis en évidence une diminution du compte spermatique dans la queue de l'épididyme à 250 mg/kg pc/j. Il n'est pas possible de trancher à propos de cette diminution entre un trouble développemental ou le résultat de l'exposition directe des mâles au NP après le sevrage. Il n'est pas clair de savoir si les changements des mesures tubulaires représentent une lésion spécifique de toxicité reproductive ou non spécifique secondaire à la réduction du gain corporel.

Les lésions cellulaires germinales retrouvées à 100 mg/kg pc/j et non retrouvées à 250 mg/kg pc/j ne peuvent être attribuées au traitement par le NP.

Deux autres études développementales menées par voie intra péritoneale (Lee *et al.*, 1998, Odum, 2000) en période néonatale, selon le même schéma, montre des résultats contradictoires. Lee *et al.* (1998) ont mis en évidence une diminution du poids des principaux organes reproducteurs mâles et une augmentation des troubles de la migration testiculaire mais les faiblesses du protocole de l'étude ne permettent pas de la retenir. L'étude de Odum *et al.*, (2000) ne montre aucun des troubles décrit par Lee *et al.*, si ce n'est de nombreuses adhérences péritoneales qui pourraient expliquer les troubles et la migration testiculaires de la première étude.

Malgré l'orientation reprotoxique donnée à ce rapport, on ne peut passer sous silence un effet néphrotoxique retrouvé dans de nombreuses études à des doses de NP très proches de celles ayant eu des effets reprotoxiques. Dans l'étude multigénérationnelle de Chapin (1999), le LOAEL pour la néphrotoxicité est à 15 mg/kg pc/j, c'est-à-dire égal au NOAEL reprotoxique.

Il n'existe pas à ce jour de VTR établie pour le nonylphénol.

**Tableau résumé des LOAEL et NOAEL identifiés par voie orale,
retenus pour la reprotoxicité**

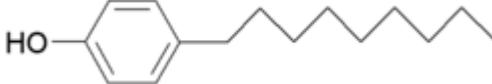
| Références de l'étude source | Espèce | Effets considérés | Voie d'exposition | Durée d'exposition | Dose critique utilisée |
|-------------------------------|---------------------|---|---------------------|--|------------------------|
| Chapin <i>et al.</i> , 1999 | Rats Sprague Dawley | Augmentation de la durée du cycle oestral Ouverture vaginale précoce Diminution du poids des ovaires Diminution du compte spermatique épидidymaire | Orale <i>ad lib</i> | Multigénérationnelle F0, F1, F2, F3 | NOAEL 15 mg/kg pc/j |
| Nagao <i>et al.</i> , 2001 | Rats Sprague Dawley | Diminution LH sérique Ouverture vaginale précoce | Gavage | Multigénérationnelle F0, F1, F2 | NOAEL 10 mg/kg pc/j |
| de Jager <i>et al.</i> , 1999 | Rats Sprague Dawley | Lésions histologiques des tubes séminifères | Gavage | 10 semaines de la 12 ^{ème} à la 22 ^{ème} | LOAEL 100 mg/kg pc/j |

2. Le profil toxicologique

2.1. Informations générales

2.1.1 Identification de la substance

Les données d'identification ont été recherchées dans le rapport européen d'évaluation des risques (EU, 2002).

| | |
|--|---|
| Numéro CAS, ENEICS. | CAS Nos 84852-15-3 et 25154-52-3 EINECS Nos 284-325-5 et 246-672-0 |
| Nom | 4-Nonyl phénol (branché) et Nonylphénol |
| Synonymes | Isononylphénol, Phénol, nonyl-, branché NP Para-Nonylphénol Monoalkyl (C3-9) phénol |
| Formule brute | C15H24O |
| Formule développée |  |
| Appartenance à une liste reprotoxique et classification | R22, R34, R50/53 S36, S36/37/39, S45, S60 |

2.1.2 Propriétés physico-chimiques

| | |
|---|--|
| Forme physique | Liquide jaune pâle, visqueux, modérément volatil, d'odeur légèrement phénolique (INRS FT249) |
| Poids moléculaire | 200,34 (INRS FT249). |
| Point d'ébullition | 293 à 297 ° à la pression atmosphérique (INRS FT249). |
| Point de fusion | -10°C à 5°C (INRS FT249). |
| Pression de vapeur | 0,3 hPa à 25°C (INRS FT249) |
| Densité | 0,95 kg/l (INRS FT249) |
| Facteurs de conversion | 1 ppm = 9 mg/m ³ à 25 °C et 101 kPa (INRS FT249) |
| Solubilité | 6 mg/l à 20°C (EU, 2002). |
| LogKow | 4,48 (Ahel et Giger, 1993) |
| Koc | 3,14 (5,23) (IPCS-EHC 189, 1997) |
| BCF | 271 (IUCLID dataset 2000) |
| BAF | ND* |
| Produits de dégradation environnementale | Minéralisation par biodégradation (Gaffney 1976) |

*ND : données non disponibles dans les bases de recherche

2.1.3 Plausibilité d'exposition humaine

| | |
|----------------------------|---|
| Types d'utilisation | • Intermédiaire pour la production d'éthoxylates de nonylphénol utilisés pour les détergents et peintures |
|----------------------------|---|

| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> Fabrication des résines phénol-formaldéhyde et de résines époxydiques Fabrication de plastiques et de stabilisants dans l'industrie des polymères Agent tensio-actif Fabrication d'oximes phénoliques, de certaines peintures spéciales Comme substance active, adjuvant ou coformulant dans des produits phytopharmaceutiques (pesticides, biocides) et des médicaments vétérinaires |
| Restrictions d'usages | / |
| HPV/ tonnages (Europe, France) | Europe : 73500 tonnes (EU, 2002). Utilisation : 78500 tonnes (CEFIC 1996) |
| Médias de l'environnement concernés | Eaux de surface et souterraine, eaux usées, sédiments, sols, air, biotope aquatique, alimentation, air intérieur, eau de boisson (HSDB) |
| Types de populations concernées | Exposition professionnelle, exposition en population générale : alimentaire et via les cosmétiques, exposition environnementale (EU 2002) |

2.2. Toxicocinétique

| | Données chez l'animal | Données chez l'homme |
|--|--|---|
| Substance mère | 4-nonylphénol ramifié | 4-nonylphénol ramifié |
| Voies de métabolisation possibles | Hépatique et excrétion digestive (70%) et urinaire (20%) après absorption orale, non présent dans le CO ₂ exhalé (EU, 2002). Pas de cycle entéro-hépatique. (Knaak et al, 1966) (Fennell et MacNella, 1997) | Hépatique par glucurono-conjugaison et sulfoconjugaison Après 1 prise orale ou une I.V. : 10% dans les urines, 1,5% dans les fèces (Müller, 1997), en contradiction avec les données animales. |
| Métabolites principaux | Dérivés glucurono et sulfo-conjugués. Le NP inchangé dans la bile et les urines n'est constaté chez le rat femelle qu'à des doses supérieures à 100 mg/kg, témoin d'une saturation métabolique (Green et al., 2003) | Dérivés glucurono et sulfo-conjugués |
| Absorption (%/ voie) | Cutanée : rats, porcs : <i>in vitro</i> Absorption = 0,15% Pénétration = 3% chez le porc, 6% chez le rat Couche cornée : 2% chez le porc, 0,5% chez le rat. (Monteiro-Riviere et al. 1999) | <i>In vitro</i> Absorption : 0,1% Pénétration : 4% Couche cornée : 1,7% (Monteiro-Riviere et al. 1999) |
| Distribution | Dans tout l'organisme. Biodisponibilité < 20% après un premier passage hépatique (Hüls, 1995 a) | Pas assez de données pour conclure |
| Stockage, accumulation (% et cible) | Pas de bio accumulation : 0,4% dans les tissus, 1,3% dans le tube digestif et la carcasse (Fennell et MacNella, 1997) | Pas assez de données pour conclure. Une étude humaine de 25 échantillons de tissu adipeux |

| | | |
|--|--|---|
| | | prélevés à l'autopsie de personnes sans exposition professionnelle au NP ne retrouve que des traces négligeables (Müller, 1997) |
| Transferts Barrière Hémato-Encéphalique | ND | ND |
| Transferts placenta Liquide amniotique | ND | ND |
| Transferts lait maternel | ND | ND |
| Elimination (demi-vies) | ½ vie : rats wistar = 310 minutes (Hüls, 1995 a) | 2-3h (Müller, 1998) |

2.3. Toxicité générale

2.3.1 Etudes de toxicité aiguë

Il n'y a pas de données humaines disponibles. Pour les expositions aiguës, orales ou cutanées, le NP est modérément毒害的. La DL 50 par voie orale varie de 1200 à 2400 mg/kg chez le mâle et de 1600 à 1900 mg/kg chez la femelle. Les signes de toxicité associent salivation excessive, diarrhée et léthargie. A l'autopsie, des ulcéractions gastriques sont parfois mises en évidence (Berol Kemi A.B., 1982, Hüls A.G., 1982, ICI 1984). La DL 50 chez le lapin par voie cutanée est de 2031 mg/kg (Smith et al., 1969). Il n'existe pas de données disponibles pour la voie aérienne.

2.3.2 Etudes de toxicité subaiguë

Il n'y a pas de données par voie aérienne ou cutanée. Dans une étude de 28 jours par voie orale, des rats Sprague Dawley sont exposés au NP à des doses de 0, 25, 100 ou 400 mg/kg pc/j (Hüls., 1989). Ni mortalité, ni signe de toxicité ne sont rapportés. A 400 mg/kg pc/j, on note pour les deux sexes une diminution significative du gain de poids et de la consommation alimentaire. Quelques anomalies biologiques, une augmentation du poids du foie, des reins, des testicules apparaissent de même que des lésions histologiques rénales de hyalinisation des tubes proximaux retrouvés uniquement chez le mâle à 400 mg/kg pc/j. Aucune lésion n'est observée à 25 et 100 mg/kg pc/j, faisant ressortir un NOAEL à 100 mg/ kg pc/j. Une étude d'une durée de 11 jours a exposé des rats Nobles femelles juvéniles au NP à des doses de 0, 0.05, 35.6 mg/kg pc/j par voie sous-cutanée. Un groupe contrôle positif a reçu 0.05 mg/kg pc/j de diéthylstilbestrol (DES) pour une durée identique (Colerangle et Roy, 1996). L'objectif est d'étudier l'influence du NP sur la croissance des structures mammaires et une éventuelle prolifération cellulaire de la glande. Les résultats se montrent positifs à tous les dosages pour le NP et pour le DES où les lésions sont plus prononcées. Le choix de rats Noble oestrogénosensibles, ainsi que l'utilisation de la voie sous-cutanée, font émettre des doutes pour une transposition à l'homme (UE 2002).

Odum *et al.* (1999) reprennent cette expérimentation avec le même protocole sans confirmer que le NP puisse induire les changements décrits dans la première expérimentation alors que le DES induit toujours la croissance mammaire et la prolifération cellulaire.

Une troisième étude d'exposition subaiguë exposent des rats Sprague Dawley au NP du 7^{ème} jour de la gestation au 50^{ème} jour de vie (Latendresse *et al.*, 2001), via un régime alimentaire sans soja ni alfalfa et contenant du NP à 0, 0.0375, 1.875, 15, 37.5, 75, 150 mg/kg pc/j. L'expérimentation a pour but de définir et d'étudier les effets néphrotoxiques. Quatre grades de lésions kystiques sont définis de 1, où les lésions sont minimales à 4, où elles sont sévères. Les résultats montrent, à 150 mg/kg pc/j, que 100% des rats ont des lésions rénales sévères. A 75 mg/kg pc/j, 33% des mâles, 27% des femelles ont des lésions modérées, 34% de mâles et 26% de femelles des lésions discrètes. Un NOAEL de 37.5 mg/kg pc/j est établi. Le mécanisme évoqué est une prolifération des cellules épithéliales tubulaires qui bloquerait les tubules et provoquerait les lésions kystiques. La prolifération cellulaire serait sous la dépendance des récepteurs oestrogéniques rénaux stimulés par le NP amené au rein par le sang et l'urine.

2.3.3 Etudes de toxicité subchronique

Les données humaines se limitent à deux cas de leucodermie des mains et des avant-bras chez des travailleurs japonais exposés à des détergents alcalins. Les auteurs spéculent sur le rôle du NP contenu dans ces détergents (Ikeda *et al.*, 1970). Il n'y a pas eu d'autres cas rapportés. Chez l'animal, aucune étude par exposition subchronique aérienne ou dermique n'est retrouvée dans la littérature. Deux études animales subchroniques par voie orale sont disponibles. La première est une étude à dose répétée de 90 jours chez le rat Sprague Dawley suivant les lignes directrices de l'OCDE et les BPL (CMA, 1997, Cunny *et al.*, 1997). Le NP est administré par voie orale à des doses de 0, 15, 50, 140 mg/kg pc/j. A 140 mg, sont notés une diminution du gain de poids et de l'alimentation, des lésions histologiques hépatiques (nécrose cellulaire) et rénales (minéralisation notée lors d'une deuxième lecture anatomopathologique). Un NOAEL de 50 mg/kg pc/j est dérivé de cette étude.

La deuxième expérimentation est multigénérationnelle (NTP., 1997, Chapin *et al.*, 1999). Trois générations de rats Sprague Dawley sont exposées par voie orale à des doses de 0, 15, 50, 160 mg/kg pc/j de NP. Les résultats montrent une diminution du gain pondéral corporel et une augmentation du poids des reins à 50 et 160 mg/kg pc/j. Dès 15 mg et à toutes les générations, des lésions dégénératives et de dilatation tubulaire rénale apparaissent, bien que non dose-dépendantes, ces lésions retrouvées sont constantes aux générations F0, F1, F2, F3 et permettent d'établir un LOAEL de 15 mg/kg pc/j.

2.3.4 Etudes de toxicité chronique

Il n'existe aucune étude de toxicité chronique.

2.3.5 Génotoxicité

In vitro, deux tests d'Ames sur *Salmonella typhimurium* (Hüls., 1984, Shimizu *et al.*, 1985) sont négatifs avec ou sans activation. Un test de mutation génique avec ou sans activation métabolique sur hamster (ligne directrice 476 OCDE) est également négatif (Hüls., 1990).

In vivo, deux tests de micronoyau (ligne directrice 474 OCDE) chez la souris, l'un par voie intra-péritonéale (Hüls., 1999b), l'autre par voie orale (Hüls., 1998) sont négatifs.

Le nonylphénol n'est pas considéré comme génotoxique.

2.3.6 Etudes de cancérogenèse

Il n'y a pas d'étude de cancérogenèse disponible *in vivo*. Le caractère non mutagène du NP rend improbable le développement d'un cancer selon un mécanisme génotoxique. Le potentiel cancérogène par un mécanisme non génotoxique est peu probable dans la mesure où aucune étude à dose répétée n'a montré de prolifération ou d'hyperplasie cellulaire. La prolifération cellulaire induite par le NP chez les rats Noble après injection sous-cutanée (Colerangle et Roy., 1996) n'a pu être dupliquée (Odum *et al.*, 1999). Par ailleurs, la voie d'administration et la race de rats utilisées rendent peu plausible une transposition à l'homme.

2.3.7 Irritation et sensibilisation

Il n'y a pas de données humaines.

Chez l'animal, il existe des études montrant une irritation cutanée, oculaire et respiratoire.

Au niveau de la peau, deux études menées selon la ligne directrice 404 de l'OCDE chez le lapin (Union Carbide., 1992, Hüls., 1986) montrent la survenue d'une nécrose cutanée sur la zone en contact. Même si d'autres études (2 BPL et 3 non standardisées) (Enichem., 1992, Berd Kemi A.B., 1987, Gavorhi *et al.*, 1973, ICI., 1979, ICI., 1982) ne montrent que des lésions d'érythème ou d'induration, il est raisonnable de considérer le NP comme corrosif pour la peau.

Au niveau des yeux, deux études menées selon la ligne directrice 405 de l'OCDE (Hüls., 1986, ICI., 1979) montrent de graves lésions conjonctivales, cornéennes et iridiennes chez le lapin. Le NP est un irritant oculaire sévère.

Au niveau de l'appareil respiratoire, une diminution du rythme respiratoire de 25% est notée chez la souris après une exposition nasale à la concentration nasale de 3636 mg/m³ alors qu'aucun changement n'est noté à 267 mg/m³. (ICI, 1995). Le NP est à considérer comme légèrement irritatif.

Pour la sensibilisation, il n'y a pas de données animales par voie aérienne. Sur le plan cutané, deux études menées selon la ligne directrice 406 de l'OCDE (Hüls., 1986c, ICI., 1980) et une non standardisée (ICI., 1979), chez le cobaye, suggèrent que le NP n'a pas de potentiel significatif de sensibilisation sur la peau.

2.4. Toxicité sur la reproduction et le développement

2.4.1 Données humaines

Il n'y a pas de données humaines.

2.4.2. Données animales

2.4.1.1. Effets sur la fertilité et la reproduction

Deux études retenues par l'UE (2002), et trois études postérieures ont été utilisées. La première étude est une étude du NTP 1997 et de Chapin *et al.* (1999) conduite selon la ligne directrice 416 de l'OCDE. L'expérimentation est multigénérationnelle chez des rats Sprague Dawley soumis à une diète de 0, 15, 45, 150 mg/kg pc/j sur trois générations F0, F1, F2, F3. Elle commence à 7 semaines pour les parents F0 et se termine à 8 semaines pour la génération F3. La perte de poids à 45 et 150 mg/kg pc/j et les lésions rénales tubulaires à toutes les générations dès 15 mg/kg pc/j ont été signalées antérieurement. La fertilité et les accouplements sont normaux. A 45 et 150 mg/kg pc/j, on note un allongement du cycle oestral et une ouverture vaginale précoce, une diminution du poids des ovaires mais sans lésion histologique, une diminution de la densité spermatique épididymaire et du compte des spermatides à la génération F2. Pour ces modifications spermatiques, l'explication est incertaine : Chapin *et al.* (1999) penchent pour un bruit statistique et biologique ou la mise en jeu de phénomènes inconnus de pharmacodynamie ou de toxicodynamie. Les perturbations du système reproductif apparaissent mineures et sans retentissement sur la fertilité. Un NOAEL reproductif de 15 mg/kg pc/j ressort de cette étude.

La deuxième étude retenue par l'UE (2002) suit la ligne directrice 415 de l'OCDE. Des rats Sprague Dawley sont exposés par gavage à des doses de NP de 0, 100, 250 et 400 mg/kg pc/j de la 12^{ème} semaine à la 22^{ème} semaine (de Jager *et al.* 1999a). Un LOAEL de 100 mg/kg pc/j est établi sur la constatation de lésions histologiques des tubes séminifères (diminution du diamètre des tubules et du diamètre de leur lumière). A 250 et 400 mg/kg pc/j, les lésions s'aggravent de façon dose dépendante avec des effets sur la spermatogenèse (vacuolisation, nécrose, décollement épithelial), une diminution du poids des testicules et de l'épididyme. A noter une mortalité importante à toutes les doses, sans doute en relation avec les pics sériques secondaires aux gavages. Une étude des mêmes auteurs (De Jager *et al.*, 1999b) selon le même protocole mais à une période différente : 7^{ème} jour de la gestation à 10 semaines postnatales, confirment les résultats de l'étude adulte mais avec des lésions plus

sévères (l'exposition des nouveaux-nés pendant la période d'allaitement se faisant au travers du lait maternel).

Les trois autres études comportent deux études multigénérationnelles et une étude à dose répétée.

Nagao *et al.* (2001) soumet pendant deux générations des rats Sprague Dawley à des doses de 2, 10, 50, mg/kg pc/j de NP en gavage. Un NOAEL de 10 mg/kg pc/j est établi à la génération F0 sur une augmentation du poids des reins et du foie avec des lésions histologiques : diminution des corps éosinophiliques rénaux et hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires. Il n'est pas constaté de lésion reproductive chez les rats F0. A la génération F1, une diminution de la LH sérique et une ouverture vaginale précoce sont observées. Un NOAEL à 10 mg/kg pc/j pour la reproduction est défini.

La deuxième étude multigénérationnelle est aussi une étude sur 2 générations (Tyl *et al.*, 1999), menée selon la ligne directrice de l'EPA OPPTS. Elle soumet par voie orale des rats Sprague Dawley à des doses de NP de 0, 0.015, 1, 5, 15, 150 mg/kg pc/j. Un retard minime (non significatif) de l'ouverture vaginale et de la séparation préputiale semble liée à la perte de poids.

La dernière étude à dose répétée expose pendant la gestation du 11^{ème} au 18^{ème} jour des rats Wistar à des doses de 0, 3, 15, 75 mg/kg pc/j de NP administré par gavage (Hossaini *et al.*, 2001). Une diminution, dose dépendante, du poids absolu de l'épididyme est observée pour des doses égales à 15 et 75 mg/kg pc/j. Cette étude permet d'identifier un NOAEL à 3 mg/kg pc/j.

2.4.1.2. Effets sur le développement

Cinq études ont été retenues. La première est une étude standard de toxicité développementale (OCDE 414). Des rats Wistar ont été exposés *in utero* par gavage à des doses de 0, 75, 150, 300 mg/kg pc/j, du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation. Le sacrifice a lieu au 20^{ème} jour de la gestation (Initiative Umweltrelevante Altstoffe., 1992). Les résultats montrent une toxicité maternelle dès 150 mg/kg pc.j. Les effets observés sont une diminution de la consommation alimentaire et du poids total, des reins pâles et irréguliers. Le NOAEL maternel est égal à 75 mg/kg pc/j et le LOAEL à 150 mg/kg pc/j. Par contre, il n'y a pas de toxicité développementale constatée : la gestation, le nombre de fœtus sont normaux, aucune anomalie fœtale n'est constatée. Le NOAEL fœtal est égale à 300 mg/kg pc/j ou plus. L'étude de Jager *et al.* (1999b) selon la ligne directrice 415 de l'OCDE est unigénérationnelle, débutant au 7^{ème} jour de la gestation jusqu'à la 10^{ème} semaine postnatale pour les nouveaux-nés F1. Les animaux sont exposés par gavage à des doses de 0, 100, 250, 400 mg/kg pc/j. Les effets sont observés sur les testicules, avec une diminution du poids absolu des testicules et des epididymes à 100 mg/kg pc/j, une diminution du compte spermatique à 250 :mg/kg pc/j (confirmation des résultats après nouvelle lecture de la publication). A 100 mg/kg pc/j une diminution du diamètre des tubes séminifères et du diamètre de la

lumière des tubes, et enfin une diminution de l'épaisseur de l'épithélium basal sont observées.

Dans les trois autres études, la voie d'administration est intrapéritonéale (IP). Lee. (1998) injecte en IP à des rats Sprague Dawley des doses de 0, 0,08, 0,8, 8 mg/kg pc/j. Une première expérimentation se fait de J1 à J15 de vie à 0,08 , 0,8 et 8 mg/kg pc/j . on note une baisse significative du poids de la prostate, des épididymes, des testicules des vésicules séminales pour les 2 dosages les plus élevés alors que rien n'est observé à 0,08 mg/kg pc/j Ce n'est qu'à 8 mg/kg pc/j qu'une une diminution de la distance anogénitale et une augmentation des troubles de la migration testiculaire sont observées. Dans la deuxième étude, où les animaux sont exposés à 0 ou 8 mg/kg pc/j, les injections sont faites à des dates variables : soit de J1 à J18, soit de J6 à J24, soit de J13 à J30, en expositions postnatales. Dans ce dernier cas, les lésions ne sont plus retrouvées, montrant une période critique d'exposition de J1 à J12 de vie. Une injection d'ICI 182.780, 10 minutes après celle du NP annule les effets de ce dernier. A l'âge adulte, après une exposition à 8 mg/kg pc/j de J1 à J15 de vie, chez des mâles, des troubles de la fertilité après accouplement avec des femelles non traitées sont notés

Des faiblesses expérimentales sont attachées à cette étude (UE 2002) : groupes d'animaux peu importants, pas de regroupement par poids, voie IP questionnable pour une transposition à l'homme, présence chez 50% des rats d'adhérences péritonéales pouvant interférer dans les troubles de la migration testiculaire. Il n'y a pas de lésion à 0.08 mg/kg pc/j mais le nombre de rats est très faible par rapport au grand nombre traité à 8 mg/kg pc/j. Aucune conclusion ferme vis-à-vis de l'effet reprotoxique et de sa transposition à l'homme ne peut être retenue de cette étude.

Lee (1999) réitère son expérimentation selon le même protocole. Les résultats sont discordants avec seulement trois rats sur neuf porteurs d'une atrophie testiculaire et d'une diminution du compte spermatocytaire. Il n'y a pas de trouble de la migration testiculaire, de trouble du poids des principaux organes génitaux internes.

Odum *et al.* (2000) ont contrôlé les résultats de Lee selon un protocole proche (rats Alpk, voie I.P., dose de 8 mg/kg pc/j de J1 à J15, autopsie à 34 à 36 jours). L'étude ne montre aucun trouble à part des adhérences intrapéritonéales.

2.4.1.3 Mécanismes d'action proposés

Il y a de nombreuses études menées *in vitro* ou *in vivo* sur l'effet oestrogénique du NP.

Dans une étude *in vitro*, Routledge and Sumpter (1997) ont utilisé des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) qui contiennent un système d'expression oestrogénosensible. L'oestrogénicité du NP s'est révélée positive, mais 30 000 fois moins que le 17 β -oestradiol. L'effet oestrogénique *in vitro* a aussi été étudié sur des cellules humaines de cancer du sein

oestrogénosensibles : les cellules MCF-7 (Soto et al., 1991) et dans une autre étude sur ces mêmes cellules MCF-7 et sur des cellules ZR-75 (Soto et al., 1991, White et al., 1994). L'effet oestrogénique du NP est de 10^3 à 10^6 moins puissant que celui de l'oestradiol.

Quatre études *in vivo* confirment l'effet oestrogénique du NP.

L'étude de Kim *et al.* (2002) a été menée sur des rats Sprague Dawley immatures à des doses de NP de 0, 10, 25, 50, 100, 200 mg/kg pc/j. L'administration se fait par gavage. Une ouverture vaginale précoce à 50 mg/kg pc/j et une réponse utérotrophique à 100 mg sont retrouvées. Dans l'étude d'ICI (1996), les rats Wistar sont gavés pendant trois jours après le 20^{ème} jour de vie à des doses de 9,5 à 285 mg/kg pc/j. L'augmentation du poids de l'utérus commence à la dose de 47,5 mg/kg pc/j qui est un LOAEL, le NOAEL étant à 9,5 mg/kg pc/j. La troisième étude (CMA., 1997) utilise le même protocole sur des rats ovariectomisés, avec des doses de 30, 100, 300 mg/kg pc/j. L'utérotrophie survient à 300 mg/kg pc/j.

La dernière expérimentation d'utérotrophie (Lee et Lee, 1996) utilise la voie IP, avec des injections de 0, 25, 50 ou 100 mg/kg pc/j chez des rats S.D. de 20-21 jours. Les résultats montrent une augmentation du poids de l'utérus dose dépendante à tous les dosages. Comme pour les études *in vitro*, les expérimentations *in vivo* retrouvent un effet oestrogénique du NP qui est de 10^3 à 10^6 moins puissant que celui de l'oestradiol.

Dans deux des études (Routledge et Sumpter, 1997 ; Lee et Lee, 1996), l'administration concomitante d'un antagoniste oestrogénique agissant au niveau des récepteurs (Tamoxifén, ICI 182.780) bloque l'action du NP, prouvant que l'effet du NP se fait par interaction au niveau des récepteurs oestrogéniques.

2.5. Analyse de la cohérence des données animale et humaine

La pauvreté des données humaines, l'absence de données d'exposition par les voies aériennes, le caractère limité des données cutanées chez les animaux rendent difficiles l'analyse de la cohérence des données animales et humaines.

Par voie orale, l'absorption digestive est importante, la biodisponibilité du NP est de l'ordre de 15%. Le NP subit une glucuroconjugaaison majoritaire et une sulfoconjugaaison minoritaire. Malgré le caractère limité de l'étude chez l'homme (deux volontaires), cette voie métabolique semble confirmée. Chez le rat, l'élimination se fait essentiellement par les fecès et à un moindre degré par les urines sans notion de bioaccumulation. Chez l'homme, les données semblent différentes, avec une élimination urinaire et digestive de 11,5% au terme de l'expérimentation, augurant d'une bioaccumulation . Des traces de NP dans des biopsies graisseuses post-mortem chez des sujets non exposés professionnellement sont retrouvées. L'absorption cutanée chez l'animal et l'homme est très voisine *in vitro*, le caractère corrosif observé chez l'animal est sans doute extrapolable chez l'homme au vu des lésions de leucodermie rapportées chez deux travailleurs japonais.

Il n'y a pas de données sur la toxicocinétique suivant une exposition aérienne. Cependant, sur la base d'un haut coefficient de partition, il semble prudent de supposer qu'une absorption significative survienne par cette voie. De plus, du fait de l'absence de passage hépatique immédiat, la biodisponibilité est vraisemblablement plus importante que par voie orale.

Hors contexte professionnel, la principale voie d'exposition est la voie orale à partie du NP contenu dans les aliments, soit directement, soit par migration des films d'emballages alimentaires. Aucune donnée humaine ne permet en 2006 d'identifier un NOAEL ou un LOAEL directement chez l'homme.

2.6. Comparaison des indices de toxicité en fonction des effets

Les différents effets retrouvés dans le cadre du NP montrent que les effets apparaissant aux doses les plus faibles, sont reprotoxiques (épididyme) et néphrotoxiques. Les LOAEL les plus faibles sont de 15 mg/kg pc/j chez le rat. Les NOAEL reprotoxiques varient de 3 à 15 mg/kg pc/j et le LOAEL reprotoxique le plus fort est égal à 100 mg /kg pc/j.

2.7. Conclusion

Il n'existe pratiquement pas de données humaines et aucune ne concerne la reprotoxicité. Une activité oestrogénique du NP a pu être démontrée tant *in vitro* qu'*in vivo*. L'importance de cette activité est de 10^3 à 10^6 fois moindre que celle de l'oestradiol. Les effets du NP sur la fertilité et la reproduction ont été bien étudiés sur des expérimentations multigénérationnelles chez le rat. Ces études ont montré qu'une exposition sur plusieurs générations entraînent des perturbations mineures sur le système reproductif des nouveau-nés, à savoir : allongement du cycle oestral, accélération de l'ouverture vaginale et possiblement une baisse du poids des ovaires et du compte spermatique mais sans changement fonctionnel sur la reproduction et la fertilité. Le NOAEL pour ces changements est de 15 mg/kg pc/j. Une toxicité testiculaire (vacuolisation des tubes séminifères, nécrose cellulaire, diminution du diamètre des tubules) a été rapportée pour des expositions qui entraînent également une mortalité notable. Le LOAEL pour ces lésions testiculaires dans une étude à doses répétées par gavage est de 100 mg/kg pc/j.

Une étude développementale avec exposition du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation ne met pas en évidence de trouble du développement. Les NOAEL maternel et fœtal sont respectivement de 75 et 300 mg/kg pc/j. A l'inverse, dans une étude par gavage exposant les rats *in utero*, pendant la lactation puis pendant 10 semaines, une diminution du compte spermatique est observée à 250 mg/kg pc/j mais il n'est pas possible de trancher entre une lésion développementale ou une responsabilité de l'exposition directe au NP après la lactation.

Toutes ces observations confirme la reprotoxicité du nonylphénol vraisemblablement par action sur les récepteurs oestrogéniques.

Les effets toxiques pertinents identifiés lors des études toxicologiques disponibles sont principalement les effets sur la reproduction mais aussi la néphrotoxicité. Il ressort de la revue réalisée par l'UE en 2002 les situations à risque suivantes :

1. La marge de sécurité des ouvriers de l'industrie de fabrication du NP ou de son utilisation industrielle exposés au NP est voisine de 10.
2. La marge de sécurité des peintres utilisant des sprays de peinture contenant du NP est inférieure à 1.
3. La marge de sécurité d'une population vivant non loin d'une industrie textile, exposée au NP via l'air ambiant, l'eau de boisson et la nourriture est proche de 3.

3. La construction de la VTR

3.1. Identification d'une dose critique

3.1.1 Présentation des doses repères

3.1.1.1 Toxicité générale

Il est à noter qu'une seule des études à doses répétées n'a pas été réalisée selon les lignes directrices de l'OCDE. Cette étude (Latendresse *et al.*, 2001) respecte cependant les BPL et peut être classée selon Klimish *et al.* en classe 1.

Tableau résumé de la Toxicité Générale

Retenant les études de bonne qualité (OCDE, Klimish 1)

| Références de l'étude source | Espèce | Effets considérés | Voie d'exposition | Durée d'exposition | Dose critique utilisée |
|--|---------------------|---|--|---|-------------------------|
| Hüls., 1989 | Rats Sprague Dawley | Hyalinisation rénale ↑ poids du foie, des reins et des testicules | Orale <i>ad lib</i> 0, 25, 100, 400 mg/kg pc/j | 28 jours | LOAEL 100 mg/kg pc/j |
| CMA 1997 Cunny <i>et al.</i> , 1997 | Rats Sprague Dawley | Lésions hépatiques (nécrose cellulaire) Lésions rénales (minéralisation) | Orale <i>ad lib</i> 0, 15, 50, 100 mg/kg pc/j | 90 jours | NOAEL 50 mg/kg pc/j |
| Latendresse <i>et al.</i> , 2001 | Rats Sprague Dawley | Lésions kystiques rénales (dose dépendant) | Orale <i>ad lib</i> 0.0375, 1.875, 15, 37.5, 75, 150 mg/kg pc/j | 7 ^{ème} jour de gestation, J50 | NOAEL 37.5mg/kg pc/j |
| NTP., 1997 Chapin <i>et al.</i> , 1999 | Rats Sprague Dawley | Lésions rénales Dégénération tubulaire Dilatation tubulaire | Orale <i>ad lib</i> 0, 15, 50, 160 mg/kg pc/j | Multigénérationnelle F0, F1, F2, F3 | LOAEL 15 mg/kg pc/j |

3.1.1.2. Reprotoxicité

Deux études répondent aux lignes directrices de l'OCDE (NTP 1997 & Chapin *et al.*, 1999, de Jager *et al.*, 1999a). Les deux autres respectent les BPL et peuvent être classées selon Klimish *et al.* en classe 1.

Tableau résumé de la Reprotoxicité

Retenant les études de bonne qualité (OCDE, Klimish 1)

| Références de l'étude source | Espèces | Effets considérés | Voie d'exposition | Durée d'exposition | Doses repères |
|---|---------------------|---|---|---|---|
| NTP., 1997 Chapin <i>et al.</i> , 1999 | Rats Sprague Dawley | Augmentation du cycle oestral Accélération de l'ouverture vaginale Diminution du poids des ovaires Diminution du compte spermatique épидidymaire | Orale <i>ad lib</i> 0, 15, 50, 160 mg/kg pc/j | Multigénérationnelle F0, F1, F2, F3, | NOAEL 15 mg/kg pc/j $\alpha = 5\%$ |
| De Jager <i>et al.</i> , 1999a | Rats Sprague Dawley | Lésion histologique des tubes séminifères | Gavage 0, 100, 250, 400 mg/kg pc/j | 10 semaines | LOAEL 100 mg/kg pc/j, $\alpha = 5\%$ |
| Nagao <i>et al.</i> , 2001 | Rats Sprague Dawley | F1 - Diminution LH sérique Accélération de l'ouverture vaginale | Gavage 2, 10, 50 mg/kg pc/j | Multigénérationnelle F0, F1, F2 | NOAEL 10 mg/kg pc/j $\alpha = 1$ ou 5% |
| Hossaini <i>et al.</i> , 2001 | Rats Wistar | Diminution absolue et dose dépendante du poids de l'épididyme | Gavage 3, 15, 75 mg/kg pc/j | Gestation 11 ^{ème} jour au 18 ^{ème} jour | NOAEL 3 mg/kg pc/j $\alpha = 5\%$ |

Les risques de deuxième espèce bêta n'ont pas été calculés par les auteurs dans les études retenues.

3.1.2 Choix de la dose critique

Deux types de doses critiques peuvent être retenues en fonction de l'exposition des animaux : la première, pour une exposition sur plusieurs générations, par voie orale, correspond à un NOAEL de 10 mg/kg pc/j. Une diminution de la LH sérique et une accélération de l'ouverture vaginale dans la génération F1 est observée à 50 mg/kg pc/j, correspondant au LOAEL. La seconde, pour une exposition pendant la gestation (J11-J18) avec un effet sur la progéniture, correspond à un NOAEL de 3 mg/kg pc/j. Une diminution absolue du poids de l'épididyme est observée à 15 mg/kg pc/j, correspondant au LOAEL.

3.2. Facteurs d'incertitude

Selon la méthode de construction de VTR reprotoxiques proposées, les facteurs d'évaluation suivant doivent être appliqués aux doses repères :

- un facteur inter espèces (UF_A) de 10, compte tenu des incertitudes de transpositions et de la faible quantité de données de toxicocinétique chez l'homme ;
- un facteur intra espèce (UF_H) de 10, tenant compte de la variabilité humaine.

Le facteur d'incertitude UF_D qui tient compte de la qualité de la base de données et de la suffisance de ces données n'est pas nécessaire dans ce cas étant donné que les études de reproduction ont été réalisées selon plusieurs schémas expérimentaux, dont des études sur plusieurs générations et des études sur le développement.

3.3. Discussion et présentation de la VTR

Deux VTR peuvent ainsi être construites à partir des études sur le nonylphénol.

La première, sur la base d'une étude sur plusieurs générations chez le rat, serait de 0,15 mg/kg pc/j pour une exposition chronique de l'homme.

La seconde, sur la base d'une étude sur le développement, serait de 0,03 mg/kg pc/j, et permettrait de protéger spécifiquement les femmes enceintes (effets sur la progéniture liés à une exposition *in utero*).

| VTR | Référence étude source | Espèces | Effets considérés | Doses repères | UF |
|-------------------------------|--|---|---|--|------------------|
| Reproduction 0,15 mg/kg/j | NTP., 1997 Chapin <i>et al.</i> , 1999 | Rats Sprague Dawley, expo orale, de F0 à F3 | ↑ du cycle oestral Accélération de l'ouverture vaginale ↓ poids ovaires ↓compte spermatique épидidymaire | NOAEL = 15 mg/kg pc/j LOAEL = $\alpha = 5\%$ | 100 (UFA et UFH) |
| Développement 0,03 mg/kg/j | Hossaini <i>et al.</i> , 2001 | Rats Wistar, expo orale de GD11 à GD18 | ↓ absolue et dose dépendante du poids épididymes | NOAEL 3 mg/kg pc/j LOAEL = 15 mg/kg pc/j $\alpha = 5\%$ | 100 (UFA et UFH) |

4. BIBLIOGRAPHIE

4-nonylphenol (CAS N° 104-40-5), nonylphenol (CAS N° 25154-52-3). (2003). In : base de données HSDB.

ACEVEDO R., PARNELL P.G., VILLANUEVA H., CHAPMAN L.M., GIMENEZ T., GRAY S.L., and BALDWIN W.S. (2005). The contribution of hepatic steroid metabolism to serum estradiol and estriol concentrations in nonylphenol treated MMTV neu mice and its potential effects on breast cancer incidence and latency. *Journal of Applied Toxicology*, **25**, 339-353.

AHEL M., and GIGER W. (1993). Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere*, **28**, 1471-1478.

BEROL KEMI A.B. (1982). Irritant effect on rabbit skin of nonylphenol. Huntingdon Research Centre Report N°861361D/BKI94/SE.

BEROL KEMI A.B. (1987). Irritant effect on rabbit skin of nonylphenol. Huntingdon Research Center Report N°861361D/BKI941SE.

BLAKE C.A., and BOOCKFOR F.R. (1997). Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone. *Biology of Reproduction*, **57**, 255-266.

BOOCKFOR F.R., and BLAKE C.A. (1997). Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis and increases the incidence of sperm deformities. *Biology of Reproduction*, **57**, 267-277.

BRENNAN S.J., BROUGHAM C.A., ROCHE J.J., and FOGARTY A.M. (2005). Multi-generational effects of four selected environmental estrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere*.

BUCKIOVA D. (2002). Reproductive toxicity of bisphenol A, nonylphenol, genistein and diethylstilbestrol in CD 1 mice. *Reproductive Toxicology*, **16**, 391.

CAMERON MCKENNA. (2002). Environmental law bulletin. European Union : directive on cement, nonylphenoletoxylate and nonylphenol.

CEFIC. (1996). Survey of nonyphenol and nonylphenol ethoxylate production, use, life cycle emission and occupational exposure.

CERTA H., FEDTKE N., WIEGAND H.J., MUELLER A.M.F., and BOLT H.M. (1996). Toxicokinetics of *p*-tert-octylphenol in male Wistar rats. Archives of Toxicology, **71**, 112-122.

CHAPIN R.E., DELANEY J., WANG Y., LANNING L., DAVIS B., COLLINS B., MINTZ N., and WOLFE G. (1999). The effects of 4-nonylphenol in rats : a multigeneration reproduction study. Toxicological Sciences, **52**, 80-91.

CHEMICALS MANUFACTURERS ASSOCIATION. (1997). 90 day dietary study in rats administred *para*-nonylphenol. Corning Hazleton Study. CHV 2603-105.

CHEMICALS MANUFACTURERS ASSOCIATION. (1997). Uterine weight assay of *p*-nonylphenol and *p*-octylphenol ethoxylate-5 (OPE-5) administered orally to ovariectomized Sprague Dawley rats. MB Research Labs Project N°MB9 6-4960.07.

COLERANGLE J.B., and ROY D. (1996). Exposure of environmental estrogenic compound nonylphenol to Noble rats alters cell kinetic in the mammary gland. Endocrine, **4**, 115-122.

CUNNY H.C., MAYES B.A., ROSICA K.A., TRUTTER J.A., and Van MILLER J.P. (1997). Subchronic toxicity (90-day) study with *para*-nonylphenol in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology, **26**, 172-178.

DANZO B.J., SHAPPELL H.W., BANERJEE A., and HACHEY D.L. (2002). Effects of nonylphenol, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (*p,p'*-DDE) and pentachlorophenol on the adult female guinea pig reproductive tract. Reproductive Toxicology, **16**, 29-43.

ENICHEM. (1992). Acute dermal irritation study in rabbits. Instituto di Richerche Biomediche Report N°910515.

EUROPEAN UNION RISK ASSESSMENT Report on Existing Substances. (2002) : 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol (CAS N°8485 2-15-3 and CAS N°25154-52-3). EUR 20387 EN, Series : 2nd Priority List vol. 10.

FERGUSON S.A., FLYNN K.M., DELCLOS K.B., and NEWBOLD R.R. (2000). Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicology and Teratology*, **22**, 583-591.

FLYNN K.M., NEWBOLD R.R., and FERGUSON S.A. (2002). Multigenerational exposure to dietary nonylphenol has no severe effects on spatial learning in female rats. *Neuro-Toxicology*, **23**, 87-94.

GAFNEY P.E. (1976). Carpet and rug industry case II : biological effects. *Journal of Water Pollution Control*, **48**, 2731-2737.

GREEN T., SWAIN C., Van MILLER J.P., and JOINER R.L. (2003). Absorption, bioavailability and metabolism of para-nonylphenol in the rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **38**, 43-51.

HAN X.D., TU Z.G., GONG Y., SHEN S.N., WANG X.Y., KANG L.N., HOU Y.Y., and CHEN J.X. (2004). The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reproductive Toxicology*, **19**, 215-221.

HOSSAINI A., DALGAARD M., VINGGAARD A.M., FRANDSEN H., and LARSEN J.J. (2001). In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology*, **15**, 537-543.

HULS A.G. (1982). Nonylphenol : an acute toxicity study (LD50) in the rat. Hazleton Laboratoires Deutch and Project N°22218.

HULS A.G. (1984). Mutagenitätsunterchesung von nonylphenol mit higle of *Salmonella Typhimurium* mikaosomen-mutagenitats. Tests nach Ames. HULS Report N°84/19, Project X41.

HULS. (1986). Prüfung der akuten hautreizwirkung von nonylphenol. HULS Report N°0584.

HULS A.G. (1986). Prüfung der akuten augen . Schleimhautreizwirkung von nonylphenol. HULS Report N°0584.

HULS. (1986). Prüfung auf hautsensibisierende wirkung am meerschweichen von nonylphenol. HULS Report N°0690.

HULS A.G. (1989). Nonylphenol : 28 day oral (dietary) sub-acute toxicity study in the rat. Hazleton UK Report N°5917-671/1.

HULS A.G. (1990). *In vitro* mammalian cell gene mutation test with nonylphenol. IBR Project N°95-86-0449-90.

HULS A.G. (1999). *In vivo* mouse micronucleus test. HULS Report N°MK-99/0255.

ICI, Central Toxicology Laboratory (1979). Nonylphenol : comparaison of acute oral toxicities, skin and eye irritation and skin sensitisation. CTL Report N°CTL/T/1278.

ICI, Central Toxicology Laboratory (1980). Nonylphenol samples : skin sensitisation study. CTL Report N°CTL/T/1999.

ICI, Central Toxicology Laboratory (1982). Stripped nonylphenol : skin irritation study. CTL Report N°CTL/T/1769.

ICI, Central Toxicology Laboratory (1984). Comparaison of acute oral toxicities. CTL Report N°CTL/L708.

ICI, Chemicals and Polymers LTD. (1995). Nonylphenol : assessment of sensory irritation potential in mice. Zeneca CTL Report N°CTL/L/6768.

ICI, Surfactants (1996). Screening chemicals for effect on uterus gross in immature female rats : nonylphenol, octylphenol and nonylphenoxyacetic acid. Zeneca CTL Report N°CTL/R/IC49.

ICSC. (2000). Fiches Internationales de Sécurité Chimique. Nonylphenol (mélanges d'isomères). International Chemical Safety Cards. ICSC : 0309.

IKEDA M., OHTSUJI H., and MIYAHARA S. (1970). Two cases of leukoderma, presumably due to nonyl- or octylphenols in synthetic detergents. Industrial Health, **8**, 192-196.

INITIATIVE UMWELTRELEVANTE ALTSTOFFE. (1992). Teratogenicity study in Wistar rats treated orally with nonylphenol. IBR Project N°20-04-0502/00.91.

INOUE K., KAWAGUCHI M., OKADA F., TAKAI N., YOSHIMURA Y., HORIE M., IZUMI S., MAKINO T., and NAKAZAWA H. (2003). Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-

octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **486**, 41-50.

INRS. (2004). Fiche toxicologique N°249 . Nonylphenol et 4-nonylphenol ramifié.

IUCLID Dataset. (2000). Substance ID : 84852-15-3.

JAGER (de) C., BORNMAN M.S., and Van Der HORST G. (1999a). The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with estrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia*, **31**, 99-106.

JAGER (de) C., BORNMAN M.S., and OOSTHUIZEN J.M.C. (1999b). The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure. *Andrologia*, **31**, 107-113.

KIM H.S., SHIN J.H., MOON H.J., KANG I.H., KIM T.S., KIM I.Y., SEOK J.H., PYO M.Y., and HAN S.Y. (2002). Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. *Reproductive Toxicology*, **16**, 259-268.

LATENDRESSE J.R., NEWBOLD R.R., WEIS C.C., and DELCLOS K.B. (2001). Polycystic kidney disease induced in F1 Sprague-Dawley rats fed para-nonylphenol in a soy-free, casein-containing diet. *Toxicological Sciences*, **62**, 140-147.

LATENDRESSE J.R., WEIS C.C., MELLICK P.W., NEWBOLD R.R., and DELCLOS B. (2004). A five generation reproductive toxicity assessment of p-nonylphenol (NP) in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicologist*, **78**, 219.

LAURENZANA E.M., WEIS C.C., BRYANT C.W., NEWBOLD R., and DELCLOS K.B. (2002). Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes and estrogen receptor alpha expression. *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 53-63.

LAURENZANA E.M., BALASUBRAMANIAN G., WEIS C., BLAYDES B., NEWBOLD R.R., and DELCLOS K.B. (2002). Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and testicular steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal and adult rats. *Chemico-Biological Interactions*, **139**, 23-41.

LAWS S.C., CAREY S.A., FERRELL J.M., BODMAN G.J., and COOPER R.L. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicological Sciences*, **54**, 154-167.

LEE P.C., and LEE W. (1996). In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, **57**, 341-348.

LEE P.C. (1998). Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male newborn rats. *Endocrine*, **9**, 105-111.

LONG D.X., LI Y., PEI X.R. (2004). Study on developmental toxicity of 4-nonylphenol on cultured rat embryos. *China Public Health*, **104**, 40-45.

LSIP., Rapport d'évaluation. (2001). Le nonylphenol et ses dérivés éthoxylés. Environment Canada, Santé Canada.

MAJDIC G., SHARPE R.M., O'SHAUGHNESSY P.J., and SAUNDERS P.T.K. (1996). Expression of cytochrome P450 17 α-hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens. *Endocrinology*, **137**, 1063-1070.

MOFFAT G.J., BURNS A., Van MILLER J., JOINER R., and ASHBY J. (2001). Glucuronidation of nonylphenol and octylphenol eliminates their ability to activate transcription via the estrogen receptor. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**, 182-187.

MULLER S., SCHID P., and SCHLATTER C. (1998). Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **5**, 257-265.

MURONO E.P., DERK R.C., and LEON (de) J.H. (1999). Biphasic effects of octylphenol on testosterone biosynthesis by cultured Leydig cells from neonatal rats. *Reproductive Toxicology*, **13**, 451-462.

NAGAO T., WADA K., MARUMO H., YOSHIMURA S., and ONO H. (2001). Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration : a two-generation study. *Reproductive Toxicology*, **15**, 293-315.

NTP. (1997). Nonylphenol : multigenerational reproductive effect in Sprague-Dawley rats when exposed to nonylphenol in the diet. R.O.W. Sciences study N° 8989-30. In European Assessment Report on Existing Substances (2002) : 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol, EUR 20387 EN, Series : 2nd Priority List vol. 10.

ODUM J., and ASHBY J. (2000). Neonatal exposure of male rats to nonylphenol has no effect on the reproductive tract. *Toxicological Sciences*, **56**, 400-404.

ROUTLEDGE E.S., and SUMPTER J.P. (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3280-3288.

SHARPE R.M., FISHER J.S., MILLAR M.M., JOBLING S., SUMPTER J.P. (1995). Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 1136-1143.

SHARPE R.M., TURNER K.J., and SUMPTER J.P. (1998). Endocrine disruptors and testis development. *Environmental Health Perspectives*, **106**.

SHELBY M.D., NEWBOLD R.R., TULLY D.B., CHAE K., and DAVIS V.L. (1996). Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environmental Health Perspectives*, **104**.

SHIMUZU H., SUSUKI Y., TAKEMURA N., GOTO S., and MATSUSHITA H. (1985). The results of microbial mutation test for forty three industrial chemicals. *Japan Journal for Industrial Health*, **27**, 400-419.

SMYTH H.F., CARPENTER C.P., WEILL C.S., POZZANI U., and STRIEGEL J.A. (1962). Range-finding toxicity data : list VI. *Am. Ind. Hyg. Assoc.*, **J30**, 470-476.

SOTO A.M., JUSTICIA H., WRAY J.W., and SONNENSCHEIN C. (1991). P-nonylphenol : an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, **92**, 167-173.

TAKAGI H., SHIBUTANI M., MASUTOMI N., UNEYAMA C., MITSUMORI K., HIROSE M. (2003). Effects of perinatal exposure of five putative endocrine disrupting chemicals (EDCs), methoxychlor, genistein, diisobutylphthalate, 4-nonylphenol and bisphenol A, on endocrine/reproductive systems in rats. *Toxicologist*, **72**, 77.

TYL R.W., MYERS C.B., MARR M.C., BRINE D.R., FAIL P.A., SEELY J.C., and Van MILLER J.P. (1999). Two-generation reproduction study with para-tert-octylphenol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **30**, 81-95.

UNION CARBIDE. (1992a). Nonylphenol RNH : primary skin irritancy study in the rabbit by Departement of Transport (DOT) procedures. Union Carbide Project Report N°81U0008.

UPMEIER A., DEGEN G.H., SCHUHMACHER U.S., CETRA H., and BOLT H.M. (1999). Toxicokinetics of p-tert-octylphenol in female DA-han rats after single i.v. and oral application. Archives of Toxicology, **73**, 217-222.

VILLANUEVA H., ACEVEDO R., PARNELL P., GRAY S.L., GIMENEZ T., and BALDWIN W. (2004). Nonylphenol induces mammary cancer in MMTVneu mice. Toxicologist, **78**, 114.

VLAARDINGEN Van P.L.A., POSTHUMUS R., and TRAAS T.P. (2003). Environmental risk limits for alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. National Institute for Public Health and the Environment. RIVM rapport 601501019.

WHITE R., JOBLING S., HOARE S.A., SUMPTER J.P., and PARKER G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinologie, **135**, 175-182.

YOSHIDA M., KATSUDA S., TAKENAKA A., WATABANE G., TAYA K., and MAEKAWA A. (2001). Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. Toxicology Letters, **121**, 21-33.

YOSHIDA M., SHIMOMOTO T., KATASHIMA S., SHIRAI T., NAKAE D., WATANABE G., TAYA K., MAEKAWA A. (2003). Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats. Journal of Toxicologic Pathology, **16**, 259-266.

RAPPORT D'ÉTUDE 20/11/2006
N°INERIS-DRC-06-70355/ETSC/MBs-06DR136.doc

**Construction de VTR reprotoxique selon le
document de référence de l'Afsset**
- Toluène -

Construction de VTR reprotoxiques selon le document de référence de l'Afsset

- Toluène -

Expertise toxicologique des substances chimiques (ETSC)
Direction des risques chroniques (DRC)

Client : AFSSET

Liste des personnes ayant participé à l'étude : M. BISSON

PREAMBULE

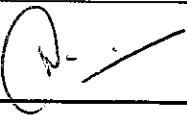
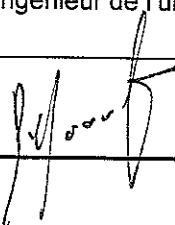
Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

| | Rédaction | Vérification | Approbation |
|---------|---|---|---|
| NOM | Michèle Bisson | Blandine Doornaert | Céline Boudet |
| Qualité | Ingénieur de l'unité ETSC | Ingénieur de l'unité ETSC | Responsable de l'unité ETSC |
| Visa |  |  |  |

**Construction d'une VTR reprotoxique pour la substance toluène
(cas 108-88-3), selon la méthode proposée dans le document de
référence**

**Organisation des connaissances
(version 1)**

Le 20 novembre 2006

Etude réalisée par :

Organisme d'expertise :

Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

INERIS

BP n°2

60550 Verneuil en Halatte

Contact : Bisson Michèle (03.44.55.65.97 / michele.bisson@ineris.fr)

Pour :

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

AFSSET

27-31 avenue du Général Leclerc

94704 Maison Alfort Cedex

Contact : Nathalie Bonvallot (01 56 29 19 33 / nathalie.bonvallot@afssel.fr)

Information sur la propriété et diffusion du document

Les résultats des travaux demeurent la propriété de l'AFSSET, qui se réserve le droit de les rendre publics. Ils ne peuvent être utilisés, ou rendus en tout ou partie publics qu'avec l'accord écrit préalable de l'AFSSET. Les informations communiquées par l'AFSSET à l'occasion de la réalisation des travaux sont confidentielles et ne doivent pas être communiquées à des tiers, sauf accord.

Préambule

A la suite de la rédaction, par le groupe de travail de l'Afsset sur les VTR reprotoxiques, d'un document de référence sur la construction de VTR pour les effets reprotoxiques, une phase pilote de construction de VTR reprotoxiques a été réalisée sur plusieurs substances tests.

Cette phase pilote avait pour objectifs :

- De mettre en évidence la possibilité ou non de construire des VTR reprotoxiques en suivant le cahier des charges et la méthodologie proposés par l'Afsset.
- De valider la méthode de construction développée dans le document de référence de l'Afsset et de la faire évoluer, si cela était nécessaire, en fonction des difficultés rencontrées.

L'INERIS a travaillé sur deux substances, une substance pour laquelle des VTR pour des effets reprotoxiques étaient déjà disponibles dans la littérature : l'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE) et une substance pour laquelle aucune VTR reprotoxique n'a été établie : le toluène.

Ce présent document réalise, en accord avec les recommandations et le plan du cahier des charges et du document méthodologique de l'Afsset, une revue des généralités et des effets toxiques du toluène disponibles dans la littérature, les effets reprotoxiques étant examinés de façon approfondie. A partir de ces dernières données, deux VTR reprotoxiques ont été construites et proposées.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| 1. RÉSUMÉ..... | 8 |
| 2. LE PROFIL TOXICOLOGIQUE | 12 |
| 2.1. INFORMATIONS GÉNÉRALES | 12 |
| 2.1.1. IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE..... | 12 |
| 2.1.2. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES | 12 |
| 2.1.3. PLAUSIBILITÉ D'EXPOSITION HUMAINE | 13 |
| 2.1.4. TOXICOCINÉTIQUE | 13 |
| 2.1.5. TOXICITÉ GÉNÉRALE | 16 |
| 2.2. TOXICITÉ SUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT | 20 |
| 2.2.1. DONNÉES HUMAINES | 20 |
| 2.2.1.1. Effets sur le développement | 20 |
| 2.2.1.2. Effets sur la fertilité | 21 |
| 2.2.2. DONNÉES ANIMALES..... | 23 |
| 2.2.2.1. Effets sur le développement | 23 |
| 2.2.2.2. Effets sur la fertilité | 30 |
| 2.2.3. MÉCANISMES D'ACTION PROPOSÉS | 31 |
| 2.3. ANALYSE DE LA COHÉRENCE DES DONNÉES ANIMALES ET HUMAINES | 32 |
| 2.4. COMPARAISON DES INDICES DE TOXICITÉ EN FONCTION DES EFFETS | 33 |
| 2.5. CONCLUSION..... | 41 |
| 3. LA CONSTRUCTION DE LA VTR..... | 42 |
| 3.1. IDENTIFICATION D'UNE DOSE CRITIQUE..... | 42 |
| 3.1.1. PRÉSENTATION DES DOSES REPÈRES | 42 |
| 3.1.2. DOSE CRITIQUE RETENUE | 43 |
| 3.2. FACTEURS D'INCERTITUDE | 43 |
| 3.3. DISCUSSION ET PRÉSENTATION DE LA VTR..... | 44 |
| 4. BIBLIOGRAPHIE..... | 46 |

1. Résumé

Chez l'homme, le toluène est toxique lors d'expositions aiguës, avec la mise en évidence de troubles neurologiques (vertiges, maux de tête...) mais les effets sont réversibles quelque soit la voie d'exposition. Lors d'expositions chroniques, la principale voie d'absorption est l'inhalation. Les effets correspondent essentiellement à des atteintes neurologiques. Les effets reprotoxiques décrits pour des expositions professionnelles correspondent à une altération des taux de LH (hormone lutéotrope), FSH (hormone folliculo-stimulante) et testostérone chez les hommes et une diminution de la fertilité chez les femmes. Une augmentation du risque d'avortement spontané et de la survenue de malformations congénitales sont également rapportées. En cas d'inhalation de toluène par des femmes toxicomanes au cours de leur grossesse des altérations du système nerveux sont observées chez les jeunes après la naissance.

Chez l'animal, lors d'exposition chroniques, les effets neurologiques systémiques décrits chez l'homme sont retrouvés. Les effets reprotoxiques sont mieux caractérisés. Ils correspondent à des effets sur la fertilité du mâle (diminution du nombre de spermatozoïdes et du poids de l'épididyme) et sur le développement (diminution du poids de naissance, retard de développement post-natal et altération du comportement).

Le toluène est utilisé comme additif dans l'essence, intermédiaire de synthèse, solvants pour les peintures, les encres, les adhésifs,... Il est également utilisé au cours de la fabrication de médicaments et de produits cosmétiques. Du fait de sa nature volatile, le toluène est présent dans l'air aussi bien de certains postes de travail que dans l'environnement.

L'analyse des nombreuses VTR existantes (Tableau I) montre que les effets reprotoxiques ne sont pas retenus comme effets critiques et que ces VTR ont été établies, pour leur majorité, pour des expositions chroniques. Il nous apparaît pertinent de proposer deux VTR reprotoxiques pour des expositions sub-chroniques ($5,74 \text{ mg/m}^3$ pour des effets sur la reproduction et $4,78 \text{ mg/m}^3$ pour des effets sur le développement) pour tenir compte des effets reprotoxiques décrits dans la littérature et des durées d'exposition auxquels ils apparaissent (Tableau II).

Tableau I : VTR non reprotoxiques existantes pour le toluène

| Organisme (année) | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR | Dose critique | UF | Etude toxicologique utilisée |
|----------------------|--|----------------------|-----------------------|-----------------------------|--|------|--|
| US EPA (2005) | Augmentation poids rein | oreale | chronique | RfD = 0,08 mg/kg/j | BMDL = 238mg/kg/j | 3000 | NTP, 1990 |
| US EPA (2005) | Effets neurologiques | inhalation | chronique | RfC = 5 mg/m ³ | NOAEL moyen ajusté = 46 mg/m ³ | 10 | (Abbate et al., 1993 ; Boey et al., 1997 ; Cavallieri et al., 2000 ; Eller et al., 1999 ; Foo et al., 1990 ; Murata et al., 1993 ; Nakatsuka et al., 1992 ; Neubert et al., 2001 ; Vrca et al., 1995 ; Zavalic et al., 1998a) |
| ATSDR (2000) | Irritation, effets neuro- comportementaux | Inhalation | aigu | MRL = 3,8 mg/m ³ | NOAEL ajusté = 36 mg/m ³ | 10 | Andersen et al., 1983 |
| ATSDR (2000) | Dysfonctionnement de la vision des couleurs | Inhalation | chronique | MRL = 0,3 mg/m ³ | LOAEL ajusté = 134 mg/m ³ | 100 | Zavalic et al., 1998a |
| ATSDR (2000) | Atteinte du système nervieux | Orale | aigu | MRL = 0,8 mg/kg/j | LOAEL = 250 mg/kg/j | 300 | Dyer et al., 1983 |
| ATSDR (2000) | Augmentation des | Orale | subchronique | MRL = 0,02 mg/kg/j | LOAEL = 5 mg/kg/j | 300 | Hsieh et al., 1990 |

| Organisme (année) | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR | Dose critique | UF | Etude toxicologique utilisée |
|------------------------------|--|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------|---|
| | monoamines neurotransmetteurs | | | | | | |
| OMS (2004) | Effets hépatotoxiques marginaux | Orale | chronique | TDI = 0,223 mg/kg | LOAEL = 312 mg/kg/j | 1 000 | Andersen <i>et al.</i> , 1983 |
| Santé Canada (2004) | Irritation du système respiratoire et effets neurologiques | Inhalation | chronique | CA = 3,75 mg/m ³ | NOAEL = 150 mg/m ³ | 10 | Andersen <i>et al.</i> , 1983 |
| Santé Canada (2004) | Diminution du poids corporel | Orale | chronique | DJA = 1,25 mg/kg/j | LOAEL ajusté = 375 mg/kg/j | 100 | NTP, 1990 |
| RIVM (2004) | Irritation nasale | Inhalation | chronique | TCA = 3,75 mg/m ³ | NOAEL = 150 mg/kg/j | 10 | Andersen <i>et al.</i> , 1983 |
| RIVM (2004) | Effets hépatotoxiques marginaux | Orale | chronique | DJA = 1,25 mg/kg | LOAEL = 375 mg/kg/j | 100 | NTP, 1990 |
| OEHHA (2003) | Effets neurologiques | Inhalation | chronique | REL = 0,3 mg/m ³ | NOAEL = 152 mg/m ³ | 100 | Hillefors-Berglund <i>et al.</i> , 1995 ; Foo <i>et al.</i> , 1990 |

Tableau II : VTR proposées par l'INERIS pour les effets reprotoxiques du toluène

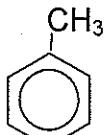
| VTR proposée | Effet critique pris en compte pour la construction de la VTR | Voie d'exposition | Durée d'exposition pour laquelle la VTR s'applique | Etude toxicologique utilisée | Espèces testées, voie et durée d'exposition du protocole | Dose critique | UF |
|---------------------------------------|---|-------------------|--|------------------------------|---|---|-------------------|
| 5,74 mg/m ³ (1,5 ppm) | <u>Effet sur la reproduction : fertilité masculine</u> | inhalation | subchronique | Ono <i>et al.</i> , 1996 | Rat (Sprague Dawley) Inhalation 90 j d'exposition chez le mâle | NOAEL = 600 ppm (2 300 mg/m ³) NOAEL _{ADJ} = 150 ppm (574 mg/m ³) | 10 (inter-espèce) |
| 4,78 mg/m ³ (11,25 ppm) | <u>développement - foetotoxicité</u> | inhalation | Sub-aiguë et sub-chronique | Roberts, 2003 | Rat (Sprague Dawley) Inhalation ♂ et ♀ : 80 j avant accouplement, ♂ : 15 j après accouplement, ♀ : 20 j pendant gestation et 15 j pendant lactation | NOAEL = 500 ppm (1 850 mg/m ³) NOAEL _{ADJ} = 125 ppm (479 mg/m ³) | 10 (inter-espèce) |

2. Le profil toxicologique

2.1. Informations générales

2.1.1. Identification de la substance

Tableau III : Informations générales

| | |
|---------------------------------------|---|
| Numéro CAS, ENEICS, etc. | CAS : 108-88-3 / EC : 203-625-9 |
| Nom | Toluène |
| Synonymes | Methyl benzene, phenyl methane, toluol, methyl benzol |
| Formule brute | C ₇ H ₈ |
| Formule développée |  |
| Appartenance à une liste reprotoxique | CMR, Reprotoxique catégorie 3 (R 63) |

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

Tableau IV : Propriétés physico-chimiques

| | |
|------------------------|---|
| Forme physique | |
| Poids moléculaire | 92,15 g/M (EU, 2003) |
| Point d'ébullition | 110,6°C à 1,013 hPa (Merck Index, 1989 dans EU, 2003) |
| Point de fusion | - 95°C (Merck Index, 1989 dans EU, 2003) |
| Pression de vapeur | 3,000 (20°C) 3,800 (25°C) Pa (IUCLID, 1994 et Mackay <i>et al.</i> , 1992 dans EU, 2003) |
| Densité | 0,8669 g/mL (20°C) (Lide, 1996 dans EU, 2003) |
| Facteurs de conversion | 1 ppm = 3,75 mg/m ³ à 25 °C et 1 atm (WHO, 1985 dans EU, 2003) 1 mg/m ³ = 0,266 ppm à 25 °C et 1 atm (OMS, 1985 dans EU, 2003) |
| Solubilité | 515 mg/L à 20 °C 534,8 mg/L à 25 °C (IUCLID, 1994 et Hansch et Leo, 1979 dans EU, 2003) |
| LogKow | 2,65 (IUCLID, 1994 dans EU, 2003) |
| Koc | 100 : moyenne géométrique d'une quinzaine de valeurs mesurées sur des sols sableux, limoneux, silteux... (variant entre 37 et 178 L/kg) (INERIS, 2005) |
| BCF | 90 (Freitag <i>et al.</i> , 1985 dans INERIS, 2005) |
| BAF | Non déterminé |

| | |
|--|--|
| Produits de dégradation environnementale | Facilement biodégradable en aérobiose (Price et al., 1974). Dans l'atmosphère, le toluène se décompose principalement par réaction photochimique (ATSDR, 1994). |
| Autres | Liquide, Inflammable |

2.1.3. Plausibilité d'exposition humaine

Tableau V : Plausibilité de l'exposition humaine

| | |
|-------------------------------------|--|
| Types d'utilisation | - utilisé dans l'essence en faible quantité (< 1 %) - utilisé isolément pour la fabrication du benzène, comme intermédiaire de synthèse, comme solvant dans les peintures, les adhésifs, les encres, les produits pharmaceutiques, et comme additif dans les produits cosmétiques (INERIS, 2005). |
| Restrictions d'usages | Aucune |
| HPV/ tonnages (Europe, France) | La consommation annuelle en Europe est de 2 750 KT (EU, 2003) |
| Médias de l'environnement concernés | Air (INERIS, 2005) |
| Types de populations concernées | Travailleurs (industries, ateliers), population générale (circulation automobile, émissions volcaniques) (INERIS, 2005) |

Le toluène suit un métabolisme comparable chez l'homme et l'animal

2.1.4. Toxicocinétique

Tableau VI : Données toxicocinétiques

| | Données chez l'homme | | | | Données chez l'animal |
|--|---|---|-----------------|---|------------------------------|
| Substance mère | Toluène | Oxydation par les cytochromes (réticulum endoplasmique) | P450 hépatiques | | Toluène |
| Voies de métabolisation possibles | | | | Oxydation par cytochromes P450 hépatiques | |
| Métabolites principaux | Acide benzoïque (99 %) puis en présence de glycine ou glucuronique : formation acide hippurique (majoritairement) ou benzoyleglucuronide (Woiwode et al., 1979 ; Woiwode et Drysch, 1981 dans EU, 2003) | | | Acide benzoïque (99 %) puis en présence de glycine : acide hippurique Autres métabolites en quantité mineure mais à action toxique : créosols, méthylhydroquinone et méthylbenzoquinone | |
| | Autres métabolites en quantité mineure (1 %) mais à action toxique : créosols, méthylhydroquinone et méthylbenzoquinone (Woiwode et al., 1979 ; Woiwode et Drysch, 1981 dans EU, 2003) | | | | |
| | - Inhalation (principale) : Taux d'absorption : 50 % (Löf et al., 1993 dans EU, 2003) | | | - Inhalation (voie principale) : Taux d'absorption : 90 % (dépend du niveau de ventilation) (Egle et Gochberg, 1976 dans EU, 2003) | |
| Absorption (%/voie) | - Orale (accidentelle ou volontaire) | | | - Orale : Taux d'absorption : 100 % (El Masry et al., 1956 ; Smith et al., 1954 dans EU, 2003) | |
| | - Cutanée : taux d'absorption : 1 % (Riihimäki et Präflti, 1978 dans EU, 2003). | | | | |
| Distribution | Sang, tissus adipeux | | | Sang, foie, rein, intestin, cœur | |
| Stockage, accumulation (% et cible) | Organe cible : tissus adipeux et richement vascularisés (cerveau) | | | Organe cible : tissus adipeux et richement vascularisés (cerveau) | |
| Transferts BHE | Non déterminé | | | Non déterminé | |
| Transferts placenta | Non déterminé | | | La concentration chez les foetus est 74 % de la concentration chez la mère dans les 2 h suivant une exposition par inhalation à 1 375 ou 2 700 mg/m ³ pendant 24 h chez le rat (Ungvary, 1984 dans OMS IPCS, 1985) | |
| Transferts lait maternel | La présence de toluène est rapportée dans le lait maternel | | | Les concentrations mesurées sont 5 fois plus élevées | |

| | Données chez l'homme | Données chez l'animal |
|---|--|--|
| maternel (Pellizzari et al., 1982 cité dans EU, 2003) | <p>maternal (Pellizzari et al., 1982 cité dans Jensen et Slorach, 1991, cité dans EU, 2003)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Elimination triphasique demi-vies calculées : $T_{1/2}$ (toluène) = 2 minutes, 30 minutes et 3,5 h (Sato et al., 1974 dans EU, 2003) • Elimination di-phasique $T_{1/2}$ (toluène) = 22 minutes, 175 minutes déterminée par Römmelt et al., 1982 (dans EU, 2003). <p>Lors d'exposition à des concentrations de toluène une quatrième phase a été décrite avec $T_{1/2}$ (toluène) = 20 h (pour des expositions à des concentrations élevées) et correspondrait à l'élimination à partir des tissus adipeux (Brugnone et al., 1983 dans EU, 2003).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Elimination en 4 phases avec $T_{1/2}$ (toluène) de 9 minutes, 2 h, 79 h, et 90 h (Nise et al., 1989 dans EU, 2003) | dans le lait que dans le sang maternel (Da Silva et al., 1991 dans EU, 2003) |

2.1.5. Toxicité générale

Toxicité aiguë

Chez l'homme, la toxicité aiguë du toluène est relativement faible (les effets induits sont peu important) quelle que soit la voie d'exposition.

Par inhalation, des expositions comprises entre 281 et 562 mg/m³ (73 et 147 ppm) induisent des maux de tête, des vertiges, des irritations des muqueuses et une somnolence (Echeverria *et al.*, 1989). Aux concentrations inférieures ou égales à 150 mg/m³ (39 ppm), la survenue de ces symptômes est moins fréquente (Andersen *et al.*, 1983).

Chez l'homme comme chez l'animal, les troubles sont généralement réversibles dans les quelques heures suivant l'arrêt de l'exposition.

Chez l'animal, par voie orale, les DL₅₀, chez le rat, varient de 5 500 à 7 500 mg/kg (Smyth *et al.*, 1969 ; Ungvary *et al.*, 1982 ; Kimura *et al.*, 1971 ; Withey et Hall, 1975 ; Wolf *et al.*, 1956) (tableau VII).

Par voie cutanée, la DL₅₀, chez le lapin, est de 12 400 mg/kg (Smyth *et al.*, 1969) (tableau VII).

Par voie intra-péritonéale, les DL₅₀ varient de 1 330 à 1 640 mg/kg chez le rat et elle est de 2 159 mg/kg chez la souris (Fodor, 1972 ; Ikeda et Ohsuji, 1971 ; Lundberg *et al.*, 1983 ; IUCLID, 1998 ; Koga et Ohmiya, 1978) (tableau VII).

Par inhalation, les CL₅₀ mesurées, chez le rat ou la souris, varient de 12,5 à 45,8 mg/L (3 262,5 à 11 954 ppm) pour des expositions comprises entre 4 et 7 heures (Bonnet *et al.*, 1982 ; Cameron *et al.*, 1938 ; BASF, 1980 ; Pozzani *et al.*, 1959 ; Carpenter *et al.*, 1976 ; Svirbely *et al.*, 1943). Une seule valeur de CL₅₀ est supérieure à 100 mg/L (26 100 ppm) pour une exposition courte de 1 heure chez le rat (Benignus, 1981) (tableau VII).

Lors d'exposition par inhalation, les effets observés sont larmoiement, rhinorhée, polypnée, ataxie, agitation, perturbations de l'équilibre, incoordination motrice, narcose, congestion des oreilles et des extrémités, salivation (pour les concentrations les plus élevées), modifications neurochimiques.

Enfin, une exposition unique par gavage chez le rat, à la dose de 250 à 1 000 mg/kg, induit des altérations de la vision. De cette étude, un LOAEL de 250 mg/kg/j a été établi (Dyer *et al.*, 1988).

Le toluène est un irritant cutané et respiratoire chez l'animal pour des concentrations élevées.

Le toluène n'est pas classé corrosif ni sensibilisant par l'Union Européenne (EU, 2003).

Tableau VII : CL₅₀ et DL₅₀

| Spèces | Voie d'exposition - durée (h) | CL ₅₀ (inhalation) DL ₅₀ (voie orale, cutanée et intrapéritonéale) | Auteurs |
|--------|-------------------------------|--|---|
| Rat | Inhalation - 1 | > 100 mg/L | Benignus (1981) |
| Rat | Inhalation - 6 | 22,0 – 23,5 mg/L | Bonnet <i>et al.</i> (1982) |
| Rat | Inhalation - 6,5 | 45,8 mg/L | Cameron <i>et al.</i> (1938) |
| Rat | Inhalation - 4 | 28,1 mg/L | BASF (1980) |
| Rat | Inhalation - 4 | 12,5 – 28,8 mg/L | Pozzani <i>et al.</i> (1959) |
| Rat | Inhalation - 4 | 33 mg/L | Carpenter <i>et al.</i> (1976) |
| Souris | Inhalation - 6 | 24,0 – 27,9 mg/L | Bonnet <i>et al.</i> (1982) |
| Souris | Inhalation - 6 | 26,0 mg/L | Bonnet <i>et al.</i> (1979) |
| Souris | Inhalation - 7 | 19,9 mg/L | Svirbely <i>et al.</i> (1943) |
| Rat | Orale | 7 500 mg/kg | Smyth <i>et al.</i> (1969) |
| Rat | Orale | 5 900 mg/kg | Ungvary <i>et al.</i> (1982) |
| Rat | Orale | 5 500 mg/kg | Kimura <i>et al.</i> (1971) |
| Rat | Orale | 5 580 mg/kg | Withey et Hall (1975) |
| Rat | Orale | 7 000 mg/kg | Wolf <i>et al.</i> (1956) |
| Lapin | Cutanée | 12 400 mg/kg | Smyth <i>et al.</i> (1969) |
| Rat | Intrapéritonéale | 1 600 mg/kg | Fodor (1972) ; Ikeda et Ohsuji (1971) ; Lundberg <i>et al.</i> (1983) |
| Rat | Intrapéritonéale | 1 330 – 1 640 mg/kg | IUCLID (1994) |
| Souris | Intrapéritonéale | 2 159 mg/kg | Koga et Ohmiya (1978) |

Toxicité chronique

Chez l'homme, pour des concentrations élevées, des effets neurologiques sévères comportant des dysfonctionnements cérébraux, pyramidaux et cognitifs tels que tremblements, ataxie, troubles de la mémoire ainsi qu'une atrophie du cervelet sont décrits.

L'exposition professionnelle de type chronique aux solvants induit un syndrome psycho-organique (Arlien-Soborg, 1992). Deux études ont permis d'identifier pour le toluène la survenue de ce syndrome, d'une part pour des expositions de 12 ans à des concentrations de 190 à 304 mg/m³ (50 à 79 ppm) associées à des expositions antérieures pouvant atteindre 3 800 mg/m³ (992 ppm)(Larsen et Leira, 1988), d'autre part pour des expositions moyennes de 43 et 157 mg/m³ (11 et 41 ppm) pendant environ 29 ans (Orbaek et Nise, 1989). Les principaux symptômes associés sont une neurasthénie et une diminution de la réponse aux tests psycho-moteurs.

Les études visant à identifier des diminutions des performances par des tests neuro-psychologiques n'ont pas montré de résultats différents de ceux obtenus dans le cas d'études de toxicité aiguë.

Les études réalisées en milieu professionnel montrent qu'une exposition chronique à des concentrations comprises entre 30 et 130 ppm (115 et 500 mg/m³) induisent entre autres des atteintes neurologiques (Abbate *et al.*, 1993 ; Boey *et al.*, 1997 ; Cavalleri *et al.*, 2000 ; Eller *et al.*, 1999 ; Foo *et al.*, 1990 ; Murata *et al.*, 1993 ; Nakatsuka *et al.*, 1992 ; Neubert *et al.*, 2001 ; Vrca *et al.*, 1995 ; Zavalic *et al.*, 1998a,b,c). Pour ces études, différents tests ont été

utilisés : tests neurocomportementaux, auditifs, visuels,... Les principales altérations rapportées sont celle du comportement, des potentiels évoqués auditifs et visuels, des paramètres électrophysiologiques, de la vision des couleurs ou de la vitesse critique de fusion ((qui est un indicateur de la capacité de fonctionnement du système nerveux central). Ainsi, dans l'étude de Zavalic *et al.* (1998a), il apparaît qu'une augmentation, non statistiquement significative, de l'index de confusion des couleurs est rapportée chez les salariés de la chaussure pour des expositions chroniques au toluène de 35 ppm (134 mg/m³). Une perte d'audition dans les hautes fréquences est notée après des expositions au toluène. Une LOAEL de 563 mg/m³ (147 ppm) a été définie (Morata *et al.*, 1993).

L'atteinte hépatique n'est pas clairement établie : deux études réalisées chez des salariés donnent des résultats contradictoires. La première, réalisée par Waldron *et al.* (1982), ne retrouve pas de modification des niveaux d'aspartate aminotransférase et d'alanine aminotransférase chez des hommes exposés professionnellement à 375 mg/m³ (98 ppm). En revanche, dans un contexte d'exposition professionnelle à un niveau de 300 mg/m³ (78,3 ppm), une augmentation des phosphatases alcalines sériques est observée (Svensson *et al.*, 1992b).

Aucune altération rénale n'est détectée pour une exposition professionnelle à 382 mg/m³ (100 ppm) pendant 6,5 heures (Nielsen *et al.*, 1985) alors que dans certains cas d'expositions accidentelles ou chez les toxicomanes à des concentrations plus élevées surviennent des dommages rénaux (oligurie), des dysfonctionnements urinaires (myoglobinurie) (Reisin *et al.*, 1975) et des acidoses (Gerkin et LoVecchio, 1998 ; Goodwin, 1988 ; Jone et Wu, 1988 ; Meulenbelt *et al.*, 1990 ; Patel et Benjamin, 1986). Pour des expositions comprises entre 97 et 232 mg/m³ (26-62 ppm) il n'y a pas d'élévation des marqueurs urinaires précoces des atteintes rénales (micro-albumine, N-acéthyl-b,D-glucosaminidase et alanine-aminopeptidase) mais une élévation de la clairance de la créatinine (Stengel *et al.*, 1998).

Il n'existe pas de données mentionnant des altérations des paramètres sanguins chez l'homme. Une légère augmentation de la pression systolique est observée pour des expositions professionnelles de 375 mg/m³ (98 ppm) pendant 20 ans, alors que la pression diastolique demeure inchangée (Morck *et al.*, 1985).

Chez l'animal, les nombreuses études pratiquées permettent de confirmer les effets observés chez l'homme. Ces effets correspondent à des effets neurotoxiques : une atteinte de l'hippocampe, une modification des neurotransmetteurs et une ototoxicité. Cette dernière est rapportée pour des expositions aux concentrations comprises entre 700 et 1 500 ppm (2 681 et 5 745 mg/m³) (Lataye *et al.*, 1999 ; Loquet *et al.*, 1999 ; Campo *et al.*, 1997 ;

Johnson et Canlon, 1994 ; Lataye et Campo, 1997 ; Pryor *et al.*, 1984). Chez des souris, exposées par voie orale au toluène à des doses de 5 à 105 mg/kg/j dans l'eau de boisson pendant 28 jours, une augmentation significative des monoamines neurotransmetteurs (norépinéphrine, dopamine et sérotonine) est mesurée pour toutes les doses. De cette étude, un LOAEL de 5 mg/kg/j est défini (Hsieh *et al.*, 1990).

Une étude de toxicité subchronique a été menée par gavage chez le rat F-344 (NTP, 1990). Des groupes de 10 rats par sexe et par groupe ont reçu du toluène dans de l'huile de maïs aux doses de 0, 312, 625, 1 250, 2 500 ou 5 000 mg/kg, 5 j/semaine pendant 13 semaines. Les doses de toluène ajustées à 7 j/semaine sont de 0, 223, 446, 893, 1 786 ou 3 571 mg/kg/j. Tous les animaux exposés à la dose de 3 571 mg/kg/j sont morts au cours de la première semaine et ont été éliminés de la suite de l'étude. Une mortalité importante est également observée chez les animaux exposés à la dose de 2 500 mg/kg/j. De nombreux effets toxiques sont rapportés à la dose de 1 786 mg/kg/j correspondant à des états de prostration, d'hypoactivité, d'ataxie, de piloérection, de larmoiement, d'hypersalivation et de tremblements corporels. Une diminution significative ($p<0,05$) du poids corporel des mâles est la seule altération significative rapportée à cette dose. Il n'y a pas d'altération des paramètres hématologique et urinaire. Certaines modifications des paramètres biochimiques sont malgré tout rapportées : augmentation significative ($p<0,05$) de la glutamoxaloacétique transaminase sérique (SGOT) chez les mâles exposés à la dose de 1 786 mg/kg/j et une augmentation de l'activité cholinestérase chez les femelles exposées à la même dose.

Différentes altérations pathologiques et des modifications du poids du foie, des reins, du cerveau et de la vessie sont observées. Chez les mâles, les poids relatifs et absolu du foie et des reins sont augmentés significativement ($p<0,05$) dès la dose de 446 mg/kg/j. Des lésions histopathologiques hépatique (hypertrophie hépatocellulaire à la dose de 1 786 mg/kg/j), rénale (néphrose et altérations de l'épithélium tubulaire), cérébrale (minéralisation focalisée et nécroses neuronales) et de la vessie (hémorragies musculaires) sont rapportées. On note l'absence d'inclusion hyaline au niveau tubulaire proximal. De cette étude, un NOAEL de 223 mg/kg/j est déterminé ainsi qu'un LOAEL de 446 mg/kg/j basé sur les modifications pondérales hépatiques et rénales chez le rat mâle.

Des altérations rénales sont également rapportées, chez le rat, mais uniquement pour des expositions chroniques par inhalation (6 heures/jour) à la concentration de 600 ppm (298 mg/m³) (Bruckner et Peterson, 1981 ; CIIT, 1980 ; NTP, 1990 ; Ono *et al.*, 1996 ; Poon *et al.*, 1994).

Le toluène a été étudié par les différents organismes : la Commission Européenne, l'IARC et l'US EPA (JOCE, 2004 ; IARC, 1999 ; US EPA, 2005). Il n'a pas été classé cancérogène par l'Union Européenne et l'US EPA considère que les données ne sont pas suffisantes pour

envisager une classification. Le toluène est classé en groupe 3 par l'IARC (l'agent ne peut être classé pour sa cancérogénicité pour l'homme). Enfin, à l'aide de nombreux tests les effets mutagène et clastogènes ont été testés lors d'expériences *in vivo* et *in vitro*. L'ensemble des données n'a pas permis de classer le toluène pour son potentiel génotoxique par l'Union Européenne (JOCE, 2004).

2.2. Toxicité sur la reproduction et le développement

Il existe très peu d'études réalisées chez l'homme. La majorité des données disponibles dans la littérature sont issues d'études expérimentales pratiquées chez l'animal. La qualité de ces études est variable ; certaines d'entre elles n'ont pas été retenues dans l'élaboration de ce document du fait de la qualité incertaine de leur réalisation ou de l'absence de résultats pertinents pour l'élaboration d'une VTR. Cependant par soucis de transparence nous justifierons ce choix au cas par cas.

2.2.1. Données humaines

Les rares données disponibles chez l'homme sont issues d'exposition par inhalation.

2.2.1.1. Effets sur le développement

Une revue récente de la littérature (Bukowski, 2001) montre qu'il existe très peu d'études relatives aux effets du toluène sur le développement en milieu professionnel. Les principaux effets rapportés sont une augmentation des avortements spontanés pour des niveaux d'exposition de l'ordre de 50 à 150 ppm (191,5 à 574,5 mg/m³) (Axelsson et Rylander, 1984, Taskinen *et al.*, 1994, Ng *et al.*, 1992b) et des malformations congénitales (Mc Donald *et al.*, 1987, Taskinen *et al.*, 1989). Ces études sont difficilement exploitables compte tenu de l'exposition à d'autres polluants, du nombre restreint d'individus impliqués dans l'étude et des faibles niveaux d'exposition. La seule étude qui sera malgré tout détaillée est celle de Ng *et al.*, (1992b) car c'est la plus complète. Cependant sa qualité scientifique reste discutable. Une pratique d'inhalation abusive du toluène (toxicomanie) s'est développée depuis quelques années notamment chez les femmes enceintes (Costa *et al.*, 2002). Les niveaux d'exposition sont élevés (500 à 5 000 ppm soit 1 875 à 18 750 mg/m³) et les principaux effets rapportés sont des effets tératogènes essentiellement au niveau du système nerveux central (Arnold *et al.*, 1994, Pearson *et al.*, 1994). Compte tenu des niveaux d'exposition, ces études ne peuvent être retenues pour l'élaboration d'une VTR pour les effets reprotoxiques et ne seront pas détaillées ci-dessous.

Ng *et al.*, 1992b :

- Type d'étude : étude transversale.
- Lieu : manufacture de matériel radiophonique à Singapour.
- Nombre de personnes exposées : 86 employées dont 55 femmes fortement exposées (105 grossesses) et 31 femmes faiblement exposées (68 grossesses).

- **Voies d'exposition** : inhalation et cutanée.
- **Durée d'exposition** : moyenne 25 ans (0,5 à 37 ans).
- **Niveaux d'exposition** : niveau élevé (moyenne 88 ppm entre 50-150 ppm) et niveau faible (entre 0-25 ppm).
- **Groupe témoin** : 190 employées non-exposées au toluène.
- **Résultat de l'étude** : Une augmentation significative des taux d'avortements spontanés entre les semaines 12 et 28 de la gestation est rapportée chez les femmes fortement exposées au toluène (88 ppm soit 337 mg/m³).

2.2.1.2. Effets sur la fertilité

L'impact du toluène sur les concentrations plasmatiques de FSH (hormone folliculo-stimulante), LH (hormone lutéotrope) et testostérone a été évaluée chez 262 hommes employés dans deux usines de l'industrie de la photographie au Danemark (Morck *et al.*, 1988). Les résultats de cette étude sont difficilement exploitables en raison de l'absence de groupe témoin.

Deux études montrent l'influence du toluène sur les niveaux des hormones de LH, FSH et de testostérone lors d'expositions professionnelles à des concentrations de 36 ppm (138 mg/m³) (valeur moyenne) ou comprises entre 5 et 45 ppm (19 et 172 mg/m³) (Svensson *et al.*, 1992a ; Svensson *et al.*, 1992b). Ces résultats montrent qu'une action du toluène sur les mécanismes de la régulation endocrine est possible.

Chez l'homme, aucune étude relative à la qualité du sperme n'est disponible. Dans les études de fertilité, il n'y a pas d'effet observé pour des expositions comprises entre 10 et 200 ppm (38,3 et 766 mg/m³) (Plenge-Bönig et Karmaus, 1999).

Chez la femme, le toluène n'induit pas de troubles menstruels (Ng *et al.*, 1992a) pour des expositions comprises entre 50 et 150 ppm (191,5 et 574,5 mg/m³). Il semblerait, cependant, que des expositions quotidiennes à de faibles niveaux de toluène puissent induire une diminution de la fertilité chez la femme (Plenge-Bönig et Karmaus, 1999). Toutefois, il n'est pas exclu que d'autres facteurs d'exposition tels que le bruit ou le stress puissent également être impliqués dans les phénomènes observés.

Ng *et al.*, 1992b :

- **Type d'étude** : cas témoin.
- **Lieu** : manufacture de matériel radiophonique à Singapour.
- **Nombre de personnes exposées** : 231 femmes fortement exposées et 58 femmes faiblement exposées.
- **Voies d'exposition** : inhalation et cutanée.
- **Durée d'exposition** : moyenne 25 ans (0,5 à 37 ans).
- **Niveaux d'exposition** : niveau élevé (moyenne 88 ppm entre 50-150 ppm) et niveau faible (entre 0-25 ppm).
- **Groupe témoin** : 187 employés (sexe féminin) non-exposées au toluène.

- **Symptômes observés** : Les niveaux de dysfonctionnement utérins (cycles irréguliers et saignement menstruels prolongés ou abondants) sont similaires dans les différents groupes. Des dysménorrhées semblent plus fréquentes chez les femmes exposées au plus fort concentrations de toluène par rapport au groupe témoin. Cependant cette différence n'est pas retrouvée chez les femmes exposées à des concentrations faibles (0-25 ppm).
- **Résultat de l'étude** : Le toluène n'induit pas de troubles menstruels pour des expositions moyennes de 88 ppm (50-150 ppm) soit 337 mg/m³.

Svensson et al., 1992a :

- **Type d'étude** : cas témoin.
- **Lieu** : industrie de l'impression en héliogravure en Suède.
- **Nombre de personnes exposées** : 20 employés (sexe masculin) (âge moyen : 48,2 ans (30-63 ans)).
- **Voies d'exposition** : inhalation et cutanée.
- **Durée d'exposition** : moyenne 25 ans (0,5 à 37 ans).
- **Niveaux d'exposition** : 36 ppm (8-111 ppm), niveaux sanguins de toluène moyen : 1,7 µmol/L (1,0 – 6,6) et dans les tissus adipeux : 5,7 mg/kg (2,5 – 21).
- **Groupe témoin** : 44 employés (sexe masculin) de l'industrie non-exposés à des solvants organiques (âge moyen 39,0 ans (23-63 ans)).
- **Symptômes observés** : Il y a une association négative entre la concentration sanguine de toluène et le niveau plasmatique de prolactine. Les sujets exposés présentent une diminution statistiquement significative des concentrations de FSH, de LH et de testostérone libre ainsi qu'une augmentation de la concentration en triiodothyronine (T_3) par rapport au groupe témoin. Chez 8 sujets exposés les concentrations en FSH et LH augmentent pendant la période d'arrêt de l'exposition correspondant à leur période de vacances, ce qui reflète la réversibilité du phénomène. Alors que dans le même temps les niveaux de thyroéostimuline (TSH), de T_3 libre et de thyroxine (T_4) libre diminuent.
- **Résultat de l'étude** : les résultats ne permettent pas conclure à une corrélation entre l'exposition cumulée et la concentration plasmatique en hormones.

Svensson et al., 1992b :

- **Type d'étude** : cas témoin.
- **Lieu** : 2 industries suédoises (impression en héliogravure).
- **Nombre de personnes exposées** : 47 employés (sexe masculin) dont 28 à un faible niveau d'exposition et 19 à un fort niveau d'exposition (âge moyen : 44,4 ans (23-62 ans)).
- **Voies d'exposition** : inhalation et cutanée.
- **Durée d'exposition** : - faible niveau d'exposition : 18,4 (4-33 ans)
- fort niveau d'exposition : 14,5 (3-39 ans)
- **Niveaux d'exposition** : - faible niveau d'exposition : <5 ppm, 5-10 ppm, 10-15 ppm.
 - fort niveau d'exposition : 20-25 ppm, 25-45 ppm,,
 > 45 ppm.

- **Groupe témoin** : 23 employés (sexe masculin) de l'industrie du métal et 23 artisans. Aucun d'entre eux n'est exposé à des solvants organiques, âge moyen : 43,5 ans (20-61 ans).
- **Symptômes (ou paramètres) observés** : Il n'existe pas de différence de la concentration plasmatique en hormones entre les sujets exposés et témoins. Cependant, chez les jeunes sujets exposés une diminution significative des niveaux de LH, FSH et testostérone a été observée. Cette évolution est inversement proportionnelle à l'augmentation de l'exposition.
- **Résultat de l'étude** : Il n'y a pas de corrélation entre exposition cumulée et concentration plasmatique en hormones.

Plenge-Bönig et Karmaus, 1999 :

- **Type d'étude** : étude transversale.
- **Lieu** : industrie de l'imprimerie en Allemagne.
- **Nombre de personnes exposées** : 150 employés (sexe masculin) et 90 employées (sexe féminin).
- **Voies d'exposition** : inhalation et cutanée.
- **Durée d'exposition** : non précisé
- **Niveaux d'exposition** : Chez les hommes : faible (< 10 ppm (383 mg/m³)), moyen (10-30 ppm (383-115 mg/m³)), et élevé (< 200 ppm (766 mg/m³) avant 1984, <100 ppm (383 mg/m³) 1984 à 1994, < 50 ppm (191,5 mg/m³) après 1994) et chez les femmes faible (< 10 ppm (38,3 mg/m³)).
- **Groupe témoin** : il n'y a pas de groupe témoin
- **Symptômes (ou paramètres) observés** : Chez les femmes exposées professionnellement au toluène, une diminution significative de la fécondité d'environ 50 % est rapportée.
Aucun effet du toluène sur la fécondité masculine n'a été mis en évidence mais il ne peut pas être complètement exclu. Chez les femmes, après prise en compte des différents biais (habitude tabagique et âge) de faible niveau d'exposition semblent induire une diminution de la fécondité. Cependant, cette étude ne tient pas compte des autres sources d'exposition notamment le bruit et le stress qui pourraient être à l'origine d'au moins une partie des effets rapportés. Dans ces conditions, cette étude est difficilement exploitable.
- **Résultat de l'étude** : Il n'y a pas d'association entre exposition professionnelle au toluène et fécondité chez les hommes et leurs partenaires du fait des biais de l'étude.

2.2.2. Données animales

2.2.2.1. Effets sur le développement

Nous disposons de nombreuses études concernant les effets du toluène sur le développement.

Exposition par inhalation

La majorité de ces études correspond à des expositions pratiquées par inhalation chez le rat. Cependant, s'il existe de nombreuses études bon nombre d'entre elles présentent des biais ou des limites et ne peuvent pas être exploitées dans ce travail.

Chez le rat, l'exposition au toluène ne semble pas induire de malformations chez les fœtus mais serait à l'origine de diminution du poids à la naissance, de retard de développement post-natal et d'altération du comportement (UE, 2003).

Une diminution du poids des fœtus, du poids de naissance et un retard du développement post-natal est rapporté par plusieurs études (Huntingdon Research Center, 1992 ; Ono *et al.*, 1995 ; Thiel et Chahoud, 1997 ; Haas *et al.*, 1999 ; Hougaard *et al.*, 1999). Les LOAEL proposés sont de l'ordre de 1 000 à 2 000 ppm (3 750 à 7 500 mg/m³) et les NOAEL sont compris entre 400 et 750 ppm (1 500 et 2 872 mg/m³).

Des altérations du comportement ont été rapportées chez des rats exposés au toluène pendant la période de développement du cerveau (Hougaard *et al.*, 1999 et Hass *et al.*, 1999) ainsi qu'un phénomène d'apoptose neuro-dégénérative du cervelet (Dalggaard *et al.*, 2001).

Il existe très peu d'études chez la souris. Courtney *et al.* (1986) rapportent des signes de fœtotoxicité (altération du nombre de côtes) chez la souris CD-1 exposée à 400 ppm (1 500 mg/m³) 7j/7 du 7^{ème} au 16^{ème} jour de la gestation. Ces effets ne sont pas retrouvés à 200 ppm (750 mg/m³). Jones et Balster (1997) montrent une diminution du poids de naissance, une diminution de la croissance pondérale postnatale ainsi qu'un retard d'acquisition des réflexes en l'absence de toxicité maternelle pour des expositions à 2 000 ppm (7 500 mg/m³) de toluène pendant 60 minutes pratiquées 3 fois par jour du 12^{ème} au 17^{ème} jour de la gestation. Aucun effet n'est observé pour une exposition à 400 ppm (1 520 mg/m³).

Les seules études disponibles chez le lapin (Chbb HM) (Klimisch *et al.*, 1992, BASF, 1989) sont difficilement exploitables en l'absence de toxicité maternelle à la plus forte dose retenue. Klimisch *et al.* (1992) ont montré un retard de développement du squelette dès les doses de 100 ou 300 ppm (383 ou 1 150 mg/m³) pour des expositions au toluène 6 h/j du 6^{ème} au 18^{ème} jour après l'insémination. Par contre, l'étude réalisée par BASF (1989) montre une altération des carotides aux concentrations de 100 et 500 ppm (375 et 1 875 mg/m³) 6 h/j du 6^{ème} au 18^{ème} jour après l'insémination. Aucune anomalie du squelette n'a pu être décelée dans cette étude.

Roberts, 2003

- **Type d'étude :** étude expérimentale.
- **Espèce étudiée :** rat (Sprague Dawley) mâles et femelles.
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :**
 - * génération F0 :
 - Mâles : 100 ppm (10 rats), 500 ppm (10 rats), 2 000 ppm (20 rats)
 - Femelles : 100 ppm (20 rats), 500 ppm (20 rats) et 2 000 ppm (40 rats)
 - * génération F1 :
 - Mâles : 100 ppm (10 rats), 500 ppm (10 rats), 2 000 ppm (10 rats)
 - Femelles : 100 ppm (20 rats), 500 ppm (19 rats) et 2 000 ppm (19 rats)
- **Voie d'exposition :** inhalation (exposition corps entier).
- **Temps d'exposition :** 6 h/jour.

- **Fréquence du traitement :** 7j/7. Les adultes des deux générations (F0 et F1) sont exposés pendant 80 jours avant la période de l'accouplement et pendant les 15 jours de la période de l'accouplement. Les mâles des générations F0 et F1 ne sont pas exposés au-delà. En revanche, les femelles gestantes des deux générations (F0 et F1) sont exposées du 1^{er} au 20^{ème} jour de la gestation et du 5^{ème} au 21^{ème} jour de la lactation.
Les jeunes de la génération F1 sélectionnés pour produire la génération F2 sont exposés pendant au moins 80 jours après le sevrage puis accouplés.
- **Doses ou concentrations d'exposition :** 100, 500 et 2 000 ppm (375, 1 875 et 7 500 mg/m³) toluène à 99,9 % de pureté
- **Groupe témoin :**
 - * Génération F0 : Mâles : (30 rats) et Femelles : (60 rats)
 - * Génération F1 : Mâles : (19 rats) et Femelles : (40 rats)
- **Résultats :** Les expositions au toluène n'induisent pas d'effet sur la fertilité, la fonction de reproduction, le comportement des mères et des jeunes au cours de la période de lactation chez les femelles et les mâles de la première génération mais inhibe la croissance des jeunes des générations F1 et F2 exposés à 2 000 ppm (7 500 mg/m³).
- **Le(s) effet(s) critique(s) :** Le poids des jeunes des générations F1 et F2 est diminué de manière statistiquement significative lors de l'exposition via le lait maternel.
- **NOAEL reprotox :** 500 ppm (1 875 mg/m³).
- **LOAEL reprotox :** 2 000 ppm (7 500 mg/m³).
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch) :** 1a.

Thiel et Chambon, 1997

- **Type d'étude :** étude expérimentale.
- **Espèce étudiée :** rat (Wistar) (femelles gestantes).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 300 ppm (23 animaux), 600 ppm (23 animaux), 1 000 ppm (29 animaux) et 1 200 ppm (24 animaux).
- **Voie d'exposition :** inhalation (exposition corps entier).
- **Temps d'exposition :** 6 h/jour.
- **Fréquence du traitement :** 7j/7 du 9^{ème} jour au 21^{ème} j de la gestation.
- **Concentrations d'exposition :** 300, 600, 1000 et 1 200 ppm (1 131, 2 262, 3 830 et 4 524 mg/m³) toluène à 99 % de pureté.
- **Groupe témoin :** 38 animaux.
- **Résultats :** Les jeunes de la génération F1 sont examinés pour le développement et comportement post-natal. Les adultes de la génération F1 sont accouplés et la fertilité est évaluée. Aucune donnée concernant la génération F2 n'est rapportée.

Une diminution non statistiquement significative de la croissance pondérale maternelle est rapportée pour les expositions à 1 000 et 1 200 ppm (3 830 et 4 600 mg/m³) pour les animaux de la génération P. Une diminution non statistiquement significative de la taille des portées est mentionnée chez les rats exposés à 1 200 ppm (4 600 mg/m³) ainsi qu'une augmentation de la mortalité chez les jeunes non sevrés. Les poids des jeunes de la génération F1 sont plus faibles chez les rats exposés à 1 000 et 1 200 ppm (3 830 et 4 600 mg/m³) que ceux des rats des lots témoins. Le développement physique au cours de la période de lactation (déploiement du pavillon auriculaire, poussée dentaire et ouverture des yeux) et le réflexe d'ontogenèse est

similaire dans les différents groupes excepté pour le groupe exposé à 1 200 ppm (4 600 mg/m³) où la poussée dentaire est légèrement retardée. Un retard de l'ouverture vaginal d'au moins 5 jours est rapporté chez les deux groupes exposés à 1 000 et 1 200 ppm (3 830 et 4 600 mg/m³), il n'y pas d'altération significative de l'activité spontanée à 24 heures ni de retard d'apprentissage.

- **Le(s) effet(s) critique(s)** : diminution du poids des jeunes.
- **NOAEL reprotox** : 600 ppm (2 300 mg/m³).
- **LOAEL reprotox** : 1 000 ppm (3 830 mg/m³).
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 1d.

Hougaard et al., 1999

- **Type d'étude** : étude expérimentale.
- **Espèce étudiée** : rat (Wistar).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 16 femelles gestantes.
- **Voie d'exposition** : inhalation (exposition corps entier).
- **Temps d'exposition** : 6 h/jour.
- **Fréquence du traitement** : jour 7 à 20 de la gestation.
- **Concentrations d'exposition** : 1 800 ppm (6 840 mg/m³).
- **Groupe témoin** : 16 femelles gestantes.
- **Résultats** : Une diminution (non statistiquement significative) des poids des nouveau-nés est rapportée au cours des 10 premiers jours suivant la naissance. L'évaluation neuro-comportementale des jeunes ne révèle pas d'atteinte de la fonction motrice, du niveau d'activité, du réflexe de tressaillement et « prepulse inhibition ». Les mesures de la fonction auditive montrent une diminution statistiquement significative chez le jeune mâle. Une diminution statistiquement significative de la fonction cognitive a été mesurée au moyen du test « Morris water maze » chez les rats des deux sexes mais les effets mesurés sont plus marqués chez les femelles.
- **Le(s) effet(s) critique(s)** : diminution de la fonction auditive et cognitive.
- **NOAEL reprotox** : non déterminé
- **LOAEL reprotox** : 1 800 ppm (6 900 mg/m³)
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 2e

Hass et al., 1999

- **Type d'étude** : étude expérimentale.
- **Espèce étudiée** : rat (Wistar).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 18 femelles gestantes.
- **Voie d'exposition** : inhalation (exposition corps entier).
- **Temps d'exposition** : 6 h/jour.
- Fréquence du traitement** : du 7^{ème} jour de la gestation au 18^{ème} jour après la naissance.
- **Concentrations d'exposition** : 1 200 ppm (4 600 mg/m³).
- **Groupe témoin** : 14 femelles gestantes.
- **Résultats** : Il n'y a pas de toxicité maternelle observée ni d'altération de la viabilité des jeunes. Une diminution statistiquement significative des poids des jeunes au cours des 10 premiers jours de la vie est rapportée, elle n'est pas observée au-delà. Une altération de la fonction cognitive évaluée au moyen du test « Morris water maze » est

rapportée chez les jeunes femelles âgées de 3,5 mois. Aucune autre altération neuro-comportementale n'est rapportée.

- **Le(s) effet(s) critique(s)** : effets neurologiques.
- **NOAEL reprotox** : non déterminé.
- **LOAEL reprotox** : 1 200 ppm (4 600 mg/m³).
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 2e.

Dalgaard et al., 2001

- **Type d'étude** : étude expérimentale.
- **Espèce étudiée** : rat (Mol :WIST).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : femelles gestantes.
- **Voie d'exposition** : inhalation (exposition corps entier).
- **Temps d'exposition** : 6 h/jour.
Fréquence du traitement : du 7^{ème} jour de la gestation au 18^{ème} jour après la naissance.
- **Concentrations d'exposition** : 1 200 ppm (4 600 mg/m³) et 1 800 ppm (6 900 mg/m³).
- **Groupe témoin** : exposé à de l'air.
- **Résultats** : Cette étude comporte deux séries d'expériences indépendantes.
 1. La qualité du sperme de 10 jeunes rats mâles, exposés à 1 200 ppm (4 600 mg/m³) au cours de la gestation et pendant la période de lactation, a été examinée 110 jours après la naissance. Aucun effet n'est observé.
 2. Chez les jeunes mâles, dont les mères ont été exposées à 1 800 ppm (6 900 mg/m³) puis qui ont eux-mêmes été exposés via le lait maternel, une diminution du poids relatif et absolu des testicules de manière non statistiquement significative est rapportée à 11, 21 et 90 jours après la naissance. Une diminution statistiquement significative du poids corporel est observée au 11^{ème} jour après la naissance et n'est pas retrouvée ensuite. Cette diminution du poids des testicules n'est pas accompagnée d'anomalie histologique ni d'apoptose neurodégénérative de l'hippocampe. En revanche, le toluène induit de manière statistiquement significative une apoptose de la couche des grains du cervelet (parie du cortex cérébelleux) au 21^{ème} jour après la naissance. Ce phénomène n'est pas retrouvé aux autres temps d'investigation (11 et 90^{ème} jour après la naissance).
- **Le(s) effet(s) critique(s)** : effets reprotoxiques.
- **NOAEL reprotox** : 1 800 ppm (6 900 mg/m³).
- **LOAEL reprotox** :
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 2e.

Exposition par Voie Orale

Les rares études disponibles pour des expositions par voie orale, sont des études incomplètes car réalisées sur une seule dose, avec un nombre d'animaux insuffisant ou les résultats sont difficilement exploitables. Elles sont malgré tout détaillées ci-dessous car ce sont les seules études disponibles par cette voie d'exposition.

Gospe et al., 1994

- **Type d'étude :** étude expérimentale.
- **Espèce étudiée :** rat (Sprague Dawley).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 11 femelles gestantes.
- **Voie d'exposition :** orale (gavage).
- **Temps d'exposition :** dose quotidienne unique.
- **Fréquence du traitement :** 7j/7 du 6^{ème} jour au 19^{ème} jour de la gestation.
- **Dose d'exposition :** 520 mg/kg en solution dans de l'huile de maïs.
- **Groupe témoin :** 11 femelles gestantes.
- **Résultats :** Ces doses n'entraînent pas de mortalité maternelle mais une diminution de la croissance pondérale (diminution de 24 %) et de la consommation de nourriture (diminution de 12 %); ces diminutions ne sont cependant pas statistiquement significatives. Il n'y a pas de différence du nombre d'implantation ou de résorption entre les lots exposés et témoins. Une diminution statistiquement significative du poids des fœtus et des organes (foie et reins) et du poids du placenta est rapportée chez les animaux exposés. Il n'y a pas de malformation des fœtus ni d'altération histologique du cerveau.
- **Le(s) effet(s) critique(s) :** diminution des poids corporel, hépatique, rénal et placentaire.
- **NOAEL reprotox :** non déterminé
- **LOAEL reprotox :** 520 mg/kg
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch) :** 2e

Gospe et al., 1996

- **Type d'étude :** étude expérimentale.
- **Espèce étudiée :** rat (Sprague Dawley).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 8 femelles gestantes.
- **Voie d'exposition :** orale (gavage).
- **Temps d'exposition :** dose quotidienne unique.
- **Fréquence du traitement :** 7 j/7 du 6^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation.
- **Dose d'exposition :** 650 mg/kg en solution dans de l'huile de maïs.
- **Groupe témoin :** 8 femelles gestantes.
- **Résultats :** Une diminution statistiquement significative du poids des fœtus et des organes (cerveau, cœur, foie et reins) ainsi qu'un retard d'ossification du squelette sont rapportés chez les animaux exposés.
- **Le(s) effet(s) critique(s) :** diminution du poids corporel et des organes (cerveau, cœur, foie et reins) et retard d'ossification du squelette.
- **NOAEL reprotox :** non déterminé
- **LOAEL reprotox :** 650 mg/kg.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch) :** 2e.

Gospe et Zhou, 1998

- **Type d'étude :** étude expérimentale.
- **Espèce étudiée :** rat (Sprague Dawley)
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 28 femelles gestantes.
- **Voie d'exposition :** orale (gavage)

- **Temps d'exposition** : dose quotidienne unique
- **Fréquence du traitement** : 7 j/7 du 6^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation.
- **Dose d'exposition** : 650 mg/kg en solution dans de l'huile de maïs.
- **Groupe témoin** : 28 femelles gestantes.
- **Résultats** : Les jeunes sont examinés au 19^{ème} jour de gestation ou au 10^{ème} ou 21^{ème} jour après la naissance. Les expositions au toluène n'induisent pas de la taille de la portée, de mortalité maternelle ou d'altération du poids du foie. Au 19^{ème} jour de la gestation le poids corporel des fœtus ainsi que le poids des organes (cerveau, cœur, foie et reins) sont diminués de manière statistiquement significative chez les animaux exposés. Au 10^{ème} jour après la naissance, seuls les poids corporel, cardiaque et rénal restent statistiquement diminués par rapport au témoin. Au 19^{ème} jour après la naissance, il n'existe plus de différence entre petits exposés et témoins.
- **Le(s) effet(s) critique(s)** : diminution du poids corporel des fœtus ainsi que le poids des organes (cerveau, cœur, foie et reins).
- **NOAEL reprotox** : non déterminé
- **LOAEL reprotox** : 650 mg/kg.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 2e.

Gospe et al., 2000

- **Type d'étude** : étude expérimentale.
- **Espèce étudiée** : rat (Sprague Dawley).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 18 femelles gestantes.
- **Voie d'exposition** : orale (gavage).
- **Temps d'exposition** : dose quotidienne unique.
- **Fréquence du traitement** : 7j/7 du 6^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation.
- **Dose d'exposition** : 650 mg/kg en solution dans de l'huile de maïs.
- **Groupe témoin** : 18 femelles gestantes.
- **Résultats** : Il n'y a pas de différence entre rats exposés et témoins en ce qui concerne les poids corporels et du cerveau. En revanche, les cerveaux des animaux exposés au toluène présentent une diminution statistiquement significative du nombre de neurones au sein de chaque couche cortical. Selon les couches corticales, la génération de neurones est retardée de 1 à 2 jours par rapport aux animaux non exposés. De plus, les animaux exposés présentent une migration neuronale anormale.
- **Le(s) effet(s) critique(s)** : altération du système nerveux central.
- **NOAEL reprotox** : non déterminé
- **LOAEL reprotox** : 650 mg/kg.
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 2e.

Kostas et Hotchin, 1981

- **Type d'étude** : étude expérimentale.
- **Espèce étudiée** : souris (Nya :NYLAR).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 12 femelles.
- **Voie d'exposition** : orale (eau de boisson).
- **Temps d'exposition** : début de la période d'accouplement, gestation, lactation.
- **Fréquence du traitement** : 7 j/7

- **Doses d'expositions** : 16, 80, 400 ppm (estimée à 7,2 – 14,4 – 72 mg/kg·j) en solution dans de l'huile de maïs.
- **Groupe témoin** : 12 femelles .
- **Résultats** : Il n'y a pas de diminution de la consommation d'eau de boisson chez les femelles exposées, pas d'augmentation de la mortalité chez les jeunes, pas d'altération du développement des yeux, des oreilles et de la « surface righting response ». Une altération de la coordination motrice (test de rotarod) chez les jeunes âgés de 45 et 55 jours est observée chez tous les groupes exposés. La relation dose-réponse inversée.
- **Le(s) effet(s) critique(s)** : altération de coordination motrice.
- **NOAEL reprotox** : non déterminé
- **LOAEL reprotox** : 72 mg/kg·j
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 2e

2.2.2.2. Effets sur la fertilité

Il existe peu d'études sur la fertilité disponibles chez l'animal. Les données dont nous disposons correspondent à des expositions par inhalation. Les études de fertilité chez le rat montrent l'absence d'effet pour des expositions à des concentrations de 2 000 ppm (7 500 mg/m³) (API, 1985, Thiel et Chahoud, 1997). Cependant, au cours d'une autre étude plus complète, Ono *et al.* (1996) a mis en évidence une diminution significative du nombre de spermatozoïdes et du poids de l'épididyme pour une exposition à 2 000 ppm (7 500 mg/m³) de toluène 6 h/j pendant 90 j.

Ono *et al.*, 1996

- **Type d'étude** : étude expérimentale
- **Espèce étudiée** : rat (Sprague-Dawley) (mâles âgés de 7 semaines, femelles âgées de 10 semaines)
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 15
- **Voie d'exposition** : inhalation (exposition corps entier)
- **Temps d'exposition** : 6 h/jour
- **Fréquence du traitement** : Les mâles sont exposés pendant 90 jours dont 60 jours avant l'accouplement. Les femelles sont exposées pendant 14 jours avant l'accouplement jusqu'au 7^{ème} jour de la gestation.
- **Concentrations d'exposition** : 600 et 2 000 ppm (2 300 et 7 500 mg/m³) de toluène à 98 % de pureté.
- **Groupe témoin** : 15
- **Résultats** : Il n'y a pas d'altération des poids des femelles témoins ou exposées.

Les femelles sont chacune accouplée avec un mâle exposé à la même dose. A l'exception d'un rat à la concentration de 600 ppm (2 300 mg/m³), tous les rats sont accouplés. Chez les femelles, une seule femelle exposée à la concentration de 2 000 ppm (7 500 mg/m³) n'est pas gestante.

Chez les femelles, sacrifiées après 20 jours de la gestation, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les exposées et les non exposées en ce qui concerne le nombre de corps jaunes, d'implantation, de fœtus en vie, le sex ratio, les malformations, le poids corporel des fœtus et la mortalité des fœtus. A 2 000 ppm

(7 500 mg/m³), la mortalité fœtale est plus élevée que chez les témoins ainsi que le nombre de mère porteuse de fœtus mort.

Chez les mâles, exposés à 2 000 ppm (7 500 mg/m³), l'augmentation du poids des reins est accompagnée d'une altération basophilique, d'une nécrose tubulaire et d'une diminution du poids du thymus. Les poids relatifs et absous de l'épididyme sont diminués à 2 000 ppm (7 500 mg/m³). Il n'y a pas d'altération histopathologique des testicules et de l'épididyme. Le nombre de cellules spermatogéniques aux 3 stades (spermatogonie, spermatocyte I, spermatides) n'est pas altérée. Le nombre de spermatozoïdes est significativement diminué (20 à 25 %) à 2 000 ppm (7 500 mg/m³). Une diminution non statistiquement significative est également rapportée à 600 ppm (2 300 mg/m³). La mobilité spermatique n'est pas altérée.

- **Le(s) effet(s) critique(s)** : diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes chez le rat mâle à 2 000 ppm (7 500 mg/m³).
- **NOAEL reprotox** : 600 ppm (2 300 mg/m³)
- **LOAEL reprotox** : 2 000 ppm (7 500 mg/m³)
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 1d

Thiel et Chambon, 1997

- **Type d'étude** : étude expérimentale.
- **Espèce étudiée** : rat (Wistar) (femelles gestantes).
- **Sexe et nombre d'animaux par lot** : 300 ppm (23 animaux), 600 ppm (23 animaux), 1 000 ppm (29 animaux) et 1 200 ppm (24 animaux).
- **Voie d'exposition** : inhalation (exposition corps entier).
- **Temps d'exposition** : 6 h/jour.
- **Fréquence du traitement** : 7 j/7 du 9^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation.
- **Concentrations d'exposition** : 300, 600, 1000 et 1 200 ppm (1 150, 2 300, 3 830 et 4 600 mg/m³) de toluène (99 % de pureté).
- **Groupe témoin** : 38 animaux.
- **Résultats** : les adultes de la génération F1 sont accouplés et la fertilité est évaluée. Il n'y a pas de différence entre les groupes témoins et traités à l'exception de l'indice de fertilité qui est statistiquement augmenté pour le groupe exposé à 600 ppm (2 300 mg/m³). Il n'y a pas de relation dose effet rapportée.
- **Le(s) effet(s) critique(s)** : absence d'effet.
- **NOAEL reprotox** : 1 200 ppm (4 600 mg/m³).
- **LOAEL reprotox** :
- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** : 1d.

2.2.3. Mécanismes d'action proposés

Chez l'homme, le mécanisme d'action exact du toluène lors d'expositions par inhalation est difficile à définir car les données disponibles sont issues d'études épidémiologiques réalisées en milieu professionnel. Les niveaux d'exposition au toluène sont souvent peu élevés et les études présentent souvent des biais.

Une action directe du toluène au niveau des cellules gliales est probable, notamment dans le cas d'intoxication massive (500 à 5 000 ppm soit 1 875 à 18 750 mg/m³) chez la femme

toxicomane enceinte ayant abusée du toluène au cours de la grossesse (syndrome psycho-organique chez les fœtus) (Costa *et al.*, 2002).

Chez le rat, le toluène n'induirait pas de malformation mais serait à l'origine de diminution du poids corporel à la naissance, de retard de développement post-natal et d'altération du comportement. Ils seraient liés à une action directe du toluène.

Des altérations du comportement ont également été rapportées chez des rats exposés au toluène au cours de la période de développement du cerveau ainsi qu'un phénomène d'apoptose neurodégénérative du cervelet. Les données disponibles sont peu nombreuses et il serait souhaitable qu'elles soient complétées.

Chez la souris et le lapin, très peu d'études sont disponibles. Des signes de fœtotoxicité (altération du nombre de côtes ou retard de développement du squelette) sont rapportés à des concentrations plus faibles pour des expositions entre 100 et 400 ppm (383 et 1 532 mg/m³) pratiquées du 7^{ème} au 16^{ème} jour de la gestation. Ces données restent parcellaires et aucune relation dose-effet n'a pu être établie. Dans ces conditions, même si ces deux espèces semblent plus sensibles que le rat, il n'est pas possible de conclure compte tenu du manque de données.

Le rôle des métabolites minoritaires (< 1 %) du toluène (méthylhydroquinone et méthylbenzoquinone) est suspecté dans les mécanismes de reprotoxicité. Il s'agirait essentiellement de dommages oxydatifs à l'ADN qui pourraient être à l'origine des malformations observées au niveau des cellules spermatiques. Cet aspect présente un impact mineur en raison de la faible quantité des métabolites impliqués.

2.3. Analyse de la cohérence des données animales et humaines

Chez l'homme, la principale voie d'absorption du toluène est l'inhalation, l'ingestion restant un phénomène accidentel ou volontaire. Par inhalation, l'absorption est rapide : 10 à 15 minutes après le début de l'exposition (Carlsson, 1982). Le taux d'absorption (environ 50 %) est proportionnel au niveau de ventilation pulmonaire. Les données chez l'animal font état d'un taux d'absorption chez l'animal de 90 %.

Chez l'homme comme chez l'animal, le toluène s'accumule dans les tissus adipeux, le cerveau, et dans de nombreux autres organes (sang, foie, rein, moelle osseuse). Quatre-vingt dix neuf pour cent du toluène sont métabolisés sous forme d'acide benzoïque après oxydation par les cytochromes P450 hépatiques puis éliminé par voie urinaire sous forme d'acide hippurique.

Les données toxicocinétiques dont nous disposons ne mettent pas évidence de différences entre l'homme et l'animal (paragraphe 2.1.4.).

Les études réalisées chez l'homme et qui ont été décrites au paragraphe 2.2.1. ne peuvent pas être utilisées pour l'élaboration de VTR compte tenu des biais de ces études (faible

population, expositions multiples, influence du facteur sociétal,...). En revanche, les études réalisées chez le rat (paragraphe 2.2.2.) sont de bonne qualité.

Il semble donc tout à fait raisonnable d'utiliser les données disponibles chez le rat pour l'établissement de VTR.

2.4. Comparaison des indices de toxicité en fonction des effets

Chez la femme, des avortements spontanés sont rapportés pour des expositions de l'ordre de 88 ppm (337 mg/m³) (Ng *et al.*, 1992b). Mais ces données issues d'études épidémiologiques chez les travailleuses présentent des biais décrits dans le paragraphe précédent. Lors d'expositions intentionnelles la femme enceinte peut inhale des concentrations très élevées (500 à 5 000 ppm soit 1 875 à 18 750 mg/m³) de toluène pour lesquelles des effets tératogènes et notamment une atteinte du système nerveux central sont rapportés (Arnold *et al.*, 1994 ; Pearson *et al.*, 1994)). Chez le rat, les effets sur la reproduction et/ou le développement apparaissent à des concentrations de l'ordre de 1 000 à 2 000 ppm (3 750 à 7 500 mg/m³).

Les différents organismes proposant des VTR ont été consultés, notamment les organismes les plus reconnus (OMS, ATSDR, US-EPA/IRIS, Santé Canada, RIVM et OEHHA) pour une revue des valeurs existantes. Tous ces organismes proposent des VTR pour des expositions aiguë, sub-chronique ou chronique et pour des expositions par inhalation ou par voie orale. Aucune de ces VTR n'a été proposée pour des effets reprotoxiques.

L'ensemble des VTR est présenté dans le tableau VIII et détaillé au cours des pages suivantes.

Tableau VII : VTR existantes pour le toluène

| Organisme (année) | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR | Dose critique | UF | Etude toxicologique utilisée |
|----------------------|--|----------------------|-----------------------|--------------------------------|---|------|--|
| US EPA (2005) | Augmentation poids rein (rat) | orale | chronique | RfD = 0,08 mg/kg/j | NOAEL = 223 mg/kg/j LOAEL = 446 mg/kg/j BWLD = 238mg/kg/j | 3000 | NTP, 1990 |
| US EPA (2005) | Effets neurologiques (homme) | inhalation | chronique | RfC = 5 mg/m ³ | NOAEL moyen : 34 ppm (128 mg/m ³) Ajusté 46 mg/m ³ | 10 | (Abbate et al., 1993 ; Boey et al., 1997 ; Cavalleri et al., 2000 ; Eller et al., 1999 ; Foo et al., 1990 ; Murata et al., 1993 ; Nakatsuka et al., 1992 ; Neubert et al., 2001 ; Vrca et al., 1995 ; Zavalic et al., 1998a) |
| ATSDR (2000) | Dysfonctionnement de la vision des couleurs (homme) | Inhalation | chronique | MRL = 0,3 mg/m ³ | LOAEL ajusté = 134 mg/m ³ | 100 | Zavalic et al., 1998a |
| ATSDR (2000) | Absence d'effet (homme) | Inhalation | aigu | MRL = 3,8 mg/m ³ | NOAEL ajusté = 36 mg/m ³ | 10 | Andersen et al., 1983 |

| Organisme (année) | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR | Dose critique | UF | Etude toxicologique utilisée |
|------------------------------|--|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|---|
| ATSDR (2000) | Atteinte du système nerveux (rat) | Orale | aigu | MRL = 0,8 mg/kg/j | LOAEL = 250 mg/kg/j | 300 | Dyer <i>et al.</i> , 1983 |
| ATSDR (2000) | Augmentation des monoamines neurotransmetteurs (souris) | Orale | subchronique | MRL = 0,02 mg/kg/j | LOAEL = 5 mg/kg/j | 300 | Hsieh <i>et al.</i> , 1990 |
| OMS (2004) | Effets hépatotoxiques marginaux (souris) | Orale | chronique | TDI = 0,223 mg/kg | LOAEL = 312 mg/kg/j | 1 000 | NTP, 1990 |
| Santé Canada (2004) | Irritation du système respiratoire et effets neurologiques (homme) | Inhalation | chronique | CA = 3,75 mg/m ³ | NOAEL = 150 mg/m ³ | 10 | Andersen <i>et al.</i> , 1983 |
| Santé Canada (2004) | Diminution du poids corporel (souris) | Orale | chronique | DJA = 1,25 mg/kg/j | LOAEL ajusté = 375 mg/kg/j | 100 | NTP, 1990 |

| Organisme (année) | Effet | Voie d'exposition | Durée d'exposition | VTR | Dose critique | UF | Etude toxicologique utilisée |
|------------------------------|--|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--|-----------|---|
| RIVM (2001) | Irritation nasale (rat) | Inhalation | chronique | TCA = 0,4 mg/m ³ | NOAEL = 223 mg/kg/j LOAEL = 446 mg/kg/j | 300 | NTP, 1990 |
| RIVM (2001) | Effets hépatotoxiques marginaux (souris) | Orale | chronique | TDI = 0,223 mg/kg | LOAEL = 312 mg/kg/j | 1 000 | Andersen et al., 1983 |
| OEHHA (2003) | Effets neurologiques (rat) | Inhalation | chronique | REL = 0,3 mg/m ³ | NOAEL = 152 mg/m ³ | 100 | Hillefors-Berglund et al., 1995 ; Foo et al., 1990 |

L'US EPA (IRIS) propose une RfD de 0,08 mg/kg/j (2005).

Cette valeur a été établie à partir d'une étude de 13 semaines par gavage chez le rat. L'effet retenu est l'augmentation du poids du rein (NTP, 1990).

Chez le rat, le NOAEL retenu est de 223 mg/kg/j et le LOAEL retenu de 446 mg/kg/j. Après modélisation de l'augmentation du poids absolu des reins des rats mâles, une benchmarkdose limite (BMDL) (limite inférieure de l'intervalle de confiance) de 238 mg/kg/j est calculée pour une augmentation de 10 % de la réponse.

Facteurs d'incertitude : un facteur de 3 000 est appliqué à la BMDL pour tenir compte des différences inter- et intra-espèces (100), de l'extrapolation d'une étude subchronique à une possibilité d'exposition chronique (10), du nombre limité de données et des résultats d'immunotoxicité contradictoires (3).

Calcul : BMDL / 3 000 = 238 mg/kg/j / 3 000 = 0,08 mg/kg/j

L'US EPA (IRIS) propose une RfC de 5 mg/m³ (2005).

Cette valeur est établie à partir d'études épidémiologiques pour des expositions professionnelles au toluène (Abbate *et al.*, 1993 ; Boey *et al.*, 1997 ; Cavalleri *et al.*, 2000 ; Eller *et al.*, 1999 ; Foo *et al.*, 1990 ; Murata *et al.*, 1993 ; Nakatsuka *et al.*, 1992 ; Neubert *et al.*, 2001 ; Vrca *et al.*, 1995 ; Zavalic *et al.*, 1998a). L'effet le plus sensible est l'effet neurologique correspondant à des troubles de la vision en couleur, des altérations de l'audition, une diminution des performances lors d'analyse de comportement, des altérations de la vitesse de conduction nerveuse motrice et sensorielle, des maux de tête et des étourdissements. La plupart des études ont identifié des NOAELs de l'ordre de 25 à 50 ppm (96 à 191 mg/m³) ce qui permet de déterminer un NOAEL moyen (moyenne arithmétique) de 34 ppm (128 mg/m³) puis un NOAEL ajusté de 46 mg/m³. Ce dernier prend en compte le volume d'air inhalé au cours de 8 heures de travail (10 m³), le volume d'air inhalé pendant 24 heures (20 m³) et rapporte l'exposition de la semaine de travail (5 j) à une semaine complète (7 j).

Facteurs d'incertitude : un facteur de 10 est appliqué pour tenir compte des différences intra-espèces.

Calcul : 128 mg/m³ x 10 m³/ 20 m³ x 5 j/ 7 j x 1/10 = 46 mg/m³ x 1/10 = 4,6 mg/m³
(5 mg/m³)

L'ATSDR a établi un MRL de 1 ppm (3,8 mg/m³) pour une exposition aiguë par inhalation (2000).

Cette valeur est établie à partir d'une étude expérimentale chez 16 volontaires, exposés 6 heures par jour, pendant 4 jours consécutifs, aux concentrations de 0, 10, 40 et 100 ppm (0, 38,3, 153,2, 383 mg/m³). Les sujets ont été exposés à des concentrations différentes

chaque jour (Andersen *et al.*, 1983). Aucun effet n'est observé pour les concentrations de 10 et 40 ppm (38,3 et 153,2 mg/m³). À 100 ppm (383 mg/m³) une augmentation statistiquement significative de l'irritation oculaire et nasale, des céphalées, des étourdissements et une sensation d'étouffement est rapportée. En revanche, à cette concentration il n'y a pas d'altération des performances (8 tests pratiqués). De cette étude, un NOAEL de 40 ppm est défini (ce qui correspond à 9,5 ppm pour une exposition continue). Facteurs d'incertitude : un facteur de 10 est appliqué pour tenir compte de la variabilité intra-espèce.

Calcul : 40 ppm x 5 j/7 j x 8 h/24 h x 1/10 = 1 ppm (3,8 mg/m³)

L'ATSDR a établi un MRL de 0,08 ppm (0,3 mg/m³) pour une exposition chronique par inhalation (2000).

Cette valeur est établie dans le cadre d'expositions chroniques chez les salariés de l'industrie de la chaussure (Zavalic *et al.*, 1998a). Dans cette étude, un LOAEL de 35 ppm (134 mg/m³) pour des dysfonctionnements de vision de la couleur est défini.

Facteurs d'incertitude : un facteur de 100 est appliqué pour tenir compte du fait que le MRL est établi à partir d'un LOAEL (facteur de 10) et de la variabilité intra-espèce (facteur de 10).

Calcul : 35 ppm x 5 j/7 j x 8 h/24 h x 1/100 = 0,08 ppm (0,3 mg/m³)

L'ATSDR a établi un MRL de 0,8 mg/kg/j pour une exposition orale aiguë (2000).

Cette valeur est établie à partir d'une étude expérimentale, chez le rat, exposé par gavage aux doses de 0, 250, 500 ou 1 000 mg/kg de toluène (Dyer *et al.*, 1988). Le test utilisé est le test des potentiels évoqués qui permet l'étude des atteintes du système nerveux. Les résultats ont permis de déterminer un LOAEL de 250 mg/kg/j.

Facteurs d'incertitude : un facteur total de 300 est appliqué pour tenir compte du fait que le MRL est établi à partir d'un LOAEL (facteur de 3), de la variabilité intra-espèce (facteur de 10) et de la variabilité inter-espèce (facteur de 10).

Calcul : 250 mg/kg/j x 1/300 = 0,8 mg/kg/j

L'ATSDR a établi un MRL de 2.10⁻² mg/kg/j pour une exposition subchronique par voie orale (ATSDR, 2000).

Cette valeur est établie à partir du LOAEL de 5 mg/kg/j prenant en compte une augmentation des monoamines neurotransmetteurs (norépinéphrine, dopamine, sérotonine) dans le cerveau de souris, après une exposition par l'eau de boisson contaminée au toluène durant 28 jours (Hsieh *et al.*, 1990).

Facteurs d'incertitude : un facteur de 300 est appliqué pour tenir compte du fait que le MRL est établi à partir d'un LOAEL (facteur de 3), de la variabilité intra-espèce (facteur de 10) et de la variabilité inter-espèce (facteur de 10).

Calcul : $5 \text{ mg/kg/j} \times 1/300 = 0,02 \text{ mg/kg/j}$

L'OMS a établi une TDI de 223 µg/kg (2004).

Cette valeur a été établie à partir d'une étude expérimentale réalisée chez la souris après une administration de toluène par gavage. Un LOAEL de 312 mg/kg a été établi pour les effets hépatotoxiques marginaux (NTP, 1990).

Facteurs d'incertitude : un facteur de 1 000 est appliqué et correspond à un facteur de 100 pour les variations inter- et intra-espèces et d'un autre facteur de 10 pour tenir compte de la courte durée de l'étude et du fait que la valeur utilisée pour la dérivation est un LOAEL.

Calcul : $312 \text{ mg/kg} \times 5 \text{ j}/7 \text{ j} \times 1/1\,000 = 223 \text{ µg/kg}$

Santé Canada a établi une CA de 3,75 mg/m³ pour une exposition chronique par inhalation (2004).

Cette valeur a été établie à partir d'une étude expérimentale chez 16 volontaires exposés au toluène durant 4 jours (6 h/j) (Andersen *et al.*, 1983). A 375 mg/m³, une irritation du système respiratoire et des effets neurologiques ont été notés. Aucun effet n'a été relevé à 150 mg/m³, qui est donc un NOAEL pour cette étude.

Facteurs d'incertitude : un facteur de 10 a été appliqué pour la variabilité au sein de la population (variabilité intra-spécifique).

Calcul : $150 \text{ mg/m}^3 \times (6 \text{ h}/24 \text{ h}) \times 1/10 = 3,75 \text{ mg/m}^3$

Santé Canada a établi une DJA de 1,25 mg/kg/j pour une exposition chronique par voie orale (2004).

Cette valeur a été établie à partir d'une étude expérimentale chez des souris (B6C3F1) exposées au toluène par inhalation 6,5 h/j, 5 j/sem (NTP, 1990). L'effet critique retenu est la diminution de poids corporel pour un LOAEL ajusté de 375 mg/m³.

Facteurs d'incertitude : un facteur d'incertitude de 100 est utilisé qui correspond à un facteur 10 pour l'extrapolation à l'homme (variabilité inter-spécifique) et un facteur 10 pour la variabilité au sein de la population (variabilité intra-spécifique).

Calcul : $375 \text{ mg/m}^3 \times (6,5 \text{ h}/24 \text{ h}) (5 \text{ j}/7 \text{ j}) \times 0,043 \text{ m}^3/\text{j} \times 0,025 \text{ kg} \times 1/100 = 1,25 \text{ mg/kg/j}$

Le RIVM propose une TCA de 0,4 mg/m³ pour une exposition chronique par inhalation (Baars et al., 2001).

Le toluène est un irritant pulmonaire induisant des effets toxiques pour le système nerveux central, chez l'homme, pour des concentrations de l'ordre de 383 mg/m³. A partir d'études d'expositions chroniques, le LOAEL retenu chez l'homme est de 332 mg/m³ (88 ppm) (Foo et al., 1990). De plus, une étude expérimentale, chez le rat, permet de retenir un LOAEL de 2 261 mg/m³ (600 ppm) pour une dégénérescence de l'épithélium nasal (NTP, 1990).

Facteurs d'incertitude : un facteur de 10 est appliqué pour tenir compte des différences intra-espèces, un autre facteur de 10 tient compte de l'utilisation du LOAEL. Un facteur supplémentaire de 3 est appliqué en raison de l'absence de données telles que le nombre restreint d'expérimentation et le manque de caractérisation des expositions pratiquées chez l'animal.

Le RIVM propose une TDI de 2,23 mg/kg/j pour une exposition chronique par voie orale (Baars et al., 2001).

Cette valeur est celle retenue par l'OMS pour une exposition chronique par voie orale.

L'OEHHA propose un REL de 0,3 mg/m³ pour une exposition chronique par inhalation (2003).

Cette valeur est issue d'une étude d'inhalation chez le rat (Hillefors-Berglund et al., 1995) et étayée par une étude épidémiologique chez 30 travailleuses d'une usine d'assemblage électronique (Foo et al., 1990).

Les rats ont été exposés à 0, 40, 80, 160 ou 320 ppm durant 4 semaines (6 h/j, 5 j/sem) suivies par 29 - 40 jours de récupération. Des effets neurologiques (diminution du poids de la zone limbique sous corticale du cerveau et altération des récepteurs à la dopamine) ont été observés à 80 ppm mais n'étaient plus significatifs à 40 ppm, qui correspond à un NOAEL pour cette étude.

Facteurs d'incertitude : un facteur 100 a été appliqué pour l'utilisation d'une étude subchronique, un facteur 1 pour l'extrapolation à l'homme (variabilité inter-espèce) et un facteur 10 pour la variabilité au sein de la population (variabilité intra-espèce).

Remarques : aucun facteur d'incertitude n'a été pris pour la variabilité inter-espèce en raison de l'existence de données épidémiologiques chez l'homme à des niveaux d'exposition suffisants, qui confirment la similarité d'effet entre le rat et l'animal.

Calcul : $(40 \text{ ppm} \times 6 \text{ h}/24 \text{ h} \times 5 \text{ j}/7 \text{ j}) \times 1/100 = 0,07 \text{ ppm (0,3 mg/m}^3)$

En résumé, il existe 12 VTR existantes pour les voies d'exposition orale et respiratoire (6 par voie). Pour ces deux voies d'exposition, les VTR ont principalement été établies pour des expositions chroniques. Une seule VTR pour une exposition aigüe est proposée pour chacune des deux voies d'exposition. Même si les VTR par voie orale constituent des

données intéressantes, nous focaliserons notre attention sur celles par inhalation. En effet, comme nous l'avons décrit dans les paragraphes précédents, c'est la voie principale d'exposition et c'est pour cette voie que nous disposons de données pour les effets reprotoxiques. Les VTR par inhalation ont été établies pour une exposition aiguë MRL = 3,8 mg/m³ (ATSDR, 2000), pour des expositions chroniques RfC = 5 mg/m³ (US EPA, 2000), MRL = 0,3 mg/m³ (ATSDR, 2000), CA = 3,75 mg/m³ (Santé Canada, 2004), TCA = 0,4 mg/m³ (RIVM, 2001), et REL = 0,3 mg/m³ (OEHHA, 2003).

Ces VTR correspondent à des NOAEL ajustés de 36 mg/m³ pour une exposition aiguë et à des NOAEL (ajustés ou pas) compris entre 36 et 152 mg/m³ ou LOAEL de 150 mg/m³ pour des expositions chroniques.

Toutes ces concentrations sont bien inférieures à celles pour lesquelles les effets critiques reprotoxiques sont décrits et résumés dans le tableau IX (NOAEL de 500-600 ppm soit 1 800-2 300 mg/m³, LOAEL de 2 000 ppm soit 7 500 mg/m³). Cependant, les études relatant des effets reprotoxiques correspondent à des temps d'exposition sub-aiguës ou sub-chroniques. Il est intéressant de vérifier s'il ne serait pas utile d'établir des VTR pour les effets reprotoxiques pour ces temps d'exposition (sub-aiguë ou sub-chronique) et/ou pour protéger la femme enceinte.

Tableau IX : NOAEL et LOAEL pouvant être établis pour les effets reprotoxiques du toluène

| Etude retenue | NOAEL/LOAEL établis | Effet critique | Espèces Animales |
|--------------------------|--|---|----------------------|
| Roberts, 2003 | NOAEL = 500 ppm (1 850 mg/m ³) LOAEL = 2 000 ppm (7 500 mg/m ³) | <u>Effet sur le développement - foetotoxicité</u> Diminution du poids corporel des jeunes des générations F1 et F2 | Rat (Sprague Dawley) |
| Ono <i>et al.</i> , 1996 | NOAEL = 600 ppm (2 300 mg/m ³) LOAEL = 2 000 ppm (7 500 mg/m ³) | <u>Effet sur la reproduction : fertilité</u> Diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes | Rat (Sprague Dawley) |

2.5. Conclusion

Dans l'hypothèse où il serait souhaitable de proposer des VTR pour les effets reprotoxiques, deux types d'effets reprotoxiques peuvent être retenus, des effets sur la reproduction et des effets sur le développement. Ces deux types d'effets peuvent être pris en compte pour établir des VTR pour les effets reprotoxiques.

Après analyse des données disponibles, deux études expérimentales permettent d'établir des doses critiques pour les effets sur la fertilité et pour les effets sur le développement. Ces études sont respectivement l'étude de Ono *et al.*, 1996 et celle de Roberts, 2003. Ces études sont de bonne qualité. La cotation de Klimisch est de 1d pour l'étude de Ono *et al.* et de 1a pour celle de Roberts.

Pour l'étude de Ono *et al.* (1996) l'effet critique retenu est une diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes. Cet effet apparaît plus sensible que la mortalité fœtale. Cet effet semble pertinent compte tenu du mode d'action du toluène et du schéma opératoire de l'étude : exposition de 60 jours avant accouplement chez les sujets mâles.

Pour l'étude de Roberts (2003) l'effet critique retenu est la diminution du poids corporel des jeunes des générations F1 et F2. Les rats ont été exposés 6 h/j, 7 j/7 80 jours avant l'accouplement pour les deux sexes, puis du 1^{er} au 20^{ème} jour de la gestation et du 5^{ème} au 21^{ème} jour de la lactation chez les femelles. L'effet critique retenu est tout à fait pertinent car il est retrouvé dans plusieurs études expérimentales chez le rat et pour des niveaux d'expositions proches. C'est également à des niveaux proches que sont observés les effets neurotoxiques chez les jeunes rats rapportés dans d'autres études.

3. La construction de la VTR

3.1. Identification d'une dose critique

3.1.1. Présentation des doses repères

Deux NOAEL peuvent être établis pour une exposition par inhalation.

Un NOAEL de 600 ppm (2 300 mg/m³) pour des effets sur les testicules (diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes) chez le rat mâle déduit de l'étude de Ono *et al.* (1996) et un NOAEL de 500 ppm (1 875 mg/m³) élaboré à partir de l'étude de Roberts (2003) pour des effets sur le développement chez le rat. Ces données sont présentées dans le tableau X.

Tableau X : NOAEL et LOAEL pouvant être établis pour les effets reprotoxiques du toluène

| Etude retenue | Durée d'exposition | NOAEL/LOAEL établis | Effet critique | Espèces Animales |
|------------------|--|--|---|----------------------|
| Roberts, 2003 | 6 h/j, 7 j/7 ♂ et ♀ : 80 j avant accouplement, ♂ : 15 j après accouplement, ♀ : 1 ^{er} au 20 ^{ème} j gestation et 5 ^{ème} au 21 ^{ème} j lactation | NOAEL = 1 850 mg/m ³ (500 ppm) LOAEL = 7 500 mg/m ³ (2 000 ppm) | <u>Effet sur le développement - foetotoxicité</u> Diminution du poids corporel des jeunes des générations F1 et F2 | Rat (Sprague Dawley) |
| Ono et al., 1996 | 6 h/j, 7 j/7 Avant accouplement : ♂ 60 j et ♀ 14 j ; Après accouplement : ♂ 30 j et ♀ les 7 premiers jours de la gestation. | NOAEL = 2 300 mg/m ³ (600 ppm) LOAEL = 7 500 mg/m ³ (2 000 ppm) | <u>Effet sur la reproduction : fertilité</u> Diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes | Rat (Sprague Dawley) |

Le risque de première espèce alpha, le type de test statistique (non clairement précisé dans l'article) utilisé et le risque de deuxième espèce bêta devraient pouvoir être approchés dans les deux études retenues par les données de « p value » de 0,05 pour le risque de première espèce alpha (Ono et al., 1996 et Roberts, 2003).

3.1.2. Dose critique retenue

La dose critique proposée pour les effets sur le développement est le NOAEL de 500 ppm pour la diminution de poids corporel chez les jeunes pour l'étude de Roberts (2003).

La dose critique proposée pour les effets sur la reproduction est le NOAEL de 600 ppm pour la diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes pour l'étude de Ono et al., 1996.

3.2. Facteurs d'incertitude

Pour l'élaboration de la VTR pour les effets sur le développement du toluène nous proposons de partir du NOAEL de 1 850 mg/m³ (500 ppm) (Roberts, 2003) et de lui appliquer, en l'absence de données spécifiques, les facteurs d'incertitude suivant :

Variation inter-espèce : 10

Variation intra-espèce : 10

De plus, un ajustement du temps d'exposition (passage d'une exposition discontinue à continue) est envisagé. Le NOAEL ajusté est calculé de la manière suivante : $\text{NOAEL}_{\text{ADJ}} = \text{NOAEL} \times 6 \text{ h}/24 \text{ h}$

Pour l'élaboration de la VTR pour les effets sur la fertilité du toluène nous proposons de partir du NOAEL de 2 300 mg/m³ (600 ppm) (Ono *et al.*, 1996) et de lui appliquer les facteurs d'incertitude suivant :

Variation inter-espèce : 10

Variation intra-espèce : 10

De plus, un ajustement du temps d'exposition (passage d'une exposition discontinue à continue) est envisagé. Le NOAEL ajusté est calculé de la manière suivante : $\text{NOAEL}_{\text{ADJ}} = \text{NOAEL} \times 6 \text{ h}/24 \text{ h}$

3.3. Discussion et présentation de la VTR

Même si une seule VTR pourrait être proposée pour l'ensemble des effets reprotoxiques en retenant la VTR la plus pénalisante par précaution, nous avons préféré ici faire le choix de proposer deux VTR distinctes pour les effets sur la fertilité (exposition sub-chronique) et sur le développement (exposition sub-aiguë ou sub-chronique). Ceci permet également de distinguer deux durées d'exposition.

En effet, les données dont nous disposons montrent que les effets sur la fertilité masculine (diminution du poids de l'épididyme et du nombre de spermatozoïdes) ne sont observés que lors d'exposition sub-chronique : exposition des mâles pendant une période couvrant au moins un cycle complet de la spermatogenèse soit 60 jours avant l'accouplement puis 30 jours après l'accouplement soit une durée totale de 90 j. De même, les effets sur le développement (diminution du poids des jeunes pendant la période de lactation) ont été observées pour des expositions sub-chroniques : exposition des mâles et des femelles respectivement pendant au moins un cycle complet de la spermatogenèse et plusieurs cycles oestraux complets soit 80 jours avant l'accouplement puis des femelles pendant la gestation et la lactation. Rappelons que chez le rat le cycle de spermatogenèse est de 53 jours alors qu'il est de 74 jours chez l'homme. Enfin, dans certains protocoles des effets sur le développement (diminution du poids des jeunes, de la fonction auditive et cognitive) apparaissent lors d'exposition sub-aiguë : exposition uniquement des femelles du 9^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation. Ainsi dans l'étude de Roberts, il n'est pas exclu que les effets observés sur la descendance soient essentiellement liés à l'exposition *in utero* ou via la lactation. Les VTR proposées sont présentées dans le tableau XI.

Tableau XI : VTR proposées pour les effets reprotoxiques du toluène

| VTR proposée | Effet critique pris en compte pour la construction de la VTR | Voie d'exposition | Durée d'exposition pour laquelle la VTR s'applique | Etude toxicologique utilisée | Espèces testées, voie et durée d'exposition du protocole | Dose critique | UF |
|-------------------------------------|--|-------------------|--|------------------------------|---|---|--|
| 5,7 mg/m ³ (1,5 ppm) | <u>Effet sur l'a reproduction : fertilité masculine</u> | inhalation | subchronique | Ono <i>et al.</i> , 1996 | Rat (Sprague Dawley) Inhalation 90 j d'exposition chez le mâle | NOAEL = 600 ppm (2 300 mg/m ³) NOAEL _{ADU} = 150 ppm (574 mg/m ³) | 10 (inter-espèce) 10 (intra-espèce) |
| 4,8 mg/m ³ (1,25 ppm) | <u>Effet sur le développement-fetotoxicité</u> | inhalation | Sub-aiguë et sub-chronique | Roberts, 2003 | Rat (Sprague Dawley) Inhalation ♂ et ♀ : 80 j avant accouplement, ♂ : 15 j après accouplement, ♀ : 20 j pendant gestation et 15 j pendant lactation | NOAEL = 500 ppm (1 850 mg/m ³) NOAEL _{ADU} = 125 ppm (479 mg/m ³) | 10 (inter-espèce) 10 (intra-espèce) |

4. Bibliographie

Abbate C., Giorgianni C., Munao F., Pesarin F. and Salmas L. (1993) - Neurotoxicity induced by exposure to toluene. An electrophysiologic study. *Int Arch Occup Environ Health*, **64**, 389-392.

Andersen I., Lundqvist G.R., Molhave L., Pedersen O.F., Proctor D.F., Vaeth M. and Wyon D.P. (1983) - Human response to controlled levels of toluene in six-hour exposures. *Scand J Work Environ Health*, **9**, 5, 405-418.

API (1985) - Two-generation inhalation reproduction/fertility study on petroleum derived hydrocarbon with toluene. American Petroleum Institute. Washington. API Med Res Publ 32-32854.

Arlien -Soborg P. (1992) Solvent neurotoxicity. *CRC Press*, Boca Raton - Florida.

Arnold G.L., Kirby R.S., Langendoerfer S. and Wilkins-Haug L. (1994) - Toluene embryopathy: clinical delineation and developmental follow-up. *Pediatrics*, **93**, 216-220.

ATSDR (1994) - Toxicological profiles : Toluene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta - Georgia - USA. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html.1-169>

Axelsson G. and Rylander R. (1982) - Exposure to anesthetic gases and spontaneous abortion: response bias in a postal questionnaire study. *Int J Epidemiol*, **11**, 250-256.

BASF (1980) - Bestimmung der akuten inhalationstoxizität LC50 von tolluol min. 99.5% (Merck AG) als dampf bei 4stundiger exposition an Sprazgue-Dawley-Ratten., 26-60019.

BASF (1989) - Pränatale toxizität von toluol in Kaninchen nach inhalativer aufnahme. N°90R0105/86064.

Benignus V.A. (1981) - Health effects of toluene: a review. *Neurotoxicology*, **2**, 3, 567-588.

Boey K.W., Foo S.C. and Jeyaratnam J. (1997) - Effects of occupational exposure to toluene: a neuropsychological study on workers in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*, **26**, 84-87.

Bonnet P., Morele Y., Raoult G., Zissu D. and Gradiski D. (1982) - Détermination de la concentration léthale₅₀ des principaux hydrocarbures aromatiques chez le rat. *Arch Mal Prof*, **34**, 261-265.

Bonnet P., Raoult G. and Gradiski D. (1979) - Concentrations léthales 50 des principaux hydrocarbures aromatiques. *Arch Mal Prof*, **40**, 805-810.

Bruckner J.V. and Peterson R.G. (1981) - Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse : II. Model development and toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol*, **61**, 302-312.

Brugnone F., Perbellini L., Apostoli P., Locatelli M. and Mariotto P. (1983) - Decline of blood and alveolar toluene concentration following two accidental human poisonings. *int Arch Occup Environ Health*, **53**, 157-165.

Bukowski J.A. (2001) - Review of the epidemiological evidence relating toluene to reproductive outcomes. *Reg Toxicol Pharmacol*, **33**, 147-156.

Cameron G.R., Paterson J.L.H., De Saram G.S.W. and Thomas J.C. (1938) - The toxicity of some methyl derivatives of benzene with special reference to pseudocumene and heavy coal tar naphtha. *J Pathol Bacteriol*, **46**, 95-107.

Campo P., Lataye R., Cossec B. and Placidi V. (1997) - Toluene-induced hearing loss : A mid-frequency location of cochlear lesions. *Neurotoxicol Teratol*, **19**, 2, 129-140.

Carpenter C.P., Geary D.L., Myers R.C., Nacjhreimer D.J., Sullivan L.J. and King J.M. (1976) - Petroleum hydrocarbon toxicity studies. XIII. Animazl and human response to vapors of toluene concentrate. *Toxicol Appl Pharmacol*, **36**, 473-490.

Cavalleri A., Gobba F. and Nicali E. (2000) - Dose-related color vision impairment in toluene-exposed workers. *Arch Env Health*, **55**, 399-404.

CIIT (1980) - A twenty-four month inhalation toxicology study in Fisher-344 rat exposed to atmospheric toluene. Laboratories, Inc. Raleigh, NC. Chemical Industry Institute of Toxicology. Research Triangle Park. Rapport final - CIIT Docket N°2200, CIIT/IBT.

Costa L.G., Guizzetti M., Burry M. and Oberdoerster J. (2002) - Developmental neurotoxicity: do similar phenotypes indicate a common mode of action? A comparison of foetal alcohol syndrome, toluene embryopathy and maternal phenylketonuria. *Toxicol Letters*, **127**, 197-205.

Courtney K.D., Andrews J.E., Springer J., Ménache M., Williams T., Dalley L. and Graham J.A. (1986) - A perinatal study of toluene in CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, **6**, 145-154.

Dalgaard M., Hossaini K.S., Hougaard K.S. and al. e. (2001) - Developmental toxicity of toluene in male rats: effects on semen quality, testis morphology, and apoptotic neurodegeneration. *Arch Toxicol*, **75**, 103-109.

Da-Silva V.A., Malheiros L.R., Figueiredo L.F.H., Sa-Rego M.M. and Paumgarten F.J.R. (1991) - Neurobehavioral development of rats exposed to toluene through maternal milk. *Brazilian J Med Biol Res*, **24**, 1239-1243.

Dyer R.S., Bercegeay M.S. and Mayo L.M. (1988) - Acute exposures to p-xylene and toluene alter visual information processing. *Neurotoxicol Teratol*, **10**, 2, 147-153.

Echeverria D., Fine L., Langolf G., Schork A. and Sampaio C. (1989) - Acute neurobehavioural effects of toluene. *Br J Ind Med*, **46**, 7, 483-495.

Egle J.L. and Gochberg B.J. (1976) - respiratory retention of inhaled toluene and benzene in the dog. *J Toxicol Environ Health*, **1**, 531-538.

El Masry A.M., Smith J.N. and Williams R.T. (1956) - Studies in detoxication 69. The metabolism of alkyl-benzenes: n-propyl-benzene and n-butyl-benzene with further observations on ethyl-benzene. *Biochem J*, **64**, 50-56.

Eller N., Netterstrom B. and Laursen P. (1999) - Risk of chronic effects on the central nervous system at low toluene exposure. *Occup Med*, **49**, 6, 389-395.

EU (2003) - European Union Risk Assessment Report of Toluene. Institute for Health and consumer Protection, Joint Research Center, European Chemicals Bureau. Luxembourg.

Fodor G.G. (1972) - Schädliche Dämpfe. VDI Verlag. Dusseldorf.

Foo S., Jeyaratnam J. and Koh D. (1990) - Chronic neurobehavioural effects of toluene. *Br J Ind Med*, **47**, 480-484.

Freitag D., Ballhorn L., Geyer H. and Korte F. (1985) - Environmental hazard profile of organic chemicals. An experimental method for the assessment of the behaviour of organic chemicals in the ecosphere by means of simple laboratory tests with¹⁴C-labeled chemicals. *Chemosphere*, **14**, 1589-1616.

Gerkin R.D. and Lo Vecchio F. (1998) - Rapid reversal of life-threatening toluene-induced hypokalemia with hemodialysis. *J Emerg Med*, **16**, 5, 723-725.

Goodwin T.M. (1988) - Toluene abuse and renal tubular acidosis in pregnancy. *Obstet Gynecol*, **71**, 5, 715-718.

Gospe S.M., Saeed D.B. and Zhou S.S. (1994) - The effects of high-dose toluene on embryonic development in rat. *Pediatr Res*, **36**, 6, 811-815.

Gospe S.M. and Zhou S.S. (1998) - Toluene abuse embryopathy: longitudinal neurodevelopmental effects of prenatal exposure to toluene in rats. *Reprod Toxicol*, **12**, 2, 119-126.

Gospe S.M. and Zhou S.S. (2000) - Prenatal exposure to toluene results in abnormal neurogenesis and migration in rat somatosensory cortex. *Pediatr Res*, **47**, 362-368.

Gospe S.M., Zhou S.S., Saeed D.B. and Zeman F.J. (1996) - Development of a rat model of toluene-abuse embryopathy. *Pediatr Res*, **40**, 1, 82-87.

Hansch C. and Leo A.J. (1979) - substitute constants for correlation analysis in chemistry and biology. New York, John Wiley and Sons

Hass U., Lund S.P., Hougaard K.S. and Simonsen L. (1999) - Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol*, **21**, 4, 349-357.

HCR (1992) - Toluene - The effect on the pregnancy of the rat (inhalation exposure). Huntingdon Research Centre (HCR). Huntingdon, England. Report n°APT2/91279.

Hillefors-Berglund M., Liu Y. and von Euler G. (1995) - Persistent, specific and dose-dependent effects of toluene exposure on dopamine D2 agonist binding in the rat caudate-putamen. *Toxicology*, **100**, 1-3, 185-194.

Hougaard K.S., Lund S.P., Hass U. and Simonsen L. (1999) - Effects of prenatal exposure to toluene on postnatal development and behaviour in rats. *Neurotoxicol Teratol*, **21**, 241-250.

Hsieh G.C., Sharma R.P., Parker R.D. and Coulombe R.A., Jr. (1990) - Evaluation of toluene exposure via drinking water on levels of regional brain biogenic monoamines and their metabolites in CD-1 mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, **20**, 2, 175-184.

IARC (1999) - Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide - TolueneLyon, International Agency for Research on Cancer, vol 71, pp. 829-864

Ikeda M. and Otsuji H. (1971) - Phenobarbital-induced protection against toxicity of toluene and benzene in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, **20**, 30-43.

INERIS (2005) - Fiche de données toxicologique et environnementale : Toluène. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. Verneuil en Halatte.

IUCLID (1994) - Toluene. International Uniform Chemical Information Database, European Commission ISPRA. CD-ROM.

Jensen A.A. and Slorach S.A. (1991) - Chemical contaminants in human milkBoca Raton
JOCE (2004) - Commission Directive 2004/73/EC, 29th time Council directive 67/548EEC. *Official Journal of the European Communities*.

Johnson A.C. and Canlon B. (1994) - Progressive hair cell loss induced by toluene exposure. *Hear Res*, **75**, 201-208.

Jone C.M. and Wu A.H.B. (1988) - An unusual case of toluene-induced metabolic acidosis. *Clin Chem*, **34**, 12, 2596-2599.

Jones H.E. and Balster R.L. (1997) - Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of toluene. *Neurotoxicol Teratol*, **19**, 4, 305-313.

Kimura E.T., Ebert D.M. and Dodge P.W. (1971) - Acute toxicity and limits of solvent residue for sixteen organic solvents. *Toxicol Appl Pharmacol*, **19**, 4, 699-704.

Klimisch H.J., Hellwig J. and Hofmann A. (1992) - Studies on the prenatal toxicity of toluene in rabbits following inhalation exposure and proposal of a pregnancy guidance value. *Arch Toxicol*, **66**, 373-381.

Koga K. and Ohmiya Y. (1978) - Potentiation of toluene toxicity by hepatic enzyme inhibition in mice. *J Toxicol Sci*, **3**, 25-30.

Kostas J. and Hotchin J. (1981) - Behavioral effects of low-level exposure to toluene in mice. *Neurobehav Toxicol Teratol*, **3**, 467-469.

Larsen F. and Leira H.L. (1988) - Organic brain syndrome and long-term exposure to toluene: a clinical, psychiatric study of vocationally active printing workers. *J Occup Med*, **30**, 11, 875-878.

Lataye R. and Campo P. (1997) - Combined effects of a simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function. *Neurotoxicol Teratol*, **19**, 5, 373-382.

Lataye R., Campo P. and Loquet G. (1999) - Toluene ototoxicity in rats : Assessment of the frequency of hearing deficit by electrocochleography. *Neurotoxicol Teratol*, **21**, 3, 267-276.

Lide D. (1996) - Handbook of chemistry and physics: TolueneBoca Raton, Florida, CRC Press. 77th

Löf A., Wigaeus Hjelm E., Colmsjö A., Lundmark B.O., Norström A. and Sato A. (1993) - Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after humman exposure to ²H₈-toluene. *Br J Ind Med*, **50**, 55-59.

Loquet G., Campo P. and Lataye R. (1999) - Comparaison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses. *Neurotoxicol Teratol*, **21**, 6, 689-697.

Lundberg I., Hakansson M. and Gustavsson P. (1983) - Relativ leverskadande effekt av 14 organiska lösningmedel vid intraperitoneal injektion på rätta. *Arbete och Hälsa*, **22**, 1-20.

Mackay D., Shiu W.Y. and Ma K.C. (1992) Monoaromatic hydrocarbons, chlorobenzenes and PCB. vol, In: *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*, Eds, 66-73.

McDonald J.C., Lavoie J. and al. e. (1987) - Chemical exposures at work in early pregnancy and congenital defect: A case-referent study. *Br J Ind Med*, **44**, 527-533.

Merck (1989) - Toluene. The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Rahway, N.J., USA, Merck and Co. 11th

Meulenbelt J., De Groot G. and Savelkoul T.J. (1990) - Two cases of acute toluene intoxication. *Br J Ind Med*, **47**, 417-420.

Morata T.C., Dunn D.E., Kretschmer L.W., Lemasters G.K. and Keith R.W. (1993) - Effects of occupational exposure to organic solvents and noise on hearing. *Scand J Work Environ Health*, **19**, 4, 245-254.

Morck H.I., Winkel P. and Gyntelberg F. (1985) - Helbredseffekter af toluenudsaettelse. *Arbejdsmiljofondet, Kobenhavn*, 54pp.

Murata K., Araki S. and Yokoyama K. (1993) - Cardiac autonomic dysfunction in rotogravure printers exposed to toluene in relation to peripheral nerve production. *Ind Health*, **31**, 79-90.

Murata M., Tsujikawa M. and Kawanishi S. (1999) - Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluène may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 2, 478-483.

Nakatsuka H., Watanabe T. and Takeuchi Y. (1992) - Absence of blue-yellow color vision loss among workers exposed to toluene or tetrachloroethylene,mostly at levels below exposure limits. *Int Arch Occup Envriorn Health*, **64**, 113-117.

Neubert D., Gericke C. and Hanke B. (2001) - Multicenter field trial on possible health effects of toluene. II. Cross-sectional evaluation of acute low-level exposure. *Toxicology*, **168**, 139-183.

Ng T.P., Foo S.C. and Yoong T. (1992a) - Menstrual function in workers exposed to toluene. *Br J Ind Med*, **49**, 11, 799-803.

Ng T.P., Foo S.C. and Yoong T. (1992b) - Risk of spontaneous abortion in workers exposed to toluene. *Br J Ind Med*, **49**, 11, 804-808.

Nielsen H.K., Krusell L., Baelum J., Lundqvist G., Omland O., Vaeth M., Husted S.E., Mogensen C.E. and Geday E. (1985) - Renal effects of acute exposure to toluene. A controlled clinical trial. *Acta Med Scand*, **218**, 317-321.

Nise G., Attewell R., Skerfving S. and Orbaek P. (1989) - Elimination of toluene from venous blood and adipose tissue after occupational exposure. *Br J Ind Med*, **46**, 407-411.

NTP (1990) - Toxicology and carcinogenesis studies of toluène (CAS N° 108-88-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). National Toxicology Program. Research Triangle Park, NC. NTP-TR-371 - PB90-256371.

OMS IPCS (1985) - Environmental Health Criteria n° 52 : Toluène. World Health Organisation, International Programme on chemical Safety. <http://www.inchem.org/fulllist.htm>.

Ono A., Sekita K. and Ogawa Y. (1996) - Reproductive and developmental toxicity studies of toluene : II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **15**, 1, 9-20.

Ono A., Sekita K., Ohno K., Hirose A., Ogawa Y., Saito M., Naito K., Kanetko T., Furuya T., Matsumoto K., Tanaka S. and Kurokawa Y. (1995) - Reproductive and developmental toxicity studies of toluene : I. Teratogenicity study of inhalation exposure in pregnant rats. *J Toxicol Sci*, **20**, 109-134.

Orbaek P. and Nise G. (1989) - Neurasthenic complaints and psychometric function of toluene-exposed rotogravure printers. *Am J Ind Med*, **16**, 1, 67-77.

Patel R. and Benjamin J. (1986) - Renal disease associated with toluene inhalation. *Clin Toxicol*, **24**, 3, 213-223.

Pearson M.A., Hoyme H.E., Seaver L.H. and Rimsza M.E. (1994) - Toluene embryopathy: delineation of phenotype and comparison with fetal alcohol syndrome. *Pediatrics*, **93**, 211-215.

Plenge-Bonig A. and Karmaus W. (1999) - Exposure to toluene in the printing industry is associated with subfecundity in women but not in men. *Occup Environ Med*, **56**, 7, 443-448.

Poon R., Chu I., Bjarnason S., Potvin M., Renaud V. and Miller R. (1994) - Inhalation toxicity study of methanol, toluene and methanol/toluene mixture in rats : effects of 28-day exposure. *Toxicol Ind Health*, **10**, 3, 231-245.

Pozzani U.C., Weil C.S. and Carpenter C.P. (1959) - The toxicological basis of threshold limit values: 5. The experimental inhalation of vapor mixtures by rats, with notes upon the relationship between single dose inhalation and single dose oral data. *Amer Ind Hyg Assoc J*, **20**, 364-369.

Price K.S., Waggy G.T. and Conway R.A. (1974) - Brine shrimp bioassay and seawater BOD of petrochemicals. *Journal WPCF*, **46**, 1, 63-77.

Pryor G.T., Rebert C.S., Dickinson J. and Feeney E.M. (1984) - Factors affecting toluene-induced ototoxicity in rats. *Neurobehav Toxicol Teratol*, **6**, 223-238.

Rees D.C., Wood R.W., McCornmick J.P. and Cox C. (1985) - Toxicokinetics of toluene in the rat. *Scand J Work Environ Health*, **11**, 301-306.

Reisin E., Teicher A., Jaffe R. and Eliahou H.E. (1975) - Myoglobinuria and renal failure in toluene poisoning. *Br J Ind Med*, **32**, 2, 163-164.

Riihimäki V. and Pfäffli P. (1978) - Percutaneous absorption of solvent vapors in man. *Scand J Work Environ Health*, **4**, 73-85.

Roberts L.G., Bevans A.C. and Schreiner C.A. (2003) - Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in rat. I. Reproductive toxicity. *Reprod Toxicol*, **17**, 649-658.

Römmelt H., Kessel R. and Pfaller A. (1982) - Rückschlüsse auf die Arbeitsplatzbelastung durch die Bestimmung von Lösungsmittelkonzentration im Vollblut. *Verh Dtsch Ges Arbeitsmed*, **22**, 575-578.

Sato A., Nakajima T., Fujiwara Y. and Hirosawa K. (1974) - Pharmacokinetics of benzene and toluene. *Int Arch Arbeitsmed*, **33**, 169-182.

Smith J.N., Smithies R.H. and Williams R.T. (1954) - Studies in detoxication 55. The metabolism of alkylbenzene. (a) Glucuronic acid excretion following the administration of alkylbenzenes (b) Elimination of toluene in the expired air of rabbits. *Biochem J*, **56**, 317-320.

Smyth H.F., Carpenter C.P., Weil C.S., Pozzani U.C., Striegel J.A. and Nycum J.S. (1969) - Range-finding toxicity data: List VII. *Am Ind Hyg Assoc J*, **30**, 470-476.

Stengel B., Cenee S., Limasset J.-C., Diebold F., Michard D., Druet P. and Hemon D. (1998) - Immunological and renal markers among photogravure printers exposed to toluene. *Scand J Work Environ Health*, **24**, 4, 276-284.

Svensson B.G., Nise G., Erfurth E.M., Nilsson A. and Skerfving S. (1992a) - Hormone status in occupational toluene exposure. *Am J Ind Med*, **22**, 1, 99-107.

Svensson B.G., Nise G., Erfurth E.M., Nilsson A. and Skerfving S. (1992b) - Hormone status in occupational toluene exposure. *Am J Ind Med*, **22**, 1, 99-107.

Svensson B.G., Nise G., Erfurth E.M. and Olsson H. (1992b) - Neuroendocrine effects in printing workers exposed to toluene. *Br J Ind Med*, **49**, 6, 402-408.

Svirbely J.L., Dunn R.C. and Von Oettingen W.F. (1943) - The acute toxicity of vapors of certain solvents containing appreciable amounts of benzene and toluene. *J Ind Hyg Toxicol*, **25**, 366-373.

Taskinen H., Anttila A. and al. e. (1989) - Spontaneous abortions and congenital malformations among wives of men occupationally exposed to organic solvents. *Scand J Work Environ Health*, **15**, 345-352.

Taskinen H., Kyyronen P., Hemminki K., Hoikkala M., Lajunen K. and Lindbohm M.L. (1994) - Laboratory work and pregnancy outcome. *J Occup Med*, **36**, 3, 311-319.

Thiel R. and Chahoud I. (1997) - Postnatal development and behaviour of Wistar rats after prenatal toluene exposure. *Arch Toxicol*, **71**, 4, 258-265.

Ungvary G. (1984) - The possible contribution of industrial chemicals (organic solvents) to the incidence of congenital defects caused by teratogenic drugs and consumer goods. An experimental study. Prevention of physical and mental congenital defects. Part A. The scope of the problem. New York, A.R. Liss Inc

Ungvary G., Tatrai E., Szeberenyi S., Rodics K., Lorincz M. and Bareza G. (1982) - Effect of toluene exposure on the liver under different experimental conditions. *Exp Mol Pathol*, **36**, 3, 347-360.

US EPA (IRIS) (2005) - Toluene - Carcinogenicity Assessment for Lifetime Exposure. U.S. Environmental Protection Agency - Integrated Risk Information System. <http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/>.

Vraca A., Bozicevic D., Karacic V., Fuchs R., Prpic-Majic D. and Malinar M. (1995) - Visual evoked potentials in individuals exposed to long-term low concentrations of toluene. *Arch Toxicol*, **69**, 5, 337-340.

Waldron H.A., Cherry N. and Venables H. (1982) - Solvent exposure and liver function [letter]. *Lancet*, **2**, 8310, 1276.

Withey R.J. and Hall J.W. (1975) - The joint toxic action of perchloroethylene with benzene or toluene in rats. *Toxicology*, **4**, 1, 5-15.

Woiwode W. and Drysch K. (1981) - Experimental exposure to toluene: further consideration of cresol formation in man. *Br J Ind Med*, **38**, 194-197.

Woiwode W., Wodarz R., Drysch K. and Weichardt H. (1979) - Metabolism of toluene in man: Gas-chromatographic determination of o-, m- and p-cresol in urine. *Arch Toxicol*, **43**, 93-98.

Wolf M.A., Rowe V.K., McCollister D.D., Hollingsworth R.L. and Oyen F. (1956) - Toxicological studies of certain alkylated benzenes and benzene. *Arch Ind Health*, **14**, 387-398.

Zavalic M., Mandic Z., Turk R., Bogadi-Sa, Gomzi M. and Skender L.J. (1998b) - Assessment of color vision impairment in male workers exposed to toluene generally above occupational exposure limits. *Occup Med*, **48**, 3, 175-180.

Zavalic M., Mandic Z., Turk R., Bogadi-Sare A. and Plavec D. (1998a) - Quantitative assessment of color vision impairment in workers exposed to toluene. *Am J Ind Med*, **33**, 3, 297-304.

Zavalic M., Mandic Z., Turk R., Bogadi-Sare A., Plavec D. and Skender D.J. (1998c) - Qualitative color vision impairment in toluene-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*, **71**, 194-200.

ANNEXE 3 : PROPOSITION DE CONSTRUCTION DE BENCHMARK DOSES (BMD) POUR LE DnBP, LE LINURON ET L'EGEE.

Les BMD/BMDL ont été construites à partir du logiciel BMDS version 1.3.2., disponible gratuitement sur le site Internet de l'US EPA. Différents modèles mathématiques ont à chaque fois été testés. La méthode d'ajustement du modèle aux données est le maximum de vraisemblance. Le calcul de la BMDL est fondé sur la distribution asymptotique du ratio de vraisemblance (Chi2). Le niveau de confiance associé à la BMDL est systématiquement 95 %.

Calcul des benchmark doses pour le Di-n-butyl phtalate (DnBP)

Etude retenue : Lee et al., 2004.

L'étude retenue, de Lee et al., est de bonne qualité scientifique (respect de lignes directrices autres que l'OCDE, Klimish, classe 1). Des rates, au quinzième jour de gestation (GD15), ont été exposées, via la nourriture, jusqu'au 21^{ème} jour après la parturition (PND21), soit la fin de la lactation. L'alimentation est supplémentée en DBP à des concentrations égales à 0 – 20 – 200 – 2000 et 10000 ppm. Une réduction des spermatocytes testiculaires est constatée à J21 dès la concentration de 20 ppm de même que des changements au niveaux des glandes mammaires des deux sexes : dégénérescence vacuolaire chez le mâle, hypoplasie des bourgeons alvéolaires chez les nouveaux-nés de sexe féminin.

Relation dose-réponse pour la réduction du développement des spermatocytes, et l'altération de la glande mammaire (Lee et al., 2004)

| Exposition (mg/kg/j) | 0.00 | 2.00 | 24.00 | 234.00 | 1137.00 |
|---|------|------|-------|--------|---------|
| Nb animaux étudiés | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Nb animaux présentant une réduction de développement des spermatocytes* | 0 | 4* | 4 | 8 | 8 |
| Nb animaux étudiés | 8 | 8 | 8 | 8 | 10 |
| Nb animaux présentant une altération de la glande mammaire** | 1 | 8** | 6 | 8 | 9 |

* p<0,05 : test de Fischer exact

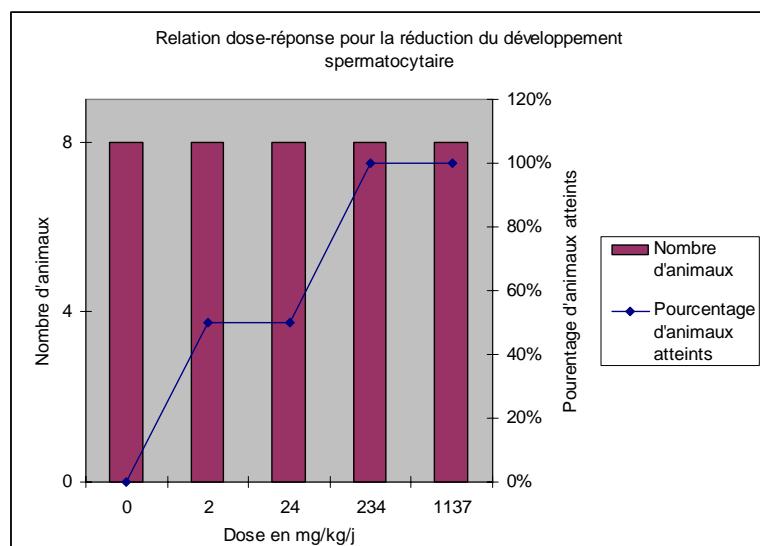
** p<0,01 : test de Fischer exact et Mann-Withney U-test.

Dose critique retenue : Le comité scientifique qui a analysé cette étude note l'impossibilité d'établir un NOAEL, les lésions constatées survenant à la plus petite concentration de 20 ppm dans la nourriture, ce qui correspond à une dose ingérée de 1,5 à 3 mg/kg pc/j. L'effet critique a donc été observé à la plus faible dose et correspond à une **diminution des spermatocytes et des lésions dysplasiques mamelonaires** chez le mâle et la femelle. Le LOAEL de 2 mg/kg pc/j retenu dans cette étude est 30 fois plus faible que ceux d'autres études à exposition plus prolongée. On peut considérer cet effet comme un effet critique reprotoxique pour dériver une VTR orale aiguë (effet sur le développement, population cible : femme enceinte).

Les auteurs ont utilisé plusieurs méthodes d'analyse en fonction des données. Les seuils de 0,05 et de 0,01 ont été retenus pour la significativité des résultats. Les lésions histopathologiques ont été comparées par un test de Fischer exact et la sévérité des lésions histopathologiques avec un test de Mann-Whitney (U)². Aucun NOAEL ne peut être proposé dans cette étude puisqu'un effet significatif a été mis en évidence dès la première dose testée (2 mg/kg/j). On peut simplement préciser que le NOAEL se situe entre 0 et 2 mg/kg/j.

Effet critique retenu : on s'est intéressé à la diminution des spermatocytes. La réponse obtenue dans l'étude de Lee *et al.* est de type dichotomique (effet/absence d'effet).

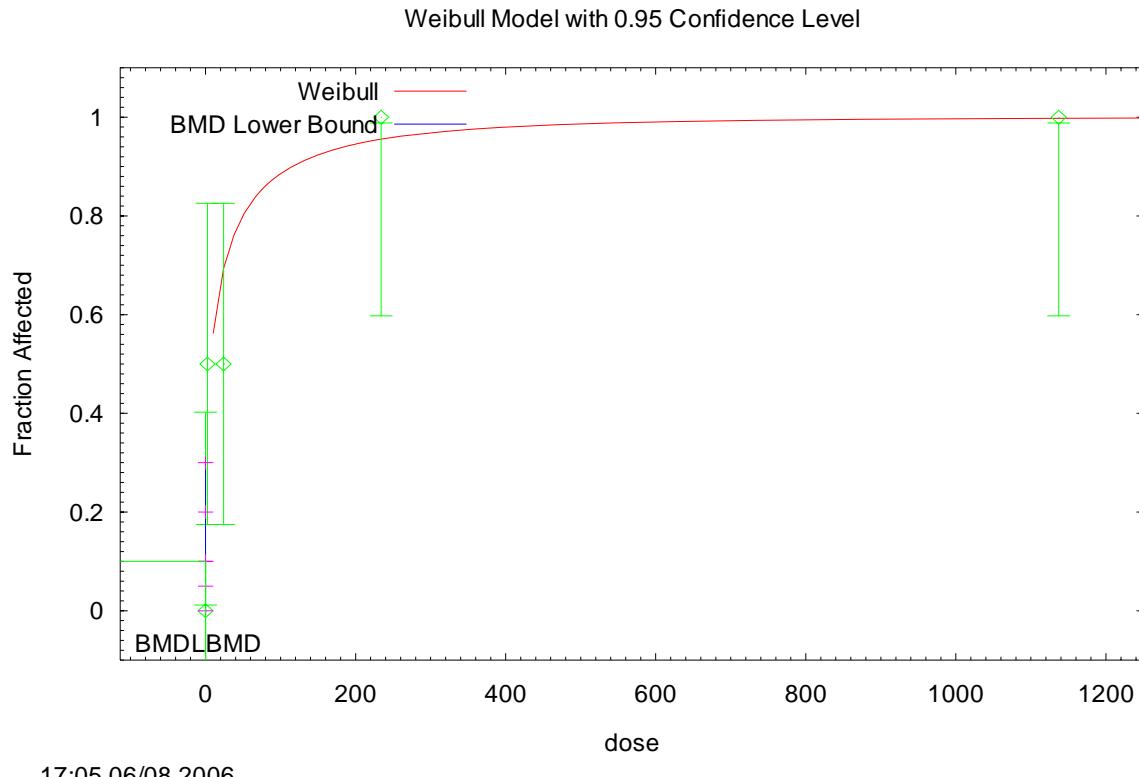
Choix du modèle : Plusieurs modèles ont été testés, dont le modèle gamma et le modèle weibull.



Pour ces modèles, le background a été considéré comme nul. Dans ces deux cas, on a donc ajusté un modèle à deux paramètres sur 4 groupes de doses plus le témoin. Ces modèles (gamma et weibull) s'ajustent bien aux données. Il a été choisi de les retenir tous les deux, mais seuls les résultats du modèle weibull sont présentés ci-dessous.

Choix de la BMR : le choix du niveau de réponse (BMR) pour le calcul de la BMD a été de 10 % en *Extra risk*. En effet, on a déjà 50 % de réponse dans le groupe d'animaux testés à la première dose (4/8, faible nombre d'animaux).

² “Numerical data were analyzed for homogeneity of variance using Bartlett's test. When the variance was homogenous among the groups, a one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out. If a significant difference was found, the mean value for each treatment group was compared to that of the controls using Dunnett's test. When the variance was heterogeneous based on Bartlett's test, the Kruskal-Wallis's H-test was employed to check for differences among the groups. If significant differences were found, a Dunnett-type rank-sum test was performed. The incidences of nipple retention, histopathological lesions and vaginal cyclicity were statistically compared using the Fisher's exact probability test. Severity of histopathological lesions was compared using the Mann-Whitney's Utest”.



Résultats : On obtient une BMD_{10} à **0,08 mg/kg/j** et une $BMDL_{10}$ à **$4,4 \cdot 10^{-5} \text{ mg/kg/j}$** . (les résultats détaillés de l'ensemble de la démarche d'ajustement se trouvent page suivante).

Le LOAEL avait été fixé à **2 mg/kg/j**. Ce LOAEL correspond à une incidence de réponse (pour la réduction du développement spermatocytaire) de 50 %, ce qui est très élevé. Il est donc logique que la BMD_{10} soit très inférieure à ce LOAEL (10 % de réponse). La BMDL est par ailleurs très éloignée de la BMD ; ceci est lié au fait que le nombre de points et le nombre d'animaux testés est faible et le niveau d'effet constaté élevé et éloigné de la BMR retenue (10 %).

Cet exercice montre que la construction d'une Benchmark dose peut être limitée par les données dont on dispose (bien qu'on ait dans ce cas plusieurs groupes de doses). Il aurait fallu disposer d'autres groupes de doses entre 0 et 2 mg/kg/j, avec un nombre d'animaux plus important, afin de réduire l'incertitude existant dans la proposition de la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la dose (BMDL).

Dans ce cas, il ne paraît donc pas pertinent pour la construction de la VTR d'utiliser la BMDL tant sa valeur est faible voire irréaliste. Se pose alors la question de l'utilisation de la BMD versus le LOAEL. Faut-il rejeter l'utilisation de la BMD dont l'effet est estimé faible mais incertain au profit d'un LOAEL dont l'effet est fort et tout aussi incertain. On constate en tout cas que la valeur du LOAEL/10 est encore supérieure à celle de la BMD.

Il semble également nécessaire d'entamer, au vu de ces résultats, une discussion sur la nature de l'effet critique pris en compte : est-il corrélé à l'action des substances anti-androgènes ? Peut-il être, au moins chez l'animal, corrélé à un impact sanitaire précis ? etc.

BMDS MODEL RUN : WEIBULL

The form of the probability function is:

$$P[\text{response}] = \text{background} + (1-\text{background})[1-\text{EXP}(-\text{slope} * \text{dose}^{\text{power}})]$$

Dependent variable = nbeflets

Independent variable = dose

Background parameter is set to zero

Total number of observations = 5

Maximum number of iterations = 250

Relative Function Convergence has been set to: 1e-008

Parameter Convergence has been set to: 1e-008

Default Initial (and Specified) Parameter Values

Background = 0 (specified)

Slope = 0.559728

Power = 0.233322

Asymptotic Correlation Matrix of Parameter Estimates

(*** The model parameter(s) -Background have been estimated at a boundary point, or have been specified by the user, and do not appear in the correlation matrix)

| | Slope | Power |
|-------|-------|-------|
| Slope | 1 | -0.89 |
| Power | -0.89 | 1 |

Parameter Estimates

| Variable | Estimate | Std. Err. |
|----------|----------|-----------|
| Slope | 0.305831 | 0.196136 |
| Power | 0.425121 | 0.169733 |

Analysis of Deviance Table

| Model | Log(likelihood) | Deviance | Test DF | P-value |
|---------------|-----------------|----------|---------|---------|
| Full model | -11.0904 | | | |
| Fitted model | -12.4299 | 2.67899 | 3 | 0.4438 |
| Reduced model | -26.9205 | 31.6602 | 4 | <.0001 |
| AIC: 28.8597 | | | | |

Goodness of Fit

| Dose | Est._Prob. | Expected | Observed | Size | Residual |
|-----------|------------|----------|----------|------|----------|
| 0.0000 | 0.0000 | 0.000 | 0 | 8 | 0 |
| 2.5000 | 0.3633 | 2.907 | 4 | 8 | 0.8038 |
| 24.0000 | 0.6930 | 5.544 | 4 | 8 | -1.184 |
| 234.0000 | 0.9554 | 7.643 | 8 | 8 | 0.6113 |
| 1137.0000 | 0.9977 | 7.982 | 8 | 8 | 0.1348 |

Chi-square = 2.44 DF = 3 P-value = 0.4864

Benchmark Dose Computation

Specified effect = 0.1

Risk Type = Extra risk

Confidence level = 0.95

BMD = 0.0815378

BMDL = 4.40776e-005

Calcul des benchmark doses pour le linuron

Etude retenue : McIntyre, 2000.

L'étude de McIntyre (2000) est de bonne qualité scientifique même si aucune référence aux lignes directrices n'est mentionnée (classification de Klimish = 1d). Des rats en gestation ont été exposés par gavage du 12^{ème} au 21^{ème} jour à 0 - 12,5 - 25 et 50 mg/kg/j de linuron. Chez les descendants mâles (F1), l'incidence d'hypoplasie des testicules et des épididymes augmente dès la première dose testée : 0 % dans le groupe « témoins » et respectivement 3,6 % et 1,8% dans le premier groupe exposé à 12,5 mg/kg/j. Ces taux d'incidence passent respectivement à 11,3 % et 9 % dans le dernier groupe exposé à 50 mg/kg/j. On observe une augmentation dose dépendante du nombre de mamelons conservés mais la différence n'est significative qu'à la plus forte dose (variable continue : pas d'incidence). Sont également en augmentation significative mais uniquement à la plus forte dose, des malformations des épididymes (6,8 %) et une absence de canal déférent (4,5 %).

Relation dose-réponse pour l'hypoplasie des testicules et des épididymes (McIntyre, 2000).

| Exposition (mg/kg/j) | 0.00 | 12.50 | 25.00 | 50.00 |
|--|------|-------|-------|-------|
| Nb animaux étudiés | 57 | 56 | 69 | 44 |
| Nb animaux présentant une hypoplasie des testicules* | 0 | 2 | 8 | 5 |
| Nb animaux présentant une hypoplasie de l'épididyme* | 0 | 1 | 8 | 2 |

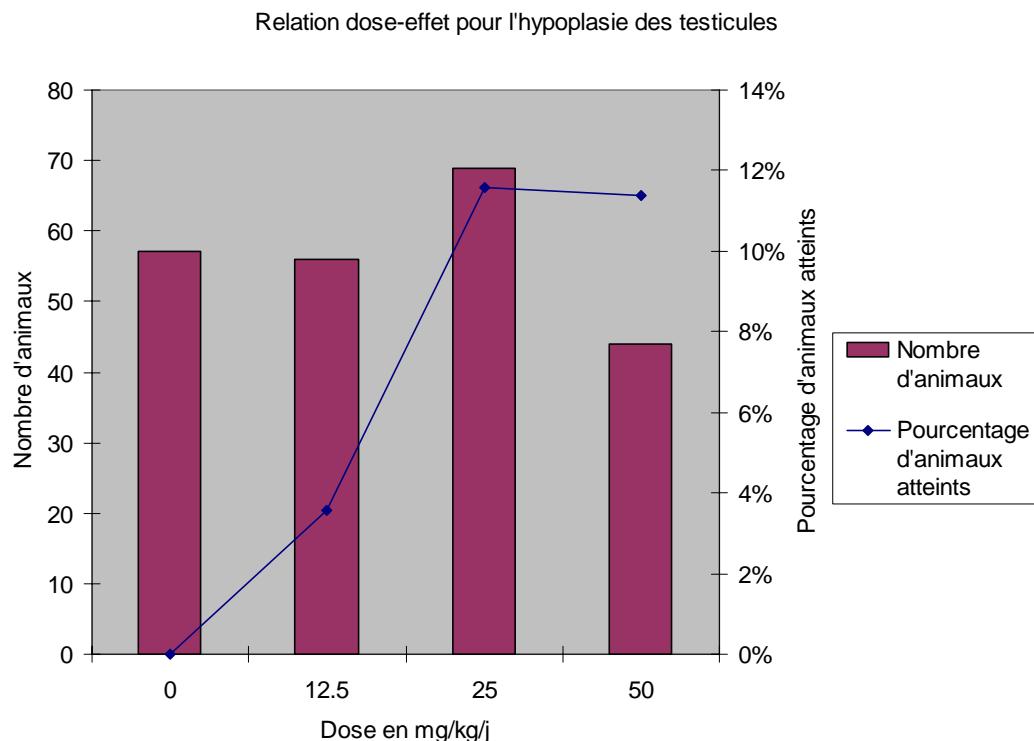
*chez les mâles nouveaux-nés

Dose critique retenue : L'effet critique observé à la plus faible dose est **l'hypoplasie des testicules et des épididymes** avec un LOAEL établi à 12,5 mg/kg/j dans l'étude de McIntyre. Cet effet est observé dans pratiquement toutes les études et dans la même gamme de dose. De plus, l'incidence de cet effet est nulle lorsque les animaux ne sont pas exposés au linuron. On peut donc considérer cet effet comme l'effet critique reprotoxique pour dériver une VTR orale aiguë (effet sur le développement, population cible : femme enceinte). Les auteurs ont utilisé les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA) et d'analyse de la covariance (ANCOVA) suivi d'un test de Dunnett pour tester les effets liés au traitement des animaux par le linuron. Le seuil de 0.05 a été retenu pour la significativité des résultats.

Aucun NOAEL ne peut être proposé dans cette étude puisqu'un effet significatif a été mis en évidence dès la première dose testée (12,5 mg/kg/j). On peut simplement préciser que le NOAEL se situe entre 0 et 12,5 mg/kg/j.

Effet critique retenu : On s'est intéressé à l'hypoplasie des testicules. La réponse obtenue dans l'étude de McIntyre est de type dichotomique (effet/ absence d'effet).

Choix du modèle : Plusieurs modèles d'ajustement des données ont été testés : entre autres les modèles logit et probit, ainsi que les modèles weibull et gamma.

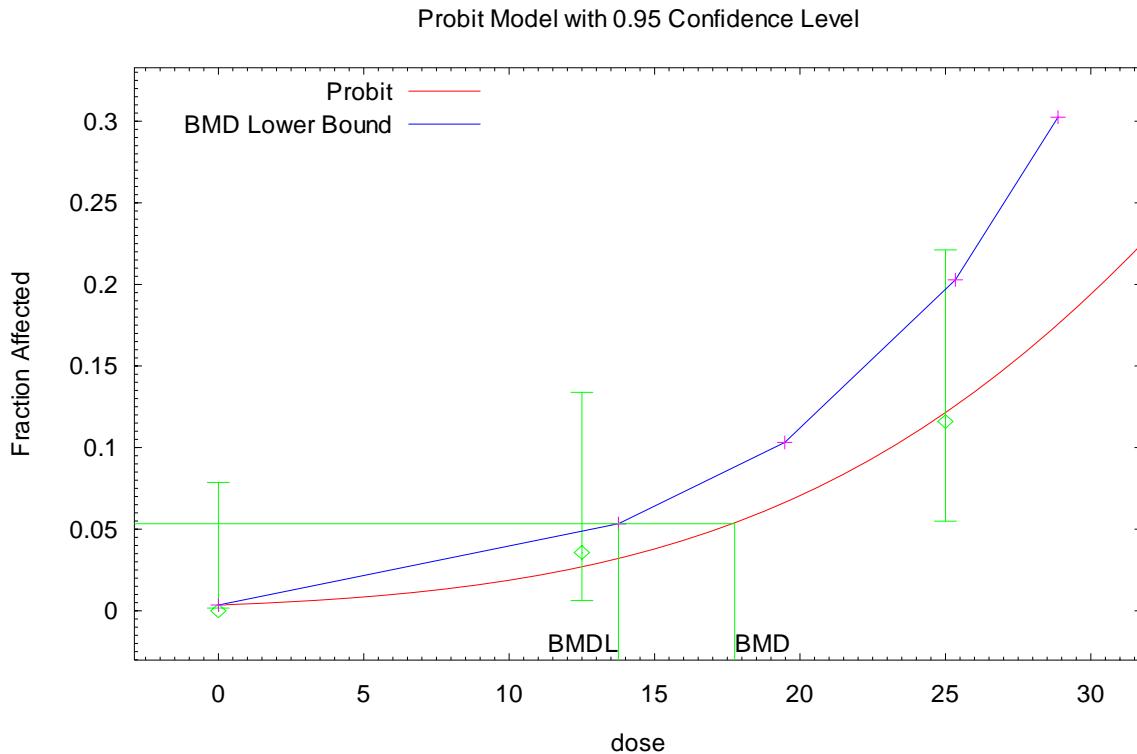


On constate sur le graphique ci-dessus qu'il n'y a pas de différence sur le pourcentage d'animaux atteints entre les doses de 25 et de 50 mg/kg/j. Aucun modèle (parmi ceux testés) ne peut s'ajuster convenablement sur ces données. Le choix a été fait d'éliminer la dose de 50 mg/kg/j pour établir la BMD. L'ajustement des modèles est donc effectué sur deux doses plus un témoin (trois groupes de doses).

Pour les modèles weibull et gamma, le background (la valeur du risque à dose 0) a été considéré comme nul. De ce fait, on ajuste dans les deux cas un modèle à deux paramètres sur deux valeurs de doses (le témoin n'est pas pris en compte puisque le background est nul). Ces modèles s'ajustent parfaitement aux données, mais ce n'est évidemment pas satisfaisant.

Pour les modèles logit et probit, le background n'est pas un paramètre explicite du modèle et ne peut être choisi par l'opérateur : il résulte de l'ajustement. On ajuste donc des modèles à deux paramètres sur trois doses. Ces deux modèles ne s'ajustent pas parfaitement aux données et l'effet à dose 0 n'est pas complètement nul (dans le cas du modèle probit par exemple, il est de 0,35 %) ; néanmoins cette situation (deux paramètres à estimer pour trois doses) est plus satisfaisante (voir compte rendu d'ajustement à la suite de la discussion). Le modèle probit apparaît selon le critère AIC légèrement plus satisfaisant que le modèle logit. C'est donc le modèle probit que nous avons retenu.

Choix de la BMR : Le choix du niveau de réponse (BMR) pour le calcul de la BMD a été de 5% en *extra risk*.



14:52 05/18 2006

Résultats : On obtient une BMD_{05} à **18 mg/kg/j** et une $BMDL_{05}$ à **14 mg/kg/j**.

Le LOAEL avait été fixé à **12,5 mg/kg/j**. Ce LOAEL correspond à une incidence de réponse (pour les hypoplasies testiculaires) de 3,6 % observé. Il est donc logique que la BMD_{05} soit supérieure (5 % de réponse). La $BMDL$ est proche de la BMD .

Le choix de la $BMDL$ plutôt que du LOAEL n'aura dans ce cas pas d'impact sur la valeur finale de la VTR proposée, si l'on choisit une réponse de 5 %. Néanmoins, l'interprétation est très différente : dans un cas ($BMDL$), c'est une valeur dont on est presque sûr qu'elle ne produit pas plus de 5 % d'effet et dans l'autre (LOAEL), c'est une valeur dont on est presque sûr qu'elle produit un effet sans le quantifier précisément. Pour l'évaluateur de risque, comme pour le gestionnaire, cette différence n'est pas anodine.

Ces résultats amène une discussion différente de celle proposée pour le DnBP : les éléments à prendre en compte ici concernent notamment :

- l'existence d'un « bruit de fond » non nul pour ce type d'effet : le modèle probit retenu donne un background à 0,35 %. Cette valeur, très éloignée du niveau d'effet auquel on s'intéresse (5%) n'a évidemment pas ou très peu d'influence sur la valeur de la $BMDL$. Néanmoins, il serait intéressant de savoir si en réalité, en faisant une recherche de témoins historiques par exemple, il est possible d'avoir un background non nul pour ce type d'effet chez les animaux étudiés ;
- le choix du niveau de réponse (ne peut-on prendre 1 % ?), en terme de toxicologie et de santé publique (une réponse à 1 % conduirait à une BMD et une $BMDL$ respectives de 8 et 4 mg/kg/j, néanmoins on s'approche du bruit de fond estimé).

BMDS MODEL RUN : probit model

The form of the probability function is:

$P[\text{response}] = \text{CumNorm}(\text{Intercept} + \text{Slope} * \text{Dose})$, where $\text{CumNorm}(\cdot)$ is the cumulative normal distribution function

Total number of observations = 3

Maximum number of iterations = 250

Relative Function Convergence has been set to: 1e-008

Parameter Convergence has been set to: 1e-008

Default Initial (and Specified) Parameter Values

intercept = -2.71571

slope = 0.0633525

Asymptotic Correlation Matrix of Parameter Estimates

| | intercept | slope |
|-----------|-----------|-------|
| intercept | 1 | -0.95 |
| slope | -0.95 | 1 |

Parameter Estimates

| Variable | Estimate | Std. Err. |
|-----------|-----------|-----------|
| Intercept | -2.69404 | 0.525515 |
| Slope | 0.0608779 | 0.0238413 |

Analysis of Deviance Table

| Model | Log(likelihood) | Deviance | Test DF | P-value |
|---------------|-----------------|----------|---------|----------|
| Full model | -33.3828 | | | |
| Fitted model | -33.6724 | 0.579239 | 1 | 0.4466 |
| Reduced model | -38.7343 | 10.7031 | 2 | 0.004741 |

AIC: 71.3448

Goodness of Fit

| Dose | Est._Prob. | Expected | Observed | Size | Residual |
|---------|------------|----------|----------|------|----------|
| 0.0000 | 0.0035 | 0.201 | 0 | 57 | -0.4493 |
| 12.5000 | 0.0266 | 1.490 | 2 | 56 | 0.4231 |
| 25.0000 | 0.1206 | 8.320 | 8 | 69 | -0.1183 |

Chi-square = 0.39 DF = 1 P-value = 0.5297

Benchmark Dose Computation

| | |
|--------------------|------------|
| Specified effect = | 0.05 |
| Risk Type = | Extra risk |
| Confidence level = | 0.95 |
| BMD = | 17.7546 |
| BMDL = | 13.759 |

Graphic

Calcul des benchmark doses pour le 2-éthoxy-éthanol (EGEE)

Etude retenue : Barbee *et al.*, 1984, pour les effets sur la fertilité ; Doe *et al.*, 1984, pour les effets sur le développement.

Effets sur la fertilité

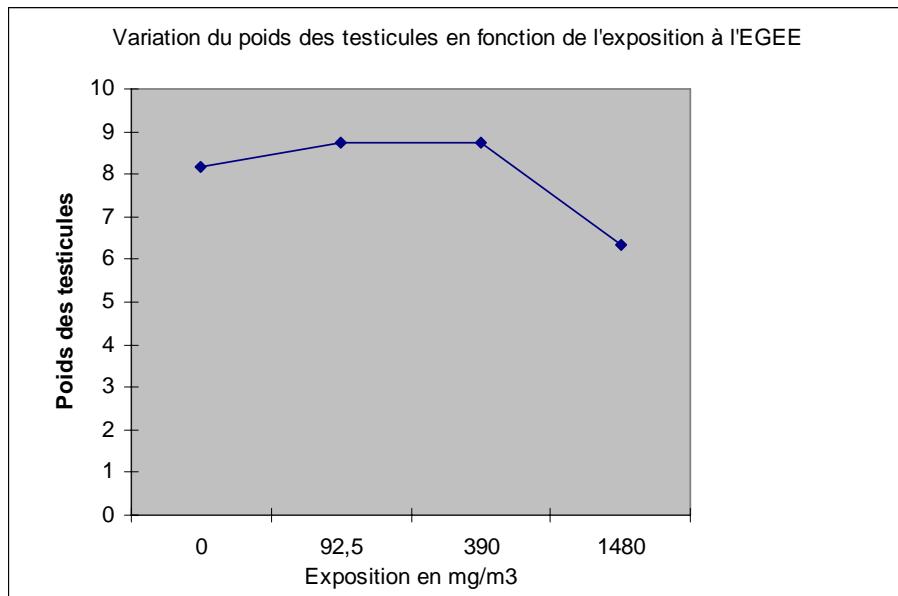
L'étude de Barbee *et al.*, 1984, est de qualité moyenne (Klimish 2e). En effet, l'étude présente des données de qualité acceptable, mais bien qu'elle ait permis de mettre en évidence un effet sur les organes reproducteurs, elle n'a pas été mise en oeuvre pour étudier spécifiquement la reprotoxicité de l'EGEE (il n'y a aucune donnée concernant la fertilité, la gestation, les portées et la lactation). C'est la seule étude disponible qui a investigué les effets sur les gonades masculines après une exposition par inhalation. Dix lapins New Zealand White par sexe et par groupe de dose et 15 rats Sprague-Dawley CD par sexe et par groupe de dose ont été exposés par inhalation 6h par jour et 5 jours par semaine, pendant 13 semaines, à 0 – 25 – 103 et 403 ppm (soit 92,5 ; 390 et 1480 mg/m³) d'EGEE sous forme de vapeurs. Le lapin est l'espèce la plus sensible, pour laquelle une diminution significative du poids corporel chez les 2 sexes à 25 et à 403 ppm a été mise en évidence, mais pas à 103 ppm. Une diminution significative du poids testiculaire a été mise en évidence à 403 ppm. Les observations histopathologiques montrent une dégénérescence focale minime à légère de l'épithélium des tubules séminifères (3/10) sans altération de la spermatogenèse à 403 ppm. A également été observée une anémie périphérique sans altération centrale (absence d'atteinte de l'érythropoïèse), avec augmentation de l'élimination des erythrocytes circulants à 403 ppm. Chez le rat, les effets observés sont non significatifs aux trois concentrations d'exposition.

*Relation dose-réponse pour la diminution du poids testiculaire chez le lapin (Barbee *et al.*, 1984)*

| Exposition (en mg/m ³) | 0 | 92,5 | 390 | 1480 |
|------------------------------------|------|------|------|-------|
| Nombre d'animaux examinés | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Poids des testicules | 8,19 | 8,73 | 8,73 | 6,36* |
| Déviation standard | 0,82 | 1,19 | 0,69 | 0,99 |

* significatif à 1480 mg/m³, p<0,05

Dose critique retenue : L'effet critique observé dans cette étude l'est uniquement chez le lapin, pour la concentration testée la plus forte. Il s'agit d'une **diminution du poids des testicules avec une dégénérescence des tubules séminifères**, sans atteinte de la spermatogenèse. Les auteurs ont utilisé un certain nombre de tests pour comparer les groupes exposés au témoin, incluant : l'analyse de la variance ANOVA, le test de Bartlett, le test de Dunnett, le test de Kruskal-Wallis... Le LOAEL reprotoxique a donc été défini à 403 ppm, soit 1480 mg/m³. Par définition, le NOAEL est de 103 ppm (380 mg/m³). D'autres effets non reprotoxiques (sur le sang) ont également été mis en évidence à 403 ppm. A noter que l'écart entre la concentration correspondant au LOAEL et celle correspondant au NOAEL est grand : 380 contre 1480 mg/m³, soit un rapport d'environ 4. Chez le rat, aucun effet reprotoxique n'a été mis en évidence, aussi le NOAEL est à 403 ppm.



On peut utiliser l'effet sur le poids des testicules pour proposer une VTR reprotoxique par inhalation. Selon le document méthodologique, la durée pourra être aiguë ou subchronique (effet sur la reproduction, population cible : homme).

Compte tenu de la nature de la relation observée entre l'exposition et le poids des testicules, il ne paraît pas pertinent de proposer une BMD/L pour cet effet.

Effets sur le développement

L'étude de Doe *et al.*, 1984 est de qualité moyenne (2e), mais suffisante pour être retenue selon la méthode de construction des VTR reprotoxiques proposées par le groupe de travail de l'AFSSET.

24 lapines Dutch et 24 rates Alpk/AP par groupe de dose ont été exposées par inhalation, 6h par jour, du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation pour les rates et 19^{ème} jour pour les lapines, à 0 – 36,6 – 184 et 920 mg/m³ (rates) et 0 – 36,8 – 184 – 644 mg/m³ (lapines) de vapeurs d'EGEE.

Les observations ont montré une toxicité maternelle pour les rates (diminution significative de l'hémoglobine, de l'hématocrite et du volume des globules rouges à 920 mg/m³) mais pas pour les lapines. Chez la rate, une augmentation marquée du taux de morts intra-utérines tardives et des pertes préimplantatoires, ainsi qu'une diminution du nombre de fœtus en vie dans les portées ont été observées, et sont significatives à 10 et 50 ppm mais pas à 250 ppm. Des effets fœtotoxiques sont mis en évidence et significatifs à 250 ppm (retard de croissance foetale, diminution du poids foetal moyen (lié au retard de croissance), réduction de l'ossification et anomalies mineurs notamment au niveau du squelette).

Chez la lapine, les observations sont plus claires puisque sont mis en évidence chez la progéniture des défauts cardiovasculaires, des défauts de la paroi abdominale, des défauts squelettiques mineurs, des côtes rudimentaires surnuméraires et l'apparition de côtes d'une longueur supérieure à la normale. Ces effets sont significatifs à 175 ppm.

*Relation dose-réponse pour les effets sur le développement (incidence des défauts, notamment squelettiques) (Doe *et al.*, 1984).*

| | | | | |
|---------------------------------|------|------|------|------|
| Exposition (mg/m ³) | 0 | 36,8 | 184 | 644 |
| Nb progénitures examinées | 136 | 138 | 96 | 134 |
| Malformations squelettiques | 44 | 72 | 35 | 87* |
| Variations (nb animaux) | 70 | 84 | 62 | 105* |
| Pourcentage | 51,5 | 60 | 54,6 | 79,1 |

* significatif $p < 0,05$;

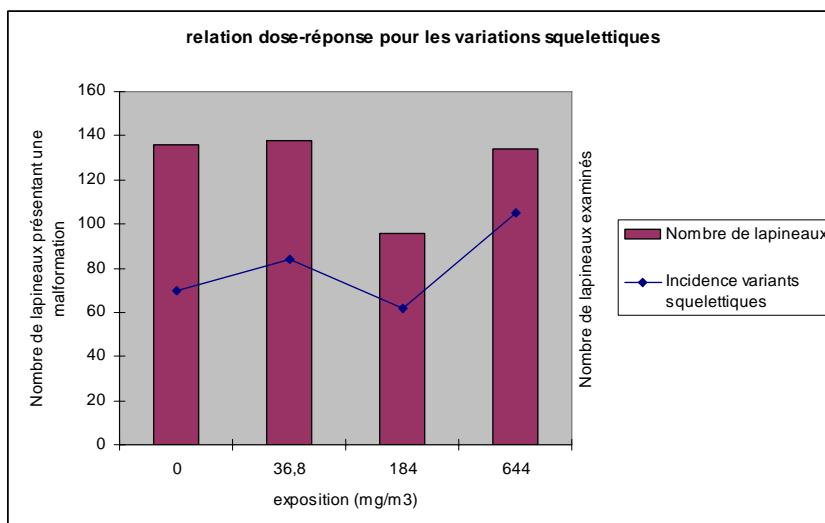
Compte tenu des observations effectuées, il est préférable de retenir, pour la construction d'une BMD, les relations doses-réponses obtenues chez les lapines car il n'y a pas eu de toxicité maternelle et les observations générales sur les mères sont plus claires, notamment en terme de signification statistique.

Dose critique retenue : L'effet critique observé chez les lapines, correspond à une **fœtotoxicité**. En effet, une **augmentation notamment des incidences de défauts squelettiques** (défaut cardiovasculaire, défaut de la paroi abdominale, défauts squelettiques mineurs, côtes rudimentaires surnuméraires et apparition de côtes d'une longueur supérieure à la normale) a été mise en évidence, avec une relation dose-réponse positive (significatif à 175 ppm, la plus forte concentration testée, $p < 0,05$). Le LOAEL a de ce fait été établi à 644 mg/m³. Par définition, le NOAEL est la concentration qui précède, et correspond à 184 mg/m³.

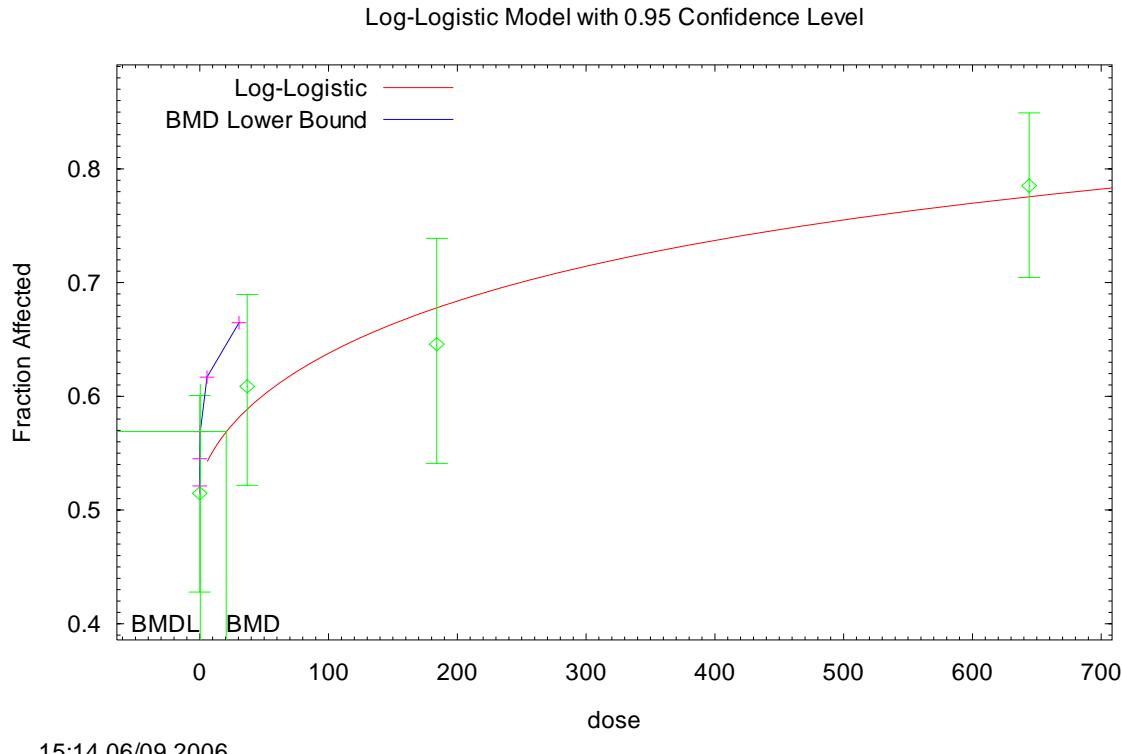
On peut donc considérer cet effet comme l'effet critique reprotoxique pour dériver une VTR respiratoire aiguë (effet sur le développement, population cible : femme enceinte). Les analyses statistiques utilisées par les auteurs ne sont pas précisées dans l'article.

Effet critique retenu : On s'est intéressé à la fœtotoxicité induite par l'EGEE. La réponse obtenue dans l'étude de Doe *et al.*, 1984, est de type dichotomique (nombre d'animaux atteints de malformations mineures, squelettiques ou viscérales, et pourcentage).

Choix du modèle : Plusieurs modèles d'ajustement des données ont été testés, dont les modèles logit et probit.



Choix de la BMR : Le choix du niveau de réponse (BMR) pour le calcul de la BMD a été de 10% en *extra risk*.



Résultats : On obtient une BMD_{10} à **20,5 mg/m³** et une $BMDL_{10}$ à **0,37 mg/m³**.

Le LOAEL avait été fixé à **644 mg/m³** et le NOAEL à **184 mg/m³**. Le LOAEL correspond à une incidence de réponse, pour les variations squelettiques, de 70 % observé, sachant qu'il y a environ 50 % des animaux qui présentent des malformations dans le groupe témoin. Il est donc logique que la BMD_{10} , en *extra risk*, qui correspond à un niveau d'effet de 55 % soit bien inférieure au LOAEL proposé. Par ailleurs, la BMDL est éloignée de la BMD (presque de deux ordres de grandeur).

Ce double phénomène est lié d'une part au très haut niveau d'effet constaté sur le témoin et d'autre part à la variabilité de l'effet (dents de scie) constatée sur les premières doses. On peut s'interroger sur le choix de cet effet critique pour l'élaboration d'une VTR.

BMDS MODEL RUN : Log logistic

The form of the probability function is:

$$P[\text{response}] = \text{background} + (1-\text{background})/[1+\text{EXP}(-\text{intercept}-\text{slope}^*\text{Log(dose)})]$$

| | |
|-----------------------------------|---|
| Dependent variable = ske2 | Total number of observations = 4 |
| Independent variable = dose | Maximum number of iterations = 250 |
| Slope parameter is not restricted | Relative Function Convergence has been set to: 1e-008 |
| | Parameter Convergence has been set to: 1e-008 |

User has chosen the log transformed model

Default Initial Parameter Values

| | |
|--------------|----------|
| background = | 0.514706 |
| intercept = | -3.60614 |
| slope = | 0.564421 |

Asymptotic Correlation Matrix of Parameter Estimates

| | background | intercept | slope |
|------------|------------|-----------|-------|
| background | 1 | -0.64 | 0.57 |
| intercept | -0.64 | 1 | -0.99 |
| slope | 0.57 | -0.99 | 1 |

Parameter Estimates

| Variable | Estimate | Std. Err. |
|------------|----------|-----------|
| Background | 0.521073 | 0.0446247 |
| Intercept | -4.23843 | 2.09489 |
| Slope | 0.675373 | 0.329534 |

Analysis of Deviance Table

| Model | Log(likelihood) | Deviance | Test DF | P-value |
|---------------|-----------------|----------|---------|---------|
| Full model | -319.211 | | | |
| Fitted model | -319.596 | 0.768837 | 1 | 0.3806 |
| Reduced model | -330.66 | 22.8984 | 3 | <.0001 |
| AIC: | 645.191 | | | |

Goodness of Fit

| Dose | Est._Prob. | Expected | Observed | Size | Residual |
|----------|------------|----------|----------|------|----------|
| 0.0000 | 0.5211 | 70.866 | 70 | 136 | -0.1486 |
| 36.8000 | 0.5888 | 81.256 | 84 | 138 | 0.4747 |
| 184.0000 | 0.6783 | 65.112 | 62 | 96 | -0.6799 |
| 644.0000 | 0.7760 | 104.766 | 106 | 135 | 0.2548 |

Chi-square = 0.77 DF = 1 P-value = 0.3788

Benchmark Dose Computation

| | |
|--------------------|------------|
| Specified effect = | 0.1 |
| Risk Type = | Extra risk |
| Confidence level = | 0.95 |
| BMD = | 20.5391 |
| BMDL = | 0.366044 |