



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1  
FACULTE DE PHARMACIE  
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2016

THESE n°4

**THESE**

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 29 janvier 2016

par

M<sup>lle</sup> TERROT Laure

Née le 2 mai 1988

à Lyon

\*\*\*\*\*

**Evaluation de la toxicité de molécules présentes dans les  
plantes en vue d'une utilisation de leurs extraits dans les  
produits cosmétiques**

\*\*\*\*\*

JURY

Mme PAYEN Léa, Professeur

Mr FOUILLET Bruno, Maître de Conférences

Mr BARET Jean-Marie, Docteur en Pharmacie

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. François-Noël GILLY
- Vice Président du Conseil d'Administration M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président de la Commission Recherche M. Germain GILLET
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire M. Philippe LALLE

### Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

#### SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Jérôme ETIENNE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

#### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

**ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon**  
**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET  
PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)  
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)  
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)  
Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)  
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**  
Monsieur François LOCHER (PU – PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)
- **ECONOMIE DE LA SANTE**  
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)  
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**  
Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)
- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**  
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**  
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)  
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)  
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)  
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)  
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)  
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)

Madame Léa PAYEN (PU-PH)

Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)

Monsieur Daniel BENZONI (Pr)

Madame Kiao Ling LIU (MCU)

Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)

Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)

Monsieur Roger BESANCON (MCU)

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)

Madame Evelyne CHANUT (MCU)

Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)

Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)

Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A**

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)

Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)

Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)

Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)

Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)

Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)

Madame Florence MORFIN (PU – PH)

Monsieur Didier BLAHA (MCU)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)

Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)

Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)

Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)

Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)

Madame Emilie BLOND (MCU-PH)



Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Charlotte BOUARD (86<sup>ème</sup> section)  
Madame Laure-Estelle CASSAGNES (85<sup>ème</sup> section)  
Monsieur Karim MILADI (85<sup>ème</sup> section)  
Madame Laurence PAGES (87<sup>ème</sup> section)

**Pr** : Professeur

**PU-PH** : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**MCU** : Maître de Conférences des Universités

**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

**HDR** : Habilitation à Diriger des Recherches

**AHU** : Assistant Hospitalier Universitaire

**PAST** : Personnel Associé Temps Partiel

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier particulièrement les membres de mon jury.

Léa Payen,

Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Lyon.

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être à la fois mon directeur du jury et mon président de thèse. Pour les relectures précieuses et les nombreux conseils.*

Bruno Fouillet,

Maître de conférences en toxicologie.

*Pour m'avoir donné goût à la toxicologie au cours de l'I2 de 5ème année.*

Jean-Marie Baret,

Pharmacien toxicologue, responsable du service des Affaires réglementaires et évaluation de la sécurité chez les laboratoires Clarins.

*Pour m'avoir d'abord permis de réaliser le stage de master 2 au sein de son équipe.*

*Pour tous ses conseils au cours du stage mais également après.*

*Pour m'avoir donné envie de travailler au sein de l'industrie cosmétique.*

Mais également à :

Véronique Goncalves,

Responsable de l'évaluation des matières premières chez les laboratoires Clarins.

*Pour son accompagnement tout au long du stage, ses conseils, son expertise des matières premières et sa sympathie qui ont fait de ce stage une expérience enrichissante et agréable.*

Je remercie également tous ceux qui m'ont accompagnée et encouragée au cours de ces longues études.

Ma mère,

*Merci d'avoir cru en moi jusqu'au bout.*

*Merci pour ses encouragements et ses nombreuses relectures.*

Ma grand-mère,

*Merci pour ses nombreux petits plats cuisinés qui m'ont permis d'avoir assez de forces pour mener à terme ce long voyage.*

Mes frères,

*Pour m'avoir appris beaucoup de choses, fait partager leurs expériences et m'avoir forgé le caractère.*

Et toute ma famille (cousins, cousines, oncles, tantes).

*Pour tous les moments passés ensemble qui sont toujours riches en rires.*

A ma binôme, Maudinette,

*Pour nos nombreuses heures de TP qui pouvaient être parfois très animées.*

Mes potes pharma : Aurou, Flo, Pierre, Maggie, Marion,

*Pour tous ces bons moments partagés avec eux, qui rendent ces études inoubliables et qui nous lient pour la vie.*

Mais aussi à tous les autres : Lydie, Karine, Charlotte, Quitterie,

*Merci tout simplement d'être là à mes côtés dans les bons moments comme dans les mauvais.*

*À mon père*

## **Sommaire**

Liste des abréviations .....	16
Liste des figures.....	19
Liste des tableaux .....	20
1. INTRODUCTION.....	21
2. OBJECTIFS .....	22
3. Définition, contexte réglementaire .....	24
3.1. Définitions .....	24
3.1.1. D'un produit cosmétique.....	24
3.1.2. D'un ingrédient cosmétique .....	24
3.2. Cadre réglementaire .....	25
4. LA DEMARCHE D'EVALUATION DE LA SECURITE POUR LES MATIERES PREMIERES/INGREDIENTS COSMETIQUES.....	30
4.1. Evaluation de la sécurité des ingrédients cosmétiques .....	30
4.1.1. L'identification du risque .....	31
4.1.2. L'évaluation de la dose-réponse.....	37
4.1.3. L'évaluation de l'exposition.....	38
4.1.4. La caractérisation du risque.....	40
4.1.5. Conclusion.....	41
4.2. Le seuil de préoccupation toxicologique .....	42
5. LES METHODES ALTERNATIVES DISPONIBLES EN COSMETIQUE .....	43
5.1. Définition et contexte réglementaire.....	43
5.2. EURL ECVAM.....	45
5.3. Validation des méthodes alternatives.....	45
5.4. Les méthodes alternatives disponibles en cosmétiques, validées ou non .....	48
5.4.1. Tests d'irritation et de corrosion cutanée .....	48
5.4.2. Tests d'irritation et de corrosion oculaire .....	53

5.4.3. Tests de phototoxicité.....	58
5.4.4. Tests de sensibilisation.....	59
5.4.5. Tests de toxicité aiguë.....	65
5.4.6. Tests de mutagénèse/génotoxicité.....	66
5.4.7. Tests de cancérogénicité.....	67
5.4.8. Tests de reprotoxicité.....	68
5.4.9. Tests de toxicité répétée.....	69
5.4.10. Les QSARs et le read-across.....	69
6. EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES CONTENUES DANS LES PLANTES.....	71
6.1. But.....	71
6.2. Matériels et méthodes.....	72
6.2.1. Outils informatiques et bases de données.....	72
6.2.2. Les ouvrages.....	76
6.2.3. Les logiciels.....	78
6.2.4. Méthodes.....	78
6.3. Résultats.....	81
6.4. Exemple de trois molécules présentes dans les extraits de plante.....	88
6.4.1. La quercétine.....	88
6.4.2. L'acide chlorogénique.....	99
6.4.3. L'apigénine.....	106
7. Exemple de l'évaluation d'une plante pour l'utilisation d'un de ces extraits en cosmétique.....	111
7.1. Principes.....	111
7.2. Exemple de <i>Cola nitida</i> .....	112
7.2.1. Informations générales.....	112
7.2.2 Usages connus.....	112
7.2.3. Etudes scientifiques.....	113

7.2.4. Etudes toxicologiques .....	113
7.2.5. Substances présentes .....	114
7.2.6. Conclusion.....	116
Conclusion générale et perspectives.....	117
Bibliographie .....	119
Annexes .....	130



## Liste des abréviations

AMM	:	Autorisation de Mise sur le Marché
Ansm	:	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ATSDR	:	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BCOP	:	Bovine Corneal Opacity and Permeability
BMD	:	Bench Mark Dose
BPF	:	Bonnes Pratiques de Fabrication
BPL	:	Bonnes Pratiques de Laboratoire
BPS	:	Phosphate Buffered Saline
CAS	:	Chemical Abstracts Service
CIR	:	Cosmetic Ingredient Review
CLP	:	Classification, Labeling, Packaging
CMR	:	Cancérogène, Mutagène, reprotoxique
CoE	:	Council of Europe
CPNP	:	Cosmetic Products Notification Portal
CPRS	:	Cosmetic Product Safety Report
DIP	:	Dossier Information Produit
DL50	:	Dose létale entraînant la mort de 50% des animaux
DPRA	:	Direct Peptide Reactivity Assay
ECHA	:	European Chemical Agency
ECVAM	:	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EFSA	:	European Food Safety Authority
EINECS	:	European Inventory of Existing Commercial chemical Substances
ELINCS	:	European List of Notified Chemical Substances
EPA	:	Environmental Protection Agency
EPI	:	Estimation Program Interface

ESIS	:	European Chemical Substances Information System
FDA	:	Food and Drug Administration
FEMA	:	Federal Emergency Management Agency
h-CLAT	:	human Cell Line Activation Test
HE	:	Huile Essentielle
HERA	:	Human & Environmental Risk Assessment
HET-CAM	:	Hen's Egg Test on the Chorio-allantoic Membrane
IARC	:	International Agency for Research on Cancer
ICE	:	Isolated Chicken Eye
ICH	:	International Conference on Harmonisation
INCI	:	International Nomenclature of Cosmetic Ingredient
INERIS	:	Institut national de l'Environnement Industriel et des Risques
INRS	:	Institut national de Recherche et de Sécurité
IUPAC	:	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	:	Joint Expert Committee on Food Additives
LLNA	:	Local Lymph Node Assay
LOAEL	:	Lowest Observed Adverse Effect Level
MoS	:	Marge of Safety
MUSST	:	Myeloid U397 Skin Sensitization Test
Log P	:	Coefficient de partage
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
NICNAS	:	National Industrial chemicals Notification an Assessment Scheme
NLM	:	National Library of Medicine
NOAEL	:	No Observed Adverse Effect Level
NOEL	:	No Observed Effect Level
NTP	:	National Toxicology Program

OCDE	:	Organization for Economic Co-operation and development
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PAO	:	Période après ouverture
PCPC	:	Personal Care Products Council
QSAR	:	Qualitative Structure-Activity Relationship
REACH	:	Registration, Evaluation, Authorization of CHemicals
RTECS	:	Registry of Toxic Effects of Chemicals Substances
SCCS	:	Scientific Committee on the Consumer Safety
SED	:	Systemic Exposure Dosage
TEHIP	:	Toxicology and Environmental Health Information Program

## Liste des figures

Figure 1 : Les différentes étapes de développement d'une nouvelle méthode alternative de la phase de recherche à l'acceptation réglementaire, d'après Biola –Videmment, 2013 (25) .....	47
Figure 2 : Principe du Corrositex noncellular membrane, d'après Cazedey, 2009 (31) .....	51
Figure 3 : Table de classification d'une substance corrosive après utilisation du Corrositex noncellular membrane. Groupe I : fort danger, groupe II : danger moyen, groupe III : danger faible, d'après Cazedey, 2009 (31) .....	51
Figure 4 : Principales étapes du test d'irritation cutanée Episkin <sup>®</sup> , d'après Lelièvre, 2007 (32) .....	52
Figure 5 : Description schématique de l'approche dite « Bottom-up » et « Top-down », d'après IIVS (38) .....	58
Figure 6 : Mécanisme de la sensibilisation cutanée et méthodes d'évaluation, d'après Quantin, 2015 (42) .....	61
Figure 7 : Schéma explicatif du fonctionnement du test DPRA, d'après Intertek (43) .....	62
Figure 8 : Schéma explicatif du fonctionnement du test KeratinoSens, d'après IIVS (46) .....	63
Figure 9 : Méthode de détection de molécules sensibilisantes grâce au test h-CLAT, d'après Casati, 2013 (41) .....	64
Figure 10 : Schéma explicatif de test MUSST, d'après Ovigne (48) .....	64
Figure 11 : Choix du cas 1 ou 2 en fonction des données toxicologiques disponibles dans la littérature .....	82
Figure 12 : Logigramme permettant d'évaluer la toxicité d'une substance en .....	85
Figure 13 : Logigramme permettant d'évaluer la toxicité d'une substance en absence de données toxicologiques .....	87
Figure 14 : Structure de la quercétine, d'après Wikipedia (56) .....	89
Figure 15 : Structure de l'acide chlorogénique, d'après Wikipedia (76) .....	100
Figure 16 : Structure de l'apigénine, d'après Wikipedia (92) .....	106
Figure 17 : Représentation schématique de <i>Cola nitida</i> et photos de ces graines, d'après wikipédia (108) .....	112

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Quantité journalière de produits cosmétiques appliquée par catégorie de produits, d'après SCCS, 2012 (11).....	39
Tableau 2 : Méthodes <i>in vitro</i> validées par l'ECVAM pour la corrosion cutanée, d'après EURL ECVAM (22).....	50
Tableau 3 : Méthodes <i>in vitro</i> validées par l'ECVAM pour l'irritation cutanée, d'après EURL ECVAM (22).....	52
Tableau 4 : Détermination de l'index d'irritation, d'après l'OCDE, 2009 (35).....	55
Tableau 5 : Détermination du score d'irritation, d'après ICCVAM, 2010 (36).....	56
Tableau 6 : Modèle de prédiction cysteine 1:10/lysine 1:50, d'après OECD, 2015 (45)....	62
Tableau 7 : Teneur en quercétine dans différentes plantes alimentaires, d'après Wikipedia (56) .....	90
Tableau 8 : Exemple d'hétérosides, 3-O-glycosides, de la quercétine, d'après Wikipedia (56) .....	91
Tableau 9 : Résultats des différents tests de mutagénicité/génotoxicité qui ont été réalisés pour la quercétine, d'après IARC, 1999 (53). .....	94
Tableau 10 : Principales sources d'acide chlorogénique dans les plantes, d'après Wikipedia (76) .....	100

## 1. INTRODUCTION

Les cosmétiques existent depuis toujours. A la préhistoire, les Hommes utilisaient déjà de la peinture pour le corps ; au temps des pharaons, les égyptiens fabriquaient du maquillage et des huiles parfumées. Les cosmétiques ont évolué au cours de l'histoire, mais il faut attendre le début de l'industrialisation au XIX<sup>ème</sup> siècle pour voir apparaître la cosmétique telle qu'on la connaît aujourd'hui.

La réglementation européenne sur les produits cosmétiques est, quant à elle, très récente. Elle apparaît à la suite de l'affaire du talc Morhange en 1972. Quatre ans plus tard, en 1976, la directive du Conseil n°76/768/CEE du 27 juillet 1976 voit le jour (1). Depuis son adoption, la directive a été modifiée 7 fois afin de refléter les tendances et les défis concernant les produits cosmétiques. Depuis le 11 juillet 2013, la directive a laissé sa place au règlement (CE) 1223/2009 (2).

Garantir l'innocuité des produits cosmétiques est une obligation réglementaire mais aussi un engagement des entreprises cosmétiques. L'évaluation de la toxicité d'un ingrédient intervient très tôt dans le développement du produit et dure tout au long de sa vie.

Par ailleurs, les consommateurs sont de plus en plus exigeants concernant l'efficacité des cosmétiques. Il faut faire preuve d'innovation et de recherche pour mettre au point de nouveaux actifs. Les plantes semblent être une source inépuisable de matières premières disponibles pour l'industrie aussi bien cosmétique que pharmaceutique. Cependant, ce n'est pas parce que la matière première est naturelle qu'elle est dépourvue de toute toxicité. Bien au contraire, les plantes renferment un grand nombre de molécules très actives qui peuvent être fatales pour l'Homme, si mal employées.

C'est pour cela qu'il est important de connaître au mieux les différentes molécules que l'on peut rencontrer dans les plantes pour les utiliser sans danger.

Essayer de mieux connaître la toxicité des molécules présentes dans les plantes a été ma mission au cours des 6 mois de stage effectués dans les Laboratoires Clarins. C'est également le sujet de cette thèse car je pense qu'il est important que cette expertise soit faite afin de garantir aux utilisateurs, des produits sans danger pour leur santé, tout en garantissant leur efficacité. Bien entendu il s'agit d'un travail long et ce n'est pas seulement en 6 mois qu'il a pu être mené à terme, mais c'est un début...

D'un un premier temps, les objectifs de ce travail seront expliqués. Le cadre réglementaire des produits cosmétiques sera ensuite défini, ainsi que la méthode d'évaluation des ingrédients. Afin de permettre cette évaluation, je détaillerai les méthodes alternatives qui sont disponibles pour la réaliser au mieux. Enfin, je parlerai plus précisément du cas particulier des plantes et de leurs extraits, qui sont des mélanges complexes pour lesquels, dans la majorité des cas, peu de données toxicologiques sont disponibles. Je terminerai par quelques exemples pour mettre en évidence ce qui a pu être expliqué avant.

## 2. OBJECTIFS

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de mon mémoire de stage, stage effectué dans le cadre de la 6<sup>ème</sup> année de Pharmacie et du Master 2 « Toxicologie humaine, évaluation des risques et vigilance » de la faculté de Pharmacie de Paris XI, sous la responsabilité du Professeur Marc PALLARDY.

J'ai réalisé ce stage, d'une durée de 6 mois, au sein du service des Affaires Réglementaires et Evaluation de la Sécurité (ARES) des Laboratoires Clarins. Le service a pour but de garantir aux consommateurs la sécurité et la conformité des produits cosmétiques.

Au sein du service, ma mission a été d'élaborer une base de données regroupant des informations sur la toxicité de molécules présentes dans les plantes. Cette base a pour objectif de faciliter l'évaluation toxicologique des extraits de plante, en vue de leur utilisation dans des produits cosmétiques.

Cette mission prend toute son importance sachant que les extraits de plante sont de plus en plus utilisés dans les produits cosmétiques car ils renferment de nombreuses substances actives, mais aussi parce que les produits naturels sont à la mode. Cette mode et cet engouement pour le « naturel » provient en partie du fait que dans l'esprit de beaucoup de personnes, une confusion est faite entre les termes plantes / nature / innocuité en opposition à chimie / industrie / danger. Alors que la plupart du temps la chimie et les industries chimiques copient la nature pour s'inspirer de ses mécanismes. Ainsi, ce qui est chimique n'est pas forcément dangereux et ce qui est naturel n'est pas forcément sans danger.

L'industrie cosmétique n'est pas la seule touchée par ce phénomène du « tout naturel ». En effet, depuis plusieurs années déjà, on a pu voir l'essor des compléments alimentaires ou de la santé par les plantes. L'utilisation de plus en plus courante des plantes dans notre vie

de tous les jours n'est pas forcément une mauvaise chose, à partir du moment où cela est contrôlé et évalué, afin de limiter les abus et de garantir la sécurité du consommateur.

Ainsi, de plus en plus de fabricants de cosmétiques revendiquent la présence de ces matières premières naturelles dans leurs produits afin de répondre aux exigences du consommateur.

Inutile de rappeler l'impact de la cosmétologie sur l'Homme. Notre peau, l'organe le plus étendu du corps humain, en contact avec le monde extérieur, est le premier moyen de défense contre ces agressions et est ainsi mise à rude épreuve. De plus en plus, les hommes rejoignent les femmes dans le besoin, la nécessité et le plaisir d'en prendre soin.

Comme tout ingrédient entrant dans la composition d'un produit cosmétique, les plantes doivent faire l'objet d'une évaluation toxicologique. Cependant, il peut s'avérer très difficile de définir un profil toxicologique complet pour ce type de matière première car un extrait de plante ou une huile essentielle ne représentent pas une seule molécule, comme le sont les produits de synthèse, mais sont constitués d'un mélange complexe de substances. Certaines de ces molécules peuvent être nocives pour l'Homme. Il est donc important de les connaître et de les caractériser au mieux, afin d'utiliser dans les produits cosmétiques des extraits ne les contenant pas ou à des taux acceptables estimés sans danger pour la santé humaine.

De part la complexité des plantes, de leur nombre considérable et du nombre de molécules qu'elles peuvent synthétiser, il est sûrement impossible de connaître et d'évaluer toutes ces substances. De plus, dans une démarche d'innovation, les entreprises cosmétiques veulent utiliser des plantes peu connues, qui sont très peu caractérisées et dont les molécules qu'elles renferment sont également très mal documentées.

Cependant, il est important de pouvoir pointer du doigt certaines molécules toxiques ou certaines familles de substances afin de les rechercher systématiquement dans les extraits. C'est cette mission qui m'a été donnée au cours de ce stage et que j'ai essayé de réaliser du mieux possible avec enthousiasme et un grand intérêt durant 6 mois.

D'ailleurs, depuis, je travaille toujours dans ce domaine où j'ai pu développer mes connaissances et ainsi enrichir mon travail initial.



### 3. Définition, contexte réglementaire

#### 3.1. Définitions

##### 3.1.1. D'un produit cosmétique

Selon l'article 2 du Règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil de l'Europe du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques (appelé plus couramment règlement cosmétique), un produit cosmétique est défini comme « toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles » (2).

Cette définition ne prend donc pas en compte les produits destinés à être ingérés, inhalés, injectés ou implantés dans l'organisme, même s'ils revendiquent également une action sur la peau, les dents, la muqueuse buccale ou les phanères. Ainsi, un produit destiné à être ingéré et revendiquant un effet améliorant le bronzage n'est pas un produit cosmétique mais un complément alimentaire.

Elle s'oppose à celle du médicament par présentation au sens de l'article L.5111-1 du code de la santé publique (3), car un produit cosmétique ne peut pas être présenté comme ayant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. Ainsi, aucun risque lié à l'utilisation d'un produit cosmétique n'est toléré, à l'inverse du médicament où la balance bénéfice/risque est prise en compte.

##### 3.1.2. D'un ingrédient cosmétique

Un ingrédient cosmétique peut être défini comme toute substance ou mélange d'origine naturelle ou synthétique, utilisé dans la formulation d'un produit cosmétique. Un ingrédient cosmétique peut être (4; 5) :

- Une substance chimique bien définie avec une formule moléculaire et structurale,
- Un mélange complexe, nécessitant une définition claire, et correspondant souvent à un mélange de substances inconnues ou de composition variable,
- Un mélange des deux premiers énoncés.

Une substance est définie par le règlement cosmétique (Article 2) comme « un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenue par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour en préserver la stabilité et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ou modifier sa composition » (2; 5).

Un mélange est quant à lui défini comme « un mélange ou une solution composé de deux substances ou plus » (2; 5).

Ainsi, un extrait de plante ou une huile essentielle peuvent être des ingrédients cosmétiques, correspondant à un mélange complexe d'origine naturelle.

### 3.2. Cadre réglementaire

Comme nous l'avons déjà relevé, les cosmétiques existent depuis plusieurs siècles mais c'est seulement à partir du début du XX<sup>ème</sup> siècle qu'ils connaissent un essor considérable. A cette époque, il n'y a aucun texte réglementaire en France spécifique aux produits cosmétiques. Il faudra attendre les années 70, avec l'affaire du talc Morhange qui fut responsable de la mort de 36 bébés et de l'intoxication de 168 autres, pour que les autorités se penchent sur la question des produits cosmétiques et de leur réglementation. C'est ainsi que la Directive du conseil n°76/768/CEE du 27 juillet 1976, qui régissait la composition, l'étiquetage et l'emballage des produits cosmétiques finis dans l'Union européenne, voit le jour (1). Cette directive européenne nécessitait d'être transposée dans le droit national de chaque pays membre. Cependant, en France, il faudra attendre 1998 pour la voir transposée et être à l'origine de la Loi n°98 535 du 1<sup>er</sup> juillet 1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'Homme.

La directive européenne a beaucoup évolué pour suivre l'effervescence des produits de beauté. En plus de 30 ans, elle a subi 7 amendements et adaptations techniques (5). La dernière modification est la Directive du Conseil n°2003/15/CE du 27 février 2003 (6).

Afin d'harmoniser au mieux la réglementation de ces produits dans toute l'Union Européenne, la Directive 76/768/CEE du 27 juillet 1976 a laissé place, depuis le 11 juillet 2013, au Règlement (CE) n°1223/2009, qui s'impose donc directement aux Etats membres sans avoir à être transcrit dans les droits nationaux : il est directement applicables dans tous les Etats membres. Il a été publié au Journal Officiel de l'Union Européenne le 22 décembre 2009 (2). C'est seulement à la date du 11 juillet 2013 qu'il devient effectif et que

tous les produits cosmétiques doivent être conformes à ce nouveau règlement. Le concept et le contenu général par rapport à la directive sont maintenus. La principale modification porte sur l'instauration d'une évaluation sur la sécurité (CPSR ou Cosmetic Product Safety Report) (5; 7).

En effet, ce nouveau règlement précise à l'article L.5131-4 du code de la santé publique que : « les produits cosmétiques mis sur le marché ne doivent pas nuire à la santé humaine lorsqu'ils sont appliqués dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation compte tenu, notamment, de la présentation du produit, des mentions portées sur l'étiquetage ainsi que toutes autres informations destinées aux consommateurs » (8; 2).

C'est pourquoi la composition du dossier cosmétique a changé. Les principales modifications par rapport à la directive portent sur la constitution d'un dossier d'information sur le produit (DIP) qui s'articule autour du rapport sur la sécurité. Le DIP et le rapport sur la sécurité seront détaillés plus loin.

Un produit cosmétique est donc un produit réglementé, bien qu'il ne fasse pas l'objet d'une autorisation préalable à leur mise sur le marché (AMM), en opposition aux médicaments, qui nécessitent une telle démarche.

Ainsi, tous les produits cosmétiques sont réglementés :

- par le règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques depuis le 11 juillet 2013, à l'exception de certaines dispositions qui ont été applicables avant cette date. Les annexes de ce règlement sont régulièrement mises à jour par des règlements de la Commission Européenne ;
- par le code de la santé publique (CSP), notamment les articles L.5131-1 à L. 5131-8 et L. 5431-1 à L.5431-9 issus de la loi n° 2014-201 du 24 février 2014 portant diverses dispositions d'adaptation au droit de l'Union Européenne dans le domaine de la santé (article 3, I et II).

La mise sur le marché d'un produit cosmétique nécessite (2) :

- Sa notification auprès des Centres Antipoison, désormais réalisable via le nouveau système européen de notification électronique (CPNP : Cosmetic Products Notification Portal),
- La constitution d'un dossier d'information produit : le dossier cosmétique (article R.5131-2 du Code de la santé publique),

- Une actualisation permanente de ce dossier cosmétique,
- La mention d'informations obligatoires sur l'étiquetage.

Le DIP est un dossier regroupant toutes les informations portant sur le produit cosmétique. Il doit être établi pour chaque produit fini mis sur le marché. Il est structuré autour du rapport d'évaluation de la sécurité.

Le contenu du DIP est précisé à l'article 11 du règlement cosmétique. Ce dossier comprend les informations suivantes (7; 5; 2) :

- « une description du produit cosmétique, incluant sa formule qualitative et quantitative, son nom exact, les noms de code, d'identification ou de formule permettant d'identifier sans ambiguïté le produit et d'établir un lien clair entre le produit cosmétique et son DIP.
- le rapport sur la sécurité du produit cosmétique établi conformément à l'annexe I du règlement cosmétique.
- une description de la méthode de fabrication et de conditionnement ainsi qu'une déclaration de conformité aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) visées à l'article 8. Cette description comporte notamment la description des conditions de fabrication et de contrôles conformes aux BPF, ainsi que la durée de conservation du produit et la méthode utilisée pour la déterminer.
- les preuves de l'effet revendiqué lorsque la nature ou l'effet du produit le justifie.
- les données relatives aux expérimentations animales réalisées par le fabricant, ses agents ou fournisseurs et relatives au développement ou à l'évaluation de la sécurité du produit cosmétique ou de ses ingrédients, y compris toute expérimentation animale réalisée pour satisfaire aux exigences législatives ou réglementaires de pays tiers ou effectuée au titre d'une autre législation ou réglementation (REACH...). »

Le DIP est à actualiser avec les informations pertinentes recueillies au fur et à mesure de la vie du produit. Il doit être disponible pour les autorités compétentes sous format électronique (ou autre) à l'adresse indiquée sur l'emballage du produit, dans une langue facilement compréhensible par l'autorité compétente. Il doit être gardé 10 ans après la mise sur le marché du dernier lot (5).

Le rapport sur la sécurité est un rapport d'expert. Il doit être établi conformément à l'annexe 1 du règlement cosmétique. Il doit contenir au minimum toutes les données

indiquées dans l'annexe 1. Si certaines données ne sont pas renseignées, ce manque doit être justifié (par exemple non réalisation du challenge test car produit anhydre) (5).

Ce rapport se divise en deux parties (voir Annexe 1) :

- Partie A : Information sur la sécurité du produit cosmétique,
- Partie B : Evaluation de la sécurité du produit cosmétique.

La partie A, composée de 10 points clairement définis par le règlement cosmétique, vise à rassembler les données nécessaires pour identifier et quantifier, à partir des dangers identifiés, les risques qu'un produit cosmétique peut présenter pour la santé humaine. Il s'agit plus simplement d'une compilation de données en vue de l'analyse du risque (2; 5; 7). Les 10 points à renseigner sont :

1. Formule quantitative et qualitative du produit cosmétique : la composition complète du produit doit être indiquée ainsi que la quantité précise de chaque matière première.
2. Caractéristiques physiques/chimiques et stabilité du produit cosmétique : permet de déterminer, si dans des conditions raisonnablement prévisibles de stockage, la stabilité du produit affecte sa sécurité et sa qualité. Cela permet également de déterminer une durabilité minimale et une période minimale après ouverture (PAO).
3. Qualité microbiologique : vise à déterminer les spécifications microbiologiques acceptables selon le type de produit. Selon les parties du corps sur lequel il est appliqué (contour des yeux, muqueuses), ou la population cible (enfants), les spécifications ne seront pas les mêmes.
4. Impuretés, traces, informations concernant le matériau d'emballage : afin d'évaluer si le produit ne contient pas de substances qui n'auraient pas été ajoutées intentionnellement à la formule et qui pourraient avoir un impact sur la sécurité du produit. Les informations concernant le matériau d'emballage sont également importantes car certaines substances peuvent migrer de l'emballage au produit.
5. Utilisation normale et raisonnablement prévisible : permet de déterminer un scénario d'exposition pertinent.
6. Exposition au produit cosmétique : afin de quantifier la quantité de produit qui va être appliquée dans la cadre d'une utilisation normale ou raisonnablement prévisible pour chaque utilisation et la fréquence d'utilisation.

7. Exposition aux substances : permet d'évaluer le risque pour chaque substance, individuellement. Cette exposition dépend de la concentration de la substance dans le produit fini et de l'exposition à ce produit.
8. Profil toxicologique des substances : permet de décrire le danger toxicologique de chaque substance présente dans le produit fini, de déterminer l'exposition potentielle et d'établir une caractérisation des risques.
9. Effets indésirables et effets indésirables graves : permet de surveiller la sécurité du produit fini après sa mise sur le marché et de mettre en place des mesures correctives, si nécessaire.
10. Informations sur le produit cosmétique : regroupe toutes autres informations non répertoriées dans les rubriques précédentes mais étant considérées comme pertinentes pour l'évaluation de la sécurité du produit, comme par exemple les tests pré-cliniques et cliniques qui ont été réalisés.

Le point n°8 est celui qui nous intéresse le plus car il stipule que le profil toxicologique des substances entrant dans la composition du produit doit être renseigné. Une attention particulière doit être portée sur la toxicité locale (irritation cutanée et oculaire, sensibilisation et phototoxicité) mais la toxicité systémique doit aussi être évaluée.

De plus, le point n°7 indique que l'exposition à ces substances doit être indiquée, notamment par le calcul des marges de sécurité. Ceci dépend de l'exposition au produit cosmétique (selon le ou les sites d'application, la quantité de produit appliquée, la fréquence d'application, la population visée).

La partie B se divise en 4 points et doit impérativement être rédigée par une personne compétente, à savoir un pharmacien, un médecin ou un toxicologue, enregistrée à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) (2; 5; 9). Les 4 points sont :

1. Conclusion de l'évaluation : déclaration sur la sécurité du produit cosmétique au regard des exigences de sécurité de l'article 3 du règlement européen. Cette conclusion indique si le produit est sûr, sûr avec des restrictions, ou non sûr pour la santé humaine, dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'emploi.

2. Avertissements et instructions d'utilisation figurant sur l'étiquette : les précautions particulières à observer lors de l'utilisation doivent être listées explicitement.
3. Raisonnement : il s'agit du cœur de l'évaluation de la sécurité ; il explique clairement et précisément comment l'évaluateur de la sécurité est arrivé à ses conclusions sur la sécurité du produit cosmétique.
4. Références de la personne chargée de l'évaluation et approbation de la partie B : l'évaluateur de la sécurité doit être un professionnel ayant les connaissances et l'expertise nécessaires pour faire une évaluation de la sécurité précise. La preuve de la qualification de l'évaluateur de la sécurité doit être produite.

Cette partie correspond à l'évaluation sur la sécurité à proprement parlé. Elle doit permettre de donner une conclusion concernant le produit cosmétique. Cette évaluation doit prendre en compte tous les dangers identifiés dans la partie A ainsi que l'exposition attendue du produit (5). Elle repose, entre autre, sur le calcul des marges de sécurité pour chaque ingrédient entrant dans la formule. Le rapport doit être établi de manière transparente, argumentée et facile à comprendre (9).

Ainsi, la sécurité des produits cosmétiques repose sur celle des ingrédients. Les maîtres mots de cette évaluation des ingrédients sont : profils toxicologiques, structures chimiques et exposition (usage) (10).

#### 4. LA DEMARCHE D'EVALUATION DE LA SECURITE POUR LES MATIERES PREMIERES/INGREDIENTS COSMETIQUES

##### 4.1. Evaluation de la sécurité des ingrédients cosmétiques

La sécurité d'un produit cosmétique est, en premier, basée sur la sécurité des ingrédients qui le composent. Cette sécurité est évaluée grâce aux données toxicologiques (11; 4). C'est pourquoi, il est nécessaire de réaliser le profil toxicologique de chaque ingrédient entrant dans la formule d'un produit cosmétique.

Pour nous guider dans cette démarche d'évaluation de la sécurité des ingrédients cosmétiques, un guide a été rédigé par le SCCS : the SCCS'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation. En 2012, parait la 8<sup>ème</sup> révision.

La 9<sup>ème</sup> révision est ouverte à commentaires depuis décembre 2015 (11; 4). La version finale devrait être publiée en début d'années 2016.

La procédure d'évaluation du risque d'un ingrédient cosmétique est basée sur les principes généraux d'évaluation du risque habituellement utilisée pour les ingrédients pharmaceutiques ou les additifs alimentaires (11). Elle se divise en 4 parties :

- L'identification du risque,
- L'évaluation de la dose-réponse,
- L'évaluation de l'exposition,
- La caractérisation du risque.

#### 4.1.1. L'identification du risque

Cette étape a pour but d'identifier si une substance est potentiellement toxique pour la santé humaine. Elle se base sur les résultats des propriétés physico-chimiques intrinsèques à la molécule et les propriétés toxicologiques. Les résultats des tests *in vivo* et *in vitro*, des études cliniques, d'épidémiologie humaine ou encore des études de relation structure-activité (QSARs, méthodes *in silico*) seront étudiés (11). Les tests et méthodes couramment utilisés seront détaillés plus loin.

Il s'agit d'une étape de caractérisation de la substance ou du mélange, qui consiste à regrouper le maximum de données sur l'ingrédient étudié (12).

Les données physico-chimiques sont des informations cruciales car elles peuvent prédire certaines propriétés toxicologiques. L'évaluation d'une substance ou d'un mélange doit prendre en compte automatiquement les informations suivantes (11; 12; 9) :

- L'identité chimique : l'ingrédient doit être désigné par son nom chimique, son nom INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredient), par son numéro CAS et EINECS / ELINCS et sa structure. Dans le cas d'une substance naturelle ou d'un extrait provenant d'une plante, le nom latin de la plante selon la nomenclature binomiale, son origine, la partie utilisée, la méthode d'extraction et les étapes de purification doivent être précisés. Ces données doivent permettre d'identifier clairement l'ingrédient.
- La forme physique (poudre, pâte, liquide, nanoparticule, composé volatil) : cette donnée permet notamment d'identifier des substances à risque comme les poudres ou les composés volatiles qui peuvent être inhalés.



- Le poids moléculaire : il doit être donné en Dalton (Da). Dans le cas d'un mélange, le poids moléculaire de chaque constituant devrait être fourni. Cette information permet d'estimer le taux de pénétration cutanée. En effet, une molécule à haut poids moléculaire (> 500 Da) sera moins susceptible de passer à travers les différentes couches cutanées. Cette valeur est à combiner avec le coefficient de partage.
- La caractérisation et la pureté de la molécule : le degré de pureté doit être précisé.
- La caractérisation des impuretés ou des contaminants (comme par exemple les métaux lourds ou les monomères) : il est primordial de connaître la nature des impuretés pouvant être présentes ainsi que leur concentration car certaines peuvent être interdites ou limitées dans les ingrédients cosmétiques (comme les CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique) ou dangereuses pour la santé humaine. Il faudra alors définir un niveau de risque acceptable pour ces substances. Des limites acceptables peuvent être fournies dans des documents de référence, tels que les monographies des Pharmacopées, les lignes directrices ICH Q3C ou encore les publications du CIR (Cosmetic Ingredient Review : organisme scientifique américain qui publie les résultats de ses évaluations sur la sécurité d'utilisation des ingrédients à usage cosmétique), ou par certaines agences comme l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : comité international d'experts scientifiques sur les additifs alimentaires).
- La solubilité : cette donnée est surtout utile en formulation.
- Le coefficient de partage éthanol / eau (log P) : sa valeur doit être fournie pour un pH et une température donnés. Il peut également être estimé par une méthode de calcul. Il permet d'estimer le caractère hydrophile ou lipophile d'une substance et d'estimer, en combinaison avec le poids moléculaire, le taux d'absorption cutanée. En effet, une substance très hydrophile (log P < -1) ou très lipophile (log P > 4) ne sera pas ou peu susceptible de passer la barrière cutanée.
- Autres informations pertinentes (propriétés organoleptiques, point de fusion, état physique).
- L'homogénéité et la stabilité : les études de stabilité de l'ingrédient doivent être fournies, dans les conditions de stockage.

- Le spectre d'absorption dans l'UV-visible : il permet d'identifier un risque de phototoxicité. Une absence d'absorption dans l'UV écarte un tel risque. Le cas échéant, il sera conseillé de réaliser des tests complémentaires.
- La composition en isomères : selon les isomères présents ou non, la toxicité peut être différente.
- Les fonctions ou les utilisations dans le produit fini.

Toutes ces informations doivent obligatoirement être présentes dans le dossier toxicologique.

Le profil toxicologique complet de l'ingrédient cosmétique doit également être renseigné. Les tests de toxicité qui doivent être réalisés sont les suivants (12; 11; 13; 9) :

- Toxicité aiguë (orale, inhalation et dermale) : c'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques, résultant d'une exposition de courte durée à une substance (12). L'étude de la toxicité aiguë a pour but de prévoir les dangers pour l'Homme en cas d'une exposition massive, d'évaluer la dose létale et de connaître les organes cibles. Ces études permettent ainsi de classer une molécule selon sa toxicité : très toxique, toxique ou nocif selon le CLP, notamment en fonction de la valeur de la dose létale induisant la mort de 50% des animaux (DL50). La toxicité aiguë est toutefois d'un intérêt limité et ne permet pas d'en déduire une toxicité chronique.

Avant la mise en place des méthodes alternatives, le test couramment utilisé est selon la méthode OCDE 401 (3 à 5 doses testées sur des groupes de 5 à 10 animaux, le plus souvent des rats). Maintenant d'autres méthodes *in vivo* ont été développées, utilisant un nombre réduit d'animaux, mais également des méthodes *in vitro* ou étudiant la relation structure / activité (QSAR).

- Irritation et corrosivité (cutanée et oculaire) : permet de classer la molécule selon son degré de corrosion et d'irritation (catégorie 1 = corrosif, catégorie 2 = irritant). Les produits cosmétiques étant majoritairement appliqués sur la peau, cette information est primordiale pour en déduire la tolérance locale. En fonction de ces résultats, la molécule ne sera pas forcément interdite dans un produit, mais la concentration sera limitée ainsi que son utilisation, par exemple l'usage dans des produits contour des yeux non souhaitée. Les tests de corrosion cutanée ont pour but de déterminer le potentiel de l'ingrédient à causer des dommages irréversibles

de la peau, alors que les tests d'irritation cutanée déterminent le potentiel de l'ingrédient à induire des lésions réversibles.

- Sensibilisation cutanée : permet de détecter les substances pouvant induire une réaction de sensibilisation après un contact cutané. Ces substances doivent être limitées dans les produits cosmétiques. De manière générale, l'utilisation de molécules susceptibles de causer des réactions allergiques doit être limitée.
- Absorption dermique percutanée (Dap) : un produit cosmétique doit avoir une action locale. Il ne doit pas être retrouvé dans la circulation sanguine et donc ne pas avoir une action systémique. C'est pourquoi, il est important d'estimer la pénétration cutanée. Un certain nombre de facteurs peuvent jouer un rôle sur l'absorption cutanée d'une substance, tels que sa lipophilie, son poids moléculaire, l'épaisseur de la peau (qui dépend du site d'application), la quantité de produit appliqué et la concentration du composé dans le produit, un phénomène d'occlusion (par exemple application sous les aisselles). Des études *in vivo* et *in vitro* permettent d'estimer le taux d'absorption cutanée attendu. Lorsqu'aucune étude n'est disponible, le taux utilisé par défaut sera de 100%. Mais dans certains cas particuliers un taux de 10% pourra être admis : lorsque le poids moléculaire de la substance est supérieur à 500 Da et le log P inférieur à -1 ou supérieur à 4 (14). Le taux d'absorption cutanée permettra par la suite de déterminer la dose systémique d'exposition et ainsi de calculer la marge de sécurité.
- Toxicité à doses répétées (toxicité subaiguë, subchronique, chronique) : les études de toxicité à doses répétées permettent de mettre en évidence les effets toxiques secondaires à l'administration d'un ingrédient (exceptés les effets sur la reproduction, la cancérogénèse, la génotoxicité), résultant d'une prise quotidienne, sur plusieurs semaines. Ces études peuvent être menées par voie orale ou cutanée ou par inhalation. Les études les plus utilisées sont celles de 28 et 90 jours par voie orale sur les rongeurs. Le rat est l'espèce la plus couramment utilisée. Ces études donnent une bonne indication des organes cibles et du type de toxicité systémique. Quand ils sont disponibles, ces tests de toxicité à doses répétées mettent en évidence la dose la plus forte pour laquelle il n'y a aucun effet secondaire observé (NOAEL) ou la dose la plus faible pour laquelle apparaît un effet secondaire (LOAEL). Ces valeurs sont nécessaires pour évaluer la relation entre la dose et la réponse. Elles permettent également le calcul des marges de sécurité. Quand cela est possible il est préférable d'utiliser les résultats des études de 90 jours ou plus.

Le cas échéant, ceux des études de 28 jours pourront être utilisés mais un facteur de sécurité devra être appliqué pour le calcul des marges de sécurité.

- Mutagénicité/génotoxicité : les produits cosmétiques peuvent être utilisés tous les jours pendant plusieurs années, il est donc important de connaître le potentiel mutagène et génotoxique des molécules entrant dans leur composition. La mutagénicité réfère à la capacité d'une substance d'induire des modifications stables et irréversibles du patrimoine génétique, transmissibles de division cellulaire en division cellulaire. La génotoxicité est la capacité des substances d'interagir avec l'ADN et/ou la machinerie cellulaire qui maintient l'intégrité du génome. Le SCCS recommande donc d'évaluer ces potentiels à l'aide de 2 tests *in vitro*, réalisés chaque fois, en présence et en absence d'activateurs métaboliques (le S9 mix est le plus utilisé) (15; 16) :
  - un test de mutation génique : un test de mutation reverse sur bactérie (test réalisé sur 5 souches de *Salmonella typhimurium* le plus souvent : test d'Ames, guideline OCDE 471)-;
  - un test de clastogénicité et aneugénicité : le test du micronoyau *in vitro* (guideline OCDE 487).

Dans le cas où tous les résultats des différents tests sont négatifs, un potentiel mutagénique peut être exclu. Par contre, il suffit qu'un de ces tests soit positif, pour que la molécule puisse être considérée comme un mutagène intrinsèque potentiel. Dans ce dernier cas, il est conseillé de réaliser d'autres tests afin de confirmer le potentiel mutagène de la substance. Les tests supplémentaires qui peuvent alors être réalisés sont un test du comète sur cellules de mammifère ou utilisant un modèle 3D de peau humaine reconstruite.

Contrairement aux études réalisées pour un actif pharmaceutique, les études recommandées par le SCCS ne comportent pas d'étude *in vivo*. Cela résulte de l'interdiction de l'expérimentation animale sur le territoire européen depuis le 11 mars 2013, pour les ingrédients cosmétiques.

Le potentiel génotoxique d'un ingrédient peut également faire l'objet d'une analyse préliminaire théorique basée sur sa structure chimique (QSAR). Cette analyse peut permettre de mettre en évidence des structures d'alerte (12).

Dans certains cas particuliers, il peut être conseillé de réaliser un autre test *in vitro* : lorsqu'un ingrédient présente une structure d'alerte, qu'il est susceptible d'être utilisé à long terme ou de faire l'objet d'une exposition systémique importante.

C'est le cas par exemple des colorants d'oxydation utilisés dans les colorants capillaires pour lesquels l'Afssaps recommande de réaliser un test supplémentaire (12).

- Carcinogénicité : pour les mêmes raisons que la mutagénicité, il est important de connaître le potentiel carcinogène d'un ingrédient cosmétique. Une substance est considérée cancérigène si elle est susceptible d'induire des tumeurs ou d'augmenter leur incidence. Cependant, il n'existe pas encore de méthodes alternatives aux tests sur animaux. La prédiction de ce potentiel peut être estimée à l'aide des logiciels de structure-activité : QSAR. Des méthodes *in vitro* sont en cours de développement.
- Reprotoxicité : des tests de reprotoxicité doivent également être réalisés. Cependant, à partir du moment où la molécule ne traverse pas la peau, il y a très peu de risque qu'il y ait un effet toxique sur la reproduction et le développement du fœtus. Ainsi, l'absence d'étude de reprotoxicité pourra être justifiée dans ce cas là. Mais il devrait être indispensable de réaliser de telles études pour un ingrédient fortement absorbé par la barrière cutanée ou pouvant être ingéré, comme un ingrédient présent dans un rouge à lèvres. Comme pour la cancérogénèse il n'existe pas encore de méthodes *in vitro* validées.

Il est important de noter que l'utilisation d'une molécule classée CMR (Cancérogène, Mutagène ou toxique pour la Reproduction) de catégorie 1, 2 ou 3 selon la directive des substances dangereuses (DSD) ou 1A, 1B et 2 selon le CLP est interdite dans les produits cosmétiques (11). Cependant, une substance de catégorie 3 selon la DSD ou 2 selon le CLP peut éventuellement avoir une autorisation sous réserve de son évaluation et de son approbation par le SCCS (12).

- Etudes toxicocinétiques : ces études regroupent des études d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination de la substance. La métabolisation est un critère important car le métabolite synthétisé peut avoir un potentiel toxique.
- Phototoxicité et photosensibilisation : les produits cosmétiques étant appliqués sur la peau, il est indispensable de connaître leur potentiel phototoxique. Dans un premier temps, il s'agira de réaliser le spectre d'absorption dans l'UV-visible. Seulement si la molécule absorbe dans l'UV, un test de phototoxicité sera réalisé, le test 3T3 NRU (Neutral Red Uptake). Dans le cas de résultats positifs, la molécule ne devra pas être présente dans des produits solaires.

- Photomutagénicité et photoclastogénicité : comme précédemment une substance n'absorbant pas dans l'UV ne présentera pas de potentiel photomutagène et photoclastogène. Dans le cas contraire des tests de mutagénèse/génotoxicité en présence d'UV pourront être réalisés.
- Données humaines : avant toute mise sur le marché, le produit fini doit être appliqué à un panel d'individu afin de vérifier la compatibilité cutanée du produit et s'assurer qu'il n'y a pas d'effets dangereux après application sur la peau pour la première fois. De plus, les produits sont suivis après leur mise sur le marché. Tous les effets indésirables sont traités par la cosmétovigilance et ces données sont rendues disponibles à l'évaluateur de la sécurité.

Remarque : depuis le 11 mars 2009, les tests sur animaux pour évaluer les ingrédients et les produits cosmétiques sont interdits. Lorsque des données *in vivo* sur l'animal sont disponibles, elles peuvent, et doivent même, être utilisées pour évaluer le potentiel toxique de l'ingrédient cosmétique. Cependant, il n'est plus possible de réaliser de nouveaux tests sur l'animal depuis cette date. Les méthodes alternatives doivent être utilisées. Cependant, elles ne sont pas disponibles dans tous les domaines, comme la cancérogénèse, la toxicité à doses répétées... Il peut donc être très difficile d'évaluer le danger intrinsèque d'un nouvel ingrédient.

#### 4.1.2. L'évaluation de la dose-réponse

Cette partie a pour but d'évaluer la relation entre la dose administrée et la réponse de l'organisme que cela engendre. En effet, bien qu'une substance soit potentiellement toxique il est possible la plupart du temps de déterminer une dose sans effet néfaste. C'est cette dose qui nous intéresse. Grâce aux études de toxicité à doses répétées, la dose la plus forte administrée sans engendrer d'effets secondaires est recherchée ; c'est ce que l'on appelle la NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). La NOAEL est très utile à l'évaluateur de la sécurité car c'est à partir de cette valeur que l'on calcule la marge de sécurité de l'ingrédient. Si aucune NOAEL n'est disponible, la dose prise en compte sera la plus faible pour laquelle apparait un effet secondaire (la LOAEL : Low Observed Adverse Effect Level) (9).

Pour les nouvelles substances utilisées en cosmétique, la détermination de la NOAEL est rendue impossible car il n'existe pas, à l'heure actuelle, des méthodes alternatives pour la toxicité chronique. Il sera donc difficile de connaître les effets indésirables à long terme. Il est cependant possible d'utiliser des méthodes *in silico*, tel que le QSAR afin d'estimer la potentiel toxique d'une substance, en comparaison avec des substances proches. Cependant, dans le cadre d'un mélange, nous ne pouvons pas utiliser de tels modèles.

Il est également possible de se baser sur des données historiques d'utilisation. En effet, certains ingrédients n'ont jamais été testés chez l'animal mais des données d'utilisation chez l'Homme sont disponibles, comme par exemple pour les additifs alimentaires ou pour toutes substances couramment consommées par l'Homme. Dans ces cas là, une faible toxicité est attendue et il peut être possible d'utiliser directement les données d'exposition humaine.

#### 4.1.3. L'évaluation de l'exposition

Cette étape permet de déterminer l'exposition humaine de l'ingrédient pour l'usage envisagé, à savoir la quantité qui va être appliquée et à quelle fréquence. La population cible sera également définie (enfants, adultes, personnes âgées, femmes enceintes). En effet, selon la population, les risques ne seront pas les mêmes.

Il est tout aussi important de déterminer la dangerosité d'une substance que son exposition. En effet, si une substance est néfaste mais que son exposition est négligeable, alors le risque est faible, et inversement, une substance qui ne présente pas de danger majeur peut entraîner des effets secondaires du fait d'une exposition importante.

Pour déterminer l'exposition, il faut calculer la dose d'exposition systémique journalière (SED). Cette dose se calcule de la manière suivante (11; 13) :

$$\text{SED (en mg/kg pc/j)} = [A_1 \times 1000 \times (C(\%)/100) \times \text{Dap}/100]/60 \text{ ou}$$

$$\text{SED} = A_2 \times (C(\%)/100) \times (\text{Dap}/100)$$

$A_1$  (en g/j) et  $A_2$  (en mg/kg pc/j) sont la quantité journalière de produit appliquée,

$C$  (%) représente la concentration de la matière première dans le produit fini cosmétique,

$\text{Dap}$  est la valeur retenue de l'absorption cutanée et 60 le poids moyen d'un adulte (en kg).

Le calcul de l'exposition d'un ingrédient dépend donc de facteurs intrinsèques à l'ingrédient (concentration de l'ingrédient dans le produit cosmétique, absorption cutanée), mais également de facteurs propres aux types de produits cosmétiques dans lequel l'ingrédient est formulé (quantité de produit appliqué et fréquence d'application).

Les valeurs de quantité journalière appliquée pour un certains nombres de produits sont fournies par le SCCS dans le tableau suivant :

**Tableau 1 : Quantité journalière de produits cosmétiques appliquée par catégorie de produits, d'après SCCS, 2012 (11).**

Product type	Estimated daily amount applied	Relative amount applied (mg/kg bw/day)	Retention factor <sup>1</sup>	Calculated daily exposure (g/day)	Calculated relative daily exposure (mg/kg bw/day)
<b>Bathing, showering</b>					
Shower gel	18.67 g	279.20	0.01	0.19	2.79
Hand wash soap <sup>2</sup>	20.00 g	-	0.01	0.20 <sup>3</sup>	3.33
<b>Hair care</b>					
Shampoo	10.46 g	150.49	0.01	0.11	1.51
Hair conditioner <sup>2</sup>	3.92 g	-	0.01	0.04	0.60
Hair styling products	4.00 g	57.40	0.1	0.40	5.74
Semi-permanent hair dyes (and lotions) <sup>2</sup>	35 ml (per application)	-	0.1	Not calculated	-
Oxidative/permanent hair dyes <sup>2</sup>	100 ml (per application)	-	0.1	Not calculated <sup>4</sup>	-
<b>Skin care</b>					
Body lotion	7.82 g	123.20	1.0	7.82	123.20
Face cream	1.54 g	24.14	1.0	1.54	24.14
Hand cream	2.16 g	32.70	1.0	2.16	32.70
<b>Make-up</b>					
Liquid foundation	0.51 g	7.90	1.0	0.51	7.90
Make-up remover <sup>2</sup>	5.00 g	-	0.1	0.50	8.33
Eye shadow <sup>2</sup>	0.02 g	-	1.0	0.02	0.33
Mascara <sup>2</sup>	0.025 g	-	1.0	0.025	0.42
Eyeliner <sup>2</sup>	0.005 g	-	1.0	0.005	0.08
Lipstick, lip salve	0.057 g	0.90	1.0	0.057	0.90
<b>Deodorant</b>					
Deodorant non-spray	1.50 g	22.08	1.0	1.50	22.08
Deodorant aerosol spray (ethanol-based) <sup>5</sup>	1.43 g	20.63	1.0	1.43	20.63
Deodorant spray (not ethanol-based)	0.69 g	10.00	1.0	0.69	10.00
<b>Oral hygiene</b>					
Toothpaste (adult)	2.75 g	43.29	0.05	0.138	2.16
Mouthwash	21.62 g	325.40	0.10	2.16	32.54

Pour les produits solaires, il est communément admis que la quantité quotidienne appliquée est de 18 g/j. Pour les conservateurs cette dose est de 17,4 g/j (11).



#### 4.1.4. La caractérisation du risque

La caractérisation du risque permet d'estimer la probabilité que la substance cause des dommages pour la santé humaine, et de fixer le niveau de risque. Cette caractérisation du risque est établie par le calcul de la marge de sécurité (MoS), marge qui dépend de la valeur de la NOAEL (ou LOAEL) et de l'exposition systémique (SED) (SCCS, 2012) :

$$\text{MoS} = \text{NOAEL}/\text{SED}$$

Pour que la molécule soit considérée comme sans danger pour la santé humaine, il est nécessaire que la marge de sécurité soit :

- supérieure ou égale à 100 chez les adultes (11; 9) : cette valeur tient compte des variations enter- et intra-espèces.
- Pour une utilisation chez les enfants un facteur d'incertitude peut être ajouté afin de prendre en compte la différence avec l'adulte pour le ratio surface cutanée/poids corporel. Ainsi, les facteurs suivants sont appliqués (17) :
  - o 2,3 pour les nouveaux nés,
  - o 1,8 jusqu'à 6 mois,
  - o 1,6 jusqu'à 12 mois,
  - o 1,5 jusqu'à 5 ans,
  - o Et enfin 1,3 jusqu'à 10 ans.

Néanmoins, dans le dernier avis du SCCS (11), il est indiqué que ces facteurs ne sont pas nécessaires pour des produits appliqués sur peau saine car la marge de sécurité de 100 prend en compte les variabilités inter-espèces. Ce qui n'est pas toujours le cas pour la région du siège où il est préférable d'appliquer ces facteurs d'incertitude.

- Pour les femmes enceintes, les experts du SCCS ne prennent pas en compte cette population pour la détermination de la marge de sécurité. Dans le règlement cosmétique (CE) n°1223/2009, les femmes enceintes sont uniquement citées comme appartenant aux groupes de population vulnérable pour l'évaluation des substances classées CMR.

En l'absence de contraintes réglementaires et toxicologiques établies, certains laboratoires décident par principe de précaution d'établir des règles qui leurs sont propres, et notamment en appliquant un facteur d'incertitude de 3, basé sur les recommandations relatives à l'évaluation du risque des substances chimiques

comme les pesticides par les agences réglementaires : US EPA et Santé Canada (Facteur de sécurité FQPA).

Ces valeurs sont cependant à utiliser lorsque la NOAEL a été établie à partir d'une étude subchronique de 90 jours ou plus. Si ce n'est pas le cas, un facteur d'incertitude supplémentaire de 3 est ajouté. Les marges de sécurité devront donc être supérieures ou égales à 300 pour l'adulte, 690 pour le bébé et 900 pour la femme enceinte. Ce même facteur d'incertitude est également utilisé si la marge de sécurité est calculée à partir de la LOAEL (11).

La NOAEL choisie pour calculer cette marge doit provenir dans un premier temps d'études réalisées selon des protocoles validés et reconnus (type OCDE). Lorsque plusieurs NOAEL sont disponibles pour un même type d'études, celle ayant la valeur la plus faible doit être utilisée afin de maximaliser le risque.

Lorsque qu'il n'y a pas de données pré-cliniques disponibles permettant de calculer la marge de sécurité, il peut alors être possible d'utiliser des données humaines. En effet, certains ingrédients cosmétiques sont également des ingrédients alimentaires ou consommés par l'Homme (huiles végétales par exemple). Ces données peuvent être par exemple une dose journalière acceptable (DJA) ou une dose de Référence (RfD). Ces valeurs sont alors comparées à la dose d'exposition systémique calculée pour l'ingrédient. Le ratio (données humaine / SED) doit alors être supérieur à 1 (pas besoin d'appliquer des facteurs supplémentaires, les variations inter-espèces étant déjà prises en compte).

#### 4.1.5. Conclusion

En fonction de toutes les données regroupées dans le dossier toxicologique, l'évaluateur de la sécurité doit conclure sur l'utilisation de la matière première dans un produit cosmétique. Ainsi, quatre conclusions distinctes pourront être émises (12) :

- La molécule peut être utilisée aux conditions prévues (type de produit, concentrations) sans autre restriction,
- La molécule peut être utilisée mais avec des restrictions d'emploi (non utilisable dans les produits contour des yeux, non utilisable en cas d'exposition au soleil...),
- La molécule peut être utilisée à condition de disposer des données de toxicité complémentaires sur le produit fini (étude de tolérance cutanée en cas d'utilisation d'un ingrédient sensibilisant),

- La molécule ne peut pas être utilisée pour l'usage envisagé.

#### 4.2. Le seuil de préoccupation toxicologique

L'approche TTC (Threshold of Toxicological Concern) ou seuil de préoccupation toxicologique est une méthode d'évaluation du risque qui commence à être prise en considération pour évaluer les ingrédients cosmétiques. Une opinion sur son utilisation en cosmétique a été publiée par le SCCS/SCHER/SCENIHR (18). Cette technique est déjà utilisée et validée pour évaluer la toxicité des matériaux en contact avec l'alimentation (aux Etats-Unis), des arômes alimentaires, des impuretés génotoxiques dans les produits pharmaceutiques (11).

L'approche TTC est un outil permettant d'identifier les niveaux d'exposition en dessous desquels il y a une faible probabilité d'avoir des effets néfastes pour la santé humaine. Elle consiste en une extrapolation des données de toxicité selon une analogie de structure avec une molécule dont la toxicité est connue.

Des bases de données sont disponibles contenant des informations sur la cancérogénicité : la CPBD (Carcinogen potency dataBase) regroupant 1500 molécules chimiques et la Munro Database qui regroupe 613 produits. La valeur seuil pour les molécules génotoxiques est de 0.15 µg/personne/j. Pour les molécules dont il n'y a pas de risque cancérogène, la base de données établie par Munro *et al* est utilisée. Elle permet de classer les molécules en 3 groupes selon la classification Cramer : faible toxicité, toxicité intermédiaire et forte toxicité, correspondant respectivement aux classes I, II et III. A chacune de ces classes est attribuée une valeur seuil (18) :

- Classe I : TTC = 1800 µg/personne/j, soit 30 µg/kg pc/j
- Classe II : TTC = 544 µg/personne/j, soit 9.1 µg/kg pc/j
- Classe III : TTC = 90 µg/personne/j, soit 1.5µg/kg pc/j

Cependant, le comité scientifique a reconnu que la classe II n'est pas valable car mal représentée dans la base de données. Les molécules de classe II devront donc être classées automatiquement en classe III (18).

Par ailleurs, cette méthode ne peut pas s'appliquer à certaines substances, telles que les aflatoxines, les métaux, les hormones potentielles ou encore les protéines (18).

Le TTC concept pourrait être un bon outil d'évaluation de la sécurité. Mais son utilisation doit cependant être limitée aux molécules présentes à de très faibles concentrations. Par ailleurs, le COLIPA assure que le TTC concept ne peut être appliqué pour évaluer les effets locaux d'une molécule (irritation, sensibilisation). Pour être utilisé dans de bonnes conditions, il est nécessaire (11) :

- Que la structure de la molécule à évaluer soit parfaitement connue,
- Que les données d'exposition soient connues.

Au cours de notre évaluation de la sécurité des molécules présentes dans les plantes, nous utiliserons le TTC concept pour les molécules ayant un potentiel génotoxique. Ainsi, elles seront considérées comme des impuretés et la valeur journalière maximale acceptée sera, par défaut, de 0.15 µg/personne/j, soit 2.5 ng/kg pc/j.

## 5. LES METHODES ALTERNATIVES DISPONIBLES EN COSMETIQUE

### 5.1. Définition et contexte réglementaire

Les méthodes alternatives correspondent à des techniques d'évaluation de la toxicité favorisant une utilisation moindre des animaux. Elles sont basées sur la règle des 3Rs : **Remplacer** les tests sur les animaux dès que des méthodes alternatives validées sont disponibles, **Réduire** le nombre d'animaux utilisés, **Raffiner** les procédures expérimentales pour réduire le stress, la douleur des animaux.

Les méthodes alternatives regroupent aussi bien des méthodes *in vivo* pour lesquelles le nombre d'animaux est réduit, que des méthodes *ex vivo*, *in vitro* ou *in silico*.

Le recours à ces méthodes est aujourd'hui une obligation, aussi bien dans le domaine de la recherche pour l'utilisation des animaux à des fins expérimentales que pour l'évaluation de la sécurité des matières premières et des produits finis cosmétiques.

En effet, la directive 86/609/CEE du conseil a instauré un cadre de protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou scientifiques en assurant à ces animaux des soins adéquats, et en empêchant que des souffrances inutiles ne leur soient infligées (19). La directive 2010/63/CE applicable au 1<sup>er</sup> janvier 2013, remplaçant la précédente, exige que

soient choisies en priorité les méthodes alternatives reconnues par l'UE, si elles existent (20).

De plus, la directive 2003/15/CE, article 4, interdit l'utilisation d'animaux de laboratoire (21):

- Pour tester les produits finis cosmétiques, depuis le 11 septembre 2004 ;
- Pour tester les ingrédients cosmétiques :
  - o depuis le 11 mars 2009, pour les études permettant de déterminer la tolérance aiguë (orale, dermique, inhalation, percutanée, péritonéale), la tolérance locale (irritation/corrosion cutanée et oculaire), absorption cutanée et la phototoxicité ;
  - o Depuis le 11 mars 2013, pour les études permettant de réaliser la toxicité à doses répétées, la toxicité pour la reproduction, la toxicocinétique et la sensibilisation.

L'utilisation d'animaux pour tester les ingrédients et les produits cosmétiques est donc interdite à partir de ces différentes dates. Ainsi, la mise sur le marché de produit fini cosmétique est maintenant interdite au sein de la communauté Européenne si pour l'évaluation de la toxicité des ingrédients ou du produit fini, la société cosmétique réalise des tests faisant intervenir des animaux après les trois dates citées ci-dessus.

C'est pourquoi le développement des méthodes alternatives a beaucoup évolué au cours de ces dernières années. Bien que d'énormes progrès aient été faits dans le domaine, il reste encore de nombreuses techniques à mettre au point.

Le Centre Européen pour la Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM) créé en 1991 permet d'encourager la recherche afin de trouver d'autres méthodes scientifiques qui fournissent le même niveau d'informations et qui n'impliquent pas l'utilisation et la souffrance des animaux. Il a pour missions de (22) :

- coordonner la validation des méthodes alternatives au niveau européen,
- favoriser l'échange d'informations sur le développement des méthodes alternatives,
- mettre en place et gérer une base de données sur les procédures,
- promouvoir le dialogue entre les différentes parties concernées.

Depuis 2011, l'ECVAM est devenu le laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes alternatives sur l'expérimentation animale : EURL ECVAM (22).

## 5.2. EURL ECVAM

L'EURL ECVAM est un organisme indépendant, reconnu comme le premier centre international pour coordonner la validation des méthodes alternatives (22). Il a pour missions :

- De promouvoir l'acceptation scientifique et réglementaire des méthodes alternatives, à travers la recherche, le développement de tests et leur validation, et la mise au point d'une base de données spécialisée ;
- De coordonner au niveau européen l'évaluation indépendante de la pertinence et de la fiabilité des tests.

Il est engagé à soutenir et servir (22) :

- La Commission européenne, et par conséquent, les États membres de l'UE ;
- Les dispositions de la directive 2010 / UE / 63.

De plus, il est une source de conseils d'experts sur (22) :

- Les aspects théoriques et pratiques de la validation de nouveaux tests ;
- L'état actuel de la validation de méthodes alternatives pour l'utilisation en toxicologie et les biosciences en général ;
- Les tests *in vitro* de la toxicité, notamment toxicité topique et systémique ;
- Les questions sur le bien-être animal (scientifiques et éthiques).

## 5.3. Validation des méthodes alternatives

La validation est un processus important car elle contribue fortement à l'acceptation internationale de toute méthode d'essai proposée.

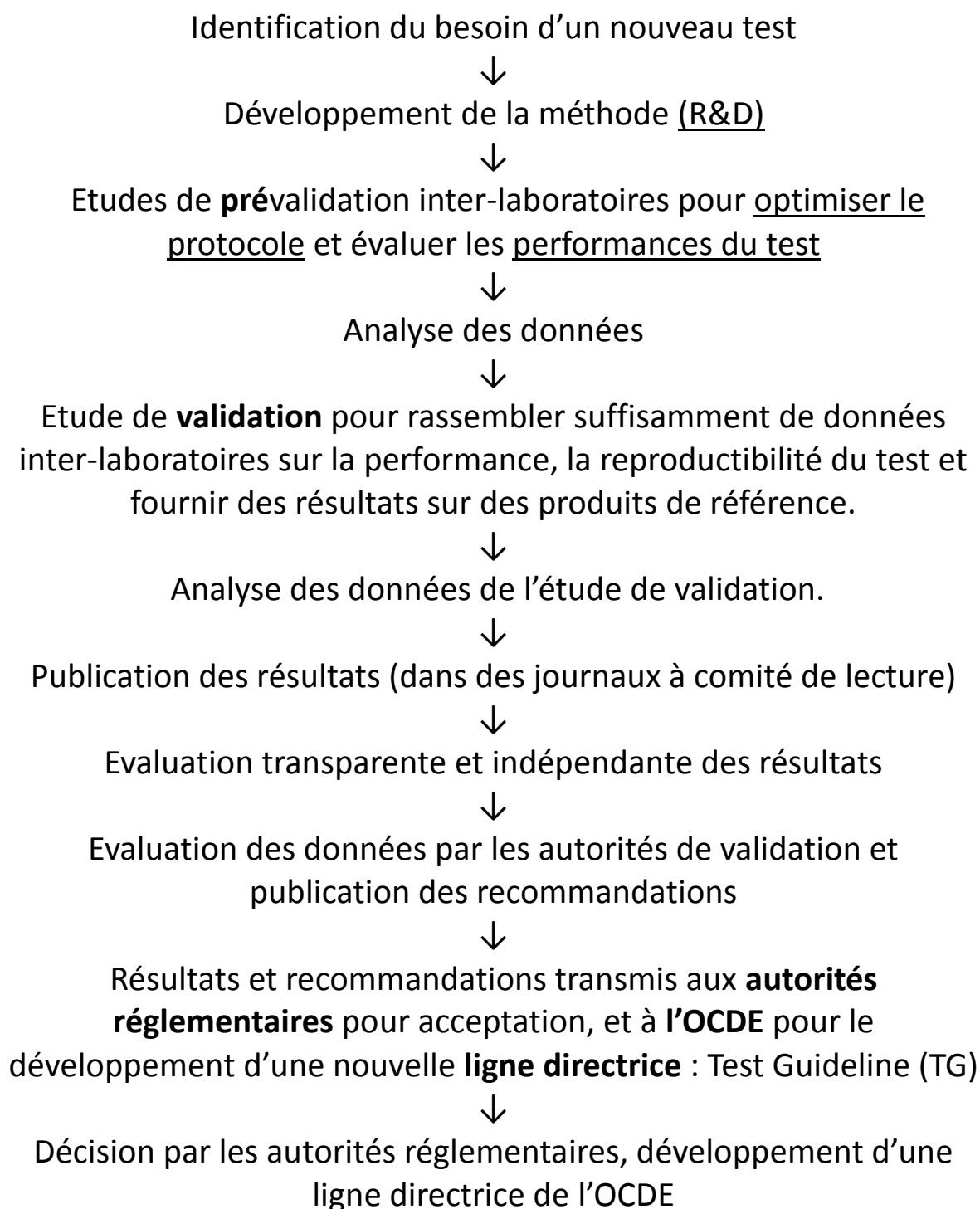
D'après l'OCDE, la validation est définie comme le « processus par lequel la fiabilité et la pertinence d'une approche particulière, d'une méthode, d'un processus ou d'une évaluation, est établi pour un objet défini » (23; 22).

La fiabilité est la mesure de la reproductibilité des résultats d'un test à l'intérieur d'un même laboratoire (intra-laboratoires) et entre plusieurs laboratoires (inter-laboratoires) au cours du temps, lorsqu'il est effectué en utilisant le même protocole standardisé. La pertinence d'un test décrit la relation entre le test et l'effet dans les espèces cibles et si le test est significatif et utile pour un but bien défini, avec les limites identifiées. Les

nouvelles méthodes et les mises à jour des tests doivent être à la fois fiables et pertinentes, à savoir validées (23).

L'acceptation réglementaire d'une méthode correspond à son acceptation formelle par les autorités réglementaires, indiquant que la méthode d'essai peut être utilisée pour fournir des informations pour répondre à une exigence réglementaire spécifique. Cela inclut, mais ne se limite pas à une adoption formelle d'une méthode par l'UE et / ou l'OCDE (22).

La validation d'une nouvelle méthode peut prendre plusieurs années. En effet, elle suit un processus bien défini, en plusieurs étapes (voir figure 1), qui doit respecter de nombreux critères de validation. Pour être validée, la méthode doit être performante, fiable (bonne reproductibilité intra- et inter-laboratoires et bonne répétabilité intra-laboratoire) et pertinente. L'étape de validation réglementaire de la méthode est très importante car elle rend éligible son utilisation (24).



**Figure 1** : Les différentes étapes de développement d'une nouvelle méthode alternative de la phase de recherche à l'acceptation réglementaire, d'après Biola –Videmment, 2013 (25)



#### 5.4. Les méthodes alternatives disponibles en cosmétiques, validées ou non

Plusieurs méthodes alternatives ont déjà été validées par l'EURL ECVAM et des lignes directrices ont été rédigées par l'OCDE. Cependant, il en reste encore beaucoup à développer et à valider. Certaines sont en cours de validation et devraient donc pouvoir être utilisées d'ici quelques mois, d'autres sont seulement en phase de développement et par conséquent elles ne pourront être disponibles que dans les années à venir (voir Annexe 2).

Afin de prouver l'innocuité d'un produit cosmétique, l'industriel se base sur les tests toxicologiques réalisés sur le produit fini mais aussi sur les différents ingrédients.

Ainsi, l'interdiction d'effectuer des tests sur les animaux pour évaluer les ingrédients, alors qu'il n'existe pas toujours des méthodes de substitution, pose aujourd'hui un réel problème aux industries cosmétiques et ouvre une voie de recherche dans ce domaine.

Des méthodes validées par l'EURL CVAM permettant l'évaluation toxicologique d'un ingrédient cosmétique sont disponibles dans plusieurs domaines (22) :

- irritation et corrosion cutanée,
- corrosion oculaire,
- phototoxicité,
- mutagénèse/génotoxicité,
- sensibilisation.

Cependant, il reste encore des domaines pour lesquels les méthodes sont en cours de développement ou en cours de prévalidation (c'est le cas des tests de carcinogénicité) ou de validation (c'est le cas pour les tests de sensibilisation cutanée) (26; 27).

##### 5.4.1. Tests d'irritation et de corrosion cutanée

La corrosion cutanée est à différentier de l'irritation cutanée. Les substances corrosives provoquent des dommages irréversibles de la peau (nécroses), tandis que les substances irritantes entraînent des dommages réversibles (réactions d'inflammation locales) (27).

Les tests permettant d'évaluer l'irritation et la corrosion d'une substance sur la peau font partis des premiers tests développés et validés par l'EURL ECVAM.

Le test de référence, à partir duquel ont été développées les méthodes alternatives, est le test de Draize pour la corrosion cutanée (guideline OCED 404), réalisé sur le lapin

(application sur la peau des lapins). Il permet de classer les substances en plusieurs catégories selon leur potentiel corrosif ou irritant. Les substances corrosives sont classées en catégorie 1, puis en sous catégories 1A (corrosif sévère), 1B (corrosif modéré) ou 1C (corrosif moyen). Les substances irritantes sont classées en catégorie 2. Les substances non irritantes ne sont pas classées (27).

Ce test ne peut cependant plus être réalisé pour évaluer le potentiel irritant ou corrosif d'un ingrédient cosmétique, puisque réalisé sur des animaux. Ainsi, d'autres méthodes, *in vitro*, ont dû être développées. Six méthodes alternatives sont validées par l'EURL ECVAM pour évaluer la corrosion cutanée (tableau 2) et trois méthodes sont validées pour évaluer l'irritation cutanée (tableau 3).

#### 5.4.1.1. Tests de corrosion cutanée

En ce qui concerne la corrosion cutanée, plusieurs tests sont disponibles (tableau 2). Ces tests sont réalisés sur peau humaine reconstruite, sur peau *ex vivo* ou encore sur une membrane non cellulaire. On peut citer :

- Episkin<sup>®</sup>, Epiderm<sup>™</sup> ou SkinEthic<sup>™</sup> Human skin model pour la corrosion cutanée. La ligne directrice rédigée par l'OCDE est la DG 431. Elle est disponible depuis 2004 et a été révisée en 2009. Ce test consiste à appliquer la substance à tester sur un modèle en 3 dimensions de peau humaine reconstruite. Les substances corrosives sont identifiées par leur habilité à entraîner une décroissance de la viabilité cellulaire (viabilité cellulaire qui peut être mesurée par le test de viabilité cellulaire au MTT) (28).

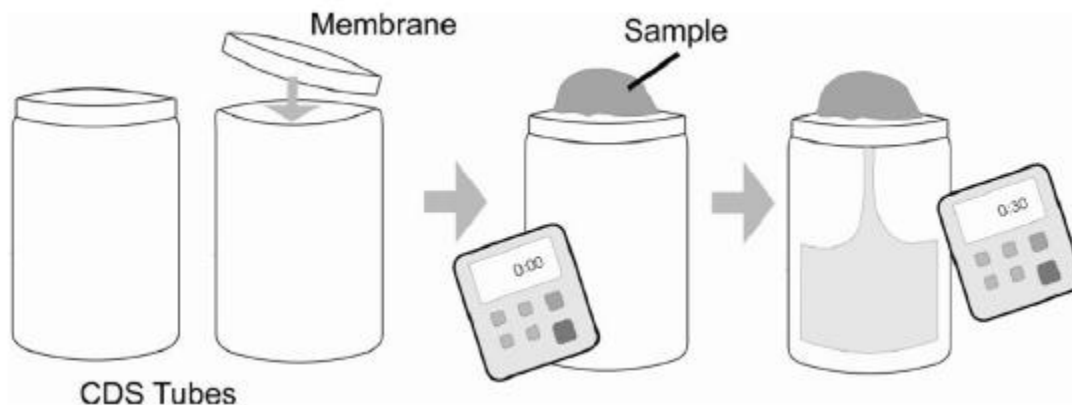
Plusieurs modèles de peaux reconstruites sont disponibles mais le principe du test est le même quel que soit le modèle utilisé. La méthode consiste à appliquer 40 µl de la substance à tester sur la surface du *stratum corneum* de 6 peaux reconstruites. Trois seront incubés à 37.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 3 minutes et les trois autres pendant 1 heure. A la fin de cette période, les tissus sont rincés avec du PBS et un test de viabilité cellulaire au MTT est réalisé. Les résultats sont comparés au contrôle positif (soude KOH)). La substance est considérée comme corrosive si après 3 minutes d'exposition la viabilité des cellules est inférieure à 50% ou si elle est supérieure ou égale à 50% après 3 minutes mais inférieure à 15% au bout d'une heure d'exposition. Dans le cas contraire, la molécule est considérée comme non corrosive (28; 29).

Cette méthode permet de distinguer les substances corrosives des substances non corrosives, et de différencier les corrosif forts (catégorie 1A), des autres corrosifs (catégories 1B et 1C) (22; 28).

**Tableau 2 : Méthodes *in vitro* validées par l’ECVAM pour la corrosion cutanée, d’après EURL EVCAM (22).**

Generic description of test method	Standardised description of test method in EU legislation	OECD Test Guidelines
<i>In vitro</i> skin corrosion		
<b>Transcutaneous electrical resistance test (TER)</b>	<b>B.40</b> <i>In vitro</i> skin corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER)	<b>TG 430</b> <i>In vitro</i> skin corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER)
<b>RhE- Human Skin Models:</b> Episkin™, Epiderm™, SkinEthic™ EpiCS®(EST-1000)	<b>B.40bis</b> <i>In vitro</i> skin corrosion: human skin model test	<b>TG 431</b> <i>In vitro</i> skin corrosion: human skin model test
<b>CORROSITEX®</b>	<b>No EU test method available</b>	<b>TG 435</b> <i>In vitro</i> Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion

- Corrositex® noncellular membrane (Figure 2). Ce test n’est pas validé par l’ECVAM mais une ligne directrice est disponible, la DG 435. Il évalue le temps de passage d’un composé à travers une bio-membrane (30).



**Figure 2 : Principe du Corrositex noncellular membrane, d'après Cazedey, 2009 (31)**

La membrane est disposée au dessus d'une fiole contenant une solution de détection chimique. Lorsque la substance traverse la membrane, la solution de détection change de couleur. Selon le temps que met la substance à passer, elle sera considérée comme corrosive ou non, et son degré de corrosivité pourra être déterminée (figure 3).

	Category 1		Category 2		
Corrosivity	Packing group	Mean time	Corrosivity	Packing group	Mean time
Corrosive	I	0 to 3 min	Corrosive	I	0 to 3 min
Corrosive	II	> 3 min to 1 h	Corrosive	II	> 3 to 30 min
Corrosive	III	> 1 to 4 h	Corrosive	III	> 30 to 60 min
Non-Corrosive	Not applicable	> 4 h	Non-Corrosive	Not applicable	> 60 min

Table adapted from NIH, 1999.

**Figure 3 : Table de classification d'une substance corrosive après utilisation du Corrositex noncellular membrane. Groupe I : fort danger, groupe II : danger moyen, groupe III : danger faible, d'après Cazedey, 2009 (31)**

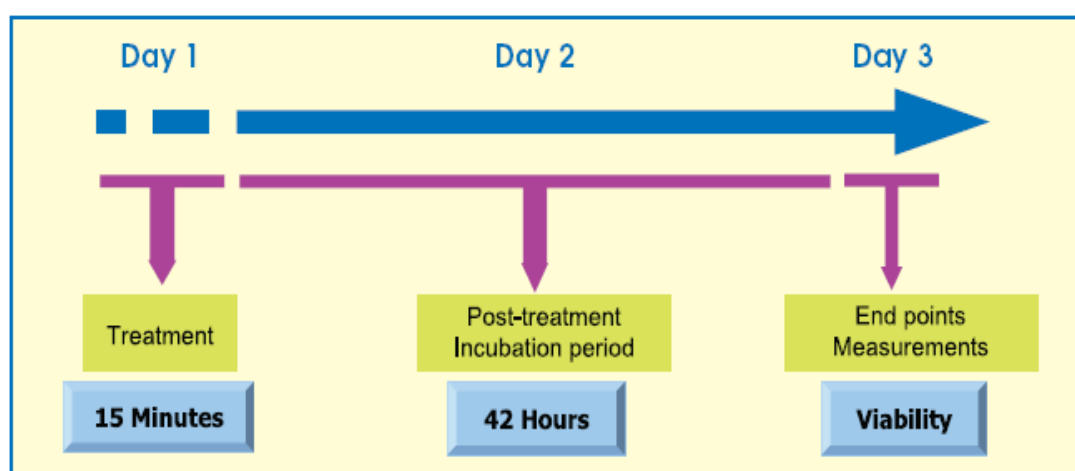
#### 5.4.1.2. Tests d'irritation cutanée

Un seul test est pour le moment validé par l'ECVAM et l'OCDE. Il fait intervenir trois modèles de peaux humaines reconstruites, dont les noms commerciaux sont : Episkin<sup>®</sup>, Epiderm<sup>™</sup> ou SkinEthic<sup>™</sup> Human skin model. Ces différents modèles validés par l'ECVAM sont regroupés dans le tableau 3. La ligne directrice rédigée par l'OCDE pour ces tests est la DG 439 (26).

**Tableau 3 : Méthodes *in vitro* validées par l'ECVAM pour l'irritation cutanée, d'après EURL ECVAM (22)**

Nr.	Test method name	Validation study type	Download documents
1	EpiSkin™	Full prospective validation study	ESAC statement 2007 (validation study) ESAC statement 2009 (performance under EU CLP)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	Full prospective validation study. A modification of the EpiDerm was validated based on the ECVAM PS (Nr.4) in 2008.	
2a	Modified EpiDerm (EPI-200)	Validation studies based on the original ECVAM Performance Standards for Skin Irritation Testing	ESAC statement 2008 (validation studies) ESAC statement 2009 (performance under EU CLP)
3	SkinEthic™ RHE		CLP

Le principe est plus ou moins le même que pour le test de corrosion. Les volumes de produits à appliquer changent, ainsi que les temps d'incubation (figure 4). Cette technique permet de classer les produits en irritant ou non irritant mais ne permet pas de définir le niveau d'irritation induit. Une substance sera classée irritante si la viabilité est inférieure ou égale à 50% et non irritante si elle est supérieure à 50%.



**Figure 4 : Principales étapes du test d'irritation cutanée EpiSkin<sup>®</sup>, d'après Lelièvre, 2007 (32)**

#### 5.4.2. Tests d'irritation et de corrosion oculaire

L'irritation oculaire se définit comme des modifications secondaires des yeux après l'application d'une substance, dont les effets observés sont réversibles dans les 21 jours après l'application (27; 22).

Le test de référence est le test de Draize pour l'irritation oculaire (OECD 405), réalisé sur les lapins (instillation dans le sac lacrymal). Ce test permet de classer les substances en 2 catégories selon leur potentiel irritant ou corrosif. La catégorie 1 regroupe les substances responsables d'effets non réversibles, ou partiellement réversibles après une période de 21 jours d'observation. Les substances dont les effets observés sont complètement réversibles au cours des 21 jours sont classées dans la catégorie 2. Cette catégorie se divise en 2 sous-catégories : 2A si les effets observés sont réversibles après 7 jours d'observation et 2B, si les effets sont réversibles avant 7 jours. Si aucun effet n'est rapporté, la substance n'est pas classée (27; 22). Bien que ce test réponde aux principes des 3Rs, il ne peut être utilisé pour tester des ingrédients cosmétiques.

Ainsi, les méthodes alternatives détaillées ci-dessous ont été développées.

##### 5.4.2.1. Tests de corrosion oculaire

Plusieurs méthodes ont été validées par l'ECVAM pour tester la corrosion oculaire et déterminer les irritants sévères. Cependant, ces tests ne permettent pas de classer les substances en irritants oculaires faibles ou modérés. Ils permettent uniquement de différencier les substances sévèrement irritantes ou corrosives (11; 26).

Deux approches sont possibles (22) :

- Tests *in vitro* organotypiques :
  - Le test Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP). La ligne directrice de l'OCDE est la DG 437, éditée en 2009 ;
  - Le test Isolated Chicken Eye (ICE). La ligne directrice de l'OCDE est la DG 438, émise en 2009 ;
  - Le test Isolated Rabbit Eye (IRE) ;
  - Le test Hens Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane (Het-Cam) ;

Les deux derniers tests ne sont actuellement pas validés réglementairement. Toutefois, le test sur membrane (Het-Cam) est largement utilisé par l'industrie cosmétique en raison de son faible coût (27; 33).

Tous ces tests sont autorisés en cosmétique car le prélèvement de la cornée des animaux provient des abattoirs.

#### Test BCOP :

Le principe de ce test est d'évaluer le potentiel corrosif ou sévèrement irritant d'une substance, en mesurant sa capacité à induire une opacité et augmenter la perméabilité d'une cornée bovine isolée. Les effets toxiques observés sur la cornée sont donc mesurés par la décroissance de la transmission de la lumière (opacité) et par l'augmentation du passage de la fluorescéine sodium (perméabilité) à l'aide d'un opacimètre et d'un spectrophotomètre à lumière visible, respectivement. Les résultats de ces deux mesures permettent de calculer le score d'irritation *in vitro* (*In Vitro* Irritancy Score (IVIS)), score utilisé pour classer la substance.

$$\text{IVIS} = \text{valeur moyenne de l'opacité} + (15 \times \text{valeur moyenne de la perméabilité OD}_{490})$$

Une substance qui induit un score supérieur ou égal à 55,1 est classée comme corrosive ou sévèrement irritante. Par contre si le score est inférieur à 55,1, des tests complémentaires doivent être réalisés pour déterminer la classification de la substance (irritant modéré, irritant faible, non irritant) (34).

#### Test ICE :

Comme pour le BCOP, ce test permet d'identifier les substances corrosives ou sévèrement irritantes. Le potentiel irritant est mesuré par la capacité d'une substance à induire une toxicité sur l'œil de poulet énucléé. Les effets toxiques sur la cornée sont mesurés par l'évaluation qualitative de l'opacité, l'évaluation qualitative des dommages à l'épithélium, fondée sur l'application de la fluorescéine à l'œil (rétention de la fluorescéine), la mesure quantitative d'épaisseur accrue (gonflement), et l'évaluation qualitative des dommages morphologiques macroscopiques à la surface. Chaque effet est scoré, et la somme des quatre scores permet de déterminer un index d'irritation, comme indiqué dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Détermination de l'index d'irritation, d'après l'OCDE, 2009 (35).**

Gonflement moyen de la cornée (%)	Catégorie OPI
0 à 5	I
>5 à 12	II
>12 à 18 (>75 min après traitement)	II
>12 à 18 (≤75 min après traitement)	III
>18 à 26	III
>26 à 32 (>75 min après traitement)	III
>26 à 32 (≤75 min après traitement)	IV
>32	IV

Score moyen maximal d'opacité <sup>†</sup>	Catégorie OPI
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

Score de rétention moyenne de fluorescéine 30 minutes après traitement <sup>†</sup>	Catégorie OPI
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV



<u>Classification du SGH de l'ONU</u>	<u>Combinaison des 3 variables</u>
Sans catégorie	3 x I 2 x I, 1 x II
Aucune prédiction n'est possible	Autre combinaison
Catégorie 1	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II* 2 x IV, 1 x I* Opacité cornéenne $\geq 3$ à 30 min (dans au moins deux yeux) Opacité cornéenne = 4 en un point temporel quelconque (dans au moins deux yeux) Relâchement important de l'épithélium (dans au moins un œil)

\*Combinaisons moins probables.

#### Test Het-Cam :

Ce test permet également de déterminer le potentiel corrosif ou sévèrement irritant d'une substance en mesurant sa capacité à induire une toxicité sur la membrane chorio-allantoïdienne d'un œuf de poule fécondé. Trois critères sont pris en compte : l'hémorragie, la coagulation et la lyse des vaisseaux. Chaque critère est évalué séparément et donne lieu à un score (voir tableau 5).

**Tableau 5 : Détermination du score d'irritation, d'après ICCVAM, 2010 (36)**

Effect	Score		
	0.5 min	2 min	5 min
Lysis	5	3	1
Hémorragie	7	5	3
Coagulation	9	7	5

Cette méthode n'est actuellement pas validée pour classer une substance. Elle est utilisée dans le cadre de tests non réglementaires (36).

- Tests de cytotoxicité : Cytosensor Microphysiometer (CM), Fluorescein Leakage (FL), Neutral Red Release (NRR), Red Blood Cell test (RBC).

Les tests Cytosensor Microphysiometer (CM) et Fluorescein Leakage (FL) sont validés scientifiquement mais n'ont pas encore fait l'objet d'un guide OCDE.

Ces méthodes n'étant pas encore couramment utilisées ne seront pas détaillées.

#### 5.4.2.2. Tests d'irritation oculaire

En ce qui concerne les méthodes alternatives pour évaluer l'irritation oculaire, elles sont en cours de validation par l'ECVAM. On peut citer EpiOcular<sup>TM</sup> Eye Irritation Test et SkinEthic<sup>TM</sup> Human Corneal Epithelium, deux tests utilisant des épithéliums de cornées humaines reconstruites, qui imitent étroitement les propriétés morphologiques, histologiques, biochimiques et physiologiques de l'épithélium cornéen humain. Le premier test met en œuvre un modèle tridimensionnel de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain (22). Le deuxième test utilise un modèle tridimensionnel de cellules épithéliales humaines immortalisées de cornée.

La seule méthode d'essai actuellement validée par l'OECD est le test EpiOcular<sup>TM</sup> Eye Irritation (OECD 492). Cette méthode permet de différencier un irritant oculaire d'un non irritant oculaire. Par contre elle ne permet pas de différencier un fort irritant d'un faible irritant. Ce test ne peut être utilisé seul pour déterminer la classification d'une substance (37).

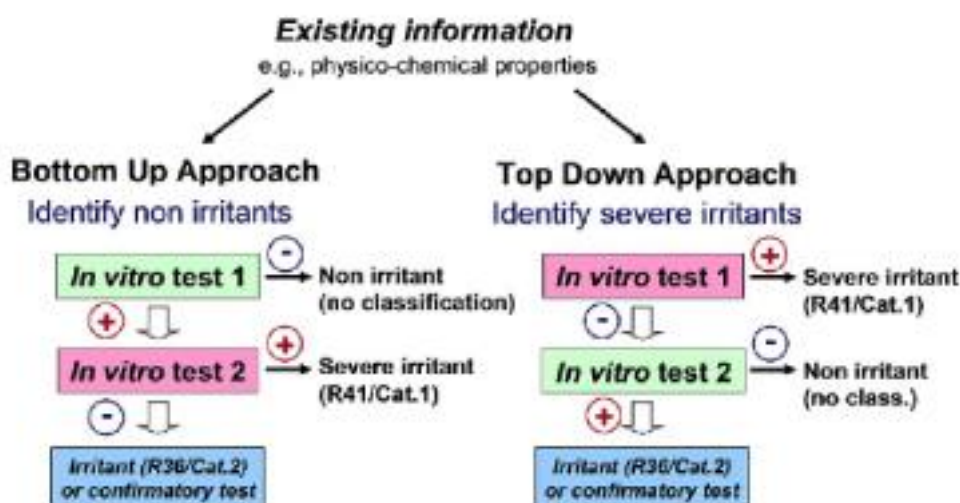
Le principe de ce test est de déterminer l'innocuité d'une substance sur une des couches cellulaire de la cornée, l'épithélium. L'irritation est estimée par la mesure de la viabilité cellulaire à l'aide d'un test au MTT. La substance à tester est appliquée à la surface de l'épithélium reconstruit pendant une durée variant selon le type de produit appliqué (liquide, solide). Après la période d'incubation, les tissus sont mis en présence de MTT afin de mesurer la viabilité cellulaire (37).

Le test de viabilité cellulaire au MTT se déroule en deux étapes : la première est la réduction du sel de tétrazolium (de couleur jaune) par la succinate déshydrogénase, enzyme mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan, de couleur bleu. La deuxième étape est l'extraction du formazan des cellules (à l'aide de l'isopropanol). La quantité de précipité bleu formée est alors dosée par spectrophotomètre à 550 nm et est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Une substance induisant une viabilité cellulaire inférieure ou égale à 60 est considérée comme irritante. Dans le cas contraire, la substance est non irritante (37).

#### 5.4.2.3. Combinaison de tests

Actuellement, une seule méthode alternative n'est pas suffisante pour déterminer le potentiel irritant d'une substance et la classer, et ainsi remplacer complètement le test de Draize *in vivo*. L'EURL ECVAM recommande d'utiliser une approche dite « Bottom-up » et « Top-down ». La première approche consiste à différencier les substances non irritantes des substances irritantes. Puis les substances sévèrement irritantes seront différenciées de celles faiblement irritantes. La deuxième approche consiste à mettre en évidence les substances fortement irritantes d'abord pour ensuite différencier celle qui ne le sont pas (figure 5).



**Figure 5 : Description schématique de l'approche dite « Bottom-up » et « Top-down », d'après IIVS (38)**

#### 5.4.3. Tests de phototoxicité

La phototoxicité est définie comme une réponse toxique déclenchée après l'exposition initiale de la peau à certains produits chimiques et à l'exposition subséquente à la lumière, ou qui est induite par irradiation de la peau après administration systémique (voie orale, intraveineuse) d'une substance chimique (27).

Il est nécessaire de réaliser un test de phototoxicité si une substance absorbe dans l'ultraviolet et la lumière visible. Si la substance n'absorbe pas dans le domaine UV-visible, elle ne peut induire de phototoxicité.

Le test validé et faisant l'objet d'une guide par l'OCDE pour évaluer la phototoxicité d'une substance est le 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Test. La ligne directrice est la DG 432, émise en 2004 (26).

Ce test permet la détermination *in vitro* du potentiel cytotoxique et phototoxique des substances après exposition à la lumière. Il est réalisé sur des cultures cellulaires de fibroblastes murins Balb/c 3T3. Il évalue la cytotoxicité par la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au produit en présence et en absence de lumière. Pour prédire le potentiel phototoxique, les réponses obtenues en présence et en absence de lumière sont comparées. Ce test est reconnu comme test de base pour déterminer le potentiel phototoxique d'une substance. Cependant, comme il possède certaines limites (fibroblastes ne supportant pas les irradiations aux UVB), d'autres méthodes sont en cours de développement, notamment sur un modèle de peau humaine reconstituée en 3 dimensions : EpiSkin Phototoxicity Assay (EPA). La substance est appliquée à la surface du *stratum corneum* puis la peau reconstruite est exposée ou non à des irradiations UVA et UVB. La phototoxicité est évaluée par mesure de la viabilité cellulaire (test au MTT le plus souvent) mais également par le dosage de marqueurs pro-inflammatoire (IL-1 $\alpha$ ). Les premiers essais montrent que cette méthode serait capable de différencier une substance phototoxique d'une substance non phototoxique (32).

#### 5.4.4. Tests de sensibilisation

Les substances sensibilisantes sont des substances capables d'induire une réaction de sensibilisation après un contact cutané.

Les réactions de sensibilisation se déroulent en 2 phases :

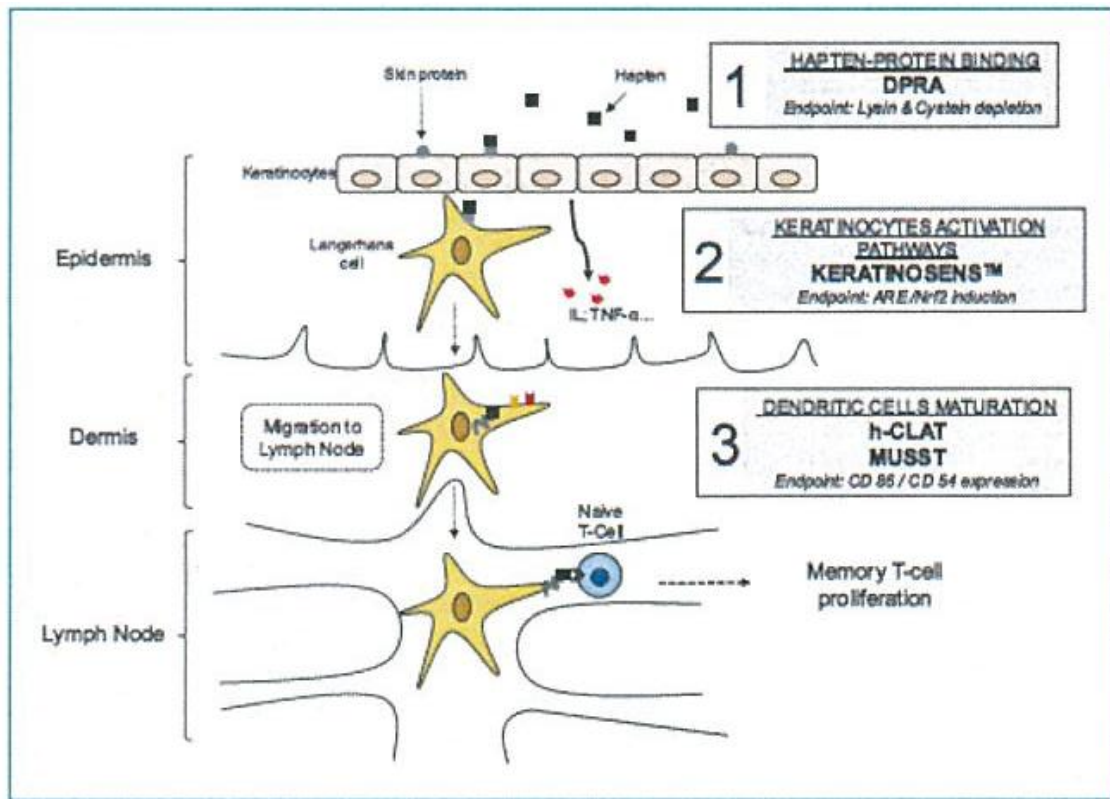
- Une phase d'induction : induction d'une mémoire immunologique spécifique ;
- Une phase de révélation : production d'une réponse allergique à médiation cellulaire par exposition d'un individu sensibilisé au même allergène après réexposition à cet allergène.

Il s'agit d'un mécanisme complexe en plusieurs étapes qu'il est difficile de traduire *in vitro*.

Les tests de référence pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant d'une substance sont des méthodes sur animaux. Bien que ces techniques utilisent un nombre restreint d'animaux et sont des méthodes alternatives, elles sont cependant interdites pour évaluer un ingrédient cosmétique. Le test le plus connu est le LLNA (Local Lymph Node Assay) pour la sensibilisation cutanée, réalisé sur des souris, dont la ligne directrice est l'OCDE TG 429. On peut également citer le Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) et le Buehler Test (ligne directrice OECD 406), réalisés sur des cochons d'inde.

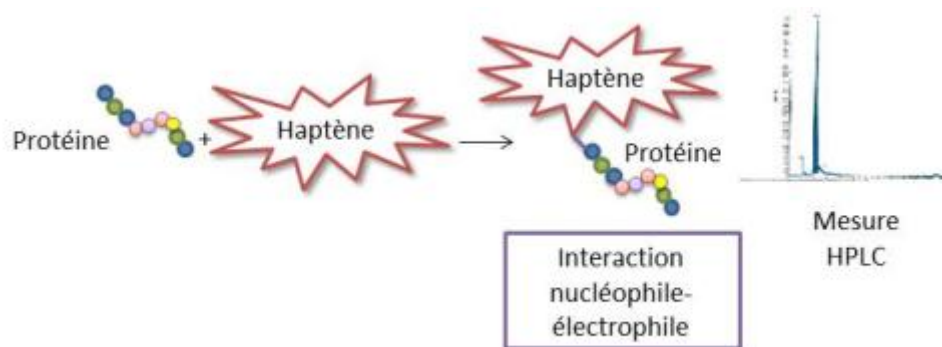
Plusieurs tests alternatifs sont en cours de validation par l'EURL ECVAM depuis 2009. Deux tests : le *in chemico* Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) et le *in vitro* KeratinoSens™ test method ont été validés récemment par l'EURL ECVAM et des lignes directrices OCDE ont été publiées en février 2015 : TG 442C et TG 442D (39). Le test human Cell Line Activation Test (h-CLAT) a également été validé et un projet de ligne directrice a été publié par l'OCDE en juillet 2014 (40). Une ligne directrice devrait donc être très prochainement publiée. Un autre test est en cours de validation, le Myeloid U937 Skin Sensitisation Test (MUSST). Des données supplémentaires sont requises pour le valider.

L'inconvénient de ces tests est qu'ils doivent être utilisés en combiné pour donner des résultats fiables. L'utilisation d'un seul de ces tests est insuffisante pour déterminer le potentiel sensibilisant d'une substance (41). En effet, chaque test s'intéresse à une étape spécifique de la réaction de sensibilisation, le DPRA et le KeratinoSens s'intéresse à l'étape de réactivité des protéines, le h-CLAT et le MUSST s'intéresse à l'étape d'activation des cellules dendritiques (figure 6). Un seul test négatif n'est donc pas suffisant pour affirmer une absence de sensibilisation cutanée de la substance, contrairement au LLNA. C'est pourquoi l'EURL ECVAM développe une stratégie de tests intégrés (ITS : Integrated Test Strategies) pour évaluer au mieux les substances potentiellement sensibilisantes (41).



**Figure 6 : Mécanisme de la sensibilisation cutanée et méthodes d'évaluation, d'après Quantin, 2015 (42)**

- Le DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) : test *in chimico* permettant de quantifier la réactivité chimique basée sur l'observation de la déplétion de deux peptides synthétiques de référence contenant chacun un résidu nucléophile de type cystéine ou lysine qui vont réagir avec la molécule sensibilisante (phénomène d'hapténation). Ce test se base donc sur le fait qu'une substance capable de se lier à une protéine est potentiellement apte à être un allergène de contact. Les mesures de réactivité se font par le dosage du peptide libre par couplage avec un spectre HPLC et un spectre de masse, après incubation pendant 24 heures de la substance à tester, puis calcul du pourcentage de déplétion, comme le montre la figure 7.



**Figure 7 : Schéma explicatif du fonctionnement du test DPRA, d'après Intertek (43)**

Selon le résultat, la molécule est classée en catégorie de réactivité minimale, faible, modéré ou forte. Une limite de 6.38% de déplétion est utilisée comme support de discrimination entre les sensibilisants et les non sensibilisants. Si la réactivité est minimale, la substance sera considérée comme potentiellement non-sensibilisante, si la réactivité est faible, modérée ou forte, elle sera classée comme potentiellement sensibilisante (tableau 6). Une des limites de ce test est qu'il ne peut détecter les pro-haptènes, qui nécessitent une métabolisation pour être sensibilisant. La détection des pré-haptènes (qui nécessitent une activation abiotique) n'est pas claire, mais certains sont détectés (42; 44; 45).

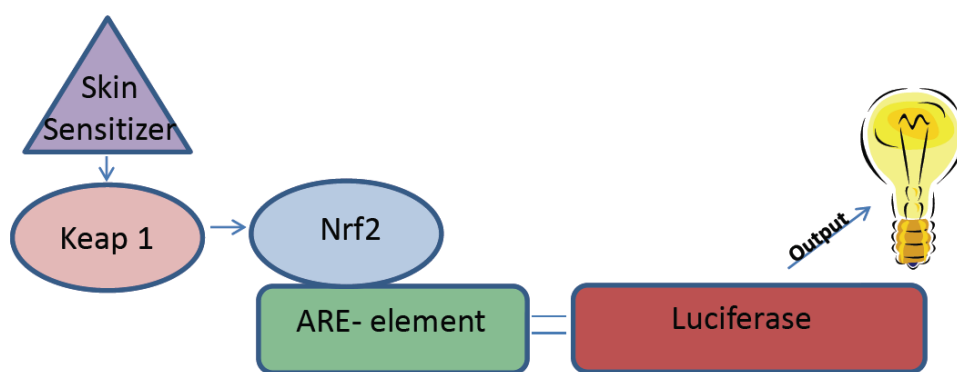
**Tableau 6 : Modèle de prédiction cystéine 1:10/lysine 1:50, d'après OECD, 2015 (45).**

Mean of cysteine and lysine % depletion	Reactivity Class	DPRA Prediction <sup>3</sup>
$0\% \leq \text{mean \% depletion} \leq 6.38\%$	No or minimal reactivity	Negative
$6.38\% < \text{mean \% depletion} \leq 22.62\%$	Low reactivity	Positive
$22.62\% < \text{mean \% depletion} \leq 42.47\%$	Moderate reactivity	
$42.47\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity	

- Le KeratinoSens™ : ce test permet d'évaluer les changements d'expression de gènes après contact avec une substance sensibilisante. Il détecte l'activation de l'élément de réponse antioxydant / électrophile (ARE) voie dépendante dans les kératinocytes. Cette méthode utilise des kératinocytes HaCaT transfectés avec un



plasmide contenant le gène de la luciférase (46). Ce gène est activé lors de la présence d'un élément de réponse antioxydant (ARE) (voir figure 8). La présence d'une molécule sensibilisante électrophile est responsable d'un stress oxydant au sein de la cellule. Le facteur de transcription Nrf2 va alors être libéré, passer la membrane nucléaire et se fixer sur la séquence ARE pour activer le gène de la luciférase. La mesure du signal (par une détection lumineuse) induit par la luciférase permet de détecter la présence du sensibilisant. La substance testée sera considérée comme potentiellement sensibilisante si, après 48h d'incubation, l'induction de l'activité de la luciférase est statistiquement significative (facteur 1,5 ou 50% d'augmentation) (47; 42).



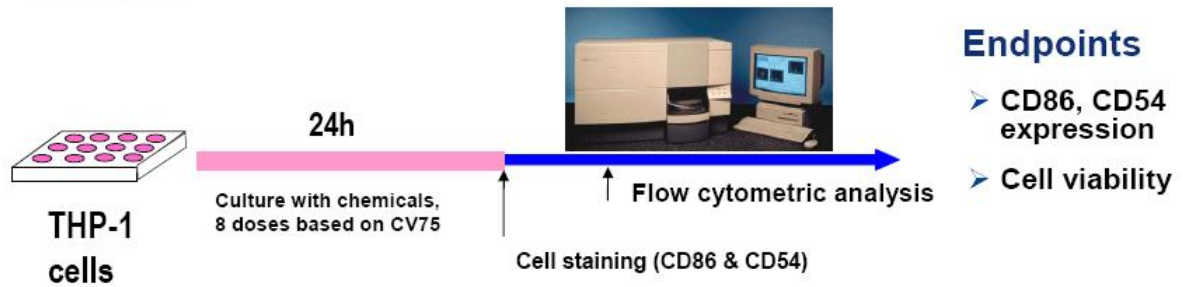
Adapted from Natsch, *et al.*, 2010

**Figure 8 : Schéma explicatif du fonctionnement du test KeratinoSens, d'après IIVS (46)**

- h-CLAT (human Cell Line Activation Test) : ce test mesure les marqueurs d'activation des cellules dendritiques (cellules présentatrices de l'antigène). Le principe de ce test est de mesurer la modulation des marqueurs CD86 et CD54 dans les cellules THP1, cellules provenant d'une lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine utilisées en tant que modèle de substitution des cellules dendritiques. Ces marqueurs sont dosés par une méthode de cytométrie en flux, 24 heures après l'exposition à 8 concentrations de la substance à tester (figure 9). La substance sera classée comme sensibilisante si l'intensité de fluorescence relative (RFI) pour chaque marqueur dépasse la limite définie ( $RFI\ CD86 \geq 150$  et  $RFI\ CD54 \geq 20$ ). La viabilité cellulaire doit être supérieure à 50% pour que les résultats soient pris en compte (39).

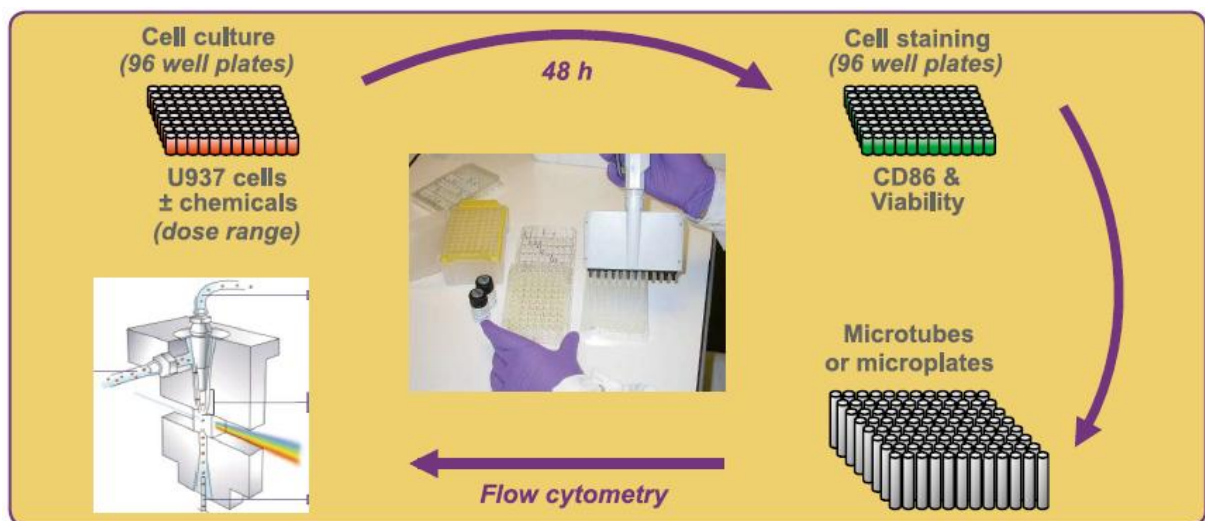


## Procedure



**Figure 9** : Méthode de détection de molécules sensibilisantes grâce au test h-CLAT, d'après Casati, 2013 (41).

- Le MUSST (Myeloid U937 Skin Sensitisation Test) : ce test est également basé sur la détection de l'activation de cellules dendritiques grâce à l'expression de marqueurs de surface lors d'un contact avec une molécule sensibilisante (figure 10). Les cellules utilisées proviennent de lignées cellulaires myéloïdes humaines U937 et le marqueur de surface étudié est le CD86. Le principe est similaire au test h-CLAT. La substance à évaluer est mise en contact avec les cellules U937 pendant 48h à différentes concentrations. L'expression du marqueur CD86 est détectée par cytométrie en flux et la viabilité cellulaire est déterminée.



**Figure 10** : Schéma explicatif de test MUSST, d'après Ovigne (48)

#### 5.4.5. Tests de toxicité aiguë

La toxicité aiguë systémique se définit par des effets secondaires qui apparaissent à la suite d'une exposition unique ou de plusieurs expositions au cours de 24 heures après exposition par une voie spécifique (orale, cutanée, inhalation), à la suite d'une période d'observation de 14 jours (27).

Le test de référence était, jusqu'en 2001, le test de toxicité aiguë par voie orale (ligne directrice OCDE 401), réalisé le plus souvent chez les rats. Ce test permettait de définir la dose létale qui tue 50% des animaux testés (DL50). D'autres tests permettant d'estimer le potentiel léthal d'une substance ont été développés *in vivo* chez l'animal, répondant aux exigences des 3Rs (27) :

- Acute toxicity class method (ligne directrice OCDE 423),
- Up and Down procedure (ligne directrice OCDE 425).

Ces deux méthodes utilisent cependant des animaux bien que leur nombre ait été réduit au maximum et ne peuvent donc être utilisées pour évaluer un ingrédient cosmétique.

Deux méthodes alternatives *in vitro* pour estimer la toxicité aiguë par voie orale d'une molécule ont été validées par l'ECVAM (22) :

- 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) assay. Cette technique a pour but d'évaluer la DL50 *in vitro* pour estimer la première dose à administrer chez l'animal. Elle permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour les tests de toxicité aiguë en administrant directement la bonne dose. Il peut également être utilisé en cosmétique mais les résultats ne pourront être vérifiés *in vivo* par la suite. Ce test utilise des fibroblastes de souris 3T3 et des kératinocytes humains normaux. Différentes concentrations sont appliquées à ces cultures de cellules et la toxicité aiguë est estimée par mesure de la cytotoxicité cellulaire via le test de relargage du rouge neutre. La prédiction pour classer les molécules selon le GHS est cependant faible : 31% sur les fibroblastes de souris 3T3 et 29% sur les kératinocytes humains (27).
- 3T3 NRU cytotoxicity assay : test de cytotoxicité *in vitro*, test pour lequel l'EURL ECVAM a publié des recommandations en 2013. Ce test permet d'identifier les substances qui ne nécessitent pas de classification CLP pour leur toxicité aiguë par voie orale, substances pour lesquelles la DL50 est supérieure à 2000 mg/kg pc. Il utilise des fibroblastes de souris BALB/c3T3. Il est basé sur la capacité des cellules

viables à incorporer le colorant rouge neutre. L'absorption du colorant est mesurée par spectrophotomètre. Ce test n'est pas encore complètement validé (49).

Ces 2 méthodes alternatives permettent de donner un ordre d'idée sur la toxicité aiguë potentielle d'une substance mais ne permettent pas le non recours aux tests *in vivo* (27). Actuellement, il n'existe aucune méthode sûre pour estimer cette toxicité, ce qui pose un problème pour évaluer un ingrédient cosmétique.

Concernant la toxicité aiguë par voie cutanée, il n'existe encore aucune technique *in vitro*. Le test de référence, toxicité aiguë par voie cutanée (ligne directrice OCDE 402), est réalisé principalement chez les rongeurs (rat, lapin ou cochon d'inde). Il n'y a donc également pas de méthodes alternatives pour évaluer la toxicité aiguë cutanée d'un ingrédient cosmétique (27).

#### 5.4.6. Tests de mutagénèse/génotoxicité

La mutagénicité réfère à la capacité d'une substance d'induire des modifications stables et irréversibles du patrimoine génétique, transmissibles de division cellulaire en division cellulaire. La génotoxicité est la capacité des substances d'interagir avec l'ADN et/ou la machinerie cellulaire qui maintient l'intégrité du génome.

Les altérations génétiques des cellules somatiques et germinales sont associées à de sérieux effets sur la santé, et peuvent apparaître à des faibles doses. En effet, les mutations dans les cellules somatiques peuvent être à l'origine de cancer et les mutations dans les cellules germinales peuvent être responsables d'avortements spontanés, d'infertilité ou de dommages héréditaires pour le nouveau-né (50).

C'est pourquoi l'étude du potentiel génotoxique est primordiale lors de l'évaluation de la toxicité d'une substance.

Afin de déterminer au mieux ce potentiel, une batterie de test est nécessaire, tests permettant d'évaluer les dommages primaires à l'ADN, de détecter des dommages stables ou irréversibles et des perturbations des mécanismes impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome (50).

Actuellement, plusieurs tests *in vitro* sont disponibles mais une batterie de test *in vitro* n'est pas suffisant pour déterminer le potentiel génotoxique d'une substance, principalement si un des tests montre un résultat positif. Un résultat positif devrait être

confirmé par un test *in vivo* car il existe de nombreux faux-positifs (50), ce qui ne peut être le cas pour évaluer un ingrédient cosmétique.

Les tests *in vitro* disponibles sont décrits ci-dessous :

- Tests de mutagénèse : le test d'Ames (ligne directrice OCDE 471). Il permet d'évaluer les mutations géniques sur bactéries (*Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli*). Il étudie la capacité de ces bactéries auxotrophes à muter pour devenir hétérotrophes et donc se multiplier sur un milieu dépourvu de l'acide aminé indispensable à leur croissance (l'histidine pour *S. typhimurium* et le tryptophane pour *E. coli*), lorsque celles-ci sont mises en contact avec un agent mutagène.
- Tests de mutation génique sur cellules : on dispose du test MLA/Tk (Mouse Lymphocyte Assay thymidine kinase, ligne directrice OCDE 476) et du HPRT (Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase). Ces tests évaluent la capacité de ces cellules à devenir résistantes à une molécule toxique (la trifluorothimidine pour le test MLA/Tk et la thioguanine pour le test HPRT) en présence d'un agent mutagène. Le test MLA/Tk est très utilisé car il permet d'identifier des substances mutagènes et clastogènes.
- Tests permettant d'évaluer le pouvoir clastogène et aneugène : il existe un test sur cellules de mammifères, le test du micronoyau *in vitro*, seul test actuellement validé. Il a été approuvé par l'OCDE en 2010, la ligne directrice disponible est la DG 487. Une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les cellules bloquées en cytochinèse après un contact avec un produit, permet de classer cette substance comme génotoxique.

D'autres tests pour évaluer la génotoxicité existent mais ils sont en cours de validation. On peut citer le test des comètes *in vitro* et les tests de génotoxicité (test des comètes et test du micronoyau) sur modèles de peau reconstruite 3D. Ces deux derniers tests nous intéressent particulièrement car ils permettraient d'évaluer la génotoxicité d'une molécule sur la peau, en tenant notamment compte de la métabolisation qu'il peut y avoir au niveau cutané (26).

#### 5.4.7. Tests de cancérogénicité

Une substance est considérée cancérogène si elle est susceptible d'induire des tumeurs ou d'augmenter leur incidence, ou de diminuer leur temps d'apparition (27).

La cancérogénèse est un processus en plusieurs étapes nécessitant de longues périodes d'incubation et la métabolisation de certaines molécules (27). On ne peut donc pas à l'heure actuelle, envisager le remplacement total de tests *in vivo*.

Il n'existe pas actuellement de tests validés. Les différents tests développés ont été prévalidés. On peut citer les tests de transformation cellulaire. Ces tests permettent la détection de changements phénotypiques induits dans des cultures cellulaires (ex : Syrian Hamster Embryo assay). Des recommandations de l'EURL ECVAM ont été publiées le 14 mars 2012 pour une inclusion dans une éventuelle ligne directrice OCDE et une acceptation réglementaire.

Il n'existe donc aucun test *in vitro* disponible pour évaluer la cancérogénicité d'un ingrédient cosmétique.

Néanmoins l'ECVAM est impliqué dans le projet FP6 carcinoGENOMICS, qui vise à développer la toxicogénomique des tests *in vitro* pour détecter les substances avec un potentiel génotoxique et cancérigène. Deux tests ont été sélectionnés pour une optimisation plus poussée : un test toxicogénomique basé sur les cellules de foie HeparG et un autre faisant intervenir les cellules de rein RPTEC/TERT1 (22).

#### 5.4.8. Tests de reprotoxicité

Deux tests sont validés par l'ECVAM pour étudier le potentiel embryotoxique et tératogène d'une molécule (51) :

- Murine Embryonic stem cell test (EST) : utilise deux lignées cellulaires de souris qui sont exposées à la substance à tester. La cytotoxicité sur les fibroblastes 3T3 et la différenciation des cellules souches embryonnaires murines ES-D3 en cellules cardiaques sont étudiées ;
- Whole rat Embryo culture (WEC) : utilise des embryons de rats aux 10<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jours de gestation, qui sont mis en culture avec la substance à étudier. Ce test ne peut être utilisé en cosmétique car des animaux sont sacrifiés.

D'autres tests sont en cours de développement ou de prévalidation. Parmi eux, deux consistent à mettre des œufs fécondés de grenouille (Frog Embryo teratogenesis assay = FETAX) ou de poisson (The Zebrafish embryo teratogenicity assay) en contact avec la substance à tester à différentes concentrations puis à les incuber durant 96H. Ces méthodes

sont en cours d'optimisation afin de maîtriser les facteurs de variabilités inter- et intra-laboratoires.

#### 5.4.9. Tests de toxicité répétée

Les études de toxicité répétée permettent de mettre en évidence les effets secondaires résultants d'une exposition quotidienne sur une période donnée à une substance. Ces tests ont pour but de mettre en évidence les caractéristiques générales de toxicité, les organes cibles, les effets dose-réponse, les informations sur la réversibilité des effets et de définir une NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) et une LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level). Ces études sont le plus souvent réalisées par voie orale, mais également par inhalation ou voie cutanée si besoin. La durée d'exposition peut être de 28 jours (toxicité subaiguë) ou de 90 jours (toxicité subchronique). L'étude la plus couramment utilisée est une étude de 90 jours par voie orale chez les rongeurs (ligne directrice OCDE 408), étude utilisée pour obtenir la NOAEL, valeur qui nous permet par la suite de calculer une marge de sécurité (22).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthodes alternatives pour la toxicité après exposition répétée.

Ainsi, les nouveaux ingrédients cosmétiques ne peuvent être testés en toxicité répétée.

#### 5.4.10. Les QSARs et le read-across

Depuis plusieurs années, on voit apparaître de nouvelles méthodes pour appréhender l'activité et la toxicité des substances chimiques via des logiciels informatiques ; on les appelle les méthodes *in silico*. Elles sont de plus en plus utilisées pour orienter les tests pré-cliniques à réaliser ou lorsqu'aucune donnée n'est disponible afin de mettre en évidence des alertes concernant la toxicité possible d'une molécule.

Parmi elles, les QSARs (quantitative structure-activity relationship ou relation quantitative structure - activité) permettent d'estimer les propriétés d'une substance à partir de sa structure moléculaire, et de donner des informations sur le danger qu'elle peut avoir. Les QSARs se basent donc sur l'hypothèse que des molécules de structure chimique similaire ont des activités similaires, c'est ce que l'on appelle la relation structure-activité. La base des QSARs est l'utilisation de groupes d'analogues comme source de données (52).

Ainsi, différents modèles ont été développés pour évaluer les similarités de structures et mettre en évidence des alertes structurales. Ces modèles offrent une alternative rapide et à moindre coût aux tests sur animaux. Parmi eux, on peut citer l'OCDE QSAR Toolbox et ToxTree.

La Toolbox de l'OCDE est un logiciel permettant de combler les lacunes portant sur la toxicité d'une substance et d'évaluer son danger pour l'Homme et l'environnement. Ce logiciel contient des données provenant d'études expérimentales, les connaissances des alertes structurales qui indiquent la présence d'un danger et l'équipement pour estimer le manque de données expérimentales. Le principe de la Toolbox est l'identification des caractéristiques structurales pertinentes et des mécanismes potentiels ou du mode d'action de la substance testée, l'identification d'autres substances chimiques ayant les mêmes caractéristiques structurales et l'utilisation des données expérimentales pour combler le manque de données sur la substance évaluée (52).

ToxTree est un logiciel basé sur les alertes structurales. Il permet de classer les molécules en trois catégories selon l'arbre de décision de Cramer. Cet arbre de décision consiste à répondre à 33 questions par oui ou par non et de classer la substance dans une des trois classes de Cramer selon sa toxicité potentielle : la classe I regroupe les molécules ayant une structure simple et suggérant une faible toxicité, alors que la classe III regroupe les molécules potentiellement réactives et dangereuses (52). Ces classes de Cramer sont également utilisées dans l'approche TTC (détaillé précédemment).

Une autre méthode *in silico* couramment utilisé est le Read-across. Contrairement aux QSARs (qui utilisent des groupes d'analogues), le read-across utilise directement un analogue pour prédire les points critiques. Aucune prédiction ne peut être faite si l'analogue proche de la substance à évaluer n'est présent dans la base. La Toolbox OCDE peut également être utilisé pour le read-across (52).

## 6. EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES CONTENUES DANS LES PLANTES

### 6.1. But

Contrairement à l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique ne met pas au point des médicaments, produits ayant pour but de soigner une maladie ; aucun risque quant à l'utilisation de ces produits n'est donc acceptable car ils sont destinés à des personnes en bonne santé.

C'est pourquoi, la toxicologie et l'évaluation de la sécurité prennent une place de plus en plus importante au sein des laboratoires cosmétiques.

Les plantes constituent une source inépuisable de matières premières. Elles sont une source de molécules actives pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques, et sont aussi utilisées dans le domaine de l'agroalimentaire. En effet, elles sont naturellement composées de molécules dont l'activité peut présenter un intérêt pour les cosmétiques. Cependant, ce n'est pas parce que ces molécules sont naturelles qu'elles ne représentent pas un risque pour la santé humaine.

Chacun sait que beaucoup de molécules synthétisées par les plantes ont une activité biologique très importante, pouvant aller jusqu'à entraîner la mort de la personne l'ayant consommée voire touchée. Il est donc primordial d'identifier ces molécules avant d'utiliser un extrait la contenant dans un produit cosmétique.

C'est pourquoi il est important de développer des bases de données regroupant le maximum d'informations sur les molécules présentes dans une plante ou sur un extrait constitué de plusieurs molécules.

Au cours de mon stage au sein des laboratoires Clarins j'ai donc été chargée de développer une telle base de données afin de faciliter l'évaluation de la sécurité des extraits de plante. Selon la richesse des données disponibles, l'utilisation de la plante pouvant contenir certaines molécules sera acceptée ou refusée, la nécessité de faire des tests complémentaires sera mise en avant, et les concentrations maximales utilisables seront calculées lorsque cela est possible.



La méthodologie suivie, et détaillée plus loin, ne se limite cependant pas au développement de la base de données pour les laboratoires Clarins, mais peut être appliquée dès que l'on se trouve face à un extrait de plante que l'on veut incorporer à une formule cosmétique.

## 6.2. Matériels et méthodes

### 6.2.1. Outils informatiques et bases de données

Afin de pouvoir regrouper un maximum d'informations sur les plantes et la toxicité des molécules présentes dans les plantes, plusieurs moteurs de recherche, sites internet et bases de données sont consultés (13). Les sites apparaissent dans l'ordre d'utilisation (le plus souvent) :

- **Google** : permet d'avoir une première approche de la plante et des molécules présentes, de renseigner les informations générales sur la substance telle que la structure chimique, le numéro CAS, le poids moléculaire, notamment grâce aux fiches de données de sécurité des fournisseurs (tel que Sigma-Aldrich) ;
- **SCCS** (Scientific Committee on Consumer Safety) : est l'un des comités d'experts scientifiques indépendants institués pour conseiller la Commission européenne sur les questions scientifiques. Le SCCS aborde les questions relatives à la sécurité sur la santé humaine des produits de consommation non alimentaires tels que les cosmétiques, les jouets, les vêtements et les textiles, les produits de soins personnels et des services de consommation (par exemple : tatouage). Les membres sont des experts scientifiques et médicaux des Etats membres et font l'objet d'élections périodiques. Des rapports concernant l'utilisation de certaines plantes et molécules en cosmétiques sont à disposition de l'évaluateur de la sécurité. Les opinions des experts sont établies sur la base d'un ensemble spécifique de données, qui ont été présentées par un demandeur (par exemple : un industriel, les autorités des États membres) afin de satisfaire à des exigences réglementaires précises. Ces opinions sont approuvées lors des réunions plénières du SCCS et sont ensuite disponibles sur leur site ;
- **CIR** (Cosmetic Ingredient Review) : est un organisme scientifique américain qui publie les résultats de ses évaluations sur la sécurité d'utilisation des ingrédients à usage cosmétique. Ces évaluations sont réalisées par des experts : toxicologues, médecins et dermatologues qui font partie de l'association professionnelle :

Personal Care Products Council, et ils ont le soutien de la US Food and Drug Administration et la Consumer Federation of America. Les rapports publiés sont disponibles sur son site internet. Ils traitent de molécules utilisées par l'industrie cosmétique et émettent des avis quant à leur utilisation et les concentrations utilisables dans les cosmétiques ;

- **PCPC Ingredient Database** : et une base de données regroupant des informations concernant, entre autre, la sécurité d'emploi de la molécule. Quand ils existent, on peut aussi consulter le RTECS, les résultats du NTP, le rapport du CIR, savoir si la substance a été classée dans une des annexes du règlement cosmétique, etc. ... ;
- **Pubmed** : est un moteur de recherche gratuit de données bibliographiques de l'ensemble des domaines de spécialisation de la biologie et de la médecine. Il a été développé par le National Center for Biotechnology Information (NCBI), et est hébergé par la Bibliothèque nationale de médecine américaine du National Institute of Health. Il permet de trouver des articles scientifiques pertinents sur une molécule donnée ou sur un extrait de plante, de préciser une potentielle activité pharmacologique ;
- **JECFA** (Joint Expert Committee on Food Additives) : est un comité international d'experts scientifiques qui est administré conjointement par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Ils ont pour mission d'évaluer la sécurité sanitaire des produits chimiques utilisés dans l'alimentation et de définir des doses journalières acceptables (DJA). Ces doses nous permettent d'avoir des données d'exposition chez l'Homme par voie orale, doses qui peuvent donc être considérées comme sans danger ;
- **EMA** (European Medicines Agency) : est l'agence de santé européenne. Elle est responsable de l'évaluation scientifique des médicaments développés par une compagnie pharmaceutique européenne pour une utilisation au sein de l'Union Européenne. Son rôle principal est de délivrer des autorisations de mise sur le marché (AMM) dans le cadre d'une procédure centralisée, pour les médicaments humains ou vétérinaire. L'agence est entourée de 7 comités pour l'aider dans sa démarche d'évaluation. Parmi eux, l'HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products), chargé de préparer des opinions sur les plantes médicinales. Les monographies rédigées par l'HMPC sont des sources très intéressantes de données. Le comité valide deux types d'usage pour les plantes couramment utilisées pour

leurs vertus thérapeutiques : l'usage bien établi et l'usage traditionnel. Le comité définit également les posologies, ce qui nous permet d'obtenir des données d'exposition chez l'Homme, et de déduire des doses sans danger pour l'Homme.

- **Duke's phytochemical and ethnobotanical databases** : le docteur James A. Duke est un botaniste américain, connu pour ces nombreuses publications sur les plantes médicinales. Il a mis au point une base de données regroupant de nombreuses plantes. Cette base permet de faire des recherches sur la composition d'une plante, son utilisation ethnobotanique, l'activité d'une substance. Un moteur de recherche permet aussi de regrouper toutes les plantes contenant une substance spécifique.
- **Toxnet** : est une interface de bases de données couvrant la toxicologie, les substances dangereuses, la santé environnementale. Elle est gérée par le programme d'information sur la toxicologie et la santé environnementale (TEHIP) de la division du service d'informations spécialisées de la National Library of Medicine (NLM) ;
- **NTP (National Toxicology Program)** : est un organisme Américain qui a pour fonction d'effectuer des tests en laboratoire sur des substances potentiellement dangereuses pour la santé humaine et de rendre disponibles les résultats ainsi obtenus ;
- **IARC (International Agency for Research on Cancer)** : est une agence intergouvernementale de recherche sur le cancer qui publie des monographies sur des substances potentiellement cancérigènes. Les monographies rédigées par son panel d'experts concernent le risque cancérigène pour l'Homme des produits chimiques, des agents biologiques ou physiques. Selon le risque, les molécules seront regroupées en 5 classes : 1, 2a, 2b, 3 et 4 correspondants respectivement à : agents cancérigènes, agents probablement cancérigènes, possible agents cancérigènes, agents inclassables quant à leur cancérigénicité et agents probablement non cancérigènes ;
- **ECHA** : permet de savoir si une molécule a déjà été préenregistrée ou enregistrée dans le contexte de REACH. En effet, les résultats des études de toxicité aiguë ou chronique, de génotoxicité ou reproxicité réalisées sur la molécule sont disponibles si cette dernière a déjà été enregistrée ;
- **ESIS (European Chemical Substances Information System)** : est une base de données mise en place par l'Union Européenne. Elle regroupe des informations sur

les substances chimiques, telles que des propriétés physico-chimiques, des données toxicologiques et écotoxicologiques ;

- **EFSA** (European Food Safety Authority) : évalue les risques pour la santé humaine des denrées alimentaires au sein de l'Union Européenne. Elle publie des rapports, disponibles sur son site internet, sur certaines molécules présentes ou utilisées dans l'alimentation (additifs, colorants). Ces rapports contiennent tous les résultats publiés sur la molécule, complétés de l'avis du groupe d'expert ;
- **FDA** (Food & Drug Administration) : est l'Administration Américaine des denrées alimentaires et des médicaments. Le rôle de cet organisme est d'autoriser la commercialisation des médicaments ou des additifs alimentaires sur le territoire des Etats-Unis ;
- **INRS** (Institut National de Recherche et de Sécurité) : est un organisme français qui a pour mission de prévenir les accidents du travail et les maladies professionnelles ;
- **INERIS** (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) : est une administration française qui contribue à la prévention des risques que les activités économiques font peser sur la santé, la sécurité des personnes et des biens, et sur l'environnement ;
- **HERA** (Human & Environmental Risk Assessment) : est un programme volontaire de l'industrie pour réaliser des évaluations des risques humains et environnementaux générés par les ingrédients des produits de nettoyage ménagers ;
- **EPA** (Environmental Protection Agency) : est une agence Américaine sur la protection de l'environnement. Elle rend disponible sur son site des études réalisées sur des substances chimiques ;
- **ATSDR ToxFAQS** (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) : est une agence fédérale de santé publique au sein de l'United States Department of Health and Human Services. L'agence met l'accent sur la réduction des risques pour la santé liés à l'exposition à des substances dangereuses en rédigeant des monographies ;
- **NICNAS** (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme) : est l'organisme de réglementation du gouvernement Australien pour les produits chimiques industriels. Il a été conçu pour protéger les travailleurs, le public et l'environnement contre les effets nocifs des produits chimiques industriels, par la rédaction de recommandations pour leur utilisation en toute sécurité.

### 6.2.2. Les ouvrages

Il existe de nombreux ouvrages traitant des plantes et de leur toxicité. Ceux qui sont couramment utilisés sont les suivants :

- Le **Botanical Safety Handbook**, Seconde édition de l'American Herbal Products Association's (AHPA) (également disponible sur internet) qui classe les plantes selon leur toxicité : la classe 1 est accordée aux plantes qui sont sans danger si consommées de façon appropriée ; la classe 2 regroupe les plantes dont l'utilisation est restreinte (2A : utilisation externe uniquement, 2B : ne doit pas être utilisée par les femmes enceintes, 2C : ne doit pas être utilisée lors de l'allaitement, 2D : autres restrictions) ; la classe 3, les plantes qui ne doivent être utilisées que sur conseil d'un spécialiste ; la classe 4, les plantes pour lesquelles il manque d'informations pour les classer.
- **British Herbal Compendium (BHC)**, volume 1 et 2 : ouvrages regroupant des monographies sur les plantes médicinales. Les monographies regroupent de nombreuses données sur la plante telles que sa composition, la pharmacologie, les études *in vitro* et *in vivo* réalisées, les données humaines.
- Les livres du Conseil de l'Europe élaborés par le comité d'experts :
  - **Les plantes dans les cosmétiques** : plantes et préparations à base de plantes utilisées en tant qu'ingrédients dans les produits cosmétiques -Volume 1 et 2 (2001). Ces deux volumes contiennent au total 115 fiches sur la sécurité d'emploi des plantes et préparations à base de plantes utilisées comme ingrédients dans les produits cosmétiques ;
  - **Active ingredients used in cosmetics : Safety Survey** (2008). Dans ce livre sont étudiées 45 substances actives présentes dans les plantes pour lesquelles aucune réglementation spécifique n'existe. Ces études se présentent sous forme de monographie dans lesquelles on y retrouve des informations sur les utilisations, les propriétés et une évaluation du risque pour l'utilisation dans les produits cosmétiques ;
  - **Plants used in cosmetics**-Volume III : Potentially harmful components (2006). Ce livre fait référence aux substances potentiellement présentes dans les plantes pouvant induire un risque pour la santé humaine. Ainsi, 24 substances ont été étudiées afin

- d'établir des monographies dans lesquelles on y retrouve une évaluation du risque pour l'utilisation dans les produits cosmétiques ;
- **Natural sources of flavourings**-Reports No. 1, 2 et 3 (2000-2007-2008). Ces trois volumes regroupent des monographies sur plus de 600 substances aromatiques dans lesquelles figurent une évaluation de la sécurité.
  - **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics** : Il s'agit d'un ouvrage listant 300 ingrédients naturels ou plantes qui sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique ou alimentaires aux Etats-Unis.
  - **Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales** : 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> édition, par Jean Bruneton. L'ouvrage présente des monographies de plantes comprenant des informations sur les origines, l'identité, la production, la composition, l'activité biologique et une évaluation de la sécurité. Il prend aussi en compte les données de la Pharmacopée européenne, les Cahiers de l'Agence du médicament. Il inclut systématiquement les indications thérapeutiques que peuvent revendiquer les espèces végétales.
  - **ESCOP** : est un comité scientifique composé d'experts issus des pays membres européens qui compte des médecins, des phytothérapeutes, des spécialistes de la pharmacognosie, de la pharmacologie et de la réglementation. Ce comité a publié un livre dans lequel figure des monographies sur l'utilisation thérapeutique des médicaments végétaux. Les posologies couramment utilisées sont renseignées, ce qui nous permet d'avoir des données d'exposition chez l'Homme.
  - **WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 1 (1999), 2 (2004), 3 (2007) et 4 (2009)** : Monographies réalisées par les experts de l'Organisation Mondiale de la Santé sur les plantes utilisées dans le monde entier en médecine traditionnelle. Elles nous fournissent beaucoup d'éléments, tels que la composition des substances trouvées dans la plantes, les études *in vitro* et *in vivo* réalisées, les données cliniques, la posologie. Ainsi, des données d'expositions chez l'Homme peuvent être également déduites.
  - **Essential Oil safety – A guide for health care professionals**, par Tisserand : livre contenant des profils toxicologiques et analytiques sur les huiles essentielles obtenues à partir de plantes.
  - **Aromatherapy Science**, par Lis-balchin : livre regroupant des monographies d'huiles essentielles couramment utilisées en médecine traditionnelle. Les

monographies regroupent des données portant sur la composition de l'huile, les utilisations, les tests pré-cliniques et cliniques, les activités pharmacologiques...

### 6.2.3. Les logiciels

Pour évaluer la toxicité des molécules, j'ai utilisé trois logiciels :

- **EPI** : il s'agit d'un programme développé par l'EPA. Il permet d'estimer le coefficient de partage eau/octanol (log P) des molécules, à partir du numéro CAS ou de la structure chimique. Pour cela, le logiciel a besoin du numéro CAS ou de la notation SMILES qui correspond à une description simplifiée de la molécule. Ainsi, à partir du poids moléculaire et du log P, le passage transcutané de la molécule peut être estimé.
- **QSAR Toolbox version 2.2** : logiciel mis à disposition par l'OCDE permettant d'apporter une aide lors de l'évaluation du risque des produits chimiques lorsque peu d'information sur leur toxicité est disponible. Il classe les molécules par catégories selon les propriétés physicochimiques, les propriétés toxicologiques (concernant l'Homme, la santé ou l'environnement) ou le devenir dans l'environnement. Ainsi, selon la structure d'une molécule, le logiciel peut estimer une activité ou une toxicité potentielle par corrélation (site internet QSARtoolbox).
- **Toxtree** : il s'agit également d'un logiciel de QSAR. Celui-ci utilise la classification Cramer pour évaluer la toxicité des molécules et donne des alertes concernant la mutagénicité, la génotoxicité et la cancérogénèse, mais aussi l'irritation cutanée et oculaire.

### 6.2.4. Méthodes

Afin d'évaluer la toxicité d'un extrait de plante deux processus peuvent se présenter :

- Des données de sécurité ou d'utilisation sur la plante et ses extraits sont disponibles dans la littérature : c'est le cas par exemple lorsque la plante est utilisée depuis de nombreuses années en médecine traditionnelle, notamment lorsque l'HMPC a validé un usage bien établi ou un usage traditionnel pour une plante. Des études toxicologiques sur l'animal ont été réalisées et/ou des résultats d'études cliniques chez l'Homme sont disponibles, permettant ainsi de définir des NOAELs ou des doses sans danger chez l'Homme. Dans ce cas là, il sera possible d'utiliser directement ces données pour évaluer la toxicité systémique de l'extrait de plante.

- Aucune donnée de sécurité n'est disponible, aucune voire peu d'utilisation connue de la plante par l'Homme. Dans ce cas là, il ne pourra pas être possible de conclure directement sur le potentiel toxique de l'extrait de plante. Il faudra se baser sur la composition de cet extrait et étudier la toxicité des molécules qui le composent.

#### 6.2.4.1. Données de sécurité disponibles

Certaines plantes sont utilisées depuis de très nombreuses années en médecine traditionnelle. Des monographies ont été rédigées par différentes instances telles que l'HMPC, l'OMS, l'ESCOP, le BHC, l'AHPA...

Les monographies de l'HMPC sont très utiles, notamment lorsqu'un usage bien défini ou un usage traditionnel ont été validés. En effet, l'HMPC valide l'utilisation d'une plante ou d'un extrait pour un usage et une posologie définis. Ainsi, la dose journalière recommandée par l'HMPC peut être considérée comme une dose sans danger ou sans danger présumé chez l'Homme. Cette dose pourra alors être utilisée pour le calcul des marges de sécurité. Des études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont également pu être réalisées. Des NOAELs peuvent donc être disponibles pour le calcul de la MOS.

Cependant, la plupart du temps, seul un nombre limité d'information est disponible. Il est rare de pouvoir compléter le profil toxicologique complet d'un extrait de plante (tolérance locale, toxicité aiguë, génotoxicité...). Lorsqu'un usage bien établi ou traditionnel a été validé par l'HMPC, il pourra être établi qu'à la posologie conseillée, aucun risque n'est attendu, de part le long historique d'utilisation de la plante. Ainsi, on pourra en déduire que la plante ou l'extrait de plante ne présente pas de potentiel toxique si l'exposition systémique est inférieure à la dose couramment utilisée chez l'Homme. L'absence de données de toxicités aiguë et répétée, de génotoxicité ou de reprotoxicité pourra alors être justifiée.

Ces monographies sont très utiles pour définir une dose sans danger chez l'Homme par voie orale mais le plus souvent il n'existe pas de données portant sur la tolérance locale. Ainsi, il faudra conseiller la réalisation de tests d'irritation cutanée et oculaire, de sensibilisation et de phototoxicité.



#### 6.2.4.2. Absence de données de sécurité disponibles

Lorsqu'aucune donnée d'utilisation ou qu'aucun test sur l'animal ne sont disponibles, il faut se pencher plus spécifiquement sur la composition de la plante et de ses extraits. En effet, ce sont les molécules synthétisées par la plante qui peuvent présenter une toxicité pour l'Homme.

A partir d'un nom de plante ou d'un extrait de plante, il faut dans un premier temps trouver dans la littérature (internet, livres, monographies), les molécules susceptibles d'être présentes. Ensuite, ces différentes molécules sont prises séparément pour évaluer leur toxicité.

Dans un premier temps, les informations permettant l'identification de la molécule sont recherchées, tout comme son nom chimique ou IUPAC, son numéro CAS, sa structure chimique ou encore son poids moléculaire. Si la solubilité est connue, elle est également renseignée car selon le mode d'extraction choisi la présence de la molécule dans l'extrait pourra être évitée lorsque cette dernière est toxique.

La famille chimique de la molécule (alcaloïdes, flavonoïdes, terpènes...) est également cherchée, ainsi que le nom des plantes dans lesquelles on peut la trouver. Par la suite, la toxicité par famille chimique pourra être évaluée.

Dans un deuxième temps, des informations sur l'activité biologique de la substance sont recherchées ainsi que des mécanismes d'action potentiels.

Dans un troisième temps, une recherche bibliographique la plus exhaustive possible est réalisée, sur la toxicité de la molécule. Cette recherche est effectuée via les différents sites internet et bases de données renseignés ci-dessus (Confère 6.2.1. et 6.2.2.). Toutes les informations sont regroupées afin de constituer une base de données.

Les informations toxicologiques renseignées dans la base de données sont celles qui doivent être présentes dans tout profil toxicologique, soit :

- données de toxicité aiguë : DL50, toxicité d'organe ;
- données de toxicité chronique : NOAEL, NOEL, LOAEL ;
- données de mutagénicité, génotoxicité et cancérogénicité ;
- données de reprotoxicité : tératogénicité, toxicité pour le développement maternel et fœtal ;

- données de tolérance locale : irritation cutanée et oculaire, sensibilisation cutanée, phototoxicité ;
- données de pharmacocinétique : métabolites toxiques ou non ;
- données humaines (posologie, DJA...).

Dans un quatrième temps, si la recherche bibliographique n'a permis d'obtenir aucune information pertinente, les logiciels de QSARs (QSAR Toolbox et Toxtree) seront sollicités. Ils permettront de donner des alertes sur un potentiel mutagène, génotoxique ou cancérigène, et sur un éventuel pouvoir irritant pour les yeux ou la peau. Le Toxtree permet aussi de classer les molécules selon la classification Cramer et donc d'obtenir un niveau de toxicité et un seuil d'exposition à ne pas dépasser, selon la classe attribuée.

Pour terminer, toutes ces informations sont prises en compte pour conclure sur la toxicité de la molécule et donc sur l'utilisation possible de l'extrait de plante dans les produits cosmétiques. Pour cela, un arbre décisionnel a été réalisé.

### 6.3. Résultats

Au cours de mes 6 mois de stage, plus de 150 extraits de plante ont pu être analysés, et plus de 350 molécules ont pu être étudiées et ont permis d'alimenter la base de données.

Cette base de données se présente sous la forme d'un tableau Excel à 30 colonnes et à autant de lignes que de molécules étudiées.

Le tableau n'est pas inclus dans cette thèse car il est la propriété de Clarins et donc confidentiel.

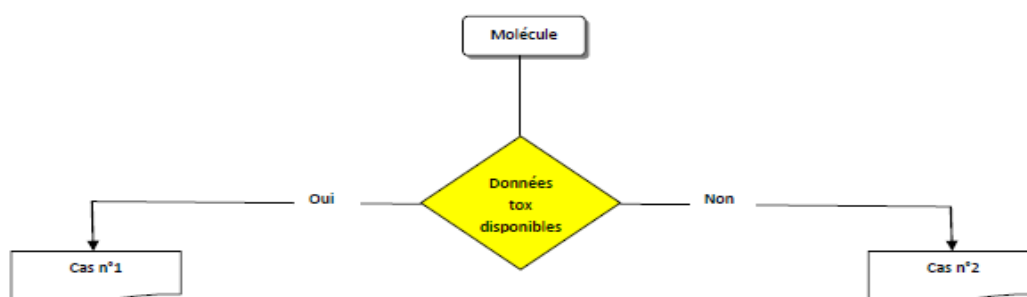
Pour conclure sur chaque molécule de façon la plus reproductible possible un logigramme a été mis au point. Il apporte une aide à la détermination de la toxicité d'une substance. Cet outil permet à l'évaluateur de la sécurité de classer les molécules en trois classes :

- Molécule pouvant être présente dans un extrait de plante, car considérée comme sans danger pour la santé humaine dans les conditions d'utilisation définies ;
- Molécule ne pouvant pas être présente dans un extrait, soit du fait qu'aucune donnée la concernant n'est disponible et par conséquent aucune évaluation toxicologique n'a pu être effectuée, soit parce que la toxicité est jugée trop importante (cas d'une molécule cancérigène par exemple). Dans cette catégorie,

nous pouvons aussi placer les substances classées génotoxiques et dont la concentration maximale tolérée tiendra compte du TTC concept ;

- Molécule qui pourra être présente dans un extrait sous réserve de réaliser des tests supplémentaires, dont les résultats devront être négatifs, écartant ainsi la toxicité suspectée. En cas de résultats positifs, la présence de la molécule devra être exclue.

Le logigramme se structure en 2 cas (Figure 11), en fonction de la présence de données disponibles suffisantes dans la littérature (cas 1) et en absence de données pertinentes permettant une analyse convenable du danger (cas 2).



**Figure 11 : Choix du cas 1 ou 2 en fonction des données toxicologiques disponibles dans la littérature**

Le cas 1 (figure 12) doit être suivi lorsque des données sont disponibles dans la littérature. Ces données peuvent être toxicologiques, scientifiques ou simplement d'usage (c'est-à-dire fournissant des informations sur une utilisation empirique de la molécule).

En fonction des données obtenues, 2 questions doivent être posées :

- Existe-t-il un rapport émit par un comité d'expert sur la molécule ? Le comité d'experts peut être celui du CIR ou du SCCS qui donne un avis concernant la substance dans le produit cosmétique, ou il peut provenir de l'EFSA, de la FDA, de l'EPA, de l'IARC, ou encore de l'INERIS dont les rapports peuvent contenir des informations importantes et utiles pour notre évaluation de la sécurité de l'ingrédient ;
- Une étude chronique a-t-elle été réalisée, nous donnant une valeur de NOAEL ? Si nous disposons d'une NOAEL, nous pouvons alors calculer la marge de sécurité de la molécule et ainsi définir des concentrations maximales utilisables dans les produits finis.

Dans le cas où un rapport a été émis, il faut vérifier la date de publication. En effet, si le rapport a été rédigé il y a une dizaine d'années ou plus, il est probable que de nouvelles informations soient disponibles.

Si le rapport est récent, les valeurs définies par le comité d'experts seront retenues. Nous suivrons donc les informations s'y trouvant et la substance pourra alors être utilisée dans un produit cosmétique, soit directement, soit dans un extrait, à la concentration maximale définie par le comité.

Si le rapport n'est pas récent, il faut confronter les résultats émis dans le rapport aux nouvelles données disponibles. Si une NOAEL plus récente et plus pertinente a été publiée, de nouvelles concentrations maximales devront être calculées pour respecter une marge de sécurité supérieure ou égale à 100. Si de nouvelles études dans le domaine de la mutagénicité, génotoxicité ou cancérogénèse, ou encore de la reprotoxicité sont parues, les résultats devront être pris en compte lors de l'évaluation. Si ces résultats confirment une absence de toxicité, les taux définis par le comité d'expert pourront être utilisés. A l'inverse, si les résultats s'avèrent positifs l'utilisation de la substance devra être restreinte voire interdite :

- Si test génotoxicité /cancérogénicité positif → utiliser le TTC Concept ;
- Si tératogénicité positif → ne pas utiliser dans les produits revendiqués femmes enceintes si l'absorption cutanée a été estimée proche de 100% ;
- Si pouvoir sensibilisant déterminé → l'utilisation est interdite sauf si des études montrent qu'un pourcentage ne provoquant pas de réaction de sensibilisation est déterminé. Si une molécule est définie comme allergène par l'IFRA, il est obligatoire de l'étiqueter dès qu'elle est utilisée à plus de 100 ppm dans les produits rincés ou 10 ppm dans les produits non rincés ;
- Si pouvoir phototoxique déterminé → la molécule ne doit pas être présente dans des produits solaires ou visages ;
- Si présence d'irritations oculaires → ne doit pas être présente dans des produits revendiqués contour des yeux.

Dans le cas où aucun rapport n'a été émis, mais que des tests de toxicité ont été réalisés chez l'animal nous utilisons la NOAEL, si elle a été déterminée, et les autres données toxicologiques, scientifiques ou d'usage pour conclure sur la possible présence de la molécule dans un extrait végétal.

S'il existe une NOAEL et si les résultats d'études complémentaires sont de bonne qualité (BPL) et favorables, alors la marge et les concentrations maximales pourront être calculées en fonction de la marge de sécurité.

S'il existe une NOAEL mais si les résultats des tests complémentaires sont défavorables, la marge de sécurité ne pourra pas être appliquée. Les modalités de restriction sont les mêmes que celles citées précédemment, avec en plus la mise en place d'un test micronoyau (MN) si une alerte QSAR est donnée.

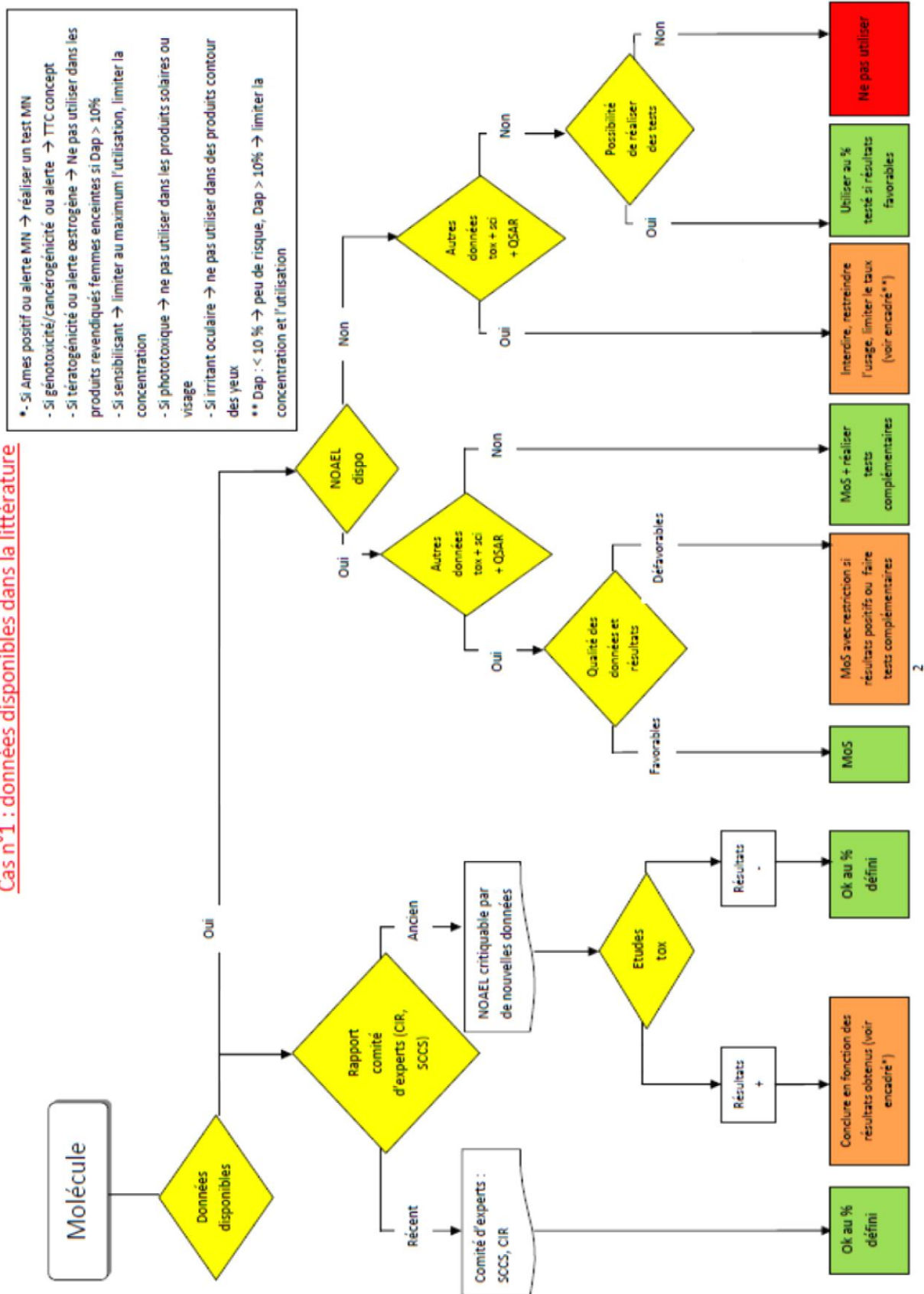
Si aucun test de toxicité à doses répétées n'a été réalisé, il n'y a alors pas de NOAEL disponible. L'évaluation de la sécurité devra se faire via des données scientifiques ou d'usage et l'utilisation des QSAR.

Dans le cas où l'absorption cutanée a été estimée comme faible (< 10%), on peut considérer qu'il y a peu de risque pour la santé humaine car il n'y aura pas de passage systémique de la molécule.

A l'inverse, si elle est élevée, selon les données disponibles, l'usage de la molécule sera interdit ou restreint à un type d'utilisation (par exemple aux produits rincés pour lesquels le temps d'application est réduit ou aux produits visage ou maquillage où la surface d'application est faible). Le pourcentage maximum autorisé dépendra des tests standards qui auront été réalisés. Ces tests comportent la recherche d'une irritation cutanée et d'une irritation oculaire, un test de phototoxicité si la substance absorbe dans l'UV, un test de sensibilisation et un test d'Ames.

Dans le cas où il n'y a aucune donnée disponible, l'utilisation de la substance dépendra de la possibilité ou non de mettre en place des tests de toxicité. Si c'est possible, la molécule sera autorisée au pourcentage testé pour lequel il n'y a pas d'effets toxiques observés. Si aucun test ne peut être effectué, la molécule ne devra pas être présente dans un extrait végétal.

**Cas n°1 : données disponibles dans la littérature**



**Figure 12 : Logigramme permettant d'évaluer la toxicité d'une substance en présence de données toxicologiques**

Le cas n°2 (figure 13) doit être suivi lorsqu'aucune donnée toxicologique n'est disponible. L'évaluation de la toxicité dépendra alors des QSARs. Les QSARs sont une aide à l'évaluation mais ne sont pas toujours une valeur exacte. Il faut donc les interpréter avec précaution et ne pas hésiter à mettre en place des tests complémentaires pour lever toute suspicion.

Dans un premier temps, le potentiel génotoxique et cancérigène est évalué. Si une alerte est donnée, le pourcentage présent dans l'extrait végétal devra être défini. Si la substance est présente à l'état de traces (de l'ordre du ppm), la substance ne sera pas interdite, mais le taux sera limité selon le TTC concept, appliqué dans le cas d'une substance génotoxique. Si la présence de la molécule est significative, alors l'extrait végétal ne pourra être utilisé pour la formulation d'un produit cosmétique.

Dans un second temps, le potentiel œstrogénique pourra également être étudié, principalement si la substance est susceptible de traverser la barrière cutanée et par la suite la barrière placentaire. Si l'absorption cutanée attendue est faible alors la présence de la molécule dans un extrait végétal ne suscitera pas de préoccupation particulière pour la sécurité du fœtus. Par contre en cas d'une forte absorption cutanée, sa présence pourrait avoir un effet sur le développement du fœtus. Ainsi, cette substance ne devra pas être présente dans des extraits végétaux utilisés dans des produits cosmétiques revendiqués pour les femmes enceintes.

Cas n°2 : aucune donnée sur la toxicité n'est disponible dans la littérature

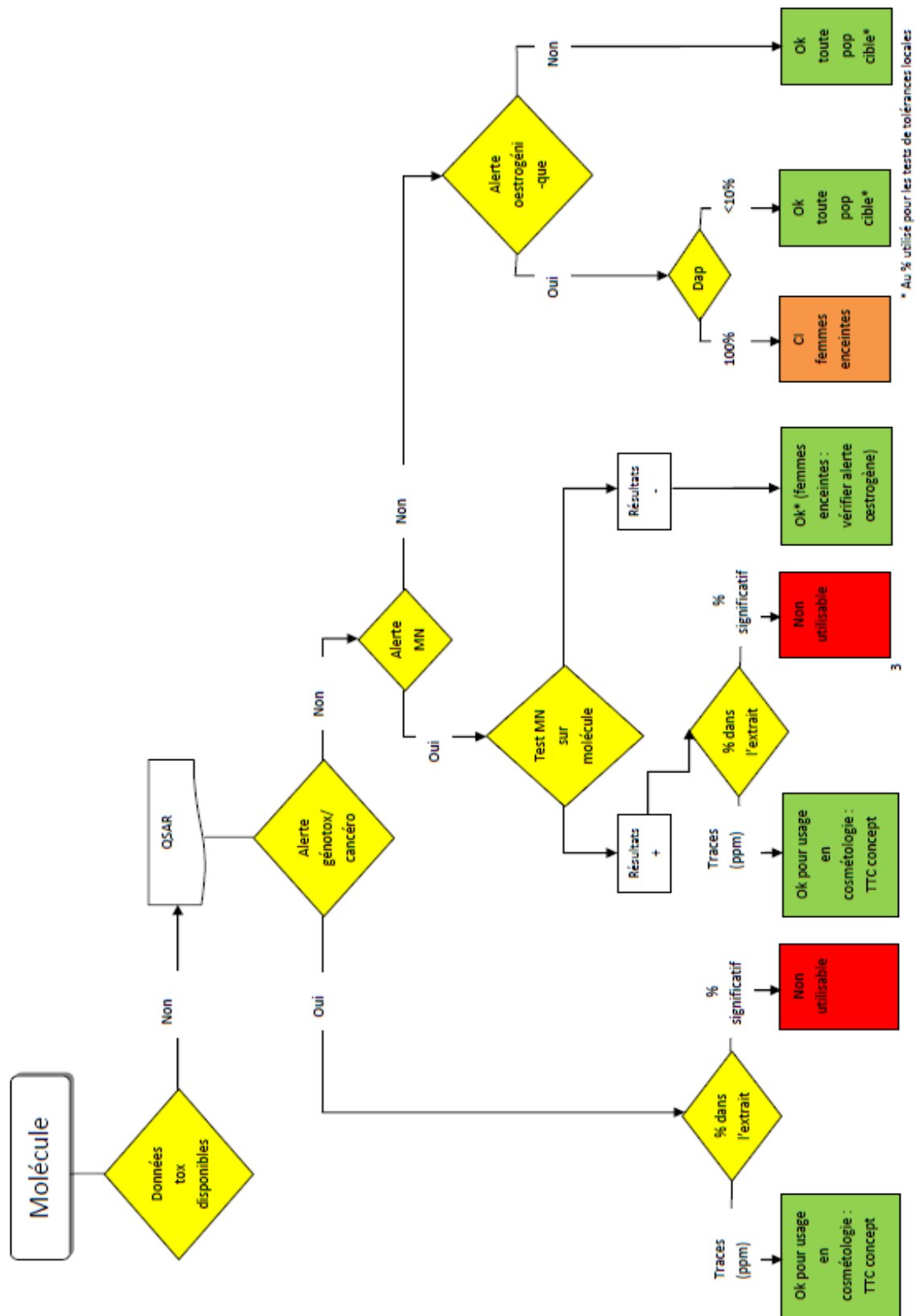


Figure 13 : Logigramme permettant d'évaluer la toxicité d'une substance en absence de données toxicologiques



## 6.4. Exemple de trois molécules présentes dans les extraits de plante

Certaines molécules sont très fréquemment retrouvées dans les extraits de plante. C'est le cas de la quercétine, de l'acide chlorogénique et de l'apigénine. Les premières recherches concernant leur toxicité ont montré des résultats défavorables. C'est pourquoi, il a été décidé de réaliser une étude bibliographique complète de ces 3 molécules pour pouvoir prendre une décision quant à leur présence dans des extraits de plante selon leur toxicité.

### 6.4.1. La quercétine

La quercétine est une molécule largement présente dans les plantes, principalement dans l'oignon, la pomme ou le thé, souvent sous forme de glycoside (53; 54). Elle pose un réel problème dans l'évaluation de la sécurité des extraits de plante à usage cosmétique car les études montrent des résultats ambigus, principalement en ce qui concerne les tests de génotoxicité : tests d'Ames positif en absence et en présence d'activateurs métaboliques, tests du micronoyau *in vitro* positif mais négatif *in vivo* et tests d'aberrations chromosomiques *in vitro* positifs sur plusieurs lignées cellulaires.

Une recherche bibliographique a été réalisée afin de définir la toxicité de cette molécule et l'avis d'experts en génotoxicité a été demandé afin de prendre une décision au sein de Clarins quant à l'utilisation, la restriction ou l'interdiction de la quercétine dans les extraits de plante.

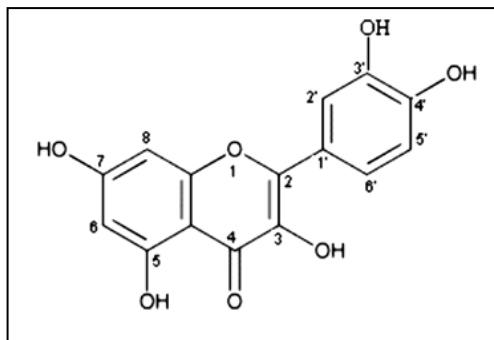
La difficulté de cette molécule est de définir sa toxicité par voie cutanée. En effet, comme elle est présente dans de nombreuses plantes alimentaires, sa toxicité par voie orale semble être faible aux doses consommées. Cependant, nous n'avons pas de données suite à une administration topique, pour laquelle les voies de métabolisation seront différentes ou inexistantes.

#### 6.4.1.1. Description et propriétés physico-chimiques

La quercétine, parfois appelée quercétol (figure 14), dont le nom défini par l'IUPAC est 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (55), et le nom chimique 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one, est une flavonol, molécule appartenant à la famille des flavonoïdes (56).

Son numéro CAS est le 117-39-5 et son numéro EINECS est le 204-187-1 (55).

Son poids moléculaire est de 302.24 Da et son coefficient de partage octanol/eau (log P) de 1.48. Ces deux valeurs nous suggèrent une pénétration cutanée de la molécule non négligeable ; la valeur prise par défaut sera de 100%.



**Figure 14** : Structure de la quercétine, d'après Wikipedia (56)

La quercétine est une poudre cristalline de couleur jaune dont la température de fusion est 316,5°C et la densité 1.799 g/cm<sup>3</sup>. Elle est soluble dans les solvants organiques (éthanol : 2 mg/ml, acétone, DMSO et DMF : 30 mg/mg) et faiblement soluble dans l'eau et le diéther (53).

#### 6.4.1.2. Source

La quercétine est une molécule ubiquitaire (tableau 7). Elle est présente dans de nombreuses plantes consommées régulièrement telles que les oignons, les myrtilles, ou les pommes. L'Homme en consommerait environ 50 mg/j (57). Le taux retrouvé dans les plantes varie considérablement selon la variété cultivée, les conditions de croissance ou encore le moment de la récolte.

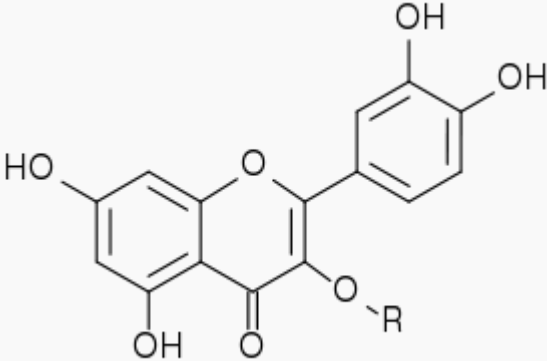
**Tableau 7 : Teneur en quercétine dans différentes plantes alimentaires, d'après Wikipedia (56)**

Plantes alimentaires riches en quercétol d'après USDA <sup>5</sup> et Phenol Explorer <sup>6</sup> (En mg/kg de matière sèche)		
Forme consommée	Nom scientifique de la plante	Teneur
Câpre	<i>Capparis spinosa</i>	1 808 - 328 mg·kg <sup>-1</sup>
Livèche	<i>Levisticum officinale</i>	1 700 mg·kg <sup>-1</sup>
Piment fort, jaune, cru	<i>Capsicum</i>	506 mg·kg <sup>-1</sup>
Sureau noir	<i>Sambucus nigra</i>	420 mg·kg <sup>-1</sup>
Chocolat, noir	<i>Theobroma cacao</i>	250 mg·kg <sup>-1</sup>
Oignon cru, rouge	<i>Allium cepa</i> var. <i>cepa</i>	199 - 12,9 mg·kg <sup>-1</sup>
Myrtille sauvage	<i>Vaccinium myrtillus</i>	177 - 12,7 mg·kg <sup>-1</sup>
Cassis	<i>Ribes nigrum</i>	57 mg·kg <sup>-1</sup>
Brocoli cru	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	32 mg·kg <sup>-1</sup>
Thé vert	<i>Camellia sinensis</i>	27 mg·kg <sup>-1</sup>
Cerise	<i>Prunus cerasus</i>	12 mg·kg <sup>-1</sup>
Vin rouge	<i>Vitis vinifera</i>	8,3 mg·l <sup>-1</sup>
Pomme crue, avec sa peau	<i>Malus domestica</i>	1,3 mg·kg <sup>-1</sup>
Thé noir	<i>Camellia sinensis</i>	0,036 mg <sup>-1</sup>

La quercétine est le plus souvent retrouvée dans les plantes sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à un sucre via un groupement hydroxyle (tableau 8). L'hétéroside le plus souvent rencontré est la rutine (ou quercétol 3-O-rutinoside), il s'agit de la source principale de quercétine dans les plantes.

**Tableau 8 : Exemple d'hétérosides, 3-O-glycosides, de la quercétine, d'après Wikipedia**

(56)

3-O-Glycosides de quercétol		
	R	Formule
Quercétol	H	
Quercitroside	O-rhamnosyl	
Hypéroside	O-β-D-galactosyl	
Isoquercitroside	O-β-D-glucosyl	
3-robinosidequercétol	O-β-D-robinosyl	
Rutoside	O-β-D-rutinosyl	

#### 6.4.1.3. Activités biologiques de la quercétine

La quercétine, comme beaucoup de flavonoïdes, a un fort pouvoir antioxydant (58). Elle pourrait avoir un rôle bénéfique sur la santé car elle possède de nombreuses activités pharmacologiques comme la prévention de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité, une activité anticancéreuse, un pouvoir anti-inflammatoire et antihistamique (59).

L'activité anti-inflammatoire de la molécule observée *in vitro* se traduit par une inhibition de la prolifération, de l'activation des macrophages et de l'expression des cytokines. Cet

effet peut également s'expliquer par l'action antioxydante qui permet une diminution de l'expression des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'activité anti-inflammatoire pourrait être associée à une régulation négative de l'activité NF-κB, sans affecter la voie de signalisation JNK (60).

Une étude a montré que la quercétine serait capable d'inhiber les cellules dendritiques et pourrait ainsi être un potentiel agent pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes (61).

La quercétine montre également une activité antiallergique par une suppression du développement des IgE à la suite d'une réponse allergique (62).

#### 6.4.1.4. Toxicocinétique

La quercétine présente donc de nombreuses activités potentielles mais son utilisation per os est cependant limitée car elle a une faible biodisponibilité, due à sa faible solubilité (63).

*In vivo*, une étude sur le hamster montre que la quercétine est rapidement métabolisée en 3'-O-méthylquercétine (ou isorhamnétol). Ce métabolite serait moins toxique que la quercétine, voire non toxique. Seulement 2% de quercétine non métabolisée serait éliminé dans les urines, alors que 97% de la molécule est éliminée sous sa forme méthylée (54).

Ce résultat est retrouvé *in vitro* avec la quercétine qui est rapidement O-méthylée en présence d'activateurs métaboliques.

#### 6.4.1.5. Toxicité de la quercétine

La quercétine est étudiée depuis de nombreuses années car elle est fréquemment présente dans les fruits et les légumes et donc consommée au quotidien (59). Les premières études de génotoxicité remontent aux années 70. De nombreux tests ont déjà été réalisés par différentes équipes de chercheurs, de la toxicité aiguë et chronique à la mutagénèse et la cancérogénèse. Dans ce chapitre, la toxicité de la quercétine va être évaluée en fonction des données disponibles.

##### ○ Toxicité aiguë

Plusieurs études de toxicité aiguë ont été mises en œuvre et ont permis de définir une dose létale entraînant la mort de 50% des animaux (DL50). La DL50 chez la souris s'élève à 160 mg/kg après une administration par voie orale et à 97 mg/kg pc à la suite d'une

administration en sous-cutanée. La DL50 obtenue chez le rat après une administration orale est de 161 mg/kg pc (64). D'après l'échelle de Hodge et Sterner, qui permet d'estimer la toxicité chez l'humain mâle adulte à partir de la DL50 obtenue par voie orale chez le rat, la quercétine serait modérément toxique.

○ Toxicité locale

La quercétine ne semble pas avoir de propriétés irritantes pour la peau, ni pour les yeux. La classification CLP ne met pas en alerte contre ces effets néfastes (55). Elle aurait même une activité photoprotectrice face aux UVB (65; 66; 67).

○ Toxicité chronique

Une étude chronique de deux ans a été réalisée chez le rat par le National Toxicology Program (68). Cette étude a révélé une NOAEL de 2200 mg/kg pc/j.

○ Mutagenicité/génotoxicité

De nombreux tests de mutagenicité et génotoxicité en présence et en absence d'activateurs métaboliques (S9 mix) ont été réalisés pour la quercétine tels que :

- des tests d'Ames sur *Salmonella typhimurium* (souches TA 97, TA 98, TA100, TA1535, TA1538) ;
- des SOS chromotests sur *Escherichia coli* PQ37 et K-12 343/113 ;
- des tests sur *Saccharomyces cerevisiae* ;
- des Mouse Lymphoma Assay sur cellules L5178Y ;
- des tests de mutation génique sur cellules CHO-AT3-2 ou sur cellules V79 ;
- des tests de micronoyau *in vitro* et *in vivo* ;
- des tests d'aberrations chromosomiques *in vitro* et *in vivo*.

Les différents résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 9.

**Tableau 9 : Résultats des différents tests de mutagenicité/génotoxicité qui ont été réalisés pour la quercétine, d'après IARC, 1999 (53).**

**Table 2. Genetic and related effects of quercetin**

Test system	Results <sup>a</sup>		Dose <sup>b</sup> (LED or HID)	Reference
	Without exogenous metabolic system	With exogenous metabolic system		
SOS chromotest, <i>Escherichia coli</i> PQ37	+	+	2.7	Rueff <i>et al.</i> (1986)
SOS chromotest, <i>Escherichia coli</i> PQ37	+	+	16	Dayan <i>et al.</i> (1987)
SOS chromotest, <i>Escherichia coli</i> PQ37	(+)	(+)	10	Czeczot & Kusztelak (1993)
<i>Salmonella typhimurium</i> , DNA repair-deficient strains, differential toxicity	-	-	200 µg/plate	Czeczot & Kusztelak (1993)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, reverse mutation	+	+	5 µg/plate	Stoewsand <i>et al.</i> (1984)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA98, TA97, TA102, TA1538, reverse mutation	+	+	10 µg/plate	Czeczot <i>et al.</i> (1990)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA98, TA1537, reverse mutation	+	+	25 µg/plate	Hardigree & Epler (1978)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA98, reverse mutation	+	+	3 µg/plate	National Toxicology Program (1992)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA102, reverse mutation	-	NT	100 µg/plate	Cross <i>et al.</i> (1996)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA102, reverse mutation	+	+	5 µg/plate	Crebelli <i>et al.</i> (1987)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538, TA1534, TA1978, TA94, D3052, reverse mutation	-	NT	150 µg/plate	Crebelli <i>et al.</i> (1987)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA97, TA1537, reverse mutation	+	NT	5 µg/plate	Busch <i>et al.</i> (1986)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, reverse mutation	-	-	500 µg/plate	Hardigree & Epler (1978)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, reverse mutation	-	NT	100 µg/plate	Czeczot <i>et al.</i> (1990)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	+	NT	3 µg/plate	Cross <i>et al.</i> (1996)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	+	+	25 µg/plate	Ochiai <i>et al.</i> (1984)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	+	+	10 µg/plate	Hatcher & Bryan (1985)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	+	+	5.4 µg/plate	Rueff <i>et al.</i> (1986)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	+	+	2.5 µg/plate	Nguyen <i>et al.</i> (1989)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	+	+	15 µg/plate	Vrijnsen <i>et al.</i> (1990)
<i>Escherichia coli</i> K-12 343/113, reverse mutation, <i>nad</i> locus	+	NT	1000	Hardigree & Epler (1978)
<i>Escherichia coli</i> K-12 343/113, forward or reverse mutation, <i>gal</i> or <i>arg</i> loci	-	-	NR	Hardigree & Epler (1978)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D4, gene conversion	+	NT	2000	Hardigree & Epler (1978)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , XA4-8Cp <sup>-</sup> forward mutation, CAN <sup>R</sup>	-	-	10 000	Hardigree & Epler (1978)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D4, reverse mutation	-	-	10 000	Hardigree & Epler (1978)
<i>Drosophila melanogaster</i> , sex-linked recessive lethal mutations	+	-	25 000	Watson (1982)
DNA single-strand breaks, mouse lymphoma L5178Y cells <i>in vitro</i>	+	NT	10	Meltz & MacGregor (1981)
DNA damage, rat liver nuclei <i>in vitro</i> (unwinding assay)	+	NT	6	Sahu & Washington (1991)
Unscheduled DNA synthesis, rat primary hepatocytes <i>in vitro</i>	-	NT	6	Cross <i>et al.</i> (1996)
Gene mutation, Chinese hamster ovary CHO-AT3-2 cells, <i>tk</i> locus <i>in vitro</i>	+	NT	9	Carver <i>et al.</i> (1983)
Gene mutation, Chinese hamster ovary CHO-AT3-2 cells, <i>hprt</i> locus <i>in vitro</i>	-	NT	15	Carver <i>et al.</i> (1983)
Gene mutation, Chinese hamster ovary CHO-AT3-2 cells, <i>hprt</i> locus <i>in vitro</i>	-	NT	15	Carver <i>et al.</i> (1983)
Gene mutation, Chinese hamster ovary cells, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase locus <i>in vitro</i>	-	NT	15	Carver <i>et al.</i> (1983)
Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, <i>hprt</i> locus <i>in vitro</i>	+	+	20	Maruta <i>et al.</i> (1979)

Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, <i>hprt</i> locus <i>in vitro</i>	-	-	89.4	van der Hoeven <i>et al.</i> (1984)
Gene mutation, mouse lymphoma L5178Y cells, <i>tk</i> locus <i>in vitro</i>	+	+	10	Meltz & MacGregor (1981)
Gene mutation, mouse lymphoma L5178Y cells, <i>tk</i> locus <i>in vitro</i>	(+)	-	17.8	van der Hoeven <i>et al.</i> (1984)
Gene mutation, mouse lymphoma L5178Y cells, <i>hprt</i> locus <i>in vitro</i>	-	-	44.7	van der Hoeven <i>et al.</i> (1984)
Gene mutation (recombination by DNA fingerprinting), other animal cells <i>in vitro</i>	+	NT	16.6	Suzuki <i>et al.</i> (1991)
Gene mutation, Chinese hamster lung cells, DT <sup>R</sup> <i>in vitro</i>	+	NT	100	Nakayasu <i>et al.</i> (1986)
Sister chromatid exchange, Chinese hamster cells <i>in vitro</i>	(+)	NT	2.5	Kubiak & Rudek (1990)
Sister chromatid exchange, Chinese hamster ovary CHO-AT3-2 cells <i>in vitro</i>	+	?	15	Carver <i>et al.</i> (1983)
Sister chromatid exchange, Chinese hamster lung V79 cells <i>in vitro</i>	-	-	22.3	van der Hoeven <i>et al.</i> (1984)
Sister chromatid exchange, Chinese hamster ovary cells <i>in vitro</i>	+	+	0.67	National Toxicology Program (1992)
Micronucleus formation, Chinese hamster lung V79 cells <i>in vitro</i>	+	+	3	Caria <i>et al.</i> (1995)
Chromosomal aberrations, Chinese hamster Don-6 and B-131 fibroblasts <i>in vitro</i>	+	NT	5	Yoshida <i>et al.</i> (1980)
Chromosomal aberrations, Chinese hamster ovary cells <i>in vitro</i>	+	NT	10	Kubiak & Rudek (1990)
Chromosomal aberrations, Chinese hamster lung V79 cells <i>in vitro</i>	+	+	9.8	Gaspar <i>et al.</i> (1994)
Chromosomal aberrations, Chinese hamster CHO-AT3-2 cells <i>in vitro</i>	+	NT	6	Carver <i>et al.</i> (1983)
Chromosomal aberrations, Chinese hamster ovary cells <i>in vitro</i>	+	+	10.1	National Toxicology Program (1992)
Cell transformation, BALB/c 3T3 mouse cells	(+)	NT	15	Meltz & MacGregor (1981)
Cell transformation, BALB/c 3T3 mouse cells	(+)	NT	10	Tanaka <i>et al.</i> (1987)
Cell transformation, Syrian hamster embryo cells, focus assay	+	NT	5	Umezawa <i>et al.</i> (1977)
Sister chromatid exchange, human lymphocytes <i>in vitro</i>	+	+	10	Rueff <i>et al.</i> (1986)
Micronucleus formation, human lymphocytes <i>in vitro</i>	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	3	Caria <i>et al.</i> (1995)
Chromosomal aberrations, human lymphocytes <i>in vitro</i>	+	NT	8	Yoshida <i>et al.</i> (1980)
Chromosomal aberrations, human HE2144 fibroblasts <i>in vitro</i>	+	NT	1	Yoshida <i>et al.</i> (1980)
Urine from Fischer 344 rats in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	-	(+)	0.2% in diet, 9 w	Stoewsand <i>et al.</i> (1984)
Urine and faeces from Sprague-Dawley rats in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	+	+	500 ip or po × 1	Crebelli <i>et al.</i> (1987)
Micronucleus formation, mouse bone-marrow cells <i>in vivo</i>	-		1000 po or ip	MacGregor (1979) [abst]
Micronucleus formation, mouse bone-marrow cells <i>in vivo</i>	-		1000 po × 2	Aeschbacher (1982)
Micronucleus formation, CD-1 mouse bone marrow cells <i>in vivo</i>	-		558 ip × 1	Caria <i>et al.</i> (1995)
Micronucleus formation, mouse bone-marrow cells and peripheral blood erythrocytes <i>in vivo</i>	-		400 ip × 1	Ngomuo & Jones (1996)
Micronucleus formation, Wistar rat bone-marrow cells <i>in vivo</i>	-		0.1% diet × 1 w	Taj & Nagarajan (1996)
Chromosomal aberrations, Wistar rat bone-marrow cells <i>in vivo</i>	-		0.1% diet × 1 w	Taj & Nagarajan (1996)
Dominant lethal mutation, inbred Swiss mice	-		400 ip × 2	Aravindakshan <i>et al.</i> (1985)
Dominant lethal mutation, Wistar rats	-		300 ip × 2	Aravindakshan <i>et al.</i> (1985)

<sup>a</sup> +, positive; (+), weakly positive; -, negative; NT, not tested

<sup>b</sup> LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose; unless otherwise stated, in-vitro test, µg/mL; in-vivo test, mg/kg bw per day; NR, not reported; w, week; ip, intraperitoneal; po, oral

<sup>c</sup> Increased CREST-negative micronuclei

Pour résumer :

- la quercétine donne des résultats positifs sur plusieurs souches de *S. typhimurium* en présence et en absence d'activateurs métaboliques (S9 mix) ;
- les tests du micronoyau sont positifs *in vitro* en présence et en absence de S9 mix mais négatifs *in vivo* ;



- les tests d'aberrations chromosomiques sont positifs *in vitro* en présence et en absence de S9 mix et négatifs *in vivo*.

La mutagénicité de cette molécule a été démontrée et serait due à la présence de groupements structuraux favorisant la mutagénicité : groupement hydroxyle libre en 3, double liaison en 2-3, groupement cétone en 4 et groupements hydroxyles en 3' et 4' (59). A l'inverse, un groupement méthoxyle sur le cycle B diminuerait la génotoxicité (cas des métabolites) et en position 3 l'annulerait.

*In vivo*, la quercétine serait rapidement métabolisée, notamment en 3'-O-méthylquercétine qui est moins toxique. Ce qui pourrait expliquer les résultats négatifs observés.

#### ○ Cancérogénicité

Plusieurs études de cancérogénèse ont été réalisées sur les rats, les souris et les hamsters. Certaines ont révélé la présence de tumeurs intestinales et au niveau de la vessie et des reins. Cependant, ces études n'auraient pas été menées dans des conditions optimales (nombre d'animaux, doses testées, durées de l'étude) et ne devraient donc pas être prises en compte (59). D'autres études, mieux réalisées ont quant à elles montrées des résultats négatifs.

Le rapport de l'IARC de 1983 a conclu qu'il n'y avait pas de différences significatives de l'incidence des tumeurs entre la molécule et les contrôles (69).

Une étude sur des rats Fischer 344/N a mis en évidence une augmentation de tumeurs tubulaires rénales, après une administration de la molécule dans l'alimentation pendant 104 semaines. Cependant, ces résultats n'étaient pas significatifs par rapport au contrôle (70; 68).

La quercétine a également été testée dans des études d'initiation-promotion. Une étude chez la souris n'a montré aucun effet sur l'initiation de tumeurs induites par le benzo-(a)-pyrène sur la peau. Mais une administration orale ou en intramusculaire augmente la carcinogénicité du 3-méthylcholanthrène sur les souris C57BL/6 (71). A l'inverse, la quercétine serait capable d'inhiber la formation de tumeurs induites par d'autres cancérigènes tel que l'azoxyméthane (72).

L'IARC a rédigé une nouvelle monographie de la quercétine. Les conclusions apportées par le groupe d'expert ne permettent pas d'affirmer le caractère cancérogène ou non de la

molécule. Les expérimentations animales pour la carcinogénicité apportent des preuves limitées ; et les études sur l'Homme fournissent des preuves inadéquates (53).

L'IARC a donc classé la quercétine dans le groupe 3 : molécule non classifiable pour son pouvoir carcinogène chez l'Homme.

- Reprotoxicité

Santi *et al* ont rapporté que la quercétine a une activité œstrogénique correspondant à 1% de celle de l'œstradiol (73).

Une étude évaluant le potentiel tératogénique a été réalisée chez le rat (74). Les résultats ne montrent pas de risques tératogènes même à la plus forte dose administrée (2000 mg/kg pc/j). Par contre, une diminution significative du poids des fœtus est observée.

- QSAR

L'utilisation du logiciel Toxtree permet de mettre en avant des analogies de structure entre différentes molécules et d'émettre des alertes de toxicité. Pour la quercétine, Toxtree classe la molécule en 3 selon Cramer et émet une alerte micronoyau et irritation cutanée.

#### 6.4.1.6. Discussion

La quercétine est une molécule qui est relativement bien évaluée depuis de nombreuses années.

L'IARC a rédigé une monographie regroupant les résultats des différents tests qui ont pu être effectués en génotoxicité et en cancérogénèse. La quercétine est en classe 3 : non classifiable pour sa carcinogénicité chez l'Homme.

Globalement, la quercétine donne des résultats génotoxiques :

- positifs *in vitro*. Pour le test micronoyau *in vitro*, cela peut s'expliquer par le pouvoir inhibiteur de cette molécule sur la topoisomérase II ;
- négatifs *in vivo*. Résultats pouvant s'expliquer par la métabolisation par voie orale de la quercétine en 3'-O-méthylquercétine.

Il serait donc intéressant pour nous de connaître la métabolisation de la quercétine par voie cutanée, car si elle est semblable à la voie orale le risque génotoxique serait faible.

Il existe un test qui étudie le potentiel génotoxique sur épiderme humain reconstitué 3D, mais il n'est pas encore validé et n'a donc pour le moment aucune valeur d'un point de vue réglementaire.

Cependant, un résultat négatif de ce test nous permettrait de considérer que la quercétine présente peu de risque génotoxique pour l'Homme après une application cutanée. La quercétine ne serait alors plus considérée comme une molécule à risque dans les extraits végétaux développés.

En attendant la validation de ce test, nous devons considérer la quercétine comme une impureté génotoxique et appliquer le TTC concept.

#### 6.4.1.7. Conclusion

La quercétine a une toxicité modérée par voie orale et ne semble pas être toxique pour la peau ou les yeux. Cependant, des études suggèrent un potentiel génotoxique de la molécule mais ne permettent pas de conclure quant à son pouvoir cancérigène pour l'Homme.

En vue de ces résultats, nous considérons la molécule comme une impureté génotoxique.

Nous devons donc, pour chaque extrait de plante :

- déterminer le taux de quercétine présent,
- évaluer l'exposition possible de la molécule : on prendra comme exposition maximale la même que celle appliquée aux conservateurs, à savoir 17.4g/j ou 269 mg/kg pc/j.

La quantité totale de quercétine appliquée devra être inférieure au  $TTC = 2.5 \text{ ng/kg pc/j}$ .

Il est également possible de réaliser, sur un extrait titré en quercétine de la plante sélectionnée, un test d'Ames et un micronoyau. Si les résultats des deux études sont négatifs pour l'extrait testé, il faudra s'assurer de la reproductibilité de la teneur en quercétine sur chaque lot utilisé. Il sera donc nécessaire de réaliser un dosage quantitative de la quercétine sur chaque lot d'extrait de plante. Ainsi, l'extrait pourra être considéré comme sans danger pour la santé humaine.

Si les résultats sont positifs, le taux de quercétine maximum autorisé dans l'extrait tiendra compte du TTC concept.

En ce qui concerne la reprotoxicité, la molécule ne semble pas avoir d'effets tératogènes. La quercétine ne sera donc pas contre-indiquée dans les produits cosmétiques revendus

pour les femmes enceintes. Par ailleurs, la teneur très basse imposée dans les produits limite toute toxicité pour le fœtus, malgré une activité oestrogénique de la molécule.

#### 6.4.2. L'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique signifie étymologiquement « naissance du vert ». Ce nom lui a été donné car après oxydation, une couleur verte se forme lorsqu'il est présent. Il a été découvert pour la première fois dans les graines de café vert (75).

Cette molécule est présente dans de nombreuses plantes, notamment alimentaires comme par exemple la pomme de terre, l'artichaut ou encore le café vert. Cette molécule est donc également retrouvée dans de nombreux extraits.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à sa toxicité qui montre un potentiel génotoxique avec des résultats positifs sur des tests d'aberrations chromosomiques *in vitro* en absence d'activateurs métaboliques, malgré les résultats négatifs du test d'Ames sur *Salmonella typhimurium*.

Il est donc important de connaître ces effets sur la peau lors d'une utilisation régulière voire quotidienne dans des produits cosmétiques.

Comme pour la quercétine, l'avis d'experts en génotoxicité a été demandé pour nous aider dans notre évaluation.

##### 6.4.2.1. Description et propriétés physico-chimiques

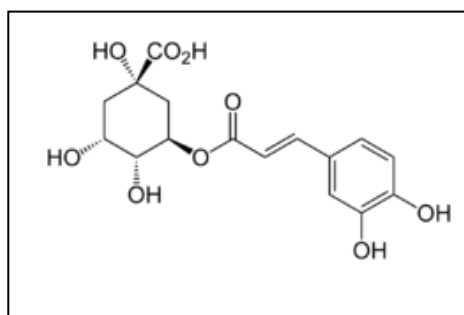
L'acide chlorogénique, également connu sous le nom IUPAC acide [[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylique, est une molécule classée dans la famille des phénols, et plus exactement des acides phénoliques. Il s'agit de l'acide caféoyquinique, qui est un ester de l'acide caféique avec l'acide quinique (76) (Figure 15).

Son numéro CAS est le 327-97-9 et son numéro EINECS le 206-325-6 (55).

Cette molécule se présente sous la forme d'une poudre cristalline. Son poids moléculaire est de 354 Da et son log de P de -1.01. Sa température de fusion est de 208°C et sa densité de 1.28 g/cm<sup>3</sup>. Une étude a montré que cette molécule est capable de passer à travers les

différentes couches cutanées et d'avoir un effet systémique (77). La valeur de pénétration cutanée retenue est donc de 100%.

L'acide chlorogénique est soluble dans l'eau chaude, l'alcool, l'acétone et le DMSO, légèrement soluble dans l'eau froide et l'acétate d'éthyl, et insoluble dans le chloroforme, l'éther, le benzène.



**Figure 15 : Structure de l'acide chlorogénique, d'après Wikipedia (76)**

#### 6.4.2.2. Source

L'acide chlorogénique est largement présent dans les plantes. Les teneurs les plus élevées sont retrouvées dans les graines de tournesol ou l'artichaut cru (Tableau 10). Mais dans notre alimentation cette molécule est principalement ingérée lors de la consommation de café. Un litre de café filtre fournit de 500 à 800 mg d'acide chlorogénique (78).

**Tableau 10 : Principales sources d'acide chlorogénique dans les plantes, d'après Wikipedia (76)**

Plantes alimentaires riches en acide chlorogénique (acide 5-caféylquinique) en mg/100 g de matière sèche		
Forme consommée	Nom scientifique de la plante	Teneur
Graines de tournesol, farine	<i>Helianthus annuus</i>	454,48 mg·100g <sup>-1</sup>
Artichaut cru	<i>Cynara scolymus</i>	202,23 mg·100g <sup>-1</sup>
Grande bardane, crue	<i>Arctium lappa</i>	126,76 mg·100g <sup>-1</sup>
Boisson de café décaféiné, filtre	<i>Coffea sp</i>	116,85 mg·100ml <sup>-1</sup>
Endive, verte, crue	<i>Cichorium intybus</i> L. var. <i>foliosum</i>	108,88 mg·100g <sup>-1</sup>

Boisson de café Robusta, filtre	<i>Coffea canephora</i>	75,80 mg·100ml <sup>-1</sup>
Nèfle du Japon	<i>Eriobotrya japonica</i>	54,75 mg·100g <sup>-1</sup>
Boisson de café Arabica, filtre	<i>Coffea arabica</i>	43,09 mg·100ml <sup>-1</sup>
Pruneau	<i>Prunus domestica</i>	38,79 mg·100g <sup>-1</sup>
Menthe douce, séchée	<i>Mentha spicata</i>	31,00 mg·100g <sup>-1</sup>
Pomme de terre, crue	<i>Solanum tuberosum</i>	26,73 mg·100g <sup>-1</sup>
Cidre, pomme	<i>Malus pumila</i>	21,45 mg·100ml <sup>-1</sup>
Pur jus de pruneau	<i>Prunus domestica</i>	20,35 mg·100ml <sup>-1</sup>
Carotte crue	<i>Daucus carota</i> spp sativus	8,88 mg·100g <sup>-1</sup>
Pur jus de pomme	<i>Malus pumila</i>	7,01 mg·100ml <sup>-1</sup>
Thé vert, infusion	<i>Camellia sinensis</i>	2,30 mg·100ml <sup>-1</sup>
Vin blanc	<i>Vitis vinifera</i>	0,10 mg·100ml <sup>-1</sup>

#### 6.4.2.3. Activités pharmacologiques de l'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique est principalement connu pour son activité antioxydante, activité retrouvée chez de nombreux polyphénols (79). Cette action s'explique par la présence des groupements hydroxyles phénoliques, qui permettraient de prévenir ou ralentir l'oxydation des lipides. Bien que l'activité antioxydante *in vitro* ait été montrée dans de nombreuses études, l'activité *in vivo* est incertaine. L'acide chlorogénique serait en effet métabolisé en acide hippurique qui ne possède aucune activité antioxydante car il est dépourvu de groupements hydroxyles (78).

Une équipe de chercheurs français a également montré que cette molécule aurait une activité anxiolytique. Une dose de 20 mg/kg pc d'acide chlorogénique aurait le même effet qu'une dose de 1 mg/kg pc de diazépam (80).

D'autres études montrent une activité antidiabétique de l'acide chlorogénique. Cette molécule retarderait l'absorption du glucose et donc son passage dans le sang (81; 82).

L'acide chlorogénique favoriserait également la perte de poids. Il est d'ailleurs commercialisé à cet effet sous le nom Svétol<sup>®</sup> par le laboratoire Naturex en Norvège et au

Royaume-Uni. Il agit en diminuant l'absorption du glucose et en réduisant la glycolyse du foie, ce qui permet l'utilisation des graisses comme source d'énergie (83).

#### 6.4.2.4. Toxicité de l'acide chlorogénique

##### ○ Toxicité aiguë

Les études réalisées chez l'animal ont permis de mettre en évidence une dose létale de 4000 mg/kg pc, pour le rat après une administration en intraveineuse. La dose de 2497 mg/kg pc s'est avérée non toxique (84).

Une administration de 270 mg/kg pc chez la souris par voie sous-cutanée ou de 135 mg/kg pc par voie intra-péritonéale n'entraîne pas d'augmentation de la mortalité (85).

##### ○ Toxicité locale

L'acide chlorogénique ne semble pas avoir des propriétés irritantes pour la peau et les yeux.

Une étude de sensibilisation cutanée sur souris BALB/c utilisant la technique PLNA (Popliteal Lymph Node Assay) a été réalisée (86). Aucune immunoréactivité n'a été induite après injection d'acide chlorogénique. Cette molécule ne semble donc pas entraîner une sensibilisation cutanée.

##### ○ Toxicité chronique

Aucune information sur l'exposition chronique à l'acide chlorogénique n'a été trouvée dans la littérature. Par conséquent, il n'y a pas de NOAEL disponible.

Des études d'exposition subchronique ont été réalisées. Une administration de 500 mg/kg pc/j d'acide chlorogénique chez le rat en intrapéritonéal pendant 8 jours n'a pas été létale (84). Cependant, l'acide chlorogénique est susceptible d'augmenter le poids des reins et des surrénales et d'engendrer une hyperplasie de l'estomac, lors d'une administration de 10 000 ppm pendant 3 semaines (87).

### ○ Mutagénicité/génotoxicité

La mutagénicité et la génotoxicité de l'acide chlorogénique ont été évaluées grâce à différents tests *in vitro* et *in vivo* :

- Tests d'Ames sur *S. typhimurium*, souches TA 98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 ;
- Tests de conversion génique sur *Saccharomyces cerevisiae* ;
- Tests d'aberrations chromosomiques sur cellules CHO ;
- Tests MLA/Tk sur cellules L5178Y ;
- Tests du micronoyau *in vivo*.

Ces tests donnent des résultats variables. Sur bactéries, les résultats observés, quelque soit la souche, sont négatifs en présence et en absence d'activateurs métaboliques, mais deviennent positifs en présence de manganèse (88; 89). Il est intéressant de noter que ces résultats sont comparables à ceux de l'acide caféique, un des constituants de l'acide chlorogénique.

Le test MLA/Tk montre des résultats positifs mais uniquement en présence de S9 mix. Les résultats sont également positifs en présence de S9 mix pour le test d'aberrations chromosomiques *in vitro* et pour le test de conversion génique (88; 89).

Le test du micronoyau *in vivo* montre des résultats négatifs après administration de 150 mg/kg pc d'acide chlorogénique chez le rat (90).

L'acide chlorogénique ne serait donc pas mutagène sur bactérie mais s'avère être clastogène sur cellules de mammifères.

### ○ Cancérogénicité

Une étude sur la souris n'a révélé aucun carcinome au niveau de la vessie (91).

Cependant, cette étude n'est pas une étude de cancérogénèse réglementaire, la durée étant inférieure à deux ans.

Il est intéressant de noter que des études de cancérogénèse ont été réalisées sur l'acide caféique, un des constituants de l'acide chlorogénique. Les résultats sont variables : selon les études la présence de tumeurs est parfois observée.



- Reprotoxicité

L'administration chez le rat de 500 mg/kg pc/j d'acide chlorogénique par voie intrapéritonéale du jour 5 au jour 12 de gestation est responsable de malformations au niveau des côtes chez 10% des fœtus. Il n'y a pas eu de mortalités fœtales observées, ni d'anomalies de développement maternel ou de toxicité au niveau du système nerveux central (84).

- Analyse QSAR

Le logiciel QSAR Toolbox version 2.2 nous met en alerte face à un potentiel génotoxique de la molécule. Le Toxtree, basé sur la classification Cramer, place l'acide chlorogénique dans le groupe 2 et donne une alerte sur le micronoyau.

Ces résultats sont cohérents avec les effets clastogènes observés dans les études *in vitro*.

#### 6.4.2.5. Discussion

L'acide chlorogénique, molécule présente entre autre dans le café et la pomme de terre, a été étudié par différentes équipes de chercheurs afin de connaître ses effets toxiques.

Cependant, les résultats obtenus proviennent d'études relativement anciennes et par conséquent elles n'ont pas toujours été faites en accord avec la réglementation actuelle.

Il serait donc nécessaire de refaire des tests de mutagénèse et de génotoxicité en respectant les doses maximales à appliquer et les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL).

Le Laboratoire Covance, entreprise spécialisée dans les études *in vitro* et particulièrement dans les études de génotoxicité préconise la réalisation :

- d'un test d'Ames complet sur les 5 souches de *Salmonella typhimurium* dont TA102 selon les BPL (guidelines OCDE 471)
  - si les résultats sont positifs, il n'est pas nécessaire de faire un test supplémentaire pour confirmation ; la molécule sera considérée comme mutagène ;
  - si les résultats sont négatifs, la réalisation d'un deuxième test est nécessaire pour confirmer ce résultat.
- d'un test MLA en deuxième intention.

Si les deux tests de mutagénicité/génotoxicité s'avèrent négatifs, l'acide chlorogénique pourra être considéré comme non génotoxique dans tous les extraits de plante. Il ne sera

alors plus nécessaire de réaliser une identification analytique et un dosage de la molécule. Sa présence dans les extraits sera donc considérée comme sans danger pour la santé humaine.

Par contre, si les résultats sont positifs, l'acide chlorogénique devra alors être considéré comme une impureté génotoxique. Une identification systématique (qualitative et quantitative) devra être réalisée pour chaque extrait de plante. Si la molécule est présente, le TTC concept sera appliqué : l'exposition devra être inférieure à 2.5 ng/kg pc/j.

#### 6.4.2.6. Conclusion

En raison du potentiel toxique de l'acide chlorogénique, qui est retrouvé dans plusieurs extraits de plante, Clarins a donc décidé de réaliser, dans un premier temps, le test d'Ames sur les 5 souches de *Salmonella typhimurium* dont TA102 selon les BPL (guidelines OCDE 471).

Les premiers résultats du test d'Ames sans période de pré-incubation sont disponibles (Annexe 3). Conformément au protocole, l'acide chlorogénique a été solubilisé dans l'eau. A partir d'une solution mère à 10 mg/mL et la gamme suivante : 16, 50, 160, 500, 1600 et 5000 µg/boite a été administrée, en utilisant la méthode d'incorporation directe, aux souches TA1535, 13537, TA102, TA98 et TA100 avec et sans activation métabolique. Aucune contamination dans les contrôles de stérilité n'a été relevée. Les témoins contemporains sont dans les normes des données historiques du laboratoire. Aucun précipité et globalement aucune toxicité ne sont observés (toxicité, marginale sans effet dose, non significative, pour la souche TA1535 à 1600 µg/boite avec S9 ratio = 0.5). Mais surtout aucune augmentation significative n'est constatée quelle que soit la souche et jusqu'à la plus forte dose recommandée par la réglementation pour ce test : 5000 µg/boite.

Ces résultats sont plutôt encourageants. Par ailleurs, ils sont conformes à ceux déjà publiés précédemment. Si les résultats d'un second essai en préincubtion sont également négatifs, un test sur cellules de mammifères (MLA/Tk) sera réalisé afin de confirmer une absence de mutagénicité de l'acide chlorogénique.

En ce qui concerne le potentiel tératogène de la molécule, nous allons contre-indiquer sa présence dans les produits revendiqués pour les femmes enceintes. Bien que le risque soit

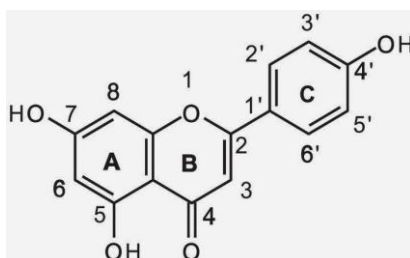
faible, l'acide chlorogénique est capable de passer à travers les différentes couches cutanées et d'atteindre la circulation sanguine.

### 6.4.3. L'apigénine

#### 6.4.3.1. Description et propriétés physico-chimique

L'apigénine (figure 16) est une molécule appartenant à la famille des flavonoïdes, et plus précisément à la classe des flavones. Son nom IUPAC est 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (92).

Son numéro CAS est le 520-36-5 et son numéro EINECS le 208-292-3 (55).



**Figure 16** : Structure de l'apigénine, d'après Wikipedia (92)

Son poids moléculaire est de 270 Da et son log P est estimé à 3,02. Ces valeurs suggèrent donc un fort passage cutané de la molécule ; par défaut le pourcentage retenu est de 100%. Par ailleurs, une étude a évalué *in vivo*, sur 9 volontaires sains de sexe féminin, la pénétration cutanée de plusieurs flavones. Les chercheurs ont conclu que ces flavonoïdes ne sont pas seulement absorbés à la surface de la peau après une application cutanée, mais sont capables de pénétrer dans les couches profondes (93).

L'apigénine est sous forme de poudre, de couleur jaune clair, avec une température de fusion à 347.5°C. Elle est pratiquement insoluble dans l'eau, modérément soluble dans les alcools et soluble dans la potasse diluée.

#### 6.4.3.2. Source

L'apigénine est une molécule que l'on trouve fréquemment dans la camomille, l'achillée millefeuilles, le persil, la menthe poivrée, le céleri ou encore le romarin (94).

Comme la majorité des flavonoïdes, l'apigénine est le plus souvent présente dans les plantes sous forme d'hétérosides. On peut citer (92) :

- L'apiine, (apigénine-7-apioglucoside) isolée dans le persil et le céleri,
- L'apigétrine (apigénine-7-glucoside), présente dans la fausse chicorée,
- La vitexine (apigénine-8-C-glucoside),
- L'isovitexine (apigénine-6-C-glucoside ou homovitexine, saponarétine),
- La rhoifoline (apigénine-7-O-néohespéridoside).

#### 6.4.3.3. Activité biologique de la l'apigénine

L'apigénine aurait plusieurs activités potentielles comme une activité antioxydante (commune à de nombreux flavonoïdes), une activité anti-inflammatoire, une activité antispasmodique et une activité antiangiogénique (95). Par ailleurs, de nombreux chercheurs travaillent sur son potentiel pouvoir antimutagène et antigénotoxique lors d'une administration avec des agents anticancéreux (96).

L'apigénine est utilisée en recherche pour son activité inhibitrice de la protéine kinase, qui lui permet une action contre la promotion tumorale et un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses du sein (95).

Elle serait utilisée aux Etats-Unis dans la préparation d'antiviraux pour le traitement du VIH ou d'autres infections, en pharmacie pour le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin ou pour des problèmes cutanés (97).

Cette molécule est utilisée en médecine traditionnelle ou alternative depuis de nombreuses années.

D'un point de vue de l'usage, l'apigénine est régulièrement consommée par le biais de la camomille pour ces effets antiphlogistique, antispasmodique et antibactérien. Les préparations à base de camomille sont également utilisées pour réduire l'inflammation cutanée ou les maladies de la peau (95). En Allemagne, la camomille est reconnue comme thé médicinal en ingestion ou en application cutanée. La camomille allemande est classée parmi les Homeopathic Pharmacopoeia of the United States en accès libre de classe C (préparation à 1 :10 (m/v) en teinture alcoolique).

Il existe des compléments alimentaires contenant de l'apigénine. Ces compléments sont autorisés au Etats-Unis mais la FDA n'a effectué aucune évaluation et précise que ces

produits ne doivent pas être utilisés pour diagnostiquer, traiter, guérir ou prévenir les maladies (98).

L'apigénine est commercialisée en tant qu'actif cosmétique par Etat Pur en France. Son indication principale revendiquée est une action anticernes. Aucune donnée n'est pour le moment disponible concernant la concentration active optimale pour une telle utilisation.

#### 6.4.3.4. Toxicocinétique

D'après une étude menée par Merfort *et al*, l'apigénine diffuserait à travers les couches profondes de la peau et serait absorbée par les vaisseaux sanguins cutanés (93).

Une étude chez le rat montre que l'apigénine, après une administration par voie orale, serait transformée en plusieurs métabolites tels que l'acide p-hydroxyphénylpropionique, l'acide p-hydroxycinnamique ou l'acide p-hydroxybenzoïque (99).

#### 6.4.3.5. Toxicité de l'apigénine

##### ○ Toxicité aiguë

Le RTECS nous donne la dose toxique la plus faible publiée ; cette dose est de 50 mg/kg pc à la suite d'une administration orale à des souris.

Mureav a étudié la dose létale de l'apigénine chez la souris et le rat. La DL 50 chez la souris par administration intrapéritonéale est de 150 mg/kg pc et de 125 mg/kg pc pour le rat.

Une étude a évalué la toxicité aiguë de l'apigénine sur le foie de souris à la suite d'une administration intrapéritonéale (100) et a estimé la réponse dose-dépendante. Aux doses de 25 ou 50 mg/kg pc, l'apigénine n'a montré aucun effet toxique sur le foie, effets évalués par un dosage des enzymes hépatiques (AST, ALT, ALP). C'est à partir de 100 mg/kg pc que les premiers effets nocifs sont observés avec une augmentation significative des enzymes hépatiques. Ces résultats sont retrouvés sur les coupes histologiques. L'augmentation significative des espèces réactives de l'oxygène (ROS ou Reactive Oxygen Species) pourrait expliquer les atteintes observées sur le foie aux doses les plus fortes. D'autres études ont mis en évidence la production de ROS par l'apigénine, montrant une action pro-oxydante de la molécule.

- Toxicité chronique

Aucune étude chronique n'a été trouvée dans la littérature. Il n'y a donc pas de NOAEL disponible.

- Toxicité locale

L'ECHA classe l'apigénine dans la catégorie 2 pour l'irritation oculaire et cutanée. Les phrases de risques associées, selon le CLP, sont H315 (provoque une irritation cutanée) et H319 (provoque une sévère irritation des yeux) (55).

- Mutagénicité/génotoxicité

Plusieurs études de mutagénicité et génotoxicité ont été réalisées par différentes équipes de chercheurs.

Le test d'Ames a été réalisé sur plusieurs souches de *Salmonella typhimurium* : TA 97, TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1538, en présence et en absence d'activateurs métaboliques. Une première étude n'a révélé aucun effet mutagène (101) de l'apigénine. Une autre étude sur l'apigénine triacétate a montré une faible mutagénicité sur les souches TA98 et TA100 (102).

Une étude SOS sur *Escherichia coli* K-12, souche PQ 37 a également été faite avec et sans activateurs métaboliques par Czczot et al. L'apigénine est capable d'engendrer une très faible induction du système SOS (103).

Un test micronoyau *in vitro* a également été réalisé. Il met en évidence une augmentation significative du nombre de micronoyaux observés sur des lymphocytes humains à partir de 10 µg/ml d'apigénine et de façon dose-dépendante. L'effet clastogène maximum a été évalué à 27 µg/ml. Ces résultats ne sont pas retrouvés à des doses faibles (104).

L'apigénine a également montré un effet clastogène sur les cellules V79, montrant une augmentation du nombre de micronoyaux (105). Cette positivité du test micronoyau pourrait s'expliquer par la capacité de l'apigénine à inhiber la topoisomérase II.

Un traitement avec 10, 20 et 40 mg/kg pc d'apigénine sur des souris n'a pas entraîné d'échanges de chromatides sœurs. La molécule montre même un effet antigénotoxique dose-dépendant face à l'action de la mitomycine C. Ces résultats sont retrouvés lors d'une étude d'aberrations chromosomiques (96).

- Cancérogénicité

Il n'y a pas d'études disponibles pour le moment concernant la cancérogénicité.

- Reprotoxicité

L'apigénine est potentiellement reprotoxique, comme la plupart des flavonoïdes. Elle serait susceptible de ralentir la synthèse des œstrogènes en inhibant l'aromatase. Elle aurait un effet sur l'appareil reproducteur de la souris à 25 mg/kg pc/j et une action anti-implantation dose-dépendante chez le rat.

Par contre, elle n'est pas considérée comme ayant une activité œstrogénique selon les critères de l'Afssaps (106).

- QSAR

Le QSAR Toolbox met en alerte sur le micronoyau et sur le potentiel œstrogène de l'apigénine. L'alerte micronoyau n'est cependant pas retrouvée en utilisant le Toxtree qui met seulement en garde contre une irritation potentielle de la peau, et classe la molécule en 3 selon Cramer.

#### 6.4.3.6. Discussion

L'apigénine est une molécule définie principalement comme chemoprotecteur. Les différentes études dans le domaine montrent, en effet, une action dans la prévention et le traitement de certains cancers, tels que le cancer du sein ou de la prostate.

Cependant des études de génotoxicité montrent également un potentiel génotoxique.

Ces deux types de résultats sont donc contradictoires.

Au vu des informations énumérées précédemment, l'apigénine peut être utilisée sans danger dans les produits cosmétiques si sa concentration est inférieure aux concentrations génotoxiques, c'est-à-dire à 10 µg/ml.

En effet, cette molécule est présente dans de nombreuses plantes alimentaires et elle est utilisée en médecine traditionnelle depuis de nombreuses années. Par ailleurs, elle est utilisée en topique depuis des décennies en médecine traditionnelle. Son pouvoir irritant doit être faible. La concentration non irritante devra être déterminée lors de tests *in vitro* d'irritation cutanée et oculaire.

Il n'est pas nécessaire de refaire des tests de mutagénèse/génotoxicité sur la molécule. Il faudra cependant ne pas revendiquer les produits en contenant pour les femmes enceintes compte tenu du potentiel œstrogène et de la pénétration cutanée importante.

#### 6.4.3.7. Conclusion

Lors de l'évaluation toxicologique d'un extrait ou d'un produit fini il faudra bien prendre en compte la quantité d'apigénine présente. Compte tenu de son potentiel génotoxique à partir d'une certaine dose, l'exposition finale ne devra pas être supérieure à l'équivalent de 10 µg/ml, valeur correspondant au seuil génotoxique pour cette molécule.

La présence d'apigénine dans un extrait végétal n'est donc pas une contre-indication à l'utilisation de cet extrait dans un produit cosmétique. Cependant, il faudra réaliser le dosage de cette molécule et s'assurer que son exposition ne dépasse pas le seuil fixé précédemment. Comme cette molécule est potentiellement irritante, il faudra s'assurer, par des tests d'irritation cutanée et oculaire qu'elle n'est pas nocive pour la peau et les yeux.

### 7. Exemple de l'évaluation d'une plante pour l'utilisation d'un de ces extraits en cosmétique

#### 7.1. Principes

La connaissance des molécules présentes dans les plantes à pour but d'évaluer, par la suite, les extraits de ces plantes les contenant.

Cette évaluation toxicologique est effectuée lorsque le laboratoire souhaite faire entrer dans son catalogue un nouvel extrait. Il s'agit de savoir si cette plante peut être ou non utilisée dans un cosmétique sans danger pour la santé humaine. Si elle est validée d'un point de vue toxicologique, elle peut toutefois être refusée par d'autres services, comme la réglementation.

Pour évaluer une plante, toutes les informations concernant la plante seront étudiées :

- Les données d'usage et les posologies si elles existent,
- Les études scientifiques et les études toxicologiques qui ont pu être réalisées,
- Les monographies disponibles,
- Les substances pouvant être présentes de la plante et ses extraits.



En fonction de toutes ces données, une conclusion sera apportée. Elle validera ou non la plante ou émettra des restrictions ou des réserves.

Afin de développer la démarche d'évaluation des plantes chez Clarins, *Cola nitida* est choisie, à titre d'exemple.

## 7.2. Exemple de *Cola nitida*

### 7.2.1. Informations générales

*Cola nitida* est une plante appartenant au genre *Cola* et à famille des Sterculiaceae (figure 17). Son nom commun est cola (ou Kola). Cette une plante indigène de l'Afrique de l'Ouest, mais qui est maintenant également cultivée en Amérique du Sud et centrale, dans les Caraïbes, au Sri Lanka et en Malaisie. La partie de plante qui nous intéresse est le fruit (et la graine), plus couramment appelé noix de Cola (107).



**Figure 17 : Représentation schématique de *Cola nitida* et photos de ces graines, d'après wikipédia (108)**

### 7.2.2 Usages connus

Les données d'usage pour *Cola nitida* concernent l'utilisation des graines en Afrique comme agent de mastication pour leurs effets stimulants et coupe-faim. D'un point de vue médicinal, les graines auraient également une action renforçant les gencives et seraient par ailleurs utilisées dans le traitement de la goutte et des maladies apparentées. Les graines auraient également une action favorable sur les organes digestifs (107).

Par ailleurs, les graines sont consommées par un grand nombre de personnes à travers l'ingestion d'une boisson dont elle est le composant principal. Elle est également présente dans de nombreux produits alimentaires (107).

### 7.2.3. Etudes scientifiques

Des études scientifiques réalisées sur les graines (109) ont démontré les propriétés suivantes :

- Stimule le système nerveux central,
- Anti-oxydant,
- Anti-inflammatoire,
- Inhibe l'action des trypanosomes.

### 7.2.4. Etudes toxicologiques

Cette plante a été étudiée par différentes instances (110) :

- Le CoE (Council of Europe) : les experts estiment qu'elle ne présente pas de risque pour la santé humaine si on respecte les teneurs en caféine (111).
- La FDA : l'agence a conclu que les extraits (HE, oléorésine, distillat) de cette plante sont reconnus sans risque pour la santé humaine.
- FEMA : l'agence a défini la dose maximale administrée par jour à 0.69 mg/kg pc/j. En dépit des nombreuses utilisations de la plante dans certains pays, en particulier les zones rurales, il n'y a pas de système normalisé pour les doses d'usage en médecine traditionnelle. Il est suggéré que de nouveaux tests soient réalisés pour déterminer les seuils sans risque pour la santé humaine, identifier les constituants de la plante et déterminer leur mode d'action (112).

Des études *in vivo* chez l'animal ont été réalisées. Après administration par voie orale chez le rat de 75 et 300 mg/kg pc d'un extrait hydroalcoolique obtenue à partir des graines de la plante, on observe des dommages sur les organes vitaux qui se traduisent par des nécroses, stéatoses, hémorragies et congestions. Une étude a démontré un effet néfaste sur l'estomac après administration répétée sur 5 jours chez le rat par voie orale de 600 mg/kg pc d'un extrait brut hydroalcoolique de graine de Cola (107).

La réalisation d'un test d'aberration chromosomique sur Chinese hamster fibroblast cell line a permis de conclure que cette plante est non génotoxique (110) pour des doses allant jusqu'à 16 mg/ml.

Une étude sur le potentiel tératogène a été réalisée sur la souris aux doses de 2.5, 5 et 10 mg/kg pc/j. Des effets toxiques ont été observés mais ces données ne sont pas acceptables pour les experts (110).

Dans le rapport de l'EMA (109), il est indiqué que la consommation de graines de Cola durant la période de gestation chez les animaux n'a pas d'incidence sur le poids, la taille de la tête et du cerveau du fœtus. Cependant, il n'y a pas assez d'études pour démontrer l'absence de risque. Il est proposé de se baser sur la teneur en caféine qui doit être inférieure ou égale à 300 mg/j chez la femme en âge de se reproduire.

Il a été démontré lors d'une étude chez des rats traités avec un extrait hydroalcoolique de Cola à 90 mg/kg pc par voie intrapéritonéale que cet extrait avait une faible activité anti-œstrogène-like provoquant le blocage de l'ovulation et du cycle menstruel par action sur l'hypophyse et/ou l'hypothalamus (109). De plus, dans une autre étude, il a été démontré que la consommation d'un extrait obtenu à partir de l'écorce du cacaotier peut interférer avec les œstrogènes naturels en se liant aux récepteurs stéroïdiens et perturber ainsi le cycle ovulatoire (113; 114).

#### 7.2.5. Substances présentes

Les substances pouvant être présentes dans cette plante sont :

- La Caféine : molécule largement utilisée dans les cosmétiques et qui ne pose pas de problème particulier. Les concentrations maximales à utiliser dans les produits finis sont de 1.8% dans les produits corps non rincés, 1.8% dans les produits visage et yeux pour l'adulte ; s'il s'agit d'un produit pour femmes enceintes les valeurs à prendre sont 0.76% pour les produits corps non rincés et également de 1.8 % pour les produits yeux.
- Le Catéchol : son numéro CAS est le 120-80-9, son poids moléculaire égal à 110 Da et son Log P compris entre 0.93 et 1.03. L'absorption cutanée estimée est donc de 100%. Il est corrosif pour les yeux, la peau et sensibilisant. Le test d'Ames est positif, ce qui suggère un potentiel mutagène de la molécule. Un potentiel

reprotoxique aux doses : 333, 667 et 1000 mg/kg pc/j a été démontré, responsable chez la mère de paralysies des membres inférieurs et pouvant aller jusqu'à entraîner la mort, et chez le fœtus de malformations. Cette molécule possède également un potentiel œstrogène (115). Donc, elle ne doit pas être présente dans l'extrait du fait de sa forte toxicité.

- L'Epicatechol : le numéro CAS est 490-46-0, le poids moléculaire de 290 Da et log P compris entre 0.51 et 1.18. L'absorption cutanée est donc estimée à 100%. La DL50 est de 1000 mg/kg pc lors d'une administration chez la souris par voie intrapéritonéale. Malgré une faible toxicité aiguë, cette molécule montre un pouvoir mutagène selon le test sister chromatid exchange qui donne des résultats positifs. Sa présence est donc déconseillée dans l'extrait végétal.
- La Théobromine : le numéro est CAS : 83-67-0. Le poids moléculaire de 180 Da et le log P de - 0.78 : l'absorption cutanée est par défaut estimée à 100%. Les différentes études de toxicité aiguë fournissent des DL50 comprise entre 300 et 1350 mg/kg pc selon l'animal et la voie d'administration utilisée. Les études de reprotoxicité mettent en évidence en NOAEL de 150 mg/kg pc/j pour la toxicité maternelle et une NOAEL de 21 mg/kg pc/j pour la toxicité sur le développement (116). Elle n'est pas mutagène sur *Salmonella typhimurium* et l'IARC la classée en catégorie 3. Ainsi, une marge de sécurité peut être calculée, les concentrations maximales utilisables également.
- La Théophylline (117) : le numéro CAS est 58-55-9, le poids moléculaire de 180 Da et le log P de -0.39. L'absorption cutanée est par défaut estimée à 100%. La DL50 chez le rat par voie orale est de 272 mg/kg pc et est supérieure à 2000 mg/kg pc par voie cutanée. Une étude de 2 ans par voie orale montre une LOAEL de 37.5 mg/kg pc/j. Cette molécule semble non génotoxique et non clastogène, mais un potentiel fœtotoxique existe aux doses de 218 mg/kg pc/j chez le rat et de 396 mg/kg pc/j chez la souris. De plus, elle est susceptible de provoquer l'accouchement prématuré. Les études de cancérogénèse n'ont montré aucune différence significative jusqu'aux doses de 7 mg/kg pc/j chez le rat et de 150 mg/kg pc/j chez la souris. Donc la marge de sécurité peut être calculée, les concentrations maximales utilisables également.

### 7.2.6. Conclusion

Au vu des données de la littérature et de l'usage traditionnel des graines de Cola, une faible toxicité est attendue par voie orale. Cependant, les graines contiennent certaines substances dont un potentiel génotoxique ne peut être exclu. Par ailleurs, aucune donnée d'utilisation par voie topique n'est rapportée.

Ainsi, avant toute utilisation d'un extrait de graine de Cola dans un produit cosmétique :

- Des tests de tolérance locale doivent être réalisés (irritation cutanée et oculaire, sensibilisation, absorption dans l'UV-visible). Les résultats doivent être en faveur d'une bonne tolérance à la concentration prévue dans le produit fini.
- L'absence de catéchol et épicatechol ou la présence à l'état de traces doivent être démontrées par une analyse qualitative. Ces substances ayant un potentiel génotoxique, l'exposition acceptable devra être en dessous de 2.5 ng/kg pc/j (TTC pour les substances génotoxiques).

Le dosage de la caféine, théobromine et théophylline dans l'extrait sera réalisée pour que ces molécules puissent servir de marqueur. En effet, des NOAEL ou LOAEL étant disponibles, il est possible de calculer les concentrations maximales à ne pas dépasser dans les produits finis pour une utilisation sans danger pour la santé humaine.

## Conclusion générale et perspectives

Les plantes et leurs extraits représentent une nouvelle source d'innovation, importante pour l'industrie cosmétique. Les consommateurs sont à la recherche de produits toujours plus efficaces. Pour cela, il faut trouver de nouveaux actifs. La nature est une source quasi inépuisable de molécules potentiellement actives et pouvant avoir des vertus intéressantes pour une utilisation en cosmétique.

Cependant, pour tous les ingrédients utilisés en cosmétique, il faut qu'un profil toxicologique complet soit fait, afin de garantir l'innocuité de l'ingrédient pour une utilisation donnée. C'est pourquoi la toxicité des extraits de plante et des molécules les composants doit être étudiée afin de permettre leur utilisation.

L'étude de la toxicité des extraits de plante et des molécules composant ces extraits est un travail de grande envergure.

Pour de nombreuses molécules, peu d'informations sont disponibles sur leur toxicité. Pour pouvoir avoir un profil toxicologique complet, il faudrait réaliser de nombreux tests. Cependant, certains de ces tests ne peuvent être réalisés que sur animaux car les méthodes alternatives ne sont pas encore disponibles. Par conséquent, beaucoup de profils toxicologiques restent incomplets et certaines molécules ne peuvent être autorisées en cosmétiques par manque de données les concernant.

De plus, il est souvent difficile de faire comprendre la nécessité de réaliser des tests de toxicité aux fournisseurs d'extraits végétaux ou aux personnes responsables de la mise sur le marché du produit cosmétique. Les tests à réaliser peuvent coûter cher et ne sont souvent pas pris en compte dans le budget de développement d'un nouveau produit.

En tant qu'évaluateur de la sécurité des produits cosmétiques, une de mes missions est de faire comprendre aux laboratoires cosmétiques et aux fournisseurs de matières premières naturelles l'importance d'avoir des données de toxicité sur les extraits de plante, afin de garantir la sécurité d'utilisation d'un produit, conformément à l'article 3 du Règlement cosmétique 1223/2009. Cependant, même si quelques progrès ont été réalisés, il est encore très difficile de d'obtenir de telles données. Certains fabricant ne réalisent aucun test et la littérature est parfois très pauvre, en particulier pour des plantes exotiques.

THESE SOUTENUE PAR : M<sup>lle</sup> TERROT Laure

Ce travail n'est qu'un début et a permis de développer une base de données de plus de 350 molécules pour les laboratoires Clarins. Des bases de données partagées sont également en train de voir le jour afin de faciliter l'échange des informations entre les différents acteurs dans le domaine des cosmétiques et des fournisseurs de matières premières. Ainsi, petit à petit, il sera plus facile d'évaluer les plantes et leurs extraits, et de permettre leur utilisation de façon la plus sûre possible dans les produits cosmétiques.

D'autre part, le développement des méthodes alternatives ouvre une nouvelle voix pour l'évaluation de la toxicité des substances. Bien que de nombreuses méthodes soient maintenant disponibles (principalement pour évaluer la toxicité locale), il en reste encore beaucoup à développer, surtout pour l'évaluation de la toxicité systémique. Les méthodes *in silico* (QSAR, read-across) sont prometteuses mais elles dépendent de la qualité des données bibliographiques disponibles pour une substance donnée ou pour une famille de composés. Elles dépendent aussi de l'expérience de l'utilisateur. Ces outils sont très intéressants mais doivent être utilisés avec intelligence. Bien qu'ils puissent nous orienter vers une toxicité potentielle d'une molécule, ils ne permettent pas encore de s'abstenir complètement de tests *in vivo* complémentaires.

**Le Président de la thèse,**

Nom : Léa PAYEN

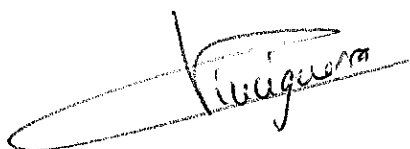
Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le - 5 JAN. 2015

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences

Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1, **Professeure C. VINCIGUERRA**

## Bibliographie

1. Directive n°76/766/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux produits cosmétiques ; J.O.C.E. L 262 ; 27 septembre 1976.
2. Règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques ; J.O.U.E. L 342 ; 22 décembre 2009.
3. Article L.5111-1 du code de la santé publique.
4. SCCS. The SCCS's Notes of guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation. 9th revision. SCCS/1564/15. 2015.
5. Colipa. Colipa Guidelines on the Product Information file (P.I.F.) Requirement. Compliance with the Regulation 1223/2009 on cosmetic products. 2011.
6. Directive n°2003/15/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 février modifiant la Directive 76/768/CEE concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux produits cosmétiques ; J.O.U.E. L 66 ; 11 mars 2003 : 26-35.
7. FEBEA. Guide pratique. Conformité avec le règlement cosmétique. Dossier d'information produit (DIP). 2012.
8. Article L.5131-4 du code de la santé publique.
9. Décision d'exécution de la commission du 25 novembre 2013 concernant les lignes directrices pour l'application de l'annexe 1 du règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques ; J.O.U.E. L315/82 ; 26 novembre 2013.
10. Joubert, JP. Toxicologie et sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme. 2012.
11. SCCS. The SCCS's Notes of guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation. 8th Revision. SCCS/1501/12. 2012.
12. Affsaps. Recommandations aux fabricants ou aux responsables de la mise sur le marché relatives à l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine d'un ingrédient ou d'une combinaison d'ingrédients à usage cosmétique.



13. Rogiers V, Pauwels M. Safety Assessment of cosmetics in Europe. 36<sup>ème</sup> éd. Bruxelles. Karger ; 2008.
14. DG SANCO. Guidance document on dermal absorption. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Doc.Sanco/222/2000 revision 7 of 19 March 2004.
15. SCCS. Addendum to the SCCS's Notes of Guidance (NoG) for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 8th revision (SCCS/1501/12). SCCS/1532/14. 2014.
16. EFSA. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. Parma; 2011. p. 1379-2447.
17. SCCNFP. Position statement on the calculation of the margin of safety of ingredients incorporated in cosmetics which may be applied to the skin on children. SCCNFP/0557/02, adopté le 27 février 2002.
18. SCCS, SCHER et SCENIHR. Opinion on use the Threshold of Toxicological Concern (TTC) approach for human safety assessment of chemical substances with focus on cosmetics and consumer products. 2012.
19. Directive n°86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques ; J.O.C.E. L 358 ; 18 décembre 1986.
20. Directive n°2010/63/CE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ; J.O.U.E. L 276 ; 20 octobre 2010.
21. Directive n°2003/15/CE du Parlement européen et du Conseil de 27 février 2003 modifiant la directive 76/768/CEE du Conseil concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux produits cosmétiques ; J.O.U.E. L 66 ; 11 mars 2003.
22. ECVAM. Validation & regulatory acceptance. <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu> (consulté le 10 août 2015).
23. OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. ENV/JM/MONO(2005)14. 2005.

24. INERIS. Méthodes alternatives en expérimentation animale : Cas concrets d'outils d'évaluation *in vitro/in vivo* et de méthodes de prédiction *in silico*. 2011.
25. Biola-Videmment A. Modèles *in vitro* en toxicologie réglementaire. 2013.
26. Zuang V, Barroso J, Bremer S, et al. ECVAM technical report on the status of alternative methods for cosmetics testing (2008-2009). JRC Scientific and Technical Reports. Ispra; 2010.
27. Zuang V, Schäffer M, Tuomainen AM, et al. EURL ECVAM progress report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods (2010-2013). Ispra: JCR Scientific and policy Reports; 2013.
28. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals No. 431: In vitro skin corrosion: Human skin model test. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2004.
29. Kandárová H, Liebsch M, Spielmann H, Genschow E, Schmidt E, Traue D, et al. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20(5): 547-59.
30. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals No. 435: In vitro membrane barrier test method for skin corrosion. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2006.
31. Cazedey E, Carvalho F, Fiorentino F, Gremião M, Salgado H. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 45(4): 759-66.
32. Lelièvre D, Justine P, Christiaens F, Bonaventure N, Coutet J, Marrot L, et al. The EPISKIN Phototoxicity Assay (EPA): Development of an in vitro tiered strategy to predict phototoxic potential. *AATEX*. 2007; 14 (special issue); 389-96.
33. Vinardell MP. The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015; 71(2): 198-204.
34. OECD. OECD guideline for the testing of Chemicals No 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2009.

35. OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals No 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2009.
36. ICCVAM. Recommended Test Method Protocol: hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. 2010. Epub 2015 sept 30.
37. OECD. OECD guideline for testing chemicals No 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2015.
38. IIVS. Ocular Irritation Assays - The Bottom-Up and Top-down approaches. [www.iivs.org](http://www.iivs.org) (consulté le 15.10.2015).
39. EURL ECVAM. EURL ECVAM Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitization testing. Ispra: JCR Scientific and policy Reports; 2015.
40. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Draft proposal for a new test guideline: In vitro Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAt). Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2015.
41. Casati S, Worth A, Amcoff P, Whelan M. EURL ECVAM Strategy for replacement of Animal Testing for Skin Sensitization hazard Identification and Classification. Ispra: JRC Scientific and Technical Reports; 2013.
42. Quantin P, Thélu A, Catoire S, Ficheux H. Perspectives and strategies of alternative methods used in the risk assessment of personal care products. *Ann Pharm Fr.* 2015.
43. Intertek. Test de sensibilisation cutanée DPRA "Direct Peptide Reactivity Assay". [www.intertek-france.com/labo/in-vitro/tests-sensibilisation-cutanee-dpra](http://www.intertek-france.com/labo/in-vitro/tests-sensibilisation-cutanee-dpra) (consulté le 15 décembre 2015).
44. EURL ECVAM. EURL ECVAM recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitization Testing. Ispra: JCR Scientific and policy Reports; 2013.
45. OECD. OECD Guideline for the testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2015.

46. IIVS. KeratinoSens Assay for Skin Sensitization: An Approach to Non-Animal Skin Sensitization Testing. Epub 2015 Aug 26.
47. EURL ECVAM. EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSens assay for skin sensitisation testing. Ispra: JCR Scientific and policy Reports; 2014.
48. Ovigne JM, Piroird C, Rousset F, Martinozzi-Teissier S, Meunier JR. The myeloid U937 skin sensitization test (MUSTT) for the prediction of skin sensitization potential.
49. EURL ECVAM. EURL ECVAM Recommendation on the 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay for Acute Oral Toxicity Testing. Ispra: JCR Scientific and policy Reports; 2013.
50. EURL ECVAM. EURL ECVAM Strategy to avoid and reduce animal use in genotoxicity testing. Ispra: JCR Scientific and policy Reports; 2013.
51. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Arch Toxicol. 2011; 85: 367-85.
52. ICCR. Report for the international cooperation on cosmetics regulation. *In silico* approaches for the safety assessment of cosmetic ingredients. 2014. Epub 2015 Aug 25.
53. IARC. Quercetin. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 73. Lyon; 1999. p. 497-515.
54. Council of Europe. Plants in cosmetics : potentially harmful components. Vol. III. Council of Europe Publishing ; 2006.
55. ECHA. <http://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/cl-inventory-database> (consulté le 11 novembre 2015).
56. Wikipedia. Quercétine. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Quercetine> (consulté le 25 juillet 2013).
57. Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. Mutat Res. 1995; 343 (2-3): 85-94.

58. Justino GC, Santos MR, Canario S, Borges C, Florencio MH, Mira L. Plasma quercetin metabolites: structure-antioxydant activity relationships. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 432(1): 109-21.
59. Okamoto T. Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int J Mol Med.* 2005; 16(2): 275-8.
60. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Galvez J, Zarzuelo A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, wich inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kB pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35(2): 584-92.
61. Huang RY, Yu YL, Cheng WC, OuYang CN, Fu E, Chu CL. Immunosuppressive Effect of Quercetin on Dendritic Cell Activation and Function. *J Immunol.* 2010; 184(12): 6815-21.
62. Lee EJ, Ji GE, Sung MK. Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells. *Inflamm Res.* 2010; 59(10): 847-54.
63. Joshi UJ, et al. Anti-inflammatory, antioxydant and entcancer activity of quercetin and its analogues. *Int J Research Pharm Biomed Sci.* 2011; 2 (4): 1756-66.
64. Sullivan M, Follis RH Jr, Hilgartner M. Toxicology of podophyllin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951; 77(2): 269-72.
65. Vicentini FT, Simi TR, Del Ciampo JO, Wolga NO, Pitol DL, Iyomasa MM, et al. Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 69(3): 948-57.
66. Vecentini FT, Fonseca YM, Pitol DL, Iyomasa MM, Bentley MV, Fonseca MJ. Evaluation of protective effect of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin against UVB-induced damage in hairless mice skin. *J Pharm Pharm Sci.* 2010; 13 (2): 274-85.
67. Yin Y, Li W, Son YO, Sun L, Lu J, Kim D, et al. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 269(2): 89-99.
68. National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Quercetin (CAS No. 117-39-5) in F344 rats (feed studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1992; 409: 1-171.
69. IARC. Quercetin. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Volume 31. Lyon ; 1983. p. 213-29.

70. Dunnick JK, Hailey JR. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of food. *Fundam. appl. Toxicol.* 1992; 19 (3): 423-31.
71. Ishikawa M, Oikawa T, Hosokawa M, Hamada J, Morikawa K, Kobayashi H. Enhancing effect of quercetin on 3-methylcholanthrene carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Neoplasma.* 1985; 32 (4): 435–41.
72. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark H. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis.* 1991; 12(7): 1193–6.
73. Santti R, Makela S, Strauss L, Korkman J, Kostian M. Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. *Toxicol ind Health.* 1997; 14: 233-7.
74. Willhite CC. Teratogenic potential of quercetin in the rat. *Fd Chem Toxicol.* 1982; 20(1): 75-9.
75. ACS. Chlorogenic acid. <http://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/molecule-of-the-week-chlorogenic-acid.html> (consulté le 30 juillet 2013).
76. Wikipedia. Acide chlorogénique. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Acide\\_chlorog%C3%A9nique](http://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_chlorog%C3%A9nique) (25 juillet 2015).
77. Marti-Mestres G, Mestres JP, Bres J, Martin S, Ramos J, Vian L. The "in vitro" percutaneous penetration of three antioxydant compounds. *Int J Pharm.* 2007; 331(1): 139-44.
78. Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan, MB. Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. *J Nutr.* 2003; 133(6): 1806-14.
79. Xu J, Hu Q, Liu Y. Effects of chlorogenic acid and bovine serum albumin on the oxidative stability of low density lipoproteins in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60(46): 11625-30.
80. Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci.* 2007; 262(1-2): 77-84.
81. McCarty MF. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Med Hypotheses.* 2005; 64(4): 848-53.
82. Johnston KM, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr.* 2003; 79(4): 728-33.

83. Naturex. Svétol. <http://www.naturex.fr/catalogues/nutrition-health/nat-life/svetol.html> (consulté le 30 juillet 2013).
84. Chaube S, Swinyard CA. Teratological and toxicological studies of alkaloidal and phenolic compounds from *Solanum tuberosum* L. Toxicol Appl Pharmacol. 1976; 36(2): 227-37.
85. Hach V, Heim F. [Comparative studies on the central stimulating effects of caffeine and chlorogenic acid in white mice]. (Abstract). *Arzneim Forsch.* 1971; 2: 23-25.
86. Liu Z, Liu Z, Shi Y, Zhou G. Evaluation of the immunosensitizing potential of chlorogenic acid using a popliteal lymph node assay in BALB/c mice. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(4): 1059-65.
87. Eklund A. Effect of chlorogenic acid in a casein diet for rats. *Nutr Metab.* 1975; 18(5-6): 258-64.
88. Stich HF, Rosin MP, Wu CH, Powrie WD. Comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid). *Mutat Res.* 1981; 90(3): 201-12.
89. Fung VA, Cameron TP, Hughes TJ, Kirby PE, Dunkel VC. Mutagenic activity of some coffee flavor ingredients. *Mutat Res.* 1988; 204(2): 219-28.
90. Hossain MM, Huismans JW, Diehl JF. Mutagenicity studies on irradiated potatoes and chlorogenic acid; micronucleus test in rats. *Toxicology.* 1976; 6(2): 243-51.
91. Wang CY, Chiu CW, Pamukcu AM, Bryan GT. Identification of carcinogenic tannin isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *J Natl Cancer Inst.* 1976; 56(1): 33-6.
92. Wikipédia. Apigénine. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Apig%C3%A9nine> (consulté le 5 août 2015).
93. Merfort I, Heilmann J, Hagedorn-Leweke U, Lippold BC. In vivo skin penetration studies of camomile flavones. *Pharmazie.* 1994; 49(7): 509-11.
94. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res.* 1998; 18(12): 1995-2018.
95. NCI. Summary of data for chemical selection : Apigenine. 2000.
96. Siddique YH, Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cells. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(3): 536-9.

97. USPTO. Results of search for all years db for; apigenin: 107 patents. 2000 <http://www.uspto.gov/patft/index.html> (consulté le 29 août 2013).
98. FDA. Dietary supplement health and education. 1994.
99. Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* 1972; 128(4) 901-11.
100. Singh P, Mishra SK, Noel S, Sharma S, Rath SK. Acute exposure of apigenin induces hepatotoxicity in swiss mice. *PLoS ONE.* 2012; 7(2); e31964.
101. Czczot H, Tudek B, Kusztełak J, Szymczyk T, Dobrowolska B, Glinkowska G, et al. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoides naturally occurring in medical herbs. *Mutat Res.* 1990; 240(3): 209-16.
102. Nagao M, Morita N, Yahagi T, Shimizu M, Kuroyanagi M, Fukuoka M, et al. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds (Abstract). *Environ Mutagen.* 1981; 3(4): 401-19.
103. Czczot H, Bilbin M. Effect of flavones and their metabolites on induction of SOS repair in the strain PQ 37- *E.coli* K-12. *Acta Biochim Pol.* 1991; 38(1): 71-4.
104. Noel S, Kasinathan M, Rath SK. Evaluation of apigenin using *in vitro* cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicol in vitro.* 2006; 20(7): 1168-72.
105. Snyder RD, Gillies PJ. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen.* 2002; 40(4): 266-76.
106. Afssaps. Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations. 2005.
107. Ojo GB, Nwoha PU, Ofusori DA, Ajavi SA, Odukoya SA, Ukwenya VO, et al. Microanatomical effects of ethanolic extract of *Cola nitida* on the stomach mucosa of adult wistar rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2009; 7(1): 47-52.
108. Wikipedia. *Cola nitida*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Kola\\_nut](https://en.wikipedia.org/wiki/Kola_nut) (consulté le 5 décembre 2015).
109. EMA. Assessment report on *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl. and its varieties and *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl., semen. EMA/HMPC/722365/2010. 2011.



110. Burdock GA, Carabin IC, Crincoli CM. Safety assessment of kola nut extract as a food ingredient. *Food chem Toxicol*. 2009; 47(8): 1725-32.
111. Conseil de l'Europe. Les plantes dans les cosmétiques. Volume I. Plantes et préparations à base de plantes utilisées en tant qu'ingrédients dans les produits cosmétiques. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2002.
112. Shama I, Ahmed A, Wala M, Warda S. Toxicological aspects of *Cola acuminata* nut extracts. *British Journal of Pharmacology & Toxicology*. 2011; 2(4): 199-204.
113. Benie T, Thieulant M. Interaction of some traditional plant extracts with uterine oestrogen or progestin receptors. *Phytother Res*. 2003; 17(7): 756-60.
114. Benie T, Duval J, Thieulant M. Effects of some traditional plant extracts on rat oestrous cycle compared with Clomid. *Phytother Res*. 2003; 17(7): 748-55.
115. Garner CE, Jefferson WN, Burka LT, Matthews HB, Newbold RR. In vitro estrogenicity of the catechol metabolites of selected polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999; 154(2): 188-97.
116. EFSA. Opinion on theobromine as undesirable substances in animal feed. Scientific Opinion of the Panel Contaminants in the Food Chain. *The EFSA journal*; 2008: 725, 51-66.
117. Conseil de l'Europe. 39. Theophylline. Active ingredients used in cosmetics : Safety Survey. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2008.
118. Amcoff P. ICATM Current Alternative Test Method Validation and Regulatory Acceptance Status Report for ICCR. Ispra: JRC Technical reports; 2013.
119. British Herbal Medicine Association. British Herbal Compendium. A handbook of scientific information on widely used plant drugs. Volume 1. Ongar : Peter Bradley; 1992.
120. British Herbal medicine Association. British Herbal Compendium. A handbook of scientific information on widely used plant drugs. Volume 2. Ongar: Peter Bradley; 2006.
121. American Herbal Products Association's. Botanical safety handbook. 2e éd. Zoe Gardner, Michael McGuffin; 2013.
122. Tisserand R, Young R. Essential Oil safety – A guide for health care professionals. 2e éd. Elsevier; 2014.
123. Lis-Malchin M. Aromatherapy Science. A guide for healthcare professionals. London: Pharmaceutical Press; 2006.

124. Conseil de l'Europe. Les plantes dans les cosmétiques. Volume II. Plantes et préparations à base de plantes utilisées en tant qu'ingrédients dans les produits cosmétiques. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2002.
125. Conseil de l'Europe. Plants in cosmetics. Volume III. Potentially harmful components. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2006.
126. Conseil de l'Europe. Active ingredients used in cosmetics : Safety Survey. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2008.
127. Conseil de l'Europe. Natural sources of flavourings. Reports No. 1. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2000.
128. Conseil de l'Europe. Natural sources of flavourings. Reports No. 2. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2007.
129. Conseil de l'Europe. Natural sources of flavourings. Reports No. 3. Strasbourg : Conseil de l'Europe ; 2008.
130. WHO. WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 1. Geneve; 1999.
131. WHO. WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 2. Geneve: WHO Library ; 2004.
132. WHO. WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 3. Geneve: WHO Library ; 2007.
133. WHO. WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 4. Geneve: WHO Library ; 2009.
134. Leung AY, Foster S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. Wiley; 2003.

## Annexes

Annexe 1 : Annexe 1 du règlement (CE) 1223/2009 : rapport sur la sécurité du produit cosmétique (2).

ANNEXE I

**RAPPORT SUR LA SÉCURITÉ DU PRODUIT COSMÉTIQUE**

Le rapport sur la sécurité du produit cosmétique comporte, au minimum, les éléments suivants:

**PARTIE A – Informations sur la sécurité du produit cosmétique**

**1. Formule quantitative et qualitative du produit cosmétique**

Formule qualitative et quantitative du produit cosmétique, y compris l'identité chimique des substances (nom chimique, INCI, CAS, EINECS/ELINCS, lorsque cela est possible) et leur fonction prévue. Dans le cas des compositions parfumantes et aromatiques, description du nom et du numéro de code de la formule et de l'identité du fournisseur.

**2. Caractéristiques physiques/chimiques et stabilité du produit cosmétique**

Caractéristiques physiques et chimiques des substances ou des mélanges, ainsi que du produit cosmétique.

Stabilité des produits cosmétiques dans des conditions de stockage raisonnablement prévisibles.

**3. Qualité microbiologique**

Spécifications microbiologiques de la substance ou du mélange et du produit cosmétique. Une attention particulière est accordée aux produits cosmétiques utilisés sur le contour des yeux, sur les muqueuses en général, sur une peau lésée, chez les enfants de moins de trois ans, chez les personnes âgées et chez les personnes au système immunitaire fragilisé.

Résultats du challenge test pour la conservation.

**4. Impuretés, traces, informations concernant le matériau d'emballage**

Pureté des substances et des mélanges.

En cas de présence de substances interdites sous forme de traces, éléments prouvant qu'elle est techniquement inévitable.

Caractéristiques pertinentes du matériau d'emballage, notamment sa pureté et sa stabilité.

**5. Utilisation normale et raisonnablement prévisible**

Utilisation normale et raisonnablement prévisible du produit. Le raisonnement est justifié en particulier à la lumière des avertissements et autres explications figurant dans l'étiquetage du produit.

**6. Exposition au produit cosmétique**

Données relatives à l'exposition au produit cosmétique compte tenu des observations faites au point 5 en ce qui concerne:

- 1) le ou les sites d'application;
- 2) la ou les zones d'application;
- 3) la quantité de produit appliquée;
- 4) la durée et la fréquence d'utilisation;
- 5) la ou les voies d'exposition normales ou raisonnablement prévisibles;
- 6) la ou les populations visées (ou exposées). Il convient de tenir compte également de l'exposition potentielle d'une population spécifique.

Le calcul de l'exposition prend aussi en considération les effets toxicologiques à envisager (il peut, par exemple, être nécessaire de calculer l'exposition par unité de surface de peau ou par unité de poids corporel). La possibilité d'une exposition secondaire par des voies autres que celles résultant d'une application directe devrait également être prise en compte (par exemple, inhalation involontaire de sprays, ingestion involontaire de produits pour les lèvres).

Une attention particulière est accordée à toute incidence possible sur l'exposition due à la taille des particules.

#### 7. Exposition aux substances

Données relatives à l'exposition aux substances contenues dans le produit cosmétique pour les effets toxicologiques appropriés compte tenu des informations figurant au point 6.

#### 8. Profil toxicologique des substances

Sans préjudice de l'article 18, profil toxicologique de la substance contenue dans le produit cosmétique pour tous les effets toxicologiques pertinents. Un accent particulier est mis sur l'évaluation de la toxicité locale (irritation de la peau et des yeux), de la sensibilisation cutanée et, en cas d'absorption UV, de la toxicité photo-induite.

Toutes les voies d'absorption toxicologiques importantes sont examinées ainsi que les effets systémiques, et la marge de sécurité basée sur une NOAEL (no observed adverse effects level - dose sans effet néfaste observé) est calculée. L'absence de ces considérations est dûment justifiée.

Une attention particulière est accordée à toute incidence possible sur le profil toxicologique résultant:

- de la taille des particules, y compris les nanomatériaux,
- des impuretés des substances et des matières premières utilisées, et
- de l'interaction des substances.

Toute utilisation d'une approche par références croisées est dûment étayée et justifiée.

La source des informations est clairement indiquée.

#### 9. Effets indésirables et effets indésirables graves

Toutes les données disponibles sur les effets indésirables et les effets indésirables graves pour le produit cosmétique ou, le cas échéant, pour d'autres produits cosmétiques. Ceci inclut des données statistiques.

#### 10. Informations sur le produit cosmétique

Autres informations pertinentes, par exemple études existantes chez des volontaires humains, ou résultats dûment confirmés et justifiés d'évaluations de risques qui ont été réalisées dans d'autres domaines pertinents.

### PARTIE B – Évaluation de la sécurité du produit cosmétique

#### 1. Conclusion de l'évaluation

Indication relative à la sécurité du produit cosmétique au regard de l'article 3.

#### 2. Avertissements et instructions d'utilisation figurant sur l'étiquette

Indication de la nécessité de faire figurer sur l'étiquette des avertissements particuliers et les instructions d'utilisation conformément à l'article 19, paragraphe 1, point d).

#### 3. Raisonnement

Explication du raisonnement scientifique aboutissant à la conclusion de l'évaluation indiquée au point 1 et aux informations prévues au point 2. Cette explication repose sur les descriptions visées à la partie A. Le cas échéant, des marges de sécurité sont évaluées et analysées.

Elle comprend, entre autres, une évaluation spécifique des produits cosmétiques destinés aux enfants de moins de trois ans et des produits cosmétiques destinés exclusivement à l'hygiène intime externe.

Il convient d'évaluer les interactions éventuelles des substances contenues dans le produit cosmétique.

La prise en compte ou non des différents profils toxicologiques est dûment justifiée.

Les incidences de la stabilité sur la sécurité du produit cosmétique sont dûment examinées.

#### 4. Références de la personne chargée de l'évaluation et approbation de la partie B

Nom et adresse de la personne chargée de l'évaluation de la sécurité.

Preuve de qualification de la personne chargée de l'évaluation de la sécurité.

Date et signature de la personne chargée de l'évaluation de la sécurité.

Annexe 2 : Etat de lieux des méthodes alternatives disponibles en 2013 (118).

Method	Current Status	Lead Action Organization	International Acceptance
<i>Dermal Corrosivity Test Methods</i>			
<b>CORROSITEX Skin Corrosivity Test</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 435 (2006)</b>
<b>EpiSkin, EpiDerm™, SkinEthic™, EST-1000 Skin Corrosivity Tests</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 431 (2004)</b>
<b>Rat TER Skin Corrosivity Test</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 430 (2004)</b>
Rat TER OECD TG 430	Updated to include Performance Standards	NICEATM-ICCVAM	Adopted by WNT 25 in April 2013.
<i>In vitro</i> skin corrosivity assays: EpiDerm™, EPISKIN™, SkinEthic™* and epiCS®* (* only for corrosives versus non corrosives)	Updated to include Performance Standards and division of corrosivity into 2 categories.	NICEATM-ICCVAM	Adopted by WNT 25 in April 2013.
<i>Dermal Irritation Test Methods</i>			
<b><i>In vitro</i> reconstructed human epidermis (RhE) test methods: EpiDerm™, EPISKIN™, SkinEthic and LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 439 (2010), Updated 2012</b>
Investigation of <i>in vitro</i> RhE dermal irritation assays to evaluate false negative corrosives from <i>in vitro</i> RhE corrosivity tests: EpiDerm™, EPISKIN™ and SkinEthic	Study completed, manuscript in preparation.	NICEATM-ICCVAM	
<i>Phototoxicity Test Methods</i>			
<b>3T3 NRU Phototoxicity Test</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 432 (2004)</b>
Test method battery to predict phototoxicity (yeast growth inhibition phototoxicity assay and red blood cell photohemolysis assay)	Japanese Regulatory Acceptance Board recommended additional work be performed	JaCVAM	
Production of reactive oxygen species (ROS) and photostability study	JaCVAM-sponsored validation study finalised, peer review will be started in 1 <sup>st</sup> quarter 2013.	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, Health Canada and KoCVAM VMT liaisons	

<i>Ocular Toxicity Test Methods</i>			
<b>Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 437 (2009)</b>
<b>Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 438 (2009)</b>
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method and the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	Revised to 1) to update positive controls, and 2) use in a “bottom-up” approach to identify chemicals not requiring classification for eye irritation under UN GHS/EU CLP.	NICEATM-ICCVAM, EURL ECVAM and the Netherlands	Adopted by WNT 25 in April 2013.
<b>Use of Histopathology as an additional endpoint in Ocular Safety Testing</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD GD 160 (2011)</b>
Cytotoxicity test: SIRC CVS	JaCVAM-sponsored validation study ongoing	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT	
Cytotoxicity test: three-dimensional dermal model (MATREX)	JaCVAM-sponsored validation study in the planning stage	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT	
Cytotoxicity test: Short Time Exposure (STE) test	JaCVAM-sponsored validation study completed – preparing submission for peer review coordinated by NICEATM-ICCVAM	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons	SPSF submitted and approved in 2012.
<b>Use of anesthetics, analgesics, and humane endpoints for routine use in the TG 405</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD updated TG 405 (2012)</b>
<b>Low volume eye test; recommendation for no future use.</b>	<b>Completed</b>		



<i>In vitro</i> approach for categorization of anti-microbial cleaning products: recommendations for further studies	Ongoing EPA pilot project accumulating data using the proposed testing strategy	NICEATM-ICCVAM	
Cytosensor Microphysiometer® (CM) Test method	The draft TG submitted to OECD for comments including a set of Performance Standards.	EURL ECVAM; NICEATM-ICCVAM	Adoption of draft TG expected by WNT 26 in 2014.
<b>Fluorescein Leakage (FL) test method</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 460 (2012)</b>
Human reconstructed tissue models for eye irritation EpiOcular EIT™ SkinEthic HCE	EURL ECVAM validation study ongoing (experimental part started in 2010 and ended in March 2012). Peer review anticipated by 2013.	EURL ECVAM; JaCVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons	
Vitrigel-EIT	MAFF-sponsored validation study in the planning stage	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons	
<b><i>Immunotoxicity (Allergic Contact Dermatitis) Test Methods</i></b>			
<b>Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 429 (2002) ISO (2002)</b>
<b>Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization (20% reduction)</b>	<b>Completed</b>		<b>Update to TG 429 OECD (2010)  ISO (2010)</b>
<b>Reduced LLNA (rLLNA)</b>	<b>Completed</b>		<b>Update to TG 429 OECD (2010)</b>
<b>Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU-ELISA)</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 442B OECD (2010)</b>
<b>Nonradioactive LLNA protocol, LLNA:DA</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 442A OECD (2010)</b>

<b>Harmonized performance standards for the LLNA</b>	<b>Completed</b>		<b>Update to TG 429 OECD (2010)</b>
Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU-Flow Cytometry)	ICCVAM international peer review, 2009 Recommendations pending a review of lead laboratory data and inter-laboratory study. KoCVAM validation study planned	NICEATM-ICCVAM, KoCVAM	
<i>In vitro</i> skin sensitization assays (h-CLAT; DPRA; MUSST)	Multi-laboratory validation ends in August 2012 (h-CLAT and MUSST). DPRA peer review is ongoing.	EURL ECVAM; JaCVAM and NICEATM-ICCVAM VMT liaison members	Proposal for an Adverse Outcome Pathway for skin sensitization has been approved by the OECD. SPSFs approved for the DPRA, Keratinosens and hCLAT.
<i>In vitro</i> skin sensitization assay KeratinoSens	External Validation Study, peer review ongoing	EURL ECVAM	SPSF approved
<i>In vitro</i> skin sensitization assay IL-8 Luc assay	METI-sponsored validation study ongoing	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, KoCVAM and Health Canada VMT liaisons	
<b>Acute Toxicity Test Methods</b>			
<b>Up and Down Procedure (UDP)</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 425 (2008)</b>
<b><i>In vitro</i> cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD GD 129 (2010)</b>
<i>In vitro</i> cytotoxicity test (3T3 Neutral Red Uptake) for identifying substances with acute oral LD50 > 2000 mg/kg b.w.	EURL ECVAM ESAC peer review completed, and EURL ECVAM Recommendation anticipated in early 2013.	EURL ECVAM and ICATM organisations	
Zebrafish Embryo Toxicity test (ZFET)	ESAC peer review finalized.	EURL ECVAM	Adopted TG by WNT 25 in April 2013.
<b>Toxicokinetic test methods</b>			
<i>In vitro</i> hepatic biotransformation – CYP induction: Hepa RG and cryopreserved human hepatocytes	ESAC peer review foreseen in 2013	EURL ECVAM; NICEATM-ICCVAM, and JaCVAM VMT liaisons	Approval of SPSF for a PBTG by WNT 25 in April 2013.

<i>Endocrine Disruptor Test Methods</i>			
<b>Stably transfected human estrogen receptor-<math>\alpha</math> transcriptional activation assay for detection of estrogenic <u>agonist-activity of chemicals</u></b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 455 (2009), updated 2012</b>
Stably transfected human estrogen receptor- $\alpha$ transcriptional activation assay for detection of estrogenic <u>antagonist-activity of chemicals</u>	International validation study in progress	JaCVAM	To be added to the TG 455 when validated and peer reviewed.
<b>LUMI-CELL<sup>®</sup> human estrogen receptor transcriptional activation assay: agonist and antagonist protocols</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 457 (2012)</b>
CertiChem MCF-7 cell proliferation assay for the detection of human estrogen receptor agonists and antagonists	International validation study completed. Protocol must be revised for adequate reproducibility	NICEATM-ICCVAM; EURL ECVAM, JaCVAM and KoCVAM VMT liaisons	
Stably transfected CHO Androgen receptor- $\alpha$ transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals.	METI-sponsored validation in planning stage.	JaCVAM, EURL ECVAM, NICEATM, ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons. VMG NA	
MELN <sup>®</sup> human estrogen receptor transcriptional activation assay: agonist and antagonist protocols	Validation study ongoing (EURL ECVAM)	EURL ECVAM (lead), NICEATM-ICCVAM, JaCVAM	To be added to the PBTG when validated and peer reviewed.
<i>Genetic Toxicity Test Methods</i>			
<b><i>In vitro</i> micronucleus test</b>	<b>Completed</b>		<b>OECD TG 487 (2010)</b>
<i>In vivo/in vitro</i> comet assay	The peer review of the <i>in vivo</i> Comet assay by the OECD Comet assay expert group has been finalised. Validation of <i>in vitro</i> study ongoing	JaCVAM (lead); EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, KoCVAM and Health Canada VMT liaisons	SPSF approved by OECD
Genotoxicity assays (micronucleus and comet) in 3D skin models	Prevalidation study ongoing	Cosmetics Europe (lead); EURL ECVAM support	
Transgenic rodent <i>in vivo</i> gene mutation assays. OECD TG 488 (2011)	Draft TG to be updated.	Health Canada	SPSF approved by WNT 25 in April 2013.

<i>Carcinogenicity Test Methods</i>			
Bhas cell transformation assay	EURL ECVAM Recommendation expected 1 <sup>st</sup> quarter 2013.	JaCVAM (lead); EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons	
SHE pH 6.7, SHE pH 7 and Balb/c 3T3 cell transformation assays	Pre-validation study and ESAC peer review completed Feb 2011; EURL ECVAM recommendation published.	EURL ECVAM	Adoption of draft TG expected by WNT 26 in 2014.
<i>Reproductive Test Methods</i>			
Hand-1 Luc assay	METI-sponsored validation in planning stage.	JaCVAM (lead); EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons	

### Annexe 3 : Résultats du test d'Ames réalisé pour l'acide chlorogénique par le laboratoire Covance.

Study Name: 8289-981  
 Experiment: 1  
 Plate incorporation assay

Study Code: EXP1 8289981  
 Date Plated: 27/08/2013  
 Date Counted: 29/08/2013

#### Without metabolic activation

Strain	Compound	Conc. Level (µg/plate)	Mean	Standard Deviation	Fold Increase	Revertant numbers per plate
TA100	Chlorogénic acid	5 µg	133,0	9,5	0,9	128 N, 127 N, 144 N
		16 µg	145,7	19,4	1,0	168 N, 133 N, 136 N
		50 µg	129,0	4,6	0,8	124 N, 130 N, 133 N
		160 µg	131,3	15,0	0,9	127 N, 148 N, 119 N
		500 µg	136,7	26,8	0,9	116 N, 127 N, 167 N
		1600 µg	127,7	2,5	0,8	128 N, 130 N, 125 N
	Water	5000 µg	124,3	11,1	0,8	123 N, 114 N, 136 N
	Water		152,7	17,9		164 N, 132 N, 162 N
TA102	Chlorogénic acid	5 µg	315,7	23,5	1,1	316 N, 339 N, 292 N
		16 µg	304,0	53,1	1,0	329 N, 243 N, 340 N
		50 µg	311,7	14,3	1,0	324 N, 296 N, 315 N
		160 µg	332,3	32,1	1,1	363 N, 299 N, 335 N
		500 µg	325,3	19,0	1,1	324 N, 345 N, 307 N
		1600 µg	347,3	25,1	1,2	376 N, 337 N, 329 N
	Water	5000 µg	314,0	32,9	1,1	351 N, 303 N, 288 N
	Water		297,0	12,5		309 N, 298 N, 284 N
TA1535	Chlorogénic acid	5 µg	12,7	3,8	1,1	10 N, 11 N, 17 N
		16 µg	10,7	1,2	0,9	12 N, 10 N, 10 N
		50 µg	10,3	5,9	0,9	8 N, 17 N, 6 N
		160 µg	10,7	2,3	0,9	12 N, 8 N, 12 N
		500 µg	9,0	1,0	0,8	8 N, 9 N, 10 N
		1600 µg	12,7	3,5	1,1	13 N, 9 N, 16 N
	Water	5000 µg	8,7	2,5	0,7	9 N, 6 N, 11 N
	Water		11,7	3,1		15 N, 11 N, 9 N
TA1537	Chlorogénic acid	5 µg	9,3	1,2	1,2	8 N, 10 N, 10 N
		16 µg	6,3	2,1	0,8	7 N, 4 N, 8 N
		50 µg	11,0	5,3	1,4	17 N, 7 N, 9 N
		160 µg	6,0	3,5	0,8	4 N, 10 N, 4 N
		500 µg	7,3	2,3	1,0	10 N, 6 N, 6 N
		1600 µg	9,0	1,0	1,2	8 N, 10 N, 9 N
	Water	5000 µg	8,0	1,0	1,0	8 N, 7 N, 9 N
	Water		7,7	4,7		4 N, 13 N, 6 N
TA98	Chlorogénic acid	5 µg	19,0	8,7	1,3	15 N, 13 N, 29 N
		16 µg	20,3	7,2	1,4	25 N, 24 N, 12 N
		50 µg	22,0	3,6	1,5	21 N, 26 N, 19 N
		160 µg	18,3	1,2	1,3	19 N, 17 N, 19 N
		500 µg	20,0	5,3	1,4	18 N, 26 N, 16 N
		1600 µg	17,3	5,9	1,2	15 N, 24 N, 13 N
	Water	5000 µg	19,7	1,5	1,3	21 N, 20 N, 18 N
	Water		14,7	3,2		16 N, 17 N, 11 N

#### Key to Plate Postfix Codes

N Normal background bacterial lawn

Strain	Compound	Conc. Level ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Mean	Standard Deviation	Fold Increase	Revertant numbers per plate
TA100	SA	2	669,0	29,5	4,4	678 N, 636 N, 693 N
TA102	MC	0.25	957,0	88,1	3,2	880 N, 938 N, 1053 N
TA1535	SA	2	702,7	67,9	60,2	661 N, 666 N, 781 N
TA1537	9AC	50	148,3	14,5	19,3	139 N, 141 N, 165 N
TA98	2NF	2.5	447,3	9,9	30,5	452 N, 454 N, 436 N

Key to Positive Controls

SA	Sodium azide
MC	Mitomycin C
9AC	9-amino acridine
2NF	2-nitrofluorene

Key to Plate Postfix Codes

N	Normal background bacterial lawn
---	----------------------------------

With metabolic activation

Strain	Compound	Conc. Level (µg/plate)	Mean	Standard Deviation	Fold Increase	Revertant numbers per plate
TA100	Chlorogénic acid	5 µg	120,7	8,0	1,0	120 N, 129 N, 113 N
		16 µg	113,3	3,1	0,9	116 N, 110 N, 114 N
		50 µg	116,7	12,3	0,9	120 N, 103 N, 127 N
		160 µg	122,0	11,0	1,0	122 N, 133 N, 111 N
		500 µg	105,3	7,8	0,8	103 N, 114 N, 99 N
		1600 µg	123,7	10,5	1,0	113 N, 134 N, 124 N
		5000 µg	98,7	4,5	0,8	99 N, 103 N, 94 N
	Water		126,3	12,7		120 N, 118 N, 141 N
TA102	Chlorogénic acid	5 µg	390,0	17,1	0,9	395 N, 404 N, 371 N
		16 µg	394,3	57,7	0,9	371 N, 460 N, 352 N
		50 µg	334,7	16,5	0,7	335 N, 351 N, 318 N
		160 µg	438,7	13,9	1,0	427 N, 454 N, 435 N
		500 µg	419,3	54,0	0,9	365 N, 420 N, 473 N
		1600 µg	381,0	18,5	0,8	374 N, 367 N, 402 N
		5000 µg	352,7	10,8	0,8	348 N, 345 N, 365 N
	Water		449,3	42,5		411 N, 442 N, 495 N
TA1535	Chlorogénic acid	5 µg	14,3	4,6	1,0	17 N, 9 N, 17 N
		16 µg	5,7	3,8	0,4	4 N, 10 N, 3 N
		50 µg	14,0	2,6	0,9	13 N, 17 N, 12 N
		160 µg	11,7	3,8	0,8	16 N, 10 N, 9 N
		500 µg	9,7	1,5	0,6	10 N, 11 N, 8 N
		1600 µg	7,0	3,0	0,5	4 N, 7 N, 10 N
		5000 µg	10,7	1,2	0,7	10 N, 10 N, 12 N
	Water		15,0	3,0		15 N, 12 N, 18 N
TA1537	Chlorogénic acid	5 µg	10,7	2,1	1,1	9 N, 10 N, 13 N
		16 µg	11,0	2,6	1,2	8 N, 13 N, 12 N
		50 µg	5,3	3,1	0,6	6 N, 2 N, 8 N
		160 µg	5,3	5,8	0,6	12 N, 2 N, 2 N
		500 µg	7,7	0,6	0,8	8 N, 8 N, 7 N
		1600 µg	6,3	4,9	0,7	4 N, 3 N, 12 N
		5000 µg	7,3	3,8	0,8	9 N, 3 N, 10 N
	Water		9,3	2,1		11 N, 10 N, 7 N
TA98	Chlorogénic acid	5 µg	23,3	3,1	1,0	26 N, 24 N, 20 N
		16 µg	25,0	3,6	1,1	22 N, 24 N, 29 N
		50 µg	25,3	10,2	1,1	21 N, 18 N, 37 N
		160 µg	29,7	7,8	1,3	36 N, 32 N, 21 N
		500 µg	24,3	4,9	1,0	30 N, 22 N, 21 N
		1600 µg	23,0	3,6	1,0	26 N, 24 N, 19 N
		5000 µg	26,3	9,5	1,1	17 N, 36 N, 26 N
	Water		23,3	3,8		19 N, 26 N, 25 N

Key to Plate Postfix Codes

N Normal background bacterial lawn

Strain	Compound	Conc. Level (µg/plate)	Mean	Standard Deviation	Fold Increase	Revertant numbers per plate
TA100	AA	2	807,7	144,9	6,4	851 N, 926 N, 646 N
TA102	AA	10	935,0	95,7	2,1	1034 N, 928 N, 843 N
TA1535	AA	2	194,7	26,5	13,0	225 N, 183 N, 176 N
TA1537	AA	2	43,7	7,4	4,7	41 N, 52 N, 38 N
TA98	B[a]P	5	763,7	50,3	32,7	708 N, 806 N, 777 N

Key to Positive Controls

AA 2-aminoanthracene  
B[a]P Benzo[a]pyrene

Key to Plate Postfix Codes

N Normal background bacterial lawn

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.



**TERROT Laure**

**Evaluation de la toxicité de molécules présentes dans les plantes en vue d'une utilisation de leurs extraits dans les produits cosmétiques**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2016, 140 p.

**RESUME**

L'évaluation de la sécurité des ingrédients cosmétiques et des produits finis cosmétiques prennent une place de plus en plus importante au cours du développement d'un nouveau produit avec la nouvelle directive européenne, entrée en vigueur le 11 juillet 2013. Les végétaux représentent une source inépuisable de molécules qui peuvent avoir une activité intéressante pour une utilisation cosmétiques. Cependant, ces molécules peuvent parfois s'avérer toxique pour l'Homme. D'où l'utilité de mettre au point une base de données scientifique, regroupant ces molécules présentes dans les extraits de plante. Cette base à pour objectif de faciliter l'évaluation de la sécurité des ingrédients naturels cosmétiques, regroupant toutes les informations disponibles sur l'identification et la toxicité des molécules (toxicité aiguë et toxicité chronique, irritation cutanée et oculaire, phototoxicité, sensibilisation, mutagénicité/génotoxicité, cancérogénicité, reprotoxicité) ainsi que des informations sur leurs usages. Certaines de ces molécules sont retrouvées de façon empirique dans les extraits de plante et posent des problèmes de toxicité, notamment de génotoxicité. Une étude bibliographique a été réalisée pour chacune de ces molécules (la quercétine, l'acide chlorogénique et l'apigénine). Selon les informations trouvées, des tests supplémentaires ont été lancés afin de confirmer les résultats publiés et des valeurs limites ont été fixées pour leur utilisation dans les produits finis.

**MOTS CLES**

Evaluation de la sécurité  
Toxicité  
Ingrédients / produits cosmétiques  
Plantes / Extraits végétaux

**JURY**

Mme PAYEN Léa, Professeur  
Mr FOUILLET Bruno, Maître de Conférences  
Mr BARET Jean-Marie, Docteur en Pharmacie

**DATE DE SOUTENANCE**

Vendredi 29 Janvier 2016

**ADRESSE DE L'AUTEUR**

5 rue Ramey - 75018 Paris