



HAL
open science

Etude de la toxicité cutanée et respiratoire des alcools dans les produits hydro-alcooliques d'hygiène des mains

Monique Manche

► **To cite this version:**

Monique Manche. Etude de la toxicité cutanée et respiratoire des alcools dans les produits hydro-alcooliques d'hygiène des mains. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S038 . tel-01859563

HAL Id: tel-01859563

<https://theses.hal.science/tel-01859563>

Submitted on 22 Aug 2018

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

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

UNIVERSITE LILLE 2 - DROIT ET SANTE
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
TOXICOLOGIE – SANTE PUBLIQUE – ENVIRONNEMENT
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE

THESE

présentée par **Monique MANCHE**

soutenue le 15 décembre 2017

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR en TOXICOLOGIE de l'UNIVERSITE de LILLE II

**Etude de la toxicité cutanée et respiratoire des alcools
dans les produits hydro-alcooliques
d'hygiène des mains**

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs

Mme Armelle BAEZA-SQUIBAN, Professeur, Université Paris Diderot Paris 7

Mme Muriel VAYSSADE, Professeur, Université de Technologie de Compiègne

Examineurs

Mme Gladys OUÉDRAOGO, Docteur, L'ORÉAL

M. Philippe HARTEMANN, Professeur émérite, Université de Lorraine

M. Gaétan RAUWEL, Docteur, Laboratoires ANIOS

M. Fabrice NESSLANY, Docteur, Institut Pasteur de Lille (co-directeur de thèse)

M. Benoît FOLIGNÉ, Professeur, Université Lille 2 (directeur de thèse)

Etude de la toxicité cutanée et respiratoire des alcools dans les produits hydro-alcooliques d'hygiène des mains

Résumé

L'hygiène des mains (HDM) est déterminante dans la prévention du risque infectieux associé aux soins. Les pratiques actuelles privilégient l'utilisation de produits hydro-alcooliques (PHA), généralement formulés avec de l'éthanol, de l'isopropanol et/ou du n-propanol, en présence de co-formulants pour une meilleure acceptabilité cutanée. L'efficacité antimicrobienne sur un temps court, nécessaire en raison des situations fréquentes de pratique d'HDM, est atteinte par des teneurs élevées en alcools pouvant excéder 80 % p/p. Cela soulève la question de la toxicité cutanée et respiratoire associée à l'utilisation des PHA. L'évaluation de la toxicité cutanée basée sur les données publiées et des essais *in vitro* d'irritation cutanée (OCDE 439) et de phototoxicité (OCDE 432) conclut à l'absence d'irritation cutanée aiguë et de phototoxicité en relation avec l'exposition cutanée à ces alcools, y compris en présence de co-formulants, tels que fournis dans les PHA. Il est ressorti de nos essais le possible manque de spécificité, déjà décrit dans la littérature, des modèles d'épidermes humains reconstitués (RhE) vis-à-vis de certaines substances, qu'il convient de garder à l'esprit dans le cadre de l'évaluation de l'irritation cutanée *in vitro*. Des investigations complémentaires et une évaluation par l'approche Weight of Evidence peuvent être utiles avant de conclure aux propriétés irritantes d'un item d'essai. En termes de génotoxicité, une différence entre les alcools ressort de la revue bibliographique, avec des propriétés génotoxiques décrites uniquement pour l'éthanol. Dans une certaine mesure, nos essais ont confirmé une différence de profil. L'isopropanol et le n-propanol testés dans une batterie de tests *in vitro* permettant d'appréhender les différents mécanismes génotoxiques (test d'Ames et test du micronoyau (MN) sur cellules humaines p53 compétentes : cellules lymphoblastoïdes TK6 et cellules pulmonaires NCI H292) ont donné des résultats négatifs, y compris lorsqu'ils étaient formulés avec des co-formulants, ou administrés sous forme de vapeurs sur les cellules NCI H292 cultivées en interface air-liquide (IAL). Pour l'éthanol, la réalisation de la même batterie de tests a conduit à des résultats équivoques uniquement dans le test du MN sur cellules TK6 avec l'éthanol seul. Un test du MN supplémentaire sur cellules TK6 en co-culture avec un RhE mimant la barrière cutanée a donné des résultats négatifs. Par ailleurs, aucune exposition systémique significative aux alcools induite par les pratiques d'HDM ne ressort des études publiées chez l'homme, avec des taux indiscernables des valeurs endogènes existantes pour l'éthanol et l'isopropanol. L'ensemble de ces données est en faveur de l'absence de risque génotoxique systémique consécutif à l'utilisation des PHA, et de l'absence de génotoxicité pulmonaire locale liée à l'exposition aux vapeurs d'alcools. En conclusion, en situation d'utilisation des PHA pour l'HDM, aucun risque pour la santé humaine en termes d'irritation cutanée aiguë, de phototoxicité et de génotoxicité ne ressort de ce travail de recherche.

Mots clés : Hygiène des mains, Produits hydro-alcooliques, Alcools, Irritation cutanée, Phototoxicité, Génotoxicité

Study of the cutaneous and respiratory toxicity of alcohols in hand hygiene alcohol-based hand rubs

Abstract

Hand hygiene (HH) is a key factor in preventing healthcare-associated infections. Current practices favor the use of alcohol-based hand rubs (AbHR), generally formulated with ethanol, propan-2-ol and/or propan-1-ol, in the presence of co-formulants for a better skin acceptability. The antimicrobial efficiency within a short time, essential because of the frequent situations of HH practice, is achieved by high levels of alcohols which can exceed 80% w/w. This raises the question of dermal and respiratory toxicity associated with the use of AbHR. The assessment of dermal toxicity based on published data and *in vitro* skin irritation (OECD 439) and phototoxicity tests (OECD 432) conclude to non acute dermal irritation and phototoxicity risk linked to dermal exposure to these alcohols, even in the presence of co-formulants, as provided in the AbHR. We encountered in our trials the possible lack of specificity, already described in the literature, of the reconstructed human epidermis (RhE) models for some substances, which should be kept in mind in the context of the evaluation of skin irritation *in vitro*. Additional investigations and an assessment using the Weight of Evidence approach may be useful before concluding the irritant properties of a test item. In terms of genotoxicity, a difference between the alcohols emerges from the bibliographic review, with genotoxic properties described only for ethanol. To a certain extent, our tests confirmed a difference in profile. Propan-2-ol and propan-1-ol tested in a battery of *in vitro* tests to explore the various genotoxic mechanisms (Ames test and micronucleus test (MN) on p53 competent human cells: lymphoblastoid cells TK6 and pulmonary cells NCI H292) gave negative results, even in the presence of co-formulants, or administered as vapors on air-liquid interface (ALI) NCI H292 cells. For ethanol, the same battery of tests gave equivocal results only in the MN test on TK6 cells with ethanol alone. An additional MN test on TK6 cells co-cultured with a RhE mimicking the existing skin barrier gave negative results. In addition, no significant systemic exposure to alcohols induced by HH practices is apparent from published studies in humans, with indiscernible levels of existing endogenous values for ethanol and isopropanol. All of these data support the absence of an increased systemic genotoxic risk resulting from the use of AbHR and the absence of local pulmonary genotoxicity due to exposure to alcohol vapors. In conclusion, during AbHR use for HH, no risk to human health in terms of acute skin irritation, phototoxicity and genotoxicity is apparent from this research.

Key words: Hand hygiene, Alcohol-based hand rubs, Alcohols, Skin irritation, Phototoxicity, Genotoxicity

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille dirigé par Fabrice NESSLANY, et rattaché au Département de Toxicologie, Santé publique et Environnement EA 4483 de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille.

Mes premiers remerciements vont spontanément à Fabrice NESSLANY, Docteur en toxicologie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et à qui je tiens à exprimer toute ma gratitude pour l'accompagnement et la qualité de l'encadrement assurés durant ces 4 années. Je le remercie de sa confiance spontanément accordée, des nombreux échanges scientifiques et orientations données à ce travail, de sa disponibilité et de son soutien inconditionnel tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie et exprime toute ma reconnaissance à Benoît FOLIGNE, Professeur à l'université de Lille II, pour avoir accepté de diriger ces travaux. Je le remercie de sa confiance, de l'intérêt porté aux travaux réalisés, de sa disponibilité et de ses précieux conseils qui m'ont guidée dans ce travail.

Je remercie tous les membres du jury.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame Armelle BAEZA-SQUIBAN, Professeur à l'Université Paris Diderot et Madame Muriel VAYSSADE, Professeur à l'Université de Technologie de Compiègne, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs, ainsi qu'à Madame Gladys OUÉDRAOGO, Docteur au sein de L'Oréal Research & Innovation, pour sa participation au jury en tant qu'examinateur.

J'adresse l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance à Monsieur Philippe HARTEMANN, Professeur émérite de l'Université de Lorraine. Je le remercie de l'intérêt porté aux travaux et à son accompagnement tout au long de cette thèse.

Egalement, mes plus vifs remerciements vont à Gaétan RAUWEL, Docteur et Directeur du Centre de Recherche des Laboratoires ANIOS. Je le remercie pour le soutien et l'amitié témoignés en toutes occasions, les conseils judicieux pour appréhender les difficultés rencontrées, l'intérêt porté aux travaux et l'accès donné à ses laboratoires pour disposer des meilleures conditions pour la formulation des produits d'essais et la réalisation des contrôles analytiques.

Je tiens également à remercier les Docteurs Anne PLATEL et Christophe CARNOY pour leur contribution à ce travail de par les échanges constructifs durant les comités de suivi de thèse.

Je remercie Messieurs Bertrand et Thierry LETARTRE, dirigeants des Laboratoires ANIOS, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et les moyens accordés pour permettre la bonne réalisation de cette thèse.

Je remercie Monsieur Jacques CRIQUELION, Directeur Scientifique et Marketing des Laboratoires ANIOS, de m'avoir amenée à réaliser cette thèse, de sa confiance et du temps accordé pour me permettre de mener ce travail de recherche en parallèle de mon activité professionnelle.

Ce travail est le fruit de plusieurs collaborations. Un grand merci à

- Monsieur Hervé FICHEUX et Madame Sophie CATOIRE de THOR PERSONNAL CARE pour votre enthousiasme à participer à cette recherche et les discussions enrichissantes sur les résultats obtenus ;
- Messieurs Jean-Marc LO-GUIDICE, Guillaume GARCON et Sébastien ANTHÉRIEU du laboratoire de toxicologie de l'université de Lille II pour avoir permis l'accès au laboratoire de toxicologie de l'université de Lille II pour les essais de génotoxicité respiratoire, et Tobias KREBS de VITROCELL Systems GmbH, pour le prêt du matériel nécessaire à ces essais ;
- Monsieur Mathieu SAUTY, responsable du laboratoire de chimie analytique des Laboratoires ANIOS. Je le remercie de sa contribution significative à la rigueur scientifique de ces travaux, la qualité des échanges et le temps accordé pour partager ses connaissances. Je remercie également Yann RIGAUT pour la réalisation des nombreuses analyses dans des délais parfois très contraignants ;
- Monsieur Jean-Noël BERTHO, responsable du laboratoire de formulation des Laboratoires ANIOS, Monsieur Sébastien TERRIER et Madame Christelle Gosteau pour avoir mis à disposition, un nombre conséquent de produits d'essais, trop souvent demandés sur des délais très courts ;
- Mesdemoiselles Carole MEQUINION, Mathilde GENS, Messieurs Killian PRIVAT, Eric VERCAUTEREN, Doris LAGACHE, Smail TALAHARI ainsi que l'ensemble du laboratoire de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille pour leur contribution aux nombreuses expérimentations réalisées dans le cadre de ce travail de recherche ;
- Madame Coliné PLE du CIIL (Center for Infection & Immunity of Lille) pour sa participation aux expérimentations de réponse inflammatoire et son aide dans l'interprétation des résultats ;
- Madame Gwendoline MORDACQ pour m'avoir fait bénéficier de son expertise dans les méthodologies d'essais utilisées, pour son amitié et son soutien.

Toute ma sympathie va à l'ensemble du personnel de l'Institut Pasteur de Lille. J'ai été sensible à leur accueil, leur convivialité, et ai beaucoup apprécié l'ambiance chaleureuse entretenue dans le laboratoire.

Et pour finir, je suis infiniment reconnaissante envers Pascal. Je le remercie de sa compréhension et sa patience sans lesquelles tout ce parcours n'aurait pas été le même. Un petit mot pour ma famille et mes amis également, qui m'ont trop souvent vu décliner les invitations depuis 4 ans déjà.

SOMMAIRE

RESUME	I
REMERCIEMENTS	II
SOMMAIRE	IV
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	X
I. INTRODUCTION	1
II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
II.1. IDENTITE DES SUBSTANCES ET CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES.....	8
II.2. TOXICOCINÉTIQUE	10
II.2.1. Ethanol.....	10
II.2.1.1. Absorption.....	10
II.2.1.2. Distribution.....	20
II.2.1.3. Métabolisme	20
II.2.1.4. Elimination	22
II.2.1.5. Résumé.....	23
II.2.2. Isopropanol.....	24
II.2.2.1. Absorption.....	24
II.2.2.2. Distribution.....	28
II.2.2.3. Métabolisme	28
II.2.2.4. Elimination	29
II.2.2.5. Résumé.....	31
II.2.3. n-propanol	32
II.2.3.1. Absorption.....	32
II.2.3.2. Distribution.....	34
II.2.3.3. Métabolisme	35
II.2.3.4. Elimination	36
II.2.3.5. Résumé.....	36
II.3. DONNÉES TOXICOLOGIQUES.....	38
II.3.1. Toxicité aiguë.....	38
II.3.1.1. Ethanol	38
II.3.1.2. Isopropanol	40
II.3.1.3. n-propanol.....	42
II.3.1.4. Résumé et comparaison des alcools.....	44
II.3.2. Toxicité chronique/subchronique	45
II.3.2.1. Ethanol	45
II.3.2.1.1. Données chez l'animal	45
a) Toxicité par voie orale	45
b) Toxicité par inhalation.....	46
c) Toxicité par voie dermale	47
II.3.2.1.2. Données chez l'homme	47
II.3.2.2. Isopropanol	48
II.3.2.2.1. Données chez l'animal	48
a) Toxicité par voie orale	48
b) Toxicité par inhalation.....	48
c) Toxicité par voie dermale	49
II.3.2.2.2. Données chez l'homme.....	49
II.3.2.3. n-propanol.....	51

II.3.2.3.1.	Données chez l'animal	51
a)	Toxicité par voie orale	51
b)	Toxicité par inhalation ou par voie dermale	51
II.3.2.3.2.	Données chez l'homme	51
II.3.2.4.	Résumé et comparaison des alcools.....	52
II.3.3.	Toxicité locale	53
II.3.3.1.	Irritation cutanée.....	53
II.3.3.1.1.	Ethanol	53
II.3.3.1.2.	Isopropanol	55
II.3.3.1.3.	n-propanol	56
II.3.3.1.4.	Données chez l'homme issues d'études avec les 3 alcools	58
II.3.3.1.5.	Résumé sur l'irritation cutanée et comparaison des alcools.....	62
II.3.3.2.	Irritation oculaire.....	63
II.3.3.2.1.	Ethanol	63
II.3.3.2.2.	Isopropanol	64
II.3.3.2.3.	n-propanol	66
II.3.3.2.4.	Résumé sur l'irritation oculaire et comparaison des alcools.....	67
II.3.3.3.	Irritation respiratoire.....	68
II.3.3.3.1.	Ethanol	68
II.3.3.3.2.	Isopropanol	68
II.3.3.3.3.	n-propanol	69
II.3.3.3.4.	Résumé sur l'irritation respiratoire et comparaison des alcools.....	69
II.3.3.4.	Sensibilisation cutanée	70
II.3.3.4.1.	Ethanol	70
II.3.3.4.2.	Isopropanol	72
II.3.3.4.3.	n-propanol	73
II.3.3.4.4.	Résumé sur la sensibilisation cutanée et comparaison des alcools	74
II.3.3.5.	Données de tolérance cutanée aux produits hydro-alcooliques chez l'homme.....	75
II.3.4.	Génotoxicité/Mutagenèse.....	77
II.3.4.1.	Ethanol	77
II.3.4.1.1.	Tests <i>in vitro</i>	77
a)	Domages primaires à l'ADN.....	77
b)	Mutations géniques sur bactéries	78
c)	Mutations géniques sur cellules de mammifères	79
d)	Mutations chromosomiques sur cellules de mammifères.....	80
II.3.4.1.2.	Tests <i>in vivo</i>	83
a)	Domages primaires à l'ADN <i>in vivo</i>	83
b)	Mutations chromosomiques <i>in vivo</i>	85
c)	Essais de mutation létale dominante chez le rongeur.....	89
II.3.4.1.3.	Mécanisme d'action	93
II.3.4.1.4.	Discussion sur la génotoxicité/ mutagenèse de l'éthanol	94
II.3.4.2.	Isopropanol	103
II.3.4.2.1.	Tests <i>in vitro</i>	103
a)	Mutations géniques sur bactéries	103
b)	Mutations géniques sur cellules de mammifères	103
c)	Mutations chromosomiques sur cellules de mammifères.....	103
II.3.4.2.2.	Tests de mutations chromosomiques <i>in vivo</i>	104
II.3.4.2.3.	Discussion sur la génotoxicité / mutagenèse de l'isopropanol	104
II.3.4.3.	n-propanol.....	105
II.3.4.3.1.	Tests <i>in vitro</i>	105
a)	Mutations géniques sur bactéries	105
b)	Mutations chromosomiques sur cellules de mammifères.....	105
II.3.4.3.2.	Discussion sur la génotoxicité / mutagenèse du n-propanol	106
II.3.5.	Potentiel cancérigène.....	107

II.3.5.1.	Ethanol	107
II.3.5.1.1.	Données chez l'animal	107
II.3.5.1.2.	Données chez l'homme	107
II.3.5.2.	Isopropanol	109
II.3.5.2.1.	Données chez l'animal	109
II.3.5.2.2.	Données chez l'homme	109
II.3.5.3.	n-propanol.....	110
II.3.5.3.1.	Données chez l'animal	110
II.3.5.3.2.	Données chez l'homme	110
II.3.5.4.	Résumé sur le potentiel cancérogène et comparaison des alcools.....	111
III.	ETUDES EXPERIMENTALES	112
III.1.	MATERIEL ET METHODES.....	112
III.1.1.	Produits à l'essai	112
III.1.1.1.	Matières premières (MP)	112
III.1.1.2.	Compositions.....	113
III.1.1.2.1.	Alcools seuls	113
III.1.1.2.2.	Co-formulants	113
III.1.1.2.3.	Solutions hydro-alcooliques (SHA)	113
III.1.1.3.	Contrôle des concentrations d'alcool.....	114
III.1.1.4.	Impuretés	116
III.1.2.	Test d'irritation cutanée <i>in vitro</i>	117
III.1.2.1.	Considérations générales	117
III.1.2.2.	Aspects méthodologiques	118
III.1.2.2.1.	Epidermes humains reconstitués (RhE).....	118
III.1.2.2.2.	Traitements et doses d'essai	120
III.1.2.2.3.	Contrôles	120
III.1.2.2.4.	Protocole du test d'irritation <i>in vitro</i>	121
a)	Pré-cultures et traitement	121
b)	Test au MTT	122
c)	Expression des résultats et interprétation	123
III.1.2.3.	Résumé de l'approche méthodologique	124
III.1.3.	Test de phototoxicité <i>in vitro</i>	125
III.1.3.1.	Considérations générales	125
III.1.3.2.	Aspects méthodologiques	126
III.1.3.2.1.	Spectre UV/VIS.....	126
III.1.3.2.2.	Essai de phototoxicité <i>in vitro</i> 3T3 NRU (3T3 NRU-PT).....	127
a)	Cellules	127
b)	Traitements et doses d'essai	128
c)	Irradiation	129
d)	Contrôles	130
e)	Protocole du test de phototoxicité.....	130
f)	Expression des résultats et interprétation	132
III.1.3.2.3.	Résumé de l'approche méthodologique	134
III.1.4.	Test d'Ames (test de mutation génique)	135
III.1.4.1.	Considérations générales	135
III.1.4.2.	Aspects méthodologiques	136
III.1.4.2.1.	Souches bactériennes	136
III.1.4.2.2.	Système d'activation métabolique.....	137
III.1.4.2.3.	Traitements et doses d'essai	138
III.1.4.2.4.	Contrôles	138
III.1.4.2.5.	Protocole du test d'Ames.....	139
a)	Ensemencement des bactéries sur gélose et administration des traitements.....	139
b)	Comptage des colonies.....	139

c)	Expression des résultats et interprétation	141
III.1.4.3.	Résumé de l'approche méthodologique	142
III.1.5.	Test du micronoyau <i>in vitro</i> (test de mutations chromosomiques)	143
III.1.5.1.	Considérations générales	143
III.1.5.2.	Aspects méthodologiques	144
III.1.5.2.1.	Lignées cellulaires	144
a)	Cellules TK6	144
b)	Cellules NCI H292	145
III.1.5.2.2.	Système d'activation métabolique.....	147
III.1.5.2.3.	Traitements et doses d'essai	147
a)	Traitement en immersion.....	147
b)	Traitement indirect par application topique sur épidermes humains reconstitués	149
c)	Traitement par vapeurs	151
III.1.5.2.4.	Contrôles	157
III.1.5.2.5.	Protocole du test du micronoyau.....	158
a)	Période de recouvrement.....	158
b)	Cytotoxicité et récolte	159
c)	Choc hypotonique et fixation	160
d)	Coloration	160
e)	Lecture.....	161
f)	Expression des résultats et interprétation	163
III.1.5.3.	Résumé de l'approche méthodologique	164
III.1.6.	Test des comètes <i>in vitro</i>	165
III.1.6.1.	Considérations générales	165
III.1.6.2.	Aspects méthodologiques	167
III.1.6.2.1.	Lignées cellulaires	167
III.1.6.2.2.	Système d'activation métabolique.....	167
III.1.6.2.3.	Traitements et doses d'essai	167
III.1.6.2.4.	Contrôles	168
III.1.6.2.5.	Détermination de la cytotoxicité.....	168
III.1.6.2.6.	Protocole du test des comètes.....	168
a)	Préparation des lames de microscopie.....	168
b)	Incorporation des cellules	169
c)	Lyse des membranes cellulaires et nucléaires.....	169
d)	Dénaturation de l'ADN et électrophorèse	169
e)	Neutralisation et déshydratation	170
f)	Coloration et analyse des lames	170
g)	Expression des résultats et interprétation	171
III.1.6.3.	Résumé de l'approche méthodologique	172
III.2.	RÉSULTATS	173
III.2.1.	Tolérance cutanée	173
III.2.1.1.	Irritation cutanée.....	174
III.2.1.1.1.	Alcools seuls	175
III.2.1.1.2.	Conclusion sur les essais d'irritation avec les alcools seuls	181
III.2.1.1.3.	Solutions hydro-alcooliques (SHA) et mélange de co-formulants (CoF ₁₀).....	183
a)	Mélange CoF ₁₀	183
b)	SHA ou solutions hydro-alcooliques	184
III.2.1.1.4.	Conclusion sur les solutions hydro-alcooliques.....	187
III.2.1.2.	Phototoxicité	188
III.2.1.2.1.	Spectres UV/VIS	188
III.2.1.2.2.	Test <i>in vitro</i> 3T3 NRU-PT	190
a)	Co-formulants seuls.....	191
b)	Mélange de co-formulants	193
c)	Produits hydro-alcooliques.....	198

III.2.2. Génotoxicité	201
III.2.2.1. Test d'Ames	202
III.2.2.1.1. Alcools seuls	203
a) Ethanol	203
b) Isopropanol	204
c) n-propanol.....	206
d) Conclusion sur les alcools seuls	207
III.2.2.1.2. Solutions hydro-alcooliques (SHA) et mélange de co-formulants (CoF ₁₀).....	208
a) Mélange CoF ₁₀	208
b) Solutions hydro-alcooliques (SHA)	210
c) Conclusion sur les SHA	214
III.2.2.2. Test du micronoyau	215
III.2.2.2.1. Alcools seuls	218
a) Ethanol	218
b) Isopropanol	228
c) n-propanol.....	231
d) Conclusion sur les alcools seuls	236
III.2.2.2.2. Solutions hydro-alcooliques (SHA) et mélange de co-formulants (CoF ₁₀).....	237
a) Mélange CoF ₁₀	237
b) Solutions hydro-alcooliques (SHA)	239
c) Conclusion sur les solutions hydro-alcooliques	243
III.2.2.3. Test des comètes.....	244
III.2.2.3.1. Alcools seuls sur cellules TK6	246
III.2.2.3.2. Vapeurs d'alcools sur cellules H292 cultivées en interface air-liquide (IAL)	247
a) Ethanol	247
b) Isopropanol	248
c) n-propanol.....	250
III.2.2.3.3. Conclusion sur le test des comètes	250
IV. DISCUSSION	252
LISTE DES TABLEAUX	280
LISTE DES FIGURES	283
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	285
ANNEXES.....	301
ANNEXE 1 : ETUDES EVALUANT L'EXPOSITION AUX ALCOOLS LIEE A L'UTILISATION DES PRODUITS HYDRO-ALCOOLIQUES PAR LES PROFESSIONNELS DE SANTE	302
1. ETHANOL	302
1.1. Evaluation des niveaux d'exposition des voies respiratoires lors de l'utilisation des produits hydro-alcooliques.....	302
1.2. Evaluation des niveaux d'exposition systémiques à l'éthanol consécutifs à l'utilisation des produits hydro-alcooliques.....	306
1.3. Evaluation de la part d'absorption cutanée <i>versus</i> la part d'absorption par les voies respiratoires.....	311
2. ISOPROPANOL	313
3. N-PROPANOL	317
ANNEXE 2 – PROTOCOLE D'UTILISATION DE L'EQUIPEMENT VITROCELL®	321
ANNEXE 3 – PUBLICATION RELATIVE A L'EVALUATION DE LA TOLERANCE CUTANEE	323
ANNEXE 4 - IDENTIFICATION DES IMPURETES PRESENTES DANS LE N-PROPANOL.....	351
ANNEXE 5 – EVALUATION DE LA REACTION INFLAMMATOIRE	352
1. Principe et objectifs des essais mis en œuvre	352
1.1. qPCR en temps réel	352
1.2. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	353

2.	Matériel et méthodes.....	354
2.1.	Médiateurs étudiés	354
2.2.	Préparation des échantillons.....	357
2.3.	qPCR en temps réel	357
2.4.	Protocole ELISA Sandwich	360
3.	Résultats	361
3.1.	Résultats des marqueurs transcriptionnels.....	361
3.2.	Résultats des marqueurs protéiques.....	363
4.	Conclusion	365

Liste des principales abréviations

AC :	Aberrations chromosomiques
ADH :	Alcool-déshydrogénase
AFSSAPS :	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ALDH :	Aldéhyde-déshydrogénase
Cl₅₀ :	Concentration inhibitrice de 50%
CIRC :	Centre international de recherche sur le cancer
CoF :	Co-formulants
COLIPA :	Comité de liaison des associations européennes de l'industrie de la parfumerie, des produits cosmétiques et de la toilette
CPA :	Cyclophosphamide
CP :	Chromatographie en phase gazeuse
CPZ :	Chlorpromazine
DCI :	Dermatite de contact irritative
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
DO :	Densité(s) optique(s)
DRF :	Dose range finding
ECDC :	European Centre for Disease Prevention and Control
ECETOC :	European Centre For Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ECVAM :	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EFSA :	European Food Safety Authority
EG :	Ethylglucuronide
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FGE :	Facteur global d'évaluation
FHA :	Friction hydro-alcoolique
FPG :	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
GHS :	Globally harmonised system (système général harmonisé)
HBSS :	Hanks balanced salt solution
HDM :	Hygiène des mains
IAL :	Interface air-liquide
IARC :	International agency for research on cancer
IAS :	Infections associées aux soins
ICH :	International Conference on Harmonisation
INRS :	Institut national de recherche et de sécurité
IPL :	Institut Pasteur de Lille
Irr- :	Sans irradiation
Irr+ :	Avec irradiation
ISO :	International Organization for Standardization / Organisation internationale de normalisation
LMPA :	Low melt point agarose
LOAEL :	Low observed adverse effect level / dose entraînant de faibles effets indésirables
MEM :	Modified eagle's medium
MMS :	Méthyl méthanesulfonate
MN :	Micronoyau(x)
MP :	Matière(s) première(s)
MPE :	Mean photo-effect / photo-effet moyen
MTT :	1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide (colorant)
NA :	Normal agarose
NAD :	Nicotinamide adénine dinucléotide

NADP :	Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate
NOAEL :	No observed adverse effect level / dose sans effet indésirable observé
NR :	Neutral red (rouge neutre : 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine hydrochloride)
NRU :	Neutral red uptake
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
OECD :	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OTM :	Olive tail moment (produit de la quantité d'ADN dans la queue par la longueur de la queue)
p/p :	Poids/poids
p/v :	Poids/volume
Pa :	Pascal
PBPK :	Physiologically based pharmacokinetic model / modèle pharmacocinétique à base physiologique
PBS :	Phosphate buffer saline / tampon phosphate salin
PHA :	Produits hydro-alcooliques
PID :	Photo-ionisation detector / détecteur par photo-ionisation
PIF :	Photo-irritation factor / facteur de photo-irritation
REACH :	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals / enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques
RhE :	Reconstructed human epidermis / épidermes humains reconstitués
RPD :	Relative population doubling / doublement relatif de la population
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute medium (milieu de culture)
SC :	<i>Stratum corneum</i>
SCCS :	Scientific Committee on Consumer Safety
SDS :	Sodium dodecyl sulfate / dodécylsulfate de sodium
SHA :	Solution(s) hydro-alcoolique(s)
SVF :	Sérum de veau fœtal
TC :	Traitement court
TEWL :	Transepidermal water loss / perte insensible en eau
TI :	Tail intensity (pourcentage d'ADN dans la queue)
TL :	Traitement long
TN :	Témoin négatif
TP :	Témoin positif
v/v :	Volume/volume
VICH :	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Approval of Veterinary Medicinal Products
VLCT :	Valeur limite court terme
VLEP :	Valeur limite d'exposition professionnelle
VME :	Valeur moyenne d'exposition

I. Introduction

Les infections associées aux soins (IAS) touchent des centaines de millions de patients dans le monde chaque année, avec des conséquences non négligeables à la fois sur le plan de la santé humaine (engagement du pronostic vital, possibilité d'invalidités à long terme) et sur le plan socio-économique (allongement de la durée de séjour en établissement de soins, coûts importants pour les systèmes de santé mais aussi pour les patients et leurs familles) (WHO 2009). En 2010, en Europe, la moyenne des prévalences des IAS en court séjour, sur la base d'une analyse des études publiées conduite par l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), s'établit à environ 7 %. Sur cette base et selon cette même analyse, 4 millions de patients seraient atteints par des infections nosocomiales chaque année. Celles-ci seraient à l'origine de 37 000 décès (Suetens, 2011). Toujours en Europe, des données plus récentes de 2014 concluent à une prévalence de 8% pour les IAS acquises en unité de soins intensifs (ECDC 2016).

Dans ses recommandations pour l'hygiène des mains (HDM) au cours des soins, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) rappelle que l'HDM est la première mesure de prévention du risque infectieux associé aux soins. Elle contribue à la prévention du risque de transmission microbienne aux patients, au personnel soignant et dans l'environnement de soins. La non-observance à l'HDM est considérée comme la cause majeure de survenue des IAS et de propagation de micro-organismes multi-résistants ; elle est également reconnue comme un facteur significatif au développement de foyers épidémiques (WHO 2009).

Au cours des dernières décennies, les pratiques d'HDM ont considérablement évolué avec la mise à disposition sur le marché de produits hydro-alcooliques (PHA) destinés à la désinfection des mains par friction. Les PHA présentent une efficacité microbiologique au moins aussi bonne que les savons antiseptiques, pour une durée d'utilisation nettement inférieure (gain de temps d'un facteur 5) et sont plus faciles de mise en œuvre car ils ne nécessitent pas de point d'eau. Il en résulte une meilleure observance des règles d'HDM, point primordial pour une efficacité du dispositif de prévention mis en place.

L'HDM est reprise dans la politique française de prévention du risque sanitaire, avec, en deuxième indicateur du tableau de bord de suivi du programme de lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de santé, le volume de PHA consommés. Ceci est à relier aux nombreuses situations où la friction hydro-alcoolique (FHA) des mains ressort comme méthode de choix pour la désinfection des mains, pour autant que les mains ne soient pas visiblement souillées. Ces situations, rappelées par l'OMS, sont

- avant et après avoir touché un patient, y compris lors du passage d'un site corporel contaminé à un autre site au cours de soins à un même patient,
- avant un geste aseptique,
- après un risque d'exposition à un liquide biologique,
- après avoir touché l'environnement d'un patient,
- après avoir retiré des gants stériles ou non stériles.

Outre la dimension socio-économique d'accessibilité en termes de coût, l'efficacité du programme d'HDM va être la résultante d'une bonne observance des pratiques, conditionnée à l'utilisation de produits efficaces et bien acceptés, tant du point de vue de la tolérance que de la durée de mise en œuvre nécessaire à l'efficacité recherchée.

En termes de tolérance, même si de nombreux rapports confirment que les PHA sont bien tolérés en raison notamment de l'incorporation d'agents hydratants dans leurs formules, des réactions cutanées sur les mains des soignants peuvent se produire en relation avec la pratique quotidienne et répétée dans une même journée des FHA (pouvant dépasser les 100 FHA par jour dans certains services tels qu'en réanimation). Ces réactions cutanées sont le plus fréquemment des dermatites de contact irritatives (DCI) mais aussi parfois des réactions plus préoccupantes telles que les dermatites de contact de type allergique ([WHO 2009](#)).

Au-delà des bonnes pratiques d'usage pour une meilleure tolérance cutanée, celle-ci sera inéluctablement dépendante de la composition chimique du PHA utilisé.

En termes d'efficacité, sur le plan européen, les preuves d'efficacité s'appuient sur le système normatif en place relatif aux antiseptiques et désinfectants chimiques. Pour l'hygiène des mains par FHA, on recherchera systématiquement une activité bactéricide (essais *in vitro* (EN 13727) et *in vivo* sur volontaires sains (EN 1500 et éventuellement EN 12791)), levuricide (essai *in vitro* EN 13624) et virucide (essai *in vitro* EN 14476).

Les principaux PHA disponibles sur le marché et présentant une activité antimicrobienne optimale sont majoritairement formulés à partir de concentrations élevées d'éthanol et/ou isopropanol (de l'ordre de 60 à plus de 80 % v/v) en association possible à d'autres actifs antimicrobiens tels que le phénoxy-éthanol, la chlorhexidine, le chlorure de benzalkonium, le biphenyl-2-ol ou le peroxyde d'hydrogène. On rencontre également le n-propanol seul ou en association à l'éthanol ou l'isopropanol. Ces formulations permettent d'accéder, grâce aux propriétés de dénaturation rapide des protéines par les alcools, à une efficacité antimicrobienne sur une durée n'excédant généralement pas les 30 secondes. Cette durée est un facteur clef pour l'observance des pratiques d'HDM, le temps nécessaire à l'utilisation des PHA devant rester compatible avec les nombreuses tâches quotidiennes mises en œuvre pour la prise en charge des patients.

Comme cela a pu être précisé précédemment, qu'il s'agisse de tolérance ou d'efficacité, la composition chimique du PHA est déterminante.

La réglementation européenne applicable à ces produits (règlement biocide CE 528/2012, [EU. 2012](#)) impose, pour leur formulation, l'utilisation de substances actives biocides évaluées au niveau européen pour confirmer leur bénéfice dans ce type d'application, et depuis le 1^{er} septembre 2013, le recours à des co-formulants autorisés dans les produits cosmétiques au titre du règlement cosmétique (CE) 1223/2009 ([EU. 2009](#)). Ces produits seront prochainement soumis à une procédure d'autorisation de mise sur le marché selon la même

approche que pour les médicaments, à savoir un rapport bénéfice / risque acceptable pour que le produit soit autorisé. Dans l'intervalle, en France comme dans certains autres pays de la communauté européenne, la mise sur le marché de ces produits relève de la seule responsabilité de l'industriel pour ce qui est du dossier d'efficacité et de sécurité d'emploi, pour autant que les pré-requis qualitatifs de composition chimique soient respectés.

Les Laboratoires ANIOS disposent de différents PHA dans leur gamme de produits d'HDM. La démarche engagée pour la conception de ces produits s'appuie sur un cahier des charges alliant à la fois les pré-requis d'efficacité, de sécurité pour la santé des utilisateurs et d'acceptabilité cosmétique et sensorielle (douceur, absence d'effet collant sur la peau, absence d'effet déshydratant).

La sécurité pour la santé des utilisateurs est appréhendée par un choix raisonné des ingrédients au regard de leurs profils toxicologiques décrits dans la littérature, et l'ajustement de leurs teneurs pour disposer des effets recherchés avec les quantités minimales nécessaires à ces activités. Ceci s'applique également aux substances biocides, et la teneur en alcool en tant qu'actif antimicrobien est ajustée à son minimum pour disposer d'une activité antimicrobienne en 30 secondes sans exposer inutilement l'utilisateur à des concentrations d'alcool en excès. C'est pour cette raison qu'un produit tel que l'ANIOSGEL 85 NPC est formulé avec 75,5% v/v (70 % p/p) d'éthanol alors que d'autres produits présents sur le marché présentent des teneurs en alcool supérieures.

La compatibilité cutanée et l'absence de potentiel sensibilisant du produit sont confirmés par la réalisation d'études cliniques tels que le patch test et l'étude du potentiel de sensibilisation par patchs répétés sur volontaires sains. Concernant les effets liés au possible passage transcutané ou par les voies respiratoires, ceux-ci ne sont pas évalués de façon systématique. Même si l'exposition par inhalation est réelle en raison des propriétés volatiles des alcools et telle que mise en évidence dans plusieurs études, toutes concluent à un faible passage systémique des alcools avec des taux sanguins nuls ou très faibles et asymptomatiques ([AFSSET 2010](#), [Ahmed-Lecheheb et al. 2012](#), [Below et al. 2012](#), [Brown et al. 2007](#), [Dumas-Campagna et al. 2014b](#), [Hautemanière et al. 2013a](#), [Huynh-Delerme et al. 2012](#), [Kinnula et al. 2009](#), [Kramer et al. 2007](#), [Miller et al. 2006](#), [Turner et al. 2004](#)).

L'évolution récente du système normatif d'évaluation de l'efficacité virucide (EN 14476 - septembre 2013) a introduit des exigences méthodologiques supplémentaires ayant pour conséquence, pour une formulation inchangée, l'augmentation du temps de contact nécessaire pour la même revendication virucide. Cette activité est essentielle notamment dans les services de pédiatrie et gériatrie concernés par les infections respiratoires virales mais aussi de façon plus générale compte tenu de l'émergence d'épisodes épidémiques de diarrhées à norovirus ou rotavirus.

De cette situation découle la nécessité de proposer de nouvelles formulations, avec, en première solution rapide de mise en œuvre, la mise à disposition de formulations plus concentrées en alcool.

Cependant, considérant la fréquence d'emploi quotidienne élevée des PHA et leur utilisation croissante prévisible, et donc l'exposition accrue du personnel soignant, l'acquisition de données de toxicité cutanée et respiratoire est souhaitable à des fins d'évaluation des risques. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans cette démarche.

Dans un premier temps, une revue bibliographique a été réalisée sur les 3 alcools usuellement rencontrés dans les PHA : l'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol. La revue a également porté sur les alcools formulés en présence de co-formulants, tels qu'utilisés pour l'HDM.

Dans un second temps, des études expérimentales ont été menées. Ces études ont visé à mettre en évidence une éventuelle différence de danger selon la nature de l'alcool présent dans les produits. Un possible effet de concentrations croissantes en alcools a également été étudié, en relation avec l'utilisation de quantités accrues d'alcool dans ces produits en vue d'une efficacité anti-microbienne optimale recherchée sur une durée d'action la plus courte possible.

En relation avec l'organe primo-exposé lors de l'utilisation de ces produits, une partie des travaux a ciblé la toxicité cutanée.

En Europe comme aux États-Unis, les professionnels de santé sont parmi les populations présentant un niveau de risque élevé de développement de réactions cutanées de type DCI (English 2004, Halioua *et al.* 2012). Ces effets indésirables constituent un facteur de dissuasion du respect des protocoles d'HDM. Il s'agit d'une situation préoccupante, la non observance à l'HDM étant considérée comme la cause majeure de survenue des infections associées aux soins et de propagation de micro-organismes multi-résistants (Gould 2003, Larson *et al.* 2006, WHO 2009). Dans ce contexte, une bonne tolérance cutanée des PHA utilisés est primordiale. Les réactions cutanées décrites sont le plus fréquemment des DCI, qui comptent pour près de 80% des dermatites de contact (Al-Otaibi et Alqahtani 2015). Il s'agit d'une atteinte de la peau causée par diverses substances qui irritent la peau par altération de la barrière cutanée avec dommages au niveau des kératinocytes et libération de médiateurs de l'inflammation (Mathias & Maibach 1978, Berardesca & Distanto 1994). L'autre forme plus préoccupante est la dermatite de contact allergique. Dans certains cas, il peut s'agir d'un phénomène de photo-irritation, c'est-à-dire d'une irritation provoquée suite à une exposition de la peau aux UV, en relation avec une modification des substances chimiques à l'intérieur de la peau sous l'action des rayons UV (Gonzalez & Gonzalez 1996, Deleo 2004). On observe alors localement une atteinte cellulaire plus ou moins forte, avec possibilité d'irritation ou réaction allergique. Les signes cliniques de la photo-irritation sont les mêmes que ceux de l'irritation : érythème, œdème et desquamation (Gould *et al.* 1995), avec une localisation généralement limitée aux zones exposées à la lumière (Epstein, 1983). Les réactions cutanées aux produits chimiques peuvent être évitées par l'adoption de mesures préventives simples telles que le port de gants de protection à défaut de l'arrêt ou réduction du nombre de situations d'expositions aux agents irritants en cause. Cependant,

ceci n'est pas applicable pour les produits d'HDM, dont l'efficacité repose sur leur application topique. Pour ces produits, à des fins de bonne tolérance cutanée, une première approche systématique consiste au choix des ingrédients au regard de leurs profils toxicologiques décrits dans la littérature, et l'ajustement de leurs teneurs pour disposer des effets recherchés avec les quantités minimales nécessaires à ces activités. Pour disposer de données objectives et à des fins de comparaison, nous avons complété cette approche avec la réalisation d'essais d'irritation et de phototoxicité. Les protocoles mis en œuvre ont suivi les lignes directrices de l'OCDE développées dans le cadre de la réglementation cosmétique (publication du 7^{ème} amendement (EU 2003) de la directive cosmétique (maintenant remplacée par le règlement 1223/2009, EU 2009)), ayant introduit progressivement l'interdiction d'expérimentation animale :

- Essai n° 439 : Irritation cutanée *in vitro*: essai sur épiderme humain reconstitué
- Essai n° 432: Essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU

Comme déjà évoqué, dans les PHA, des co-formulants sont ajoutés aux alcools pour disposer de produits présentant un niveau élevé d'acceptabilité cosmétique et sensoriel, en vue d'une observance maximale. En conséquence, les essais ont été menés à la fois avec les alcools seuls et avec des solutions hydro-alcooliques (SHA) (alcools formulés en présence de co-formulants). Les co-formulants utilisés sont ceux typiquement rencontrés dans les PHA : association d'agents hydratant, émollient et protecteur (Boyce & Pittet 2002, Yamamoto *et al.* 2010).

Les concentrations en alcool étaient comprises entre 60 et 85 ou 90 % p/p, afin d'encadrer les concentrations usuellement utilisées. Dans un contexte d'évaluation toxicologique, la teneur en co-formulants a été ajustée et portée à son maximum dans la limite des contraintes méthodologiques d'essai. Un mélange de co-formulants sans alcool à iso-concentration des produits d'essai a également été testé à des fins de contrôle et interprétation des résultats.

Le deuxième volet expérimental mis en œuvre a porté sur la caractérisation du danger génotoxique, dont les conséquences en termes de risque pour la santé justifient son étude. Non perceptibles de prime abord, des mutations dans les cellules somatiques peuvent avoir pour conséquence le vieillissement cellulaire, le développement de cancers ou être à l'origine de maladies cardio-vasculaires. Les conséquences de mutations dans les cellules germinales peuvent quant à elles être à l'origine d'infertilité, de mortalité péri-post natale et de maladies héréditaires.

La génotoxicité renvoie à différents mécanismes d'altération du génome, telles que les mutations géniques, les aberrations chromosomiques de nombre ou de structure, ou encore les lésions primaires de l'ADN. Puisqu'il n'existe pas de méthode expérimentale unique capable d'appréhender ces différents mécanismes, l'étude de la génotoxicité s'appuie sur la

réalisation d'une batterie de tests complémentaires. Plusieurs méthodologies expérimentales *in vitro* sont aujourd'hui usuellement mises en œuvre et acceptées par les autorités compétentes pour l'évaluation du potentiel génotoxique de produits d'essai (tableau 1). Ces méthodologies permettent une stratégie d'essais par étapes, avec une réduction, voire une absence d'utilisation d'expérimentation animale.

Tableau 1 : Essais de génotoxicité *in vitro* en fonction du système d'essai et du mécanisme étudié

Mécanisme étudié / Système d'essai	Lésions primaires de l'ADN	Mutation génique	Mutation chromosomique
Procaryotes	--	Test d'Ames (OCDE 471) (OECD 1997)	--
Eucaryotes	Test des comètes <i>in vitro</i>	Essais <i>in vitro</i> de mutation génique sur cellules de mammifères - utilisant les gènes Hprt et Xprt (OCDE 476) (OECD 2016e) - utilisant le gène de la Thymidine Kinase (OCDE 490) (OECD 2016i)	Essai d'aberration chromosomique <i>in vitro</i> chez les mammifères (OCDE 473) (OECD 2016b) Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules de mammifères (OCDE 487) (OECD 2016g)

Parmi ces essais, le test d'Ames et le test du micronoyau se retrouvent dans les batteries d'essai préconisées pour l'évaluation de la génotoxicité de nombreuses catégories de substances : médicaments humains (ICH S2 (R1) – ICH 2012), résidus de médicaments vétérinaires (VICH GL23(R) (VICH 2002)), dispositifs médicaux (ISO 10993-3 déc 2014, (ISO/TC 194 2014), ingrédients cosmétiques (SCCS 2016), substances chimiques (REACH, Annexe IX & X, EC. 2006), substances phyto-pharmaceutiques (EU. 2013), substances biocides (EU. 2012), alimentation humaine et animale (EFSA 2011).

Ces deux tests ont donc été réalisés en première intention pour l'ensemble des produits d'essai. Le test des comètes a quant à lui été réalisé en seconde intention avec certains produits d'essai, pour compléter les premiers résultats obtenus ainsi que les données bibliographiques disponibles.

Deux types cellulaires ont été utilisés. Le premier est une lignée lymphoblastoïde, en relation avec une exposition systémique indirecte aux produits d'essai suite au possible passage transcutané ou *via* les voies respiratoires. Le second est une lignée pulmonaire, les poumons constituant le deuxième organe primo-exposé après la peau lors de l'utilisation des PHA, du fait des propriétés volatiles des alcools. Les essais menés sur la lignée pulmonaire se sont limités aux alcools seuls, les voies respiratoires étant exposées aux seuls composés volatils. Sinon, comme pour la tolérance cutanée, à des fins de représentativité des produits réellement utilisés, plusieurs de ces essais ont été menés à la fois avec les alcools seuls et en présence de co-formulants.

L'étude de la réaction inflammatoire a également été initiée sur la lignée cellulaire pulmonaire. Les études réalisées étant insuffisantes pour effectuer une évaluation, les travaux réalisés sur ce volet ne sont pas repris dans le corps de ce rapport mais font l'objet d'une annexe spécifique à titre d'information.

II. Revue bibliographique

Les substances chimiques étudiées dans ce travail de recherche sont les 3 alcools usuellement rencontrés dans les produits hydro-alcooliques pour le traitement hygiénique ou la désinfection chirurgicale des mains. Il s'agit de 3 alcools à chaîne courte : l'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol.

Pour chaque alcool, un résumé des caractéristiques physicochimiques est présenté. La revue bibliographique a été axée sur les données de toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme et élimination) ainsi que sur les aspects toxicologiques suivants :

- toxicité aiguë,
- toxicité chronique/subchronique
- toxicité locale
- génotoxicité/mutagenèse
- cancérogenèse.

La recherche a également ciblé les alcools en présence de co-formulants, auxquels sont réellement exposés les utilisateurs.

La toxicité pour la reproduction n'a pas été incluse dans cette revue. Bien que cet aspect constitue un volet important de la toxicologie des alcools, en particulier pour l'éthanol, il a été jugé comme étant en dehors du champ d'étude.

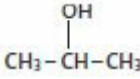
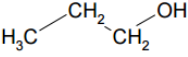



En relation avec le projet de recherche, la revue bibliographique a été plus approfondie pour l'absorption par les voies cutanées et respiratoires, la toxicité locale en termes d'irritation et sensibilisation cutanées et la génotoxicité.

II.1. Identité des substances et caractéristiques physicochimiques

L'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol sont tous trois des liquides mobiles, incolores, volatils et miscibles dans l'eau. L'éthanol est d'odeur plutôt agréable, décelable dès 84 ppm. L'odeur de l'isopropanol rappelle celle de l'éthanol mais avec une nuance acre déplaisante. Son seuil olfactif se situe entre 22 et 200 ppm. Le n-propanol a une odeur proche de celle de l'éthanol, avec un seuil olfactif plus bas compris entre 0,03 et 40 ppm. (INRS 2016a, 2016b, 2016c)

Le tableau 2 présente l'identification des substances (dénominations chimiques, N° CAS, formule chimique, masse molaire), ainsi que leur classification harmonisée selon le règlement CE 1272/2008 (EU. 2008).

Tableau 2 : Dénominations chimiques, N° CAS, formule chimique, masse molaire et classification harmonisée de l'éthanol, isopropanol et n-propanol

		Ethanol	Isopropanol	n-propanol
Dénominations chimiques		Alcool éthylique, Ethanol	Propan-2-ol, Isopropanol, Alcool isopropylique, 2- Propanol, Dimethylcarbinol, Propanol-2, Sec-propyl-alcohol	Propan-1-ol, n-propanol, Alcool n-propylique, Alcool propylique normal
N°CAS¹		64-17-5	67-63-0	71-23-8
Formule chimique		C_2H_6O $CH_3 - CH_2 - OH$	C_3H_8O 	C_3H_8O 
Masse molaire		46,1 g/mol	60,1 g/mol	60,1 g/mol
Classification selon le règlement CE n° 1272/2008	Pictogrammes²	 (GHS 02)	 (GHS02) (GHS07)	 (GHS02) (GHS07) (GHS05)
	Mention d'avertissement	Danger	Danger	Danger
	Mentions de danger	H225 Liquide et vapeurs très inflammables	H225 Liquide et vapeurs très inflammables. H319 Provoque une sévère irritation des yeux. H336 Peut provoquer somnolence ou vertiges.	H225 Liquide et vapeurs très inflammables. H318 Provoque des lésions oculaires graves H336 Peut provoquer somnolence ou vertiges

¹ N° CAS : numéro d'identification chimique ² GHS : globally harmonised system

Les données disponibles pour l'éthanol sur le site de l'ECHA dans le cadre des dossiers d'enregistrement au titre du règlement REACH (EC. 2006) indiquent également une classification irritante pour les yeux pour des teneurs supérieures ou égales à 50% :



Pictogramme : (GHS 07)

Mention d'avertissement : Danger

Mentions de danger : H319 Provoque une sévère irritation des yeux

Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces 3 alcools sont présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Principales caractéristiques physicochimiques de l'éthanol, isopropanol et n-propanol

	Ethanol	Isopropanol	n-propanol
Point de fusion	- 114 °C	-90 à -88 °C	-126,5°C
Point d'ébullition	78 - 78,5 °C	82 - 83 °C	97,1 °C
Point d'éclair (coupelle fermée)	13 °C	11,7 à 13°C	15°C
Coefficient de partage octanol/eau (Log Pow)	- 0,31	0,05	0,25 à 0,34
Densité de vapeur (air=1)	1,59	2,11	2,1
Densité	0,789	0,785	0,803
Pression de vapeur à 20°C	5,9 kPa	4,2 kPa	1,94 kPa

En France, les 3 alcools sont repris au tableau 84 des maladies professionnelles (affections provoquées par les solvants organiques liquides à usage professionnel) et disposent de valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP - concentrations atmosphériques à ne pas dépasser dans l'air de la zone de respiration des travailleurs, dans un périmètre de temps donné). Ces valeurs sont déterminées à l'échelle nationale et peuvent donc varier d'un pays à l'autre.

Sur 8 pays consultés (Allemagne, Belgique, France, Espagne, Pologne, République Tchèque, Slovaquie, Suisse),

- pour l'éthanol, les VLCT¹ varient de 1000 à 5000 ppm (1900 à 9500 mg/m³), tandis que les VME² s'étendent de 500 à 1000 ppm (950 à 1900 mg/m³)
- pour l'isopropanol, les valeurs sont plus basses, avec des VLCT variant de 400 à 500 ppm (1000 à 1250 mg/m³) et des VME variant de 200 à 400 ppm (500 à 1000 mg/m³)
- pour le n-propanol, les valeurs sont encore un peu plus basses avec des VLCT variant de 250 à 400 ppm (600 à 1000 mg/m³), et des VME variant de 100 à 200 ppm (250 à 500 mg/m³).

Les valeurs en France (INRS 2016d) pour les 3 alcools sont reprises dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4 : Valeurs limites d'exposition professionnelle de l'éthanol, isopropanol et n-propanol en France

	Ethanol	Isopropanol	n-propanol
VLCT	5000 ppm (9500 mg/m ³)	400 ppm (980 mg/m ³)	--
VME	1000 ppm (1900 mg/m ³)	--	200 ppm (500 mg/m ³)

VLCT : valeur limite court terme ; VME : valeur moyenne d'exposition

¹ valeur limite court terme : valeur à ne pas dépasser, destinée à prévenir le risque d'effets toxiques immédiats ou à court terme dus à des pics d'exposition (sauf allergies)

² valeur moyenne d'exposition : valeur limite sur la durée d'un poste de travail (généralement de 8 heures) destinée à protéger les travailleurs des effets à moyen ou à long terme de l'agent chimique considéré (sauf allergies et cancers), valeur pouvant être dépassée sur de courtes périodes à condition de ne pas dépasser la VLCT

II.2. Toxicocinétique

II.2.1. Ethanol

II.2.1.1. Absorption

Après ingestion, l'éthanol est rapidement absorbé.

Le tube digestif absorbe plus de 90 % de la dose consommée. Après une ingestion unique, l'alcoolémie est maximale après 1 heure si l'alcool a été ingéré sans nourriture, après 2 heures sinon ; la vitesse d'absorption varie aussi en fonction des individus, de la vitesse d'ingestion et de la concentration de la solution ingérée : elle est maximale pour les concentrations comprises entre 10 et 30 % (INRS 2016a).

L'éthanol est également absorbé par inhalation.

Le comportement de l'éthanol dans les voies respiratoires suit le modèle classique des gaz solubles dans l'eau : il se dissout dans le mucus présent au niveau des voies respiratoires supérieures puis diffuse selon le gradient de concentration du système bronchique vers les cellules épithéliales et le système sanguin lors de l'inspiration, et inversement lors de l'expiration (Dutch Expert Committee on Occupational Standards 2006, AFSSET 2010).

Selon les données disponibles dans la littérature, le taux d'absorption pulmonaire chez l'homme est relativement important et peut atteindre 80 %.

Chez des volontaires exposés à des teneurs atmosphériques relativement élevés de 5 800 à 10 000 ppm, le taux de rétention pulmonaire était de l'ordre de 60 %, indépendamment de la concentration et de la vitesse de ventilation (Lester & Greenberg 1951).

Chez des volontaires exposés à 25, 100 et 1 000 ppm, l'absorption était de 70 à 80 % (Tardif, 2004).

Une étude de Nadeau *et al.* (2003) menée sur cinq hommes exposés pendant 6 heures à 1000 ppm d'éthanol a conclu à un taux d'absorption pulmonaire voisin de 75 %.

L'impact de l'exposition à l'éthanol par les voies respiratoires sur l'éthanolémie a également été étudié. Chez l'animal, contrairement à l'ingestion, l'inhalation n'entraîne pas d'augmentation significative de la concentration d'éthanol dans le sang.

Chez le rat, une exposition pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine durant 13 semaines, à 1000 et 3000 ppm d'éthanol (soit 1 900 à 5 700 mg/m³) a conduit à une concentration sanguine d'éthanol comprise entre 1,8 et 18 mg/L (Scarino *et al.* 2009). A titre de comparaison, l'administration par gavage de 1 g/kg d'éthanol à un rat donne une concentration sanguine maximale de 460 mg/L.

Des données sont également disponibles chez l'homme (tableau 5). Les études sont en faveur d'un faible niveau d'exposition systémique suite à l'exposition par inhalation, avec des éthanolémies non détectées, ou du même ordre de grandeur que celles naturellement retrouvées dans l'organisme. Une étude réalisée sur 1557 personnes abstinentes ne

consommant pas d'alcool, a rapporté une éthanolémie endogène chez l'homme comprise entre 0 et 35,2 mg/L (moyenne : 1,1 mg/L ; médiane : 0,4 mg/L) (Al-Awadhi *et al.* 2004). L'éthanol endogène semble produit par fermentation par des levures et d'autres microorganismes intestinaux et/ou restitué par l'aliment.

Sur un volontaire (sexe masculin) au repos (ventilation de 6 L/min) et exposé durant 3 heures à 1000 ppm d'éthanol (1900 mg/m³), aucune éthanolémie n'a pu être détectée (mesures avant l'exposition puis à 35, 60, 120 et 180 minutes - limite de détection de 2 mg/L) (Campbell & Wilson 1986).

Dans une étude menée sur 24 volontaires (12 hommes et 12 femmes) maintenus au repos (ventilation de 6 L/min) et exposés pendant 4 heures à 80, 400 ou 800 ppm d'éthanol (soit 150, 750 ou 1 500 mg/m³), les éthanolémies moyennes étaient respectivement de 0,23, 0,85 et 2,1 mg/L (Seeber *et al.* 1994). Dans la même étude, 16 autres volontaires (8 hommes et 8 femmes) ont été exposés pendant 4 heures à 1000 ppm d'éthanol (1900 mg/m³) ou à une atmosphère de composition alternant toutes les heures entre 100 et 1900 ppm (190 et 3610 mg/m³) ou inversement. L'éthanolémie moyenne mesurée s'étendait de 0,66 à 5,6 mg/L.

L'étude de Nadeau *et al.* (2003) menée sur cinq hommes au repos, exposés pendant 6 heures à 1000 ppm d'éthanol, a obtenu des résultats semblables, avec une éthanolémie mesurée à 3 et 6 heures de 2,26 mg/L et 4,43 mg/L. Les doses de 250 et 500 ppm ont également été testées, et l'éthanolémie n'était pas détectable (limite de détection non communiquée).

L'éthanol peut également être absorbé par la peau.

Dans les études de pénétration cutanée *in vitro*, le taux d'absorption en conditions non occlusives n'excède pas 1% en relation avec l'évaporation de l'alcool. La demi-vie d'évaporation de l'éthanol a été estimée à moins de 12 secondes, signifiant qu'en 75 secondes, plus de 99 % de la dose appliquée est évaporée. En système clos, les taux peuvent atteindre 30%. Le flux d'absorption transcutané de l'éthanol est estimé inférieur à 1 mg/cm²/h.

Gummer & Maibach (1986) ont étudié la pénétration cutanée *in vitro* de l'éthanol marqué au ¹⁴C sur peau (épaisseur complète) de cobaye. La durée d'exposition était de 19 heures. En système ouvert, le taux de pénétration était inférieur à 1% (0,29 à 0,94%), quelle que soit la dose appliquée (8 à 32 mg/cm²). En conditions occlusives, à la dose de 16 mg/cm², le taux de pénétration cutanée était significativement supérieur (p<0,001), avec des taux de pénétration allant de 8,1 % à 27,1 % en fonction du système d'occlusion utilisé (parafilm, film polyester ou chambre étanche).

Tableau 5 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique à l'éthanol consécutifs à une exposition par inhalation ou par voie cutanée (revue bibliographique)

Ethanol	N ¹	Protocole	Dosage	Référence																		
<table border="1"> <tr><td colspan="2">Vapeurs</td></tr> <tr><td>ppm</td><td>mg/m³</td></tr> <tr><td>1000</td><td>1900</td></tr> </table>	Vapeurs		ppm	mg/m ³	1000	1900	1 ♂	3 h d'exposition Taux de ventilation 6L/min	<table border="1"> <tr><td>Ethanolémies</td><td>< LOD³ (2 mg/L)</td></tr> </table> avant et pendant l'exposition : 35, 60, 120 et 180 minutes	Ethanolémies	< LOD ³ (2 mg/L)	Campbell & Wilson (1986)										
Vapeurs																						
ppm	mg/m ³																					
1000	1900																					
Ethanolémies	< LOD ³ (2 mg/L)																					
		Modélisation avec une activité physique intense (ventilation de 50 L/min)	Valeur maximale estimée : 20 mg/L																			
<table border="1"> <tr><td colspan="2">Vapeurs</td></tr> <tr><td>ppm</td><td>mg/m³</td></tr> <tr><td>80</td><td>150</td></tr> <tr><td>400</td><td>750</td></tr> <tr><td>800</td><td>1500</td></tr> </table>	Vapeurs		ppm	mg/m ³	80	150	400	750	800	1500	24 12 ♂ 12 ♀	4 h d'exposition Taux de ventilation 6L/min	<table border="1"> <tr><td>80 ppm</td><td>400 ppm</td><td>800 ppm</td></tr> <tr><td>0,23 mg/L</td><td>0,85 mg/L</td><td>2,1 mg/L</td></tr> </table>	80 ppm	400 ppm	800 ppm	0,23 mg/L	0,85 mg/L	2,1 mg/L	Seeber <i>et al.</i> (1994)		
Vapeurs																						
ppm	mg/m ³																					
80	150																					
400	750																					
800	1500																					
80 ppm	400 ppm	800 ppm																				
0,23 mg/L	0,85 mg/L	2,1 mg/L																				
<table border="1"> <tr><td colspan="2">Vapeurs</td></tr> <tr><td>ppm</td><td>mg/m³</td></tr> <tr><td>1000</td><td>1900</td></tr> <tr><td>ou</td><td></td></tr> <tr><td>100 / 1900</td><td>190 / 3610</td></tr> </table>	Vapeurs		ppm	mg/m ³	1000	1900	ou		100 / 1900	190 / 3610	16 8 ♂ 8 ♀	4 h d'exposition à 1000 ppm ou en alternance horaire - à 100 et 1900 ppm (n=8) - ou à 1900 et 100 ppm (n=8) Taux de ventilation : 6 L/min	<table border="1"> <tr><td>Ethanolémies</td><td>0,66 à 5,6 mg/L</td></tr> </table> (détail par groupe non communiqué)	Ethanolémies	0,66 à 5,6 mg/L							
Vapeurs																						
ppm	mg/m ³																					
1000	1900																					
ou																						
100 / 1900	190 / 3610																					
Ethanolémies	0,66 à 5,6 mg/L																					
<table border="1"> <tr><td colspan="2">Vapeurs</td></tr> <tr><td>ppm</td><td>mg/m³</td></tr> <tr><td>250</td><td>475</td></tr> <tr><td>500</td><td>950</td></tr> <tr><td>1000</td><td>1900</td></tr> </table>	Vapeurs		ppm	mg/m ³	250	475	500	950	1000	1900	5 ♂	6 h d'exposition Sujets au repos	<table border="1"> <tr><td></td><td>250/ 500 ppm</td><td>1000 ppm</td></tr> <tr><td>3 h</td><td rowspan="2">< LOD³</td><td>2,26 mg/L</td></tr> <tr><td>6 h</td><td>4,43 mg/L</td></tr> </table> (LOD non communiquée)		250/ 500 ppm	1000 ppm	3 h	< LOD ³	2,26 mg/L	6 h	4,43 mg/L	Nadeau <i>et al.</i> (2003)
Vapeurs																						
ppm	mg/m ³																					
250	475																					
500	950																					
1000	1900																					
	250/ 500 ppm	1000 ppm																				
3 h	< LOD ³	2,26 mg/L																				
6 h		4,43 mg/L																				
44 % ²	16 8 ♂ 8 ♀	Vaporisation sur tout le corps pendant 10 sec Quantité moyenne d'éthanol : 9,72 g / personne (3,31 à 17,28 g)	<table border="1"> <tr><td>Ethanolémies</td><td>< LOD³ (9 mg/L)</td></tr> </table> avant puis 5, 10, 30 et 60 minutes suivant l'exposition	Ethanolémies	< LOD ³ (9 mg/L)	Pendlington <i>et al.</i> (2001)																
Ethanolémies	< LOD ³ (9 mg/L)																					

¹ Nombre de volontaires – ² % p/p, p/v ou v/v non précisé – ³ LOD : limite de détection

Des données similaires ont été publiées par [Pendlington et al. \(2001\)](#). L'éthanol appliqué sur peau de porc excisée (épaisseur complète) à raison de 10,34 mg/cm² pendant 24 heures a présenté un taux de pénétration cutanée de 21,17 % en conditions occlusives (parafilm) et 0,97 % en conditions non occlusives. Le flux maximum de pénétration cutanée a été estimé 10 fois plus important en conditions occlusives (0,25 mg/cm²/h *versus* 0,02). La même étude a évalué le taux d'évaporation de l'éthanol depuis la surface de la peau pendant 90 secondes suite à l'application d'éthanol à hauteur de ± 2 mg/cm². La demi-vie d'évaporation observée était courte (11,7 secondes) et le taux d'évaporation quasi nul à 60 secondes.

Le passage transcutané de l'éthanol marqué au ¹⁴C a également été étudié *in vitro* par [Beskitt & Sun \(1997\)](#) sur des échantillons de peau (épaisseur complète) prélevés chez la souris, le rat, le lapin et l'homme. 250 μ L de solution d'éthanol à 25 % v/v ont été appliqués sur des surfaces de peau de 1,77 cm² (soit une dose d'éthanol de ± 28 mg/cm²- conditions d'essai de dose dite infinie) en système clos sur une durée de 6 heures. Un total de 175 expérimentations a été réalisé sur une période de 6 ans. Une différence inter-espèce statistiquement significative du taux de pénétration cutanée a été mise en évidence, à partir des valeurs de constantes de perméabilité (Kp) mesurées : lapin > souris > rat et homme. Pour la peau humaine, la constante de perméabilité estimée était de 3,4 10⁻³ cm/h, avec un flux de pénétration à l'état stationnaire de 0,67 mg/cm²/h, et une quantité absorbée de l'ordre de 9,9 %.

[Scott et al. \(1991\)](#) ont rapporté une constante Kp sur peau humaine de 3,17 10⁻⁴ cm/h, soit environ 10 fois plus faible. Cependant, selon le DECOS ([Dutch Expert Committee on Occupational Standards 2006](#)), l'examen des conditions expérimentales laisse penser que la quantité d'éthanol utilisée dans cette étude était insuffisante, ce qui remet en question l'utilisation de cette valeur.

On retrouve également dans la littérature une étude de pénétration cutanée chez l'homme, confirmant un faible niveau d'exposition systémique (tableau 5).

16 volontaires (8 hommes et 8 femmes) ont été exposés sur tout le corps à un aérosol contenant 44 % d'éthanol pendant environ 10 secondes, correspondant à une quantité moyenne totale d'éthanol de 9,72 g par personne (3,31 à 17,28 g). Aucun échantillon dosé (prélèvements avant le début de l'étude puis 5, 10, 30 et 60 minutes suivant l'exposition) n'a présenté d'éthanolémie décelable au seuil de détection de 9 mg/L ([Pendlington et al. 2001](#)).

Indépendamment du faible taux de pénétration cutanée, un mauvais usage peut être à l'origine d'intoxication chez l'enfant. Un cas d'intoxication par voie cutanée a ainsi été publié chez une enfant de 2 ans ayant été exposée sur 10 % de sa surface corporelle à une solution d'éthanol à 70% en préparation pré-opératoire avant chirurgie plastique ([Puschel 1981](#)). Des applications d'alcool sur de grandes surfaces chez de très jeunes enfants ont également été responsables d'intoxication ([Puschel, 1981](#) ; [AFSSAPS 2011](#)). Chez les nouveau-nés et les nourrissons, une large application d'une solution alcoolique d'eau de toilette peut conduire à un coma éthylique ([Gouille & Guerbet 2015](#)). Cependant, dans ces cas, se pose aussi la question du rôle de l'inhalation dans la manifestation des effets rapportés.

Plusieurs études ont également été réalisées dans le cadre de l'évaluation des risques liée à l'utilisation des produits hydro-alcooliques (PHA) par les professionnels de santé (tableaux 6, 7 et 8). Le détail de ces études est présenté en annexe 1.

Celles-ci confirment l'exposition des voies respiratoires à l'éthanol des utilisateurs, avec une corrélation temporelle entre les pics d'exposition et la réalisation des frictions hydro-alcooliques (FHA), et un retour rapide à des valeurs de base une fois la friction terminée. Le niveau d'exposition par inhalation dépend de plusieurs paramètres tels que la teneur en alcool dans les produits, les quantités appliquées et la durée de traitement, le taux de ventilation respiratoire du sujet, le volume du local et son taux de ventilation. Les taux atmosphériques retrouvés dans les études varient d'un protocole à l'autre, mais les valeurs mesurées ou estimées sont généralement inférieures aux limites d'exposition professionnelle de l'éthanol (VLCT de 9500 mg/m³ et VME de 1900 mg/m³) (tableau 6).

On retrouve 4 études ayant investigué les teneurs atmosphériques en éthanol au niveau des voies respiratoires de volontaires lors de l'utilisation de PHA sur de courtes durées d'exposition.

Les mesures à l'aide d'un détecteur par photo-ionisation (PID) réalisées chez une infirmière lors d'une FHA avec 3 mL d'un produit à 70 % p/p d'éthanol dans un local peu ventilé ont montré un pic d'exposition atmosphérique à l'éthanol de 4000 mg/m³, avec une valeur moyennée à 1350 mg/m³ sur une durée de 100 secondes ([AFSSET 2010](#), [AFSSAPS 2011](#)).

Les mesures réalisées chez 5 volontaires (3 hommes et 2 femmes) lors de 5 FHA avec 1,5 ou 3 mL d'un produit à 70 % v/v d'éthanol dans un local peu ou pas ventilé ont montré un pic d'exposition atmosphérique à l'éthanol du même ordre de grandeur (± 4470 mg/m³). La valeur était diminuée à ± 2375 mg/m³ lorsque les frictions étaient réalisées dans un local ventilé (18 renouvellements d'air par heure). Les niveaux moyens d'exposition sur 3 minutes étaient de l'ordre de 2800 et 2350 mg/m³ en local non ventilé et 1600 et 2150 mg/m³ en local ventilé selon que la quantité de produit appliquée était de 1,5 ou 3 g par friction respectivement ([Dumas-Campagna et al. 2014b](#)).

Les mesures des teneurs atmosphériques en éthanol lors de FHA chez 12 volontaires avec un produit à base de 70 % p/p d'éthanol dans différentes situations d'hygiène des mains (utilisation entre 6 et 12 mL en 1 ou 1,5 minutes et exposition à 27 mL en 45 min) ont montré des teneurs moyennes allant de 137 à 617 mg/m³, avec des valeurs d'autant plus importantes que la quantité de produit était importante sur une courte durée ([Hautemanière et al. 2013b](#)).

Tableau 6 : Evaluation des teneurs atmosphériques en éthanol au niveau des voies respiratoires lors de l'utilisation de produits hydro-alcooliques (revue bibliographique)

Ethanol	N ¹	Protocole	[EtOH] atmosphérique			Référence												
				Moyenne / durée	Pic													
70 % p/p 60 % v/v	1 ♀	1 friction de 3 mL d'1 à 1,5 min avec chaque produit (70% p/p ou 60% v/v)		70% p/p ± 1350 mg/m ³ /100 sec 60% v/v ± 805 mg/m ³ /120 sec	± 4500 mg/m ³	AFSSET (2010), AFSSAPS 2011)												
70 % p/p 56 % p/p	5	2 protocoles pour chaque produit (à 70% ou 56 % p/p d'éthanol) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center;">1/</td> <td style="width: 15%;">1 friction avec 3 mL durant 30 sec</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2/</td> <td>1 friction avec 2x3mL, 2x45 sec</td> </tr> </table> Ventilation du local : 12 renouvellements / heure	1/	1 friction avec 3 mL durant 30 sec	2/	1 friction avec 2x3mL, 2x45 sec		Moyenne ± écart-type (mg/m³)		Bessonneau & Thomas (2012)								
1/	1 friction avec 3 mL durant 30 sec																	
2/	1 friction avec 2x3mL, 2x45 sec																	
			1/	2/														
			70 % p/p	14300 ± 1400	13200 ± 700													
			56 % p/p	20200 ± 900	18100 ± 900													
70 % p/p	12 6 ♂ 6 ♀	4 protocoles répétés à 10 reprises <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center;">1/</td> <td style="width: 15%;">Consultation</td> <td style="width: 80%;">2 frictions de 30 sec avec 3 mL espacées de 10 min (6 mL en # 11 min)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2/</td> <td>Pose de perfusion</td> <td>3 frictions de 30 sec de 3 mL : 2^{ème} après 5 min, 3^{ème} 3 min plus tard (9 mL en # 10,5 min)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3/</td> <td>Soin en réanimation</td> <td>9 frictions de 30 sec avec 3 mL toutes les 5 min (27 mL en # 44,5 min)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4/</td> <td>Avant chirurgie</td> <td>2 frictions consécutives d'1 min avec 6 mL chacune (12 mL en # 2 min)</td> </tr> </table>	1/	Consultation	2 frictions de 30 sec avec 3 mL espacées de 10 min (6 mL en # 11 min)	2/	Pose de perfusion	3 frictions de 30 sec de 3 mL : 2 ^{ème} après 5 min, 3 ^{ème} 3 min plus tard (9 mL en # 10,5 min)	3/	Soin en réanimation	9 frictions de 30 sec avec 3 mL toutes les 5 min (27 mL en # 44,5 min)	4/	Avant chirurgie	2 frictions consécutives d'1 min avec 6 mL chacune (12 mL en # 2 min)		Moyenne ± écart-type (mg/m³)		Hautemanière <i>et al.</i> (2013b)
1/	Consultation	2 frictions de 30 sec avec 3 mL espacées de 10 min (6 mL en # 11 min)																
2/	Pose de perfusion	3 frictions de 30 sec de 3 mL : 2 ^{ème} après 5 min, 3 ^{ème} 3 min plus tard (9 mL en # 10,5 min)																
3/	Soin en réanimation	9 frictions de 30 sec avec 3 mL toutes les 5 min (27 mL en # 44,5 min)																
4/	Avant chirurgie	2 frictions consécutives d'1 min avec 6 mL chacune (12 mL en # 2 min)																
			1/	137 ± 10,9														
			2/	263 ± 7,0														
			3/	346 ± 43,8														
			4/	617 ± 40,6														
70 % v/v #66 % p/p	5 3 ♂ 2 ♀	2 environnements : - 1 pièce ventilée - 18 renouvellements d'air/heure - 1 pièce fermée pas ou peu ventilée 5 frictions des mains, espacées de 15 minutes chacune 2 types de frictions : 1,5 ou 3 g de produit durant 3 minutes	Niveaux d'exposition sur 3 minutes			Dumas- Campagna <i>et al.</i> (2014b)												
				Moyenne (mg/m³)²			Pic (mg/m³)²											
				1,5 g	3 g													
			Pièce ventilée	1630±490	2155±232	± 2375												
			Pièce fermée	2787±1678	2362±1129	± 4470												
70 % p/p	26 3 ♂ 23 ♀	Test d'usage - 4 heures d'activités de soin - (# 11,5 frictions) # 33 g en 4 h	Niveau d'exposition moyen sur 4 heures 46,2 ± 34,8 mg/m ³			Hautemanière <i>et al.</i> (2013a)												
70 % p/p	--	Modélisation 20 frictions chirurgicales ou 50 frictions simples /j (120 à 150 mL en 8 h)	200 à 250 mg/m ³			AFSSET (2010)												
70 % p/p	--	Personne exposée durant 2 j à 378 mL d'éthanol par les voies respiratoires en relation avec 180 frictions de 3 mL réalisées par 30 personnes dans une pièce faiblement ventilée (0,08 m ³ /min), à raison de 3 frictions/j par personne	Concentration atmosphérique moyenne estimée en fin d'exposition : 1518 mg/m ³			Huynh- Delerme <i>et al.</i> (2012)												

¹ Nombre de volontaires / ² résultats publiés en ppm (conversion en mg/m³ effectuée avec l'hypothèse de conditions expérimentales de 25°C, 1013 hPa, où 1 ppm = 1,9 mg/m³)

Tableau 7 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique à l'éthanol consécutifs à l'utilisation de produits hydro-alcooliques (revue bibliographique)

Ethanol	N ¹	Protocole	Résultat	Référence																																	
70 % p/p	--	Etude de modélisation 42 frictions simples de 94 secondes avec 3 mL d'un produit à 70 % p/p d'éthanol sur 8 heures Hypothèse du seul métabolisme hépatique	Ethanolémie maximale estimée à 1,28 mg/L	AFSSET (2010)																																	
70 % p/p	--	Etude de modélisation 42 frictions simples de 94 secondes avec 3 mL d'un produit à 70 % p/p d'éthanol sur 8 heures Modèle ajusté ajoutant un métabolisme extra-hépatique	Ethanolémie maximale estimée : 0,42 mg/L chez la femme 0,40 mg/L chez l'homme	Dumas-Campagna <i>et al.</i> (2014b)																																	
70 % p/p	--	Etude de modélisation : 180 frictions de 3 mL sur 2 jours avec un produit à 70 % p/p d'éthanol	Ethanolémie maximale estimée à 5,9 mg/L hypothèse du seul métabolisme hépatique	Huynh-Delerme <i>et al.</i> (2012)																																	
62 % ²	5	50 frictions de 5 mL sur 4 h	<table border="1"> <tr> <td>Ethanolémies</td> <td>< LOD³ (5 mg/L)</td> </tr> </table> mesures avant et après l'exposition	Ethanolémies	< LOD ³ (5 mg/L)	Miller <i>et al.</i> (2006)																															
Ethanolémies	< LOD ³ (5 mg/L)																																				
70% p/p	20	30 frictions (1,2 à 1,5 mL) en 1 h utilisation de 36 à 45 mL de produit	<table border="1"> <tr> <td>Ethanol dans l'air expiré*</td> <td>0,001 à 0,0025 % (n=6/20)</td> </tr> <tr> <td>Ethanolémies</td> <td>< LOD³ (1 mg/L) (n=18/20) < LOQ⁴ (20 mg/L) (n=2/20)</td> </tr> </table> * mesures 1 à 2 min après l'exposition	Ethanol dans l'air expiré*	0,001 à 0,0025 % (n=6/20)	Ethanolémies	< LOD ³ (1 mg/L) (n=18/20) < LOQ ⁴ (20 mg/L) (n=2/20)	Brown <i>et al.</i> (2007)																													
Ethanol dans l'air expiré*	0,001 à 0,0025 % (n=6/20)																																				
Ethanolémies	< LOD ³ (1 mg/L) (n=18/20) < LOQ ⁴ (20 mg/L) (n=2/20)																																				
95, 85 et 55 % p/p	12 6 ♂ 6 ♀	1/ 20 frictions de 30 sec espacées d'1 min (exposition de 10 min sur une durée de 30 min) 2/ 10 frictions de 3 min espacées de 5 min (exposition de 30 min sur une durée de 80 min) <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Produit ([Ethanol])</th> <th colspan="2">Quantité d'éthanol appliquée</th> </tr> <tr> <th>1/ (sur 30 min)</th> <th>2/ (sur 80 min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (95%)</td> <td>60 g</td> <td>149,9 g</td> </tr> <tr> <td>B (85%)</td> <td>56,2 g</td> <td>140 g</td> </tr> <tr> <td>C (55%)</td> <td>39,6 g</td> <td>99 g</td> </tr> </tbody> </table> Rq : le produit C contenait également 10% de n-propanol	Produit ([Ethanol])	Quantité d'éthanol appliquée		1/ (sur 30 min)	2/ (sur 80 min)	A (95%)	60 g	149,9 g	B (85%)	56,2 g	140 g	C (55%)	39,6 g	99 g	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="3"></th> <th colspan="3">Ethanolémie mg/L</th> </tr> <tr> <th rowspan="2">Ct₀*</th> <th colspan="2">C_{max} durant essai</th> </tr> <tr> <th>1/</th> <th>2/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (95%)</td> <td rowspan="3">0,07 mg/L</td> <td>20,95</td> <td>17,50</td> </tr> <tr> <td>B (85%)</td> <td>11,45</td> <td>30,10</td> </tr> <tr> <td>C (55%)</td> <td>6,90</td> <td>8,80</td> </tr> </tbody> </table> * taux basal médian avant essai		Ethanolémie mg/L			Ct ₀ *	C _{max} durant essai		1/	2/	A (95%)	0,07 mg/L	20,95	17,50	B (85%)	11,45	30,10	C (55%)	6,90	8,80	Kramer <i>et al.</i> (2007)
Produit ([Ethanol])	Quantité d'éthanol appliquée																																				
	1/ (sur 30 min)	2/ (sur 80 min)																																			
A (95%)	60 g	149,9 g																																			
B (85%)	56,2 g	140 g																																			
C (55%)	39,6 g	99 g																																			
	Ethanolémie mg/L																																				
	Ct ₀ *	C _{max} durant essai																																			
		1/	2/																																		
A (95%)	0,07 mg/L	20,95	17,50																																		
B (85%)		11,45	30,10																																		
C (55%)		6,90	8,80																																		
70% ²	82 37 ♂ 45 ♀	Enfants âgés de 3,5 à 7,2 ans Friction avec 1,5 mL pour 47 enfants et 3 mL pour 35	<table border="1"> <tr> <td>Ethanol dans l'air expiré</td> <td>< LOD³ (0,01‰)</td> </tr> </table> mesures avant puis 15 et 60 min après l'exposition Contacts mains-bouche comptabilisés jusqu'au nombre de 30 dans les 15 premières minutes pour certains enfants	Ethanol dans l'air expiré	< LOD ³ (0,01‰)	Kinnula <i>et al.</i> (2009)																															
Ethanol dans l'air expiré	< LOD ³ (0,01‰)																																				

Ethanol	N ¹	Protocole	Résultat	Référence				
70 % p/p	86 10 ♂ 76 ♀	4 h d'activité avec traitements hygiéniques (3mL–30 sec) et chirurgicaux (2*3mL–2*45 sec) Quantité de produit utilisée Moyenne : 27,5 ± 14,9 g (9 frictions ± 5) Min : 1,23 g - Max : 59,84 g	<table border="1"> <tr> <td>Ethanol dans l'air expiré</td> <td>T0 : < LOD³ (0,01 mg/L) T4* : 0,076 ± 0,05 mg/L (n=28/86)</td> </tr> <tr> <td>Dosages sanguins et urinaires **</td> <td>< LOD³ (0,1 mg/L)</td> </tr> </table> <p>* mesures 1 à 2 min après les 4 h d'exposition ** avant et après les 4 h d'exposition</p>	Ethanol dans l'air expiré	T0 : < LOD ³ (0,01 mg/L) T4* : 0,076 ± 0,05 mg/L (n=28/86)	Dosages sanguins et urinaires **	< LOD ³ (0,1 mg/L)	Ahmed-Lecheheb <i>et al.</i> (2012)
Ethanol dans l'air expiré	T0 : < LOD ³ (0,01 mg/L) T4* : 0,076 ± 0,05 mg/L (n=28/86)							
Dosages sanguins et urinaires **	< LOD ³ (0,1 mg/L)							
70 % p/p	26 3 ♂ 23 ♀	Test d'usage - 4 h d'activités de soin - (# 11,5 frictions) # 33 g en 4 h (Niveau moyen d'exposition mesuré : 46,2 ± 34,8 mg/m ³)	<table border="1"> <tr> <td>Ethanol dans l'air expiré</td> <td>T0 : < LOD³ (0,01 mg/L) T4* : 0,03 ± 0,06 mg/L</td> </tr> <tr> <td>Dosages sanguins et urinaires **</td> <td>< LOD³ (0,1 mg/L)</td> </tr> </table> <p>* mesures 1 à 2 min après les 4 h d'exposition ** avant et après les 4 h d'exposition</p>	Ethanol dans l'air expiré	T0 : < LOD ³ (0,01 mg/L) T4* : 0,03 ± 0,06 mg/L	Dosages sanguins et urinaires **	< LOD ³ (0,1 mg/L)	Hautemanière <i>et al.</i> (2013a)
Ethanol dans l'air expiré	T0 : < LOD ³ (0,01 mg/L) T4* : 0,03 ± 0,06 mg/L							
Dosages sanguins et urinaires **	< LOD ³ (0,1 mg/L)							

¹N : Nombre de volontaires – ²% p/p, p/v ou v/v non précisé – ³LOD : limite de détection – ⁴LOQ : limite de quantification

Tableau 8 : Evaluation de la part de l'absorption cutanée dans l'exposition systémique à l'éthanol suite à une exposition par voie cutanée (revue bibliographique)

Ethanol	N ¹	Protocole	Dosage	Référence								
74,1% p/p	14 ♂	application sous pansement occlusif durant 10 min.	Ethanolémies inchangées avant et 15 et 60 minutes après le début de l'essai, de l'ordre de 1,25 mg/L	Kirschner <i>et al.</i> (2009)								
45 % p/v	14 ♂	patchs occlusifs de 10 min. Rq : le produit contenait aussi 18 % p/v de n-propanol	Ethanolémies inchangées avant et 15, 30 et 60 minutes après le début de l'essai, comprises entre 0,25 et 0,3 mg/L	Lang <i>et al.</i> (2011)								
78,2% p/p	5 + 2	5 sujets : 32 frictions à raison de 4 frictions/h sur 8 h (96 mL au total) avec ou sans exposition par inhalation durant la friction + 2 sujets contrôles (exposition aux vapeurs sans utilisation de produits)	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>Ethylglucuronide urinaire</td> </tr> <tr> <td>Avec exposition par inhalation</td> <td>1,7 mg/g de créatinine</td> </tr> <tr> <td>Sans exposition par inhalation</td> <td>0,09 mg/g de créatinine</td> </tr> <tr> <td>Sujets contrôles</td> <td>0,8 mg/g de créatinine</td> </tr> </table>		Ethylglucuronide urinaire	Avec exposition par inhalation	1,7 mg/g de créatinine	Sans exposition par inhalation	0,09 mg/g de créatinine	Sujets contrôles	0,8 mg/g de créatinine	Arndt <i>et al.</i> (2014)
	Ethylglucuronide urinaire											
Avec exposition par inhalation	1,7 mg/g de créatinine											
Sans exposition par inhalation	0,09 mg/g de créatinine											
Sujets contrôles	0,8 mg/g de créatinine											

¹ Nombre de volontaires

Bessonneau & Thomas (2012) ont rapporté des niveaux d'exposition des voies respiratoires plus élevés suite au traitement hygiénique (3 mL - 30 secondes) ou à la désinfection chirurgicale des mains (2*3mL - 2*45 secondes). 5 volontaires ont utilisé deux produits hydro-alcooliques différents (70 % p/p ou 56% p/p d'éthanol, ci-après PHA1 et PHA2) dans un local avec un taux de 12 renouvellements d'air par heure. Durant le traitement hygiénique, les valeurs moyennes maximales étaient similaires pour les deux produits, de $14,3 \pm 1,4$ mg/L pour le PHA1 et $13,2 \pm 0,7$ mg/L pour le PHA2. Durant la friction chirurgicale des mains, deux pics ont été retrouvés à 40 et 80 secondes pour les deux produits d'essai, avec des concentrations moyennes maximales de $20,2 \pm 0,9$ mg/L équivalent éthanol pour le PHA1 et $18,1 \pm 0,9$ mg/L pour le PHA2. 10 à 20 secondes après la fin des frictions, les concentrations étaient redevenues nulles.

Des études ont également investigué les teneurs atmosphériques en éthanol au niveau des voies respiratoires de volontaires en situation d'activité professionnelle (exposition long-terme), par des mesures sur une période de 4 heures, ou par extrapolation de données court-terme ou modélisation.

Le taux moyen d'éthanol inhalé mesuré chez 26 professionnels de santé durant une activité de soins de 4 heures impliquant l'utilisation d'un produit à 70 % p/p d'éthanol (utilisation en moyenne de 34,5 mL de produit correspondant à 11,5 FHA sur 4 heures) était inférieur à 50 mg/m³ ($46,2 \pm 34,8$ mg/m³) (Hautemanière *et al.* 2013a).

Dans un scénario réaliste d'utilisation des PHA au cours de la journée (20 frictions chirurgicales ou 50 frictions simples par jour), les niveaux d'exposition des voies respiratoires sur une journée de travail de 8 heures, extrapolés à partir de mesures effectuées lors d'une friction, ou de données issues de modélisations, sont de l'ordre de 200 à 250 mg/m³ (AFSSET 2010).

Les niveaux d'exposition systémique associée, appréciés par les teneurs en éthanol dans l'air expiré de sujets exposés et/ou la détermination des éthanolémies sont faibles. L'éthanolémie induite reste faible et ne devrait jamais excéder les teneurs d'éthanolémie naturelle endogène rapportées, comprises entre 0 et 35 mg/L (Al-Awadhi *et al.* 2004) (tableau 7). L'évaluation repose sur des mesures effectuées dans différentes conditions d'exposition contrôlée, ou des valeurs estimées par des études de modélisation recourant à un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK : physiologically based pharmacokinetic model).

Aucune éthanolémie consécutive à 50 frictions de 5 mL sur 4 heures avec un produit à base de 62% d'éthanol (% p/p, p/v ou v/v non précisé) n'a été retrouvée, au seuil de détection de 5 mg/L (mesures sur 5 volontaires) (Miller *et al.* 2006).

Aucune éthanolémie décelable ni dosage urinaire positif (limite de détection de 0,1 mg/L) n'ont été retrouvés chez 86 agents hospitaliers après 4 heures d'exposition en relation avec l'utilisation moyenne de 28,5 mL de produit à 70 % p/p d'éthanol pour la désinfection des mains (Ahmed-Lecheheb *et al.* 2012).

Dans l'étude de [Hautemanière et al. \(2013a\)](#) mentionnée précédemment, conduite chez 26 professionnels de santé ayant utilisé une moyenne de 34,5 mL de produit à 70 % p/p d'éthanol durant une activité de soins de 4 heures, aucune éthanolémie décelable ni dosage urinaire positif (limite de détection de 0,1 mg/L) n'ont été retrouvés.

L'éthanolémie détectée (limite de détection de 1 mg/L) après 30 frictions sur une heure avec un produit à base de 70% p/p d'éthanol (utilisation de 36 à 45 mL de produit) ne concernait que 2 volontaires sur les 20 participants et était inférieure au seuil de quantification de 20 mg/L ([Brown et al. 2007](#)).

Dans une autre étude conduite chez 12 volontaires utilisant des PHA de différents teneurs en éthanol (95, 85 et 55 % p/p), l'éthanolémie maximale mesurée après 20 traitements hygiéniques réalisés sur 30 minutes (80 mL de produit) ou 10 désinfections chirurgicales sur 80 minutes (200 mL de produit) était de 30,1 mg/L ([Kramer et al. 2007](#)). Les auteurs ont estimé que dans un scénario de 3 frictions chirurgicales des mains espacées de deux heures chacune avec un produit contenant 95% d'éthanol, l'éthanolémie moyenne estimée d'un chirurgien serait de 2,61 mg/L chez l'homme et 3,68 mg/L chez la femme.

[Kinnula et al. \(2009\)](#) n'ont pas retrouvé d'éthanol dans l'air expiré de jeunes enfants (45 filles et 37 garçons âgés de 3,5 à 7,2 ans) après utilisation de PHA à 70% d'éthanol (% p/p ou p/v ou v/v non précisé) malgré des contacts mains-bouche comptabilisés jusqu'au nombre de 30 dans les 15 premières minutes pour certains enfants. La dose de PHA utilisée était de 1,5 mL pour 47 enfants et 3 mL pour les 35 autres et les mesures ont été effectuées avec un alcoomètre (seuil de détection de 0,01%) avant puis 15 à 60 minutes après la désinfection.

Dans un scénario d'utilisation professionnelle de PHA avec 42 frictions simples de 94 secondes avec un produit à 70 % p/p d'éthanol sur une journée de travail de 8 heures, l'estimation par modélisation de l'éthanolémie maximale cumulée induite conclut à une valeur maximale voisine de 1 mg/L :

- de l'ordre de 1,28 mg/l avec l'hypothèse du seul métabolisme hépatique ([AFSSET 2010](#)),
- inférieure à 1 mg/L (0,42 mg/L chez la femme et 0,40 mg/L chez l'homme) dans un modèle ajusté ajoutant un métabolisme extra-hépatique ([Dumas-Campagna et al. 2014b](#)).

Dans un autre scénario plus exposant, avec 180 FHA sur 2 jours avec un PHA à 70 % p/p d'éthanol, l'éthanolémie consécutive maximale estimée était de 5,9 mg/L avec l'hypothèse du seul métabolisme hépatique ([Huyhn-Delerme et al. 2012](#)).

Dans l'étude de [Kramer et al. \(2007\)](#) reprise ci-dessus, le taux d'absorption cutané a également été évalué et n'excédait pas 2,3% (taux compris entre 0,5 et 2,3% en fonction des scénarios).

Les études réalisées pour identifier la part d'absorption cutanée *versus* la part de l'inhalation dans l'exposition systémique à l'éthanol suite à une application par voie cutanée, en relation avec les propriétés volatiles de l'alcool, concluent à un faible taux d'absorption cutanée et une contribution significative de la voie respiratoire (tableau 8).

Aucune augmentation décelable de l'éthanolémie chez 14 volontaires (sexe masculin) n'a pu être établie après application sous pansement occlusif de solutions d'éthanol à 74,1 % p/p durant 10 minutes, avec des valeurs de l'ordre de 1,25 mg/L avant et après administration (15 et 60 minutes après le début de l'essai) (Kirschner *et al.* 2009).

Il en est de même dans une étude menée par patchs occlusifs de 10 minutes sur 14 volontaires avec un mélange de 45 % p/v d'éthanol et 18% p/v de n-propanol, où les éthanolémies moyennes étaient comprises entre 0,25 et 0,3 mg/L avant et après administration (cinétique de mesures sur 60 minutes après le début de l'essai) (Lang *et al.* 2011).

Chez 5 volontaires ayant effectué un total de 32 frictions avec un produit à base de 78,2% p/p d'éthanol à raison de 4 frictions par heure sur 8 heures (utilisation d'un total de 96 mL), les taux d'éthylglucuronide (EG) urinaire étaient significativement réduits lorsque les volontaires ont appliqué le produit en plaçant les mains sous enceinte pour prévenir de l'exposition par inhalation durant la friction (valeur maximale de 0,09 mg/g contre 1,7 mg/g de créatinine). Lors des applications sans prévention de l'exposition par les voies respiratoires, deux volontaires étaient également présents dans la pièce sans utiliser de produits. Ceux-ci ont néanmoins présenté une valeur maximale d'EG urinaire de 0,8 mg/g, confirmant une exposition systémique à l'éthanol indépendamment de son application topique. (Arndt *et al.* 2014)

II.2.1.2. Distribution

À l'exception des os et des graisses, l'éthanol absorbé diffuse rapidement et presque uniformément dans tout l'organisme. La distribution est très rapide dans les organes fortement vascularisés comme le cerveau, les poumons, le foie ; et la concentration est maximale dans le liquide céphalo-rachidien et l'urine où elle atteint 1,3 fois la concentration plasmatique, elle-même légèrement supérieure (1,1 fois) à la concentration moyenne dans les organes. L'éthanol traverse librement le placenta et des concentrations similaires sont retrouvées dans le sang maternel et fœtal (INRS 2016a). Par voie orale, l'équilibre entre les tissus et le sang est généralement atteint 1 h à 1,5 h après l'ingestion (Bevan *et al.* 2009).

II.2.1.3. Métabolisme

La principale voie métabolique de l'éthanol est oxydative (Gouille & Guerbet 2015, INRS 2016a) et se déroule en 3 étapes (Fig. 1) :

- oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde,

- oxydation de l'acétaldéhyde en acide acétique,
- oxydation de l'acide acétique en dioxyde de carbone et en eau.

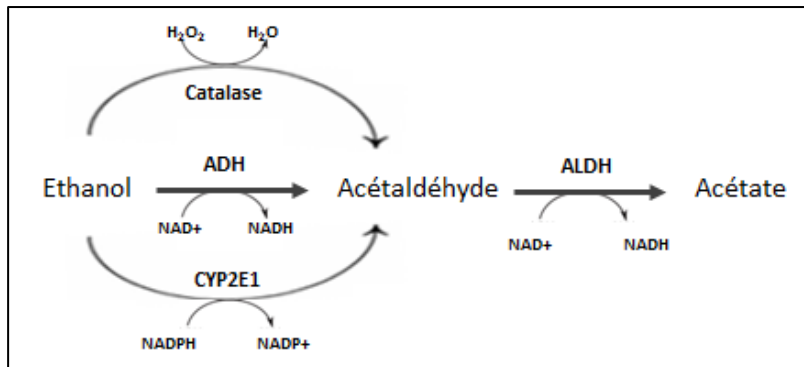


Figure 1 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol

La première étape qui mène à l'acétaldéhyde est majoritairement hépatique (80 - 90 %) sous l'action de l'alcool-déshydrogénase (ADH) au niveau du cytosol. Il a été démontré que l'ADH présente un polymorphisme qui altère l'activité fonctionnelle, expliquant certaines variations de la pharmacocinétique de l'éthanol entre les individus (Gouille & Guerbet 2015).

Il existe deux autres voies enzymatiques secondaires en raison d'une affinité moindre pour l'éthanol et généralement mises en jeu en cas d'alcoolisation chronique ou élevée :

- la voie microsomale impliquant des mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP2E1) (voie inductible),
- la voie de la catalase localisée au niveau des peroxyosomes de la plupart des tissus (voie limitée par la quantité d'eau oxygénée produite au cours des réactions du métabolisme intermédiaire).

Le métabolisme de l'éthanol est retardé en présence de n-propanol, en raison d'une affinité enzymatique de l'ADH et du système d'oxydation microsomal pour le n-propanol supérieure à celle de l'éthanol (INRS 2016c).

La deuxième étape, menant à l'acide acétique, est sous la dépendance de l'aldéhyde-déshydrogénase (ALDH) présente dans le foie (90 %) et dans le rein (10 %). L'activité ALDH du foie étant supérieure à son activité ADH, il n'y a généralement pas d'accumulation d'acétaldéhyde. Cependant, en raison du polymorphisme génétique de l'ALDH, certaines personnes peuvent dégrader plus lentement l'acétaldéhyde (Gouille & Guerbet 2015, INRS 2016a). Une accumulation d'acétaldéhyde peut également se produire en présence d'un inhibiteur spécifique de l'ALDH (tel que la prise de disulfiram par exemple, traitement aversif contre l'alcoolisme) (INRS 2016a).

Lors de la dernière étape, l'acide acétique formé est libéré dans le sang et oxydé en dioxyde de carbone et eau par les tissus périphériques.

Il existe également un métabolisme non oxydatif de l'éthanol (Gouille & Guerbet 2015). Celui-ci est accessoire pour l'élimination de l'alcool, mais permet de disposer de biomarqueurs utilisés à des fins de diagnostic en biologie clinique et médico-légale. Le métabolisme non oxydatif de l'éthanol conduit à la formation :

- d'esters éthyliques d'acides gras, par estérification des acides gras sous l'action d'une synthétase d'esters éthyliques d'acides gras,
- du phosphatidyléthanol par liaison de l'éthanol au phosphate libéré de la phosphatidylcholine après action d'une phospholipase. Sa synthèse est responsable de perturbations membranaires. Il constitue également un marqueur biologique direct d'alcoolisme chronique ;
- d'éthylsulfate, par fixation de l'éthanol sur un groupement sulfate provenant de la phosphoadénosine-phosphosulfate sous l'effet d'une sulfotransférase ;
- d'éthylglucuronide (EG) par conjugaison de l'éthanol à l'acide glucuronique sous l'action d'une glucuronosyltransférase. Il s'agit d'un métabolisme tout à fait mineur, dans un rapport voisin de 1‰ mais l'EG constitue un des biomarqueurs directs d'une consommation excessive d'alcool parmi les plus utilisés en routine biologique en raison de sa longue demi-vie dans le sang et les urines où il est encore présent dans les milieux biologiques alors que l'alcool a totalement disparu.

II.2.1.4. Elimination

La plus grande partie de l'éthanol absorbé est éliminée de l'organisme par son métabolisme oxydatif (plus de 90 %). La vitesse de métabolisation varie selon les individus. Une valeur moyenne déterminée par des essais sur volontaires se situe vers 100 mg/kg par heure. Des individus exposés régulièrement peuvent avoir une vitesse de métabolisation plus importante par induction enzymatique. La clairance plasmatique serait voisine de 220 mg/L par heure (INRS 2016a).

Pour un sujet inhalant des vapeurs d'éthanol tout en accomplissant un travail de force (taux de ventilation de 30 L/min), l'équilibre entre les vitesses d'absorption et de métabolisation assurant la stabilité de l'alcoolémie serait atteint pour une concentration de 3 500 ppm ; après 6 heures d'exposition à 8 500 ppm, l'alcoolémie maximale retrouvée chez de tels sujets est de 470 mg/L (INRS 2016a).

En dehors de ce processus de détoxification oxydante, une faible partie de l'éthanol absorbé (2 à 5 %) est éliminée sous forme inchangée dans l'air expiré, l'urine et la transpiration. Il peut également être excrété dans le lait maternel à une concentration comparable à celle du sang maternel (INRS 2016a).

II.2.1.5. Résumé

L'éthanol est rapidement et presque totalement absorbé par ingestion (plus de 90%). L'éthanol est également absorbé en quantité importante (jusqu'à 80%) par les voies respiratoires. Par voie cutanée, le taux d'absorption est faible, évalué à 1% environ sur peau de cobaye et peau de porc dans des essais *in vitro* en conditions non occlusives, et estimé à 2,3% maximum dans un essai sur volontaires exposés à l'éthanol lors de l'utilisation de produits hydro-alcooliques (PHA).

L'éthanol absorbé est distribué dans tout l'organisme, presque entièrement métabolisé pour finir en dioxyde de carbone et en eau. Le métabolisme est majoritairement oxydatif par la voie de l'ADH, à l'origine de la formation d'acétaldéhyde. Il existe deux autres voies enzymatiques secondaires d'oxydation impliquant le CYP2E1 et la voie de la catalase. L'acétaldéhyde formé est oxydé en acétate sous l'action de l'ALDH. Une partie de l'éthanol est également éliminée sous forme inchangée par voie urinaire, par l'air expiré et la sueur, ou encore *via* un métabolisme non oxydatif.

Il existe une variabilité inter-individuelle dans le métabolisme de l'éthanol en relation avec un polymorphisme des deux enzymes majoritairement impliquées, l'ADH et l'ALDH. En présence de n-propanol, le métabolisme de l'éthanol est retardé, en raison d'une affinité enzymatique de l'ADH et du système d'oxydation microsomal pour le n-propanol supérieure à celle de l'éthanol.

En situation d'exposition professionnelle lors de l'utilisation des PHA, les études disponibles chez l'homme complétées de simulations dans différents scénarios d'utilisation concluent à un niveau d'exposition systémique quasiment nul. Les éthanolémies mesurées sont souvent indiscernables des valeurs d'éthanolémie de base avant exposition et de l'éthanolémie endogène naturelle, estimée entre 0 et 35,2 mg/L.

II.2.2. Isopropanol

II.2.2.1. Absorption

L'isopropanol est bien et rapidement absorbé chez l'animal par les poumons et le tractus gastro-intestinal (> 80 % en 30 minutes et 100 % en 3 heures) (INRS 2016b).

À forte dose, l'absorption gastro-intestinale montre un temps de latence ainsi qu'une augmentation de la demi-vie suggérant une saturation du métabolisme. L'exposition de chiens, de lapins et de rats par différentes voies dévoile un taux sanguin d'isopropanol détectable dans les 30 minutes qui suivent l'exposition ; le pic sanguin après exposition orale est atteint en 0,5 à 2 heures chez le chien, en 1 heure chez le rat à faible dose (2000 mg/kg) et en 8 heures à forte dose (6000 mg/kg). L'absorption digestive est plus complète au niveau de l'intestin (67 à 91 %) qu'au niveau de l'estomac (41 %). (INRS 2016b).

L'absorption de l'isopropanol par les voies respiratoires a été étudiée chez le rat en comparant les concentrations sanguines d'isopropanol et d'acétone pendant et après une exposition unique de 4 heures à des vapeurs d'isopropanol (500 et 8 000 ppm). Les taux sanguins d'isopropanol et d'acétone étaient directement liés aux niveaux d'exposition. L'augmentation de la durée d'exposition à 8 heures a entraîné des taux sanguins significativement plus élevés que ceux obtenus chez les rats exposés pendant 4 heures, avec des taux sanguins significativement plus élevés à 8 000 ppm comparativement à 4 000 ppm (Laham *et al.* 1980).

Chez l'homme, dans une étude sur 10 volontaires ingérant 3,75 mg/kg d'isopropanol (et 1200 mg/kg d'éthanol) sur 2 heures, l'isopropanol a été retrouvé dans le sang, avec un pic de 0,83 mg/L 1 heure après la fin de l'exposition (2,27 mg/L si le prélèvement sanguin était traité par une sulfatase, ce qui suppose une sulfatation de l'isopropanol) (WHO 1990a, INRS 2016b).

Brugnone *et al.* (1983) ont analysé l'air alvéolaire de 12 employés en imprimerie exposés à des teneurs atmosphériques d'isopropanol comprises entre 7 et 645 mg/m³. La concentration d'isopropanol alvéolaire était comprise entre 4 et 437 mg/m³, avec un taux d'absorption de 0,03 à 6,6 mg/min, hautement corrélé à la dose d'exposition ($r=0,92$).

L'isopropanol peut également être absorbé en faible quantité par la peau.

Dans les études de pénétration cutanée *in vitro*, le taux d'absorption sur peau humaine est inférieur à 1 % en relation avec l'évaporation de l'alcool ; en système clos, le taux peut atteindre un peu plus de 7%. La vitesse d'absorption déterminée dans les essais *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal est inférieure à 2 mg/cm²/h.

Morris *et al.* (1995) ont étudié la pénétration cutanée *in vitro* de l'isopropanol marqué au ¹⁴C au travers d'échantillons de peau (épaisseur complète) de différentes espèces (souris, rat, homme). 250 µL de solution d'isopropanol à 70 % ont été appliqués par échantillon. La durée

de l'exposition était de 6 heures. Sous conditions occlusives, aucune différence significative n'a été retrouvée en fonction du type de peau, en termes de flux à l'état stationnaire et constante de perméabilité :

	souris	rat	humain
Flux à l'état stationnaire (mg/cm²/h)	1,88	1,30	1,65
Constante de perméabilité (Kp) (cm/h)	3,37 10 ⁻³	2,39 10 ⁻³	3,00 10 ⁻³

En revanche, le taux d'absorption était plus important chez la souris (11,6%) comparativement au rat (6,4%) et à l'homme (7,1%). En conditions non occlusives, les proportions d'alcool absorbé par la peau de souris, rat et peau humaine étaient respectivement 4, 9 et 12 fois moins importantes (3,0, 0,7, et 0,6%).

Ces résultats montrent une plus forte perméabilité de la peau de souris parmi les trois espèces testées, tandis que la peau de rat semble être un modèle plus proche de la peau humaine pour ce qui est de la pénétration cutanée. Les quantités absorbées et vitesse de pénétration sont relativement faibles. Les résultats en système ouvert indiquent que l'isopropanol en exposition cutanée sera davantage évaporé plutôt qu'absorbé.

[Boatman et al. \(1998\)](#) ont étudié *in vivo*, chez le rat, la cinétique d'absorption de l'isopropanol administré par voie cutanée. Un volume de 0,3 mL d'une solution d'isopropanol à 70% p/p a été appliqué de façon topique sous occlusion sur le dos rasé (4,3 cm²) de 8 rats (4 mâles et 4 femelles) durant 4 heures. La concentration sanguine a progressivement augmenté au cours des 4 heures, pour atteindre un pic de $\pm 0,2$ $\mu\text{mole/g}$ (0,19 chez les mâles et 0,24 chez les femelles), et a rapidement diminué dès le retrait du produit d'essai. Le taux sanguin d'acétone a augmenté de façon constante sur des durées un peu plus longues, avec un pic obtenu à 4,5 heures chez les mâles (0,79 $\mu\text{mole/g}$), et à 5 heures chez les femelles (1,17 $\mu\text{mole/g}$). Les demi-vies d'élimination d'ordre 1 pour l'isopropanol et l'acétone étaient similaires dans les deux sexes avec des valeurs moyennes de 0,8 h (0,77 à 0,93) pour l'isopropanol et 2,1 h (2,1 à 2,2) pour l'acétone.

Dans une autre expérimentation étudiant les vitesses d'absorption de l'isopropanol après application topique, 0,3 mL d'isopropanol à 70% p/p marqué au ¹⁴C ont été appliqués sous occlusion sur le dos rasé de 6 rats (3 mâles et 3 femelles) ([Boatman et al. 1998](#)). Les deux méthodes de calcul utilisées (l'une basée sur le CO₂ expiré, l'autre sur la radioactivité totale (urine, eau de lavage de la cage, fèces, CO₂ et volatiles expirés)) ont donné des résultats similaires.

	Mâles	Femelles
Vitesses d'absorption (mg/cm²/h)	0,78 \pm 0,03 ou 0,85 \pm 0,04	0,77 \pm 0,13 ou 0,78 \pm 0,16
Constante de perméabilité (Kp) (cm/h)	1,37 x 10 ⁻³ ou 1,50 x 10 ⁻³	1,35 x 10 ⁻³ ou 1,37 x 10 ⁻³

Aucune différence entre les deux sexes n'a été observée. Les auteurs précisent que selon l'échelle de [Marzulli et al. \(1969\)](#), l'absorption cutanée chez le rat de l'isopropanol appliqué par voie topique sous occlusion serait qualifiée de rapide.

Pour évaluer la part d'absorption cutanée *versus* la part de l'inhalation dans l'exposition systémique à l'isopropanol suite à une application par voie cutanée, en relation avec les propriétés volatiles de l'alcool, [Martinez et al. \(1986\)](#) ont exposé des lapins à de l'isopropanol par application de lingettes imbibées d'isopropanol durant 4 heures, en excluant le contact cutané dans un groupe contrôle par l'ajout d'un film plastique entre la peau et la lingette. Dans cet essai, les taux d'isopropanol et acétone sanguins étaient significativement plus élevés que dans le groupe contrôle, concluant à une contribution significative de la voie cutanée.

Chez l'homme, plusieurs études ont été réalisées pour étudier les niveaux d'exposition systémique induite à l'isopropanol en relation avec l'utilisation des produits hydro-alcooliques (PHA) par le personnel de santé (tableau 9). Le détail de ces études est présenté en annexe 1.

Après exposition répétée à l'isopropanol par friction hydroalcoolique des mains dans des conditions plus ou moins représentatives des expositions professionnelles aux PHA, les teneurs sanguines en isopropanol mesurées étaient faibles, comprises entre 0 et 10 mg/L.

Aucune détection d'isopropanol (seuil de détection de 1 mg/L) n'a été retrouvée dans les prélèvements sanguins effectués chez 20 volontaires 5 à 7 minutes après réalisation de 30 frictions sur une heure avec un produit à base de 70% d'isopropanol (utilisation de 36 à 45 mL de produit) ([Brown et al. 2007](#)).

Les taux sanguins d'isopropanol détectés suite à 24 frictions de 3 mL sur 4 heures (72 mL au total) avec un produit à base de 52,6% p/p d'isopropanol étaient compris entre 0,5 et 1,8 mg/L (étude sur 10 volontaires) ([Turner et al. 2004](#)).

Dans une autre étude utilisant des PHA contenant 63,14 ou 45 % p/p d'isopropanol, les taux sanguins médians maximum mesurés chez 12 volontaires après 20 traitements hygiéniques sur 30 minutes ou 10 désinfections chirurgicales sur 80 minutes étaient compris entre 4,9 et 10 mg/L ; dans des conditions d'utilisation chirurgicale réelles avec 1 traitement hygiénique et 3 frictions chirurgicales sur une période de 4 heures, les taux médians mesurés chez 10 chirurgiens étaient compris entre 1,24 mg/mL et 2,56 mg/mL ([Below et al. 2012](#)).

Dans l'étude de [Below et al. \(2012\)](#) citée ci-dessus, le taux d'absorption cutanée a également été évalué et n'excédait pas 1,1% (taux compris entre 0,4 et 1,1% en fonction des scénarios).

Aucune absorption cutanée de l'isopropanol n'a été mise en évidence dans une étude menée en conditions occlusives pour exclure la part de l'inhalation dans l'exposition.

Dans une étude chez 14 volontaires étudiant l'absorption de l'isopropanol en conditions occlusives pour éviter l'évaporation de l'alcool, l'isopropanol n'a pas pu être détecté dans les prélèvements sanguins effectués 5 et 50 minutes après la fin de l'exposition (20 mL pendant 20 min), au seuil de détection de 0,5 mg/L. Il faut cependant préciser que la teneur en isopropanol dans les produits testés n'était que de 10% p/p ([Kirschner et al. 2009](#)).

Tableau 9 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique à l'isopropanol suite à une exposition par voie cutanée (revue bibliographique)

Isopropanol	N ¹	Protocole	Résultat	Référence																												
70% p/p	20	30 frictions (1,2 à 1,5 mL) en 1 h utilisation de 36 à 45 mL de produit	<table border="1"> <tr> <td>Isopropanol sanguin*</td> <td>< LOD² (1 mg/L)</td> </tr> </table> <p>*mesures 1 à 2 min après l'exposition</p>	Isopropanol sanguin*	< LOD ² (1 mg/L)	Brown <i>et al.</i> (2007)																										
Isopropanol sanguin*	< LOD ² (1 mg/L)																															
52,6 % p/p	10 5 ♂ 5 ♀	3 mL toutes les 10 minutes durant 4 heures (exposition à 72 mL au total)	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>T₀</td> <td>T_{4h}*</td> </tr> <tr> <td>Isopropanol sanguin</td> <td>< LOD² (0,5 mg/L)</td> <td>de 0,5 à 1,8 mg/L (n=9/10)</td> </tr> </table> <p>* 5 min après la fin de l'essai</p>		T ₀	T _{4h} *	Isopropanol sanguin	< LOD ² (0,5 mg/L)	de 0,5 à 1,8 mg/L (n=9/10)	Turner <i>et al.</i> (2004)																						
	T ₀	T _{4h} *																														
Isopropanol sanguin	< LOD ² (0,5 mg/L)	de 0,5 à 1,8 mg/L (n=9/10)																														
63,14 % p/p 45 % p/p	12 6 ♂ 6 ♀	Protocole 1 1A/20 frictions de 30 sec avec 4 mL de produit chacune espacées d'1 minute 1B/10 frictions de 3 minutes avec 5x4 mL de produit chacune, espacées de 5 minutes <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Produit (% Isopropanol)</th> <th colspan="2">Quantité d'isopropanol appliquée</th> </tr> <tr> <th>1A/ (sur 30 min)</th> <th>1B/ (sur 80 min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (63,14%)</td> <td>44,25 g</td> <td>110,62 g</td> </tr> <tr> <td>B (45%)</td> <td>30,64 g</td> <td>76,6 g</td> </tr> </tbody> </table> Rq : B contenait également 30 % p/p de n-propanol et 0,2 % p/p d'éthylsulfate de mecetronium	Produit (% Isopropanol)	Quantité d'isopropanol appliquée		1A/ (sur 30 min)	1B/ (sur 80 min)	A (63,14%)	44,25 g	110,62 g	B (45%)	30,64 g	76,6 g	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="3"></th> <th colspan="3">Isopropanol sanguin mg/L</th> </tr> <tr> <th rowspan="2">Ct₀*</th> <th colspan="2">C_{max} durant essai</th> </tr> <tr> <th>1A/</th> <th>1B/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (63,14%)</td> <td>< LOD²</td> <td>5,3</td> <td>5,8</td> </tr> <tr> <td>B (45%)</td> <td>(0,03 mg/L)</td> <td>4,9</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> <p>*taux basal médian avant essai</p>		Isopropanol sanguin mg/L			Ct ₀ *	C _{max} durant essai		1A/	1B/	A (63,14%)	< LOD ²	5,3	5,8	B (45%)	(0,03 mg/L)	4,9	10	Below <i>et al.</i> (2012)
	Produit (% Isopropanol)	Quantité d'isopropanol appliquée																														
1A/ (sur 30 min)		1B/ (sur 80 min)																														
A (63,14%)	44,25 g	110,62 g																														
B (45%)	30,64 g	76,6 g																														
	Isopropanol sanguin mg/L																															
	Ct ₀ *	C _{max} durant essai																														
		1A/	1B/																													
A (63,14%)	< LOD ²	5,3	5,8																													
B (45%)	(0,03 mg/L)	4,9	10																													
10 6 ♂ 4 ♀	Test d'usage avec et sans protection respiratoire 3 interventions chirurgicales de 90 minutes chacune <ul style="list-style-type: none"> - 1 friction hygiénique de 30 sec. 10 min. avant la 1^{ère} intervention, - 1 friction chirurgicale d'1 min. ½ avant chaque intervention <table border="1"> <thead> <tr> <th>Produit (% Isopropanol)</th> <th>Quantité d'isopropanol appliquée sur 4 heures</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (63,14%)</td> <td>18,25 g</td> </tr> <tr> <td>B (45%)</td> <td>12,64 g</td> </tr> </tbody> </table> Protocole 2/ sans protection respiratoire Protocole 3/ avec protection respiratoire Rq : B contenait également 30 % p/p de n-propanol et 0,2 % p/p d'éthylsulfate de mecetronium	Produit (% Isopropanol)	Quantité d'isopropanol appliquée sur 4 heures	A (63,14%)	18,25 g	B (45%)	12,64 g	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="3"></th> <th colspan="3">Isopropanol sanguin mg/L</th> </tr> <tr> <th rowspan="2">Ct₀*</th> <th colspan="2">C_{max} durant essai</th> </tr> <tr> <th>2/**</th> <th>3/***</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (63,14%)</td> <td>< LOD²</td> <td>1,70</td> <td>1,74</td> </tr> <tr> <td>B (45%)</td> <td>(0,03 mg/L)</td> <td>2,56</td> <td>1,24</td> </tr> </tbody> </table> <p>*taux basal médian avant essai ** exposition dermique et respiratoire *** exposition dermique</p>		Isopropanol sanguin mg/L			Ct ₀ *	C _{max} durant essai		2/**	3/***	A (63,14%)	< LOD ²	1,70	1,74	B (45%)	(0,03 mg/L)	2,56	1,24							
Produit (% Isopropanol)	Quantité d'isopropanol appliquée sur 4 heures																															
A (63,14%)	18,25 g																															
B (45%)	12,64 g																															
	Isopropanol sanguin mg/L																															
	Ct ₀ *	C _{max} durant essai																														
		2/**	3/***																													
A (63,14%)	< LOD ²	1,70	1,74																													
B (45%)	(0,03 mg/L)	2,56	1,24																													
10% p/p dans l'eau ou en présence d'éthanol (74,1% p/p)	14 ♂	Application sous pansement occlusif durant 10 minutes	<table border="1"> <tr> <td>Isopropanol sanguin*</td> <td rowspan="2">< LOD² (0,5 mg/L)</td> </tr> <tr> <td>Acétone sanguin*</td> </tr> </table> <p>*mesures avant puis 15 et 60 min après le début de l'essai</p>	Isopropanol sanguin*	< LOD ² (0,5 mg/L)	Acétone sanguin*	Kirschner <i>et al.</i> (2009)																									
Isopropanol sanguin*	< LOD ² (0,5 mg/L)																															
Acétone sanguin*																																

¹N : Nombre de volontaires - ² LOD : limite de détection

Sur peau lésée ou peau non mature, la pénétration de l'alcool sera plus importante. Un mauvais usage peut être à l'origine d'intoxication chez l'enfant. Des cas de coma profond en pédiatrie ont été rapportés, résultant de traitement par des éponges imprégnées d'isopropanol à 70% pour la réduction de la fièvre (Lewin *et al.* 1977, Senz *et al.* 1958).

II.2.2.2. Distribution

L'isopropanol est rapidement distribué dans tout l'organisme, en particulier le foie, les reins et le cerveau. Il traverse facilement la barrière méningée (INRS 2016b). Après ingestion chez l'homme d'une quantité inconnue de produit de friction alcoolique à base d'isopropanol, l'isopropanol et l'acétone ont été retrouvés dans le liquide cérébro-spinal à des taux similaires aux taux sériques 6 heures après l'admission aux urgences (Natowicz *et al.* 1985).

II.2.2.3. Métabolisme

Le métabolisme et l'élimination de l'isopropanol sont résumés dans la figure 2 ci-dessous.

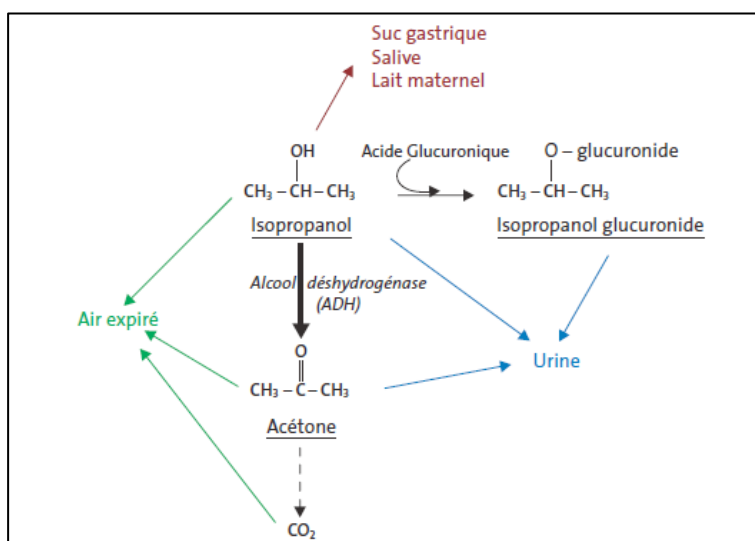


Figure 2 : Métabolisme et élimination de l'isopropanol (INRS 2016b)

L'isopropanol est oxydé en acétone sous l'action de l'alcool-déshydrogénase (ADH). Lorsque du pyrazole ou du 4-méthylpyrazole (inhibiteurs de l'ADH) a été administré à des rats avant l'exposition à l'isopropanol, son élimination et la production d'acétone étaient retardées. Dans une étude effectuée chez le lapin avec administration *i.v.* d'isopropanol (750 et 1300 mg/kg p.c.), cette voie métabolique comptait pour 64 à 84% de la dose administrée. Cette voie métabolique sature avec l'augmentation des niveaux d'exposition. Chez le rat, le ratio acétone/isopropanol sanguin diminue avec augmentation de la concentration en isopropanol à partir de 4000 ppm environ (WHO 1990a). En présence d'éthanol, la

métabolisation de l'isopropanol en acétone par l'ADH hépatique est ralentie en raison d'une plus faible affinité relative de l'ADH pour l'isopropanol. Son élimination a été retardée chez des rats ayant reçu de l'éthanol en association à l'isopropanol. *In vitro*, l'activité de l'ADH humaine vis-à-vis de l'isopropanol n'est que de 9 à 10 % de celle de l'éthanol (WHO 1990a). Le métabolisme de l'isopropanol est également retardé en présence de n-propanol, en raison d'une affinité enzymatique accrue de l'ADH pour le n-propanol (INRS 2016c).

L'acétone est directement éliminée sous cette forme ou dégradée en acétate et formiate pour aboutir à la formation de CO₂. L'acétone est un métabolite physiologique produit lors de la céto-genèse à partir de la dégradation des acides gras ; en conséquence, l'acétone se retrouve de façon naturelle dans le sang indépendamment d'une exposition systémique à l'isopropanol, à des teneurs allant de 0,01 mg/L à 10 mg/L. Un taux élevé d'acétone urinaire est un marqueur de l'exposition possible à l'isopropanol. A l'inverse, l'isopropanol peut être produit à partir d'acétone par métabolisme réducteur en présence de suffisamment de NAD et NADP (nicotinamide adénine dinucléotide et nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate). Ainsi, des niveaux élevés d'acétone peuvent conduire à une augmentation de la concentration sanguine d'isopropanol (WHO 1990a, Below *et al.* 2012). Les teneurs sanguines endogènes naturelles d'isopropanol rapportées dans la littérature varient également de 0,01 mg/L à 10 mg/L (Below *et al.* 2012).

Une voie auxiliaire de métabolisme existe également telle que démontrée chez le lapin avec 10,2% de la dose administrée *p.o.* (3000 mg/kg) retrouvée dans les urines sous forme de glucuronide (WHO 1990a). Cette voie métabolique existe chez l'homme également. Une publication d'Arndt *et al.* (2016) décrit des taux urinaires importants d'isopropyl glucuronide après intoxication à l'isopropanol par consommation orale de produit hydro-alcoolique formulé à base de cet alcool (63% v/v).

II.2.2.4. Elimination

Chez le rat et la souris, quelle que soit la voie d'exposition, la voie d'excrétion principale est l'air expiré. L'excrétion n'est pas influencée par le sexe ou une exposition répétée ; la voie d'exposition ou la dose influencent la forme sous laquelle l'isopropanol est exhalé (inchangé ou transformé en acétone).

Teramoto *et al.* (1987) ont étudié *in vivo* chez le rat l'élimination de l'isopropanol par les voies respiratoires, après administration de 0,1 mL d'isopropanol par voie intrapéritonéale. Tous les animaux ont montré des profils d'élimination semblables en termes de concentrations d'isopropanol et d'acétone dans l'air expiré. Les demi-vies biologiques de l'isopropanol et de l'acétone ont été évaluées à environ 30 min et 5 heures respectivement. Environ 2 % de la dose administrée d'isopropanol a été excrétée *via* l'air expiré sous forme inchangée.

Slauter *et al.* (1994) ont également étudié l'élimination de l'isopropanol *in vivo* chez l'animal. Des rats et souris ont reçu de l'isopropanol par voie intraveineuse (300 mg/kg), par inhalation (500 ppm et 5000 ppm pendant 6 heures) et par voie orale (dose unique ou répétée

de 300 et 3000 mg/kg). Chez le rat, environ 81 à 89 % de la dose administrée a été éliminée dans l'air expiré sous forme d'acétone, de CO₂ et sous forme d'isopropanol non métabolisé. Chez la souris, environ 76 % de la dose iv et 92% de la dose par inhalation ont été éliminés dans l'air expiré. Environ 3 à 8 % de la dose administrée a été éliminée dans les urines sous forme inchangée ou sous forme d'acétone et d'isopropanol glucuronide. Seules de petites quantités de C¹⁴ ont été retrouvées dans les matières fécales et les carcasses. Aucune différence majeure dans les taux et les voies d'excrétion n'a été observée entre les sexes ou les voies d'administration. L'exposition répétée n'a pas eu d'effet significatif sur l'excrétion. En revanche, le niveau d'exposition par inhalation a influencé la forme sous laquelle l'isopropanol était exhalé, avec un pourcentage plus élevé d'isopropanol non métabolisé retrouvé dans l'air expiré après exposition à 5000 ppm, comparativement à 500 ppm, indiquant une saturation du métabolisme.

L'élimination de l'isopropanol marqué au C¹⁴ a également été étudiée *in vivo* chez le rat après administration par voie cutanée ou intraveineuse (Boatman *et al.* 1998). Par voie *i.v.* (dose nominale de 6 mg/rat), 50 à 55% de la dose administrée ont été éliminés dans les 48 heures par les voies respiratoires sous forme de ¹⁴CO₂. Une élimination sous forme de COV expiré et par voie urinaire a également été retrouvée, à hauteur respective de 20-26% et 5-6%. Le taux de récupération était de 83%. Par voie cutanée (application dorsale sur peau rasée de 0,3 mL d'isopropanol sous occlusion), la majorité de la dose appliquée (84 à 86%) a été récupérée au niveau du site d'application. Environ 6 % de la dose ont été retrouvés dans l'air expiré (CO₂ et COV). Le taux de récupération total était de 91 à 92%.

L'isopropanol est également excrété dans le suc gastrique et la salive chez le chien et dans le lait maternel chez le rat. L'excrétion urinaire de l'isopropanol et de l'acétone est limitée et n'excède pas 4 % chez le rat, le lapin et le chien. (INRS 2016b)

L'élimination du sang suit une cinétique de 1^{er} ordre avec des demi-vies de l'ordre de 4 heures chez le chien et de 2 heures chez le rat ; les demi-vies de l'acétone sont de 11 et 5 heures respectivement (INRS 2016b).

Chez l'homme, dans une étude portant sur 10 volontaires ayant ingéré 3,75 mg/kg d'isopropanol (et 1200 mg/kg d'éthanol) sur 2 heures, l'isopropanol a été retrouvé dans l'urine, avec un taux d'excrétion urinaire totale de l'isopropanol de 1,9 % de la dose, pour partie sous forme de glucuronide (WHO 1990a, INRS 2016b).

L'étude de Brugnone *et al.* (1983) réalisée chez 12 employés en imprimerie exposés à des teneurs atmosphériques d'isopropanol comprises entre 7 et 645 mg/m³, a montré une concentration d'isopropanol alvéolaire fortement corrélée à l'exposition. Des concentrations élevées d'acétone (mais pas d'isopropanol) ont été retrouvés dans le sang (0,76 - 15,6 mg/L) et l'air alvéolaire (entre 3 et 93 mg/m³), avec des concentrations croissantes en fonction de la durée de l'exposition et une relation linéaire avec les taux d'isopropanol alvéolaire. De l'acétone a également été retrouvé dans les urines (de 0,85 à 53,7 mg/L), avec des taux corrélés à l'absorption alvéolaire de l'isopropanol et les taux sanguins d'acétone. Les clairances pulmonaires et rénales de l'acétone étaient de 41 à 97 et de 0,1 à 3 mL/min,

respectivement, pour 8 sujets, montrant une élimination de l'acétone essentiellement pulmonaire. L'excrétion pulmonaire de l'acétone variait de 10,7 à 39,8 % de la dose absorbée et été inversement proportionnelle au niveau d'exposition.

L'élimination totale de l'isopropanol suit une cinétique d'ordre 1, avec une demi-vie de 6,4 heures ; la demi-vie de l'acétone est de 22 heures, avec une élimination totale estimée à 75 heures (Natowicz *et al.* 1985). Les concentrations sanguines d'acétone sont plus faibles en présence d'éthanol, ce dernier étant un meilleur substrat de l'ADH que l'isopropanol. Chez les personnes consommant de l'alcool, la demi-vie d'élimination de l'isopropanol est de 2,5 à 3 heures ; le taux d'acétone diminue lentement pendant 30 heures. (INRS 2016b)

L'isopropanol et l'acétone ont également été mesurés dans les lavages gastriques et la salive. L'élimination par ces voies peut conduire à une réabsorption consécutive (WHO 1990a, INRS 2016b).

II.2.2.5. Résumé

L'isopropanol pénètre dans l'organisme par les voies digestive et pulmonaire, avec un taux d'absorption important (> 80% en 30 minutes). L'isopropanol peut également pénétrer par voie cutanée. Cependant, en raison de l'évaporation de l'alcool, le taux d'absorption cutanée est faible, évalué comme étant inférieur à 1% sur peau humaine dans un essai *in vitro* en conditions non occlusives, et estimé à 1,1 % maximum dans un essai sur volontaires exposés à l'isopropanol lors de l'utilisation de produits hydro-alcooliques (PHA).

L'isopropanol absorbé est distribué dans tout l'organisme. Son métabolisme est majoritairement oxydatif par la voie de l'ADH, à l'origine de la formation d'acétone, éliminé sous forme inchangée dans l'air expiré et les urines, ou dégradé en acétate et formiate sous l'action de l'ALDH pour aboutir à la formation de CO₂. Il existe une voie auxiliaire de métabolisation par conjugaison directe avec l'acide glucuronique. L'isopropanol glucuronide formé est éliminé par voie urinaire. Une partie de l'isopropanol est également éliminée sous forme inchangée par l'air expiré et par voie urinaire.

En présence d'éthanol ou de n-propanol, le métabolisme de l'isopropanol est retardé en raison d'une affinité plus faible de l'ADH pour cet alcool.

En situation d'exposition professionnelle lors de l'utilisation des PHA, les études disponibles chez l'homme concluent à un niveau d'exposition systémique faible. Lorsque de l'isopropanol a été retrouvé, les quantités absorbées mesurées n'excédaient pas 10 mg/L, quantité pouvant être retrouvée en valeur basale chez l'homme indépendamment de situations d'exposition à l'isopropanol.

II.2.3. n-propanol

II.2.3.1. Absorption

Chez l'animal le n-propanol est absorbé relativement rapidement par le tractus gastro-intestinal.

Chez le rat, le pic sanguin apparaît 1,5 heure après administration d'une dose de 3 000 mg/kg de n-propanol par intubation gastrique. La concentration maximale était d'environ 1 800 mg/L, et le taux sanguin a diminué rapidement jusqu'à ne plus être détecté dans les 5 heures suivant l'ingestion (Beauge *et al.* 1979). Dans une autre étude chez le rat avec administration de n-propanol par intubation (2,9 mmol/kg soit 174 mg/kg), le pic sanguin a été observé à 1 heure (Fahelbum & Sybil 1979). Dans une étude chez la souris, l'absorption était rapide, avec un niveau sanguin maximal 10 min après administration par intubation orale, quelle que soit la dose administrée (1, 2 ou 4 g/kg de n-propanol). Les taux sanguins étaient de 320, 480 et 510 mg/L respectivement. Le protocole a été répété sur 4 jours consécutifs ; les résultats obtenus étaient les mêmes (Maickel & Nash 1985).

Il existe également une absorption par les voies respiratoires.

La détermination du taux sanguin chez le rat suite à une exposition par inhalation a été réalisée dans une étude de tératogénèse (Nelson *et al.* 1989). Des rats adultes ont été exposés à 3 500 ou 7 000 ppm de n-propanol (9 001 ou 14 893 mg/m³) durant 1, 10 ou 19 jours à raison de 7 heures par jour. Des groupes de rats jeunes et adultes ont également été exposés à une dose unique de 10 000 ppm (23 968 mg/m³). Chez le rat adulte, le taux sanguin était d'autant plus élevé que la dose était importante, avec des valeurs respectives de 26, 42 et 66 mg/L. Chez le jeune rat, l'exposition à 10 000 ppm a entraîné un taux sanguin nettement plus important que pour le rat adulte, de 1 640 mg/L. Après plusieurs jours d'exposition (10 et 19 jours), la concentration sanguine de n-propanol n'était plus mesurable à la faible dose et indépendante de la durée d'exposition pour la dose supérieure (INRS 2016c).

Le n-propanol peut également être absorbé par la peau à forte dose (INRS 2016c). *In vitro*, le coefficient de perméabilité mesuré avec de la peau humaine est de $1,7 \cdot 10^{-3}$ cm/h (INRS 2016c).

Chez l'homme, dans une étude sur 10 volontaires ingérant 3,75 mg/kg de n-propanol (et 1200 mg/kg d'éthanol) sur 2 heures, la teneur sanguine de n-propanol dosée à 2 heures était de 0,85 mg/L (0,92 mg/L si le prélèvement sanguin était traité par une sulfatase) (WHO 1990b, INRS 2016c).

L'exposition systémique au n-propanol en relation avec un traitement par voie cutané a également été évaluée chez l'homme (tableau 10). Le détail de ces études est repris en annexe 1.

Tableau 10 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique au n-propanol suite à une exposition par voie cutanée (revue bibliographique)

n-propanol	N ¹	Protocole	Résultat	Référence																					
18 % p/v	14 ♂	<p>patches occlusifs de 10 minutes Rq : le produit contenait aussi 45 % p/v d'éthanol</p>	<table border="1"> <tr> <td>n-propanol sanguin*</td> <td>< LOD² (0,5 mg/L)</td> </tr> </table> <p>*mesures avant puis 15, 30 et 60 min après le début de l'essai</p>	n-propanol sanguin*	< LOD ² (0,5 mg/L)	Lang et al. (2011)																			
n-propanol sanguin*	< LOD ² (0,5 mg/L)																								
70 % p/p et/ou 30 % p/p	12 6 ♂ 6 ♀	<p>Protocole 1 1A/20 frictions de 30 sec avec 4 mL de produit chacune espacées d'1 min. 1B/10 frictions de 3 minutes avec 5x4 mL de produit chacune, espacées de 5 min.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Produit (% n-propanol)</th> <th colspan="2">Quantité de n-propanol appliquée</th> </tr> <tr> <th>1A/ (sur 30 min)</th> <th>1B/ (sur 80 min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>B (30%)</td> <td>20,42 g</td> <td>51,05 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Rq : B contenait également 45 % p/p d'éthanol et 0,2 % p/p d'éthylsulfate de mecetronium</p>	Produit (% n-propanol)	Quantité de n-propanol appliquée		1A/ (sur 30 min)	1B/ (sur 80 min)	B (30%)	20,42 g	51,05 g	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="3"></th> <th colspan="3">n-propanol sanguin mg/L</th> </tr> <tr> <th rowspan="2">Ct₀*</th> <th colspan="2">C_{max} durant essai</th> </tr> <tr> <th>1A/</th> <th>1B/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>B (30%)</td> <td>< LOD² (0,13 mg/L)</td> <td>9,15</td> <td>18</td> </tr> </tbody> </table> <p>*taux basal médian avant essai</p>		n-propanol sanguin mg/L			Ct ₀ *	C _{max} durant essai		1A/	1B/	B (30%)	< LOD ² (0,13 mg/L)	9,15	18	Below et al. (2012)
	Produit (% n-propanol)	Quantité de n-propanol appliquée																							
1A/ (sur 30 min)		1B/ (sur 80 min)																							
B (30%)	20,42 g	51,05 g																							
	n-propanol sanguin mg/L																								
	Ct ₀ *	C _{max} durant essai																							
		1A/	1B/																						
B (30%)	< LOD ² (0,13 mg/L)	9,15	18																						
10 6 ♂ 4 ♀	<p>Test d'usage avec et sans protection respiratoire 3 interventions chirurgicales de 90 minutes chacune</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 friction hygiénique de 30 sec. 10 min. avant la 1^{ère} intervention, - 1 friction chirurgicale d'1 min. ½ avant chaque intervention <table border="1"> <thead> <tr> <th>Produit (% n-propanol)</th> <th>Quantité de n-propanol appliquée sur 4 heures</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (70%)</td> <td>18,25 g</td> </tr> <tr> <td>B (30%)</td> <td>12,64 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Protocole 2/ sans protection respiratoire Protocole 3/ avec protection respiratoire Rq : B contenait également 45 % p/p d'éthanol et 0,2 % p/p d'éthylsulfate de mecetronium</p>	Produit (% n-propanol)	Quantité de n-propanol appliquée sur 4 heures	A (70%)	18,25 g	B (30%)	12,64 g	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="3"></th> <th colspan="3">n-propanol sanguin mg/L</th> </tr> <tr> <th rowspan="2">Ct₀*</th> <th colspan="2">C_{max} durant essai</th> </tr> <tr> <th>2/**</th> <th>3/**</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A (70%)</td> <td>< LOD² (0,013 mg/L)</td> <td>4,08</td> <td>1,16</td> </tr> <tr> <td>B (30%)</td> <td></td> <td>2,14</td> <td>0,68</td> </tr> </tbody> </table> <p>*taux basal médian avant essai ** exposition dermique et respiratoire *** exposition dermique</p>		n-propanol sanguin mg/L			Ct ₀ *	C _{max} durant essai		2/**	3/**	A (70%)	< LOD ² (0,013 mg/L)	4,08	1,16	B (30%)		2,14	0,68
Produit (% n-propanol)	Quantité de n-propanol appliquée sur 4 heures																								
A (70%)	18,25 g																								
B (30%)	12,64 g																								
	n-propanol sanguin mg/L																								
	Ct ₀ *	C _{max} durant essai																							
		2/**	3/**																						
A (70%)	< LOD ² (0,013 mg/L)	4,08	1,16																						
B (30%)		2,14	0,68																						

¹N : Nombre de volontaires - ²LOD : limite de détection

Dans une étude menée sous conditions occlusives pour éviter l'évaporation de l'alcool, aucune quantité détectable de n-propanol n'a été retrouvée dans le sang.

14 volontaires ont reçu 20 mL d'un mélange d'éthanol à 45 % p/v et de n-propanol à 18 % p/v par patchs occlusifs de 10 minutes. Le n-propanol n'a été retrouvé dans aucun échantillon dosé (cinétique de mesures sur 60 minutes après le début de l'essai – limite de détection de 0,5 mg/L) (Lang *et al.* 2011).

Dans une autre étude réalisée sur volontaires avec deux produits contenant du n-propanol (l'un à 70 % p/p et l'autre à 30 % p/p) utilisés dans différents scénarios représentatifs des expositions professionnelles aux produits hydro-alcooliques (PHA), une exposition systémique au n-propanol a été retrouvée, avec des teneurs sanguines ne dépassant pas 20 mg/L, et des taux d'absorption correspondant compris entre 0,5 et 2,9 %.

Les taux sanguins médians maxima mesurés chez 12 volontaires après 20 traitements hygiéniques sur 30 minutes ou 10 désinfections chirurgicales sur 80 minutes avec un PHA contenant 30 % p/p de n-propanol étaient de 9,15 et 18 mg/L respectivement (taux d'absorption estimés à 2,9 et 1,8 % respectivement). Dans des conditions d'utilisation chirurgicale réelles avec 1 traitement hygiénique et 3 frictions chirurgicales sur une période de 4 heures, les taux médians mesurés chez 10 chirurgiens étaient inférieurs (2,14 mg/L - taux d'absorption estimés à 1,5 %), en relation avec une quantité de produit utilisée moins importante sur une durée plus longue. Les valeurs étaient nettement diminuées lorsque les personnes portaient un masque pour se prémunir de l'exposition par inhalation (0,68 mg/L - taux d'absorption estimés à 1,2%). L'essai en conditions d'utilisation chirurgicale réelles a également été réalisé avec un PHA plus concentré en n-propanol (70% p/p). Les taux sanguins maxima étaient de 4,08 mg/L sans masque et de 1,16 mg/L avec masque (taux d'absorption estimés à 1,3 et 0,5 % respectivement). Ces données suggèrent une part significative de l'absorption de l'alcool par les voies respiratoires (Below *et al.* 2012).

II.2.3.2. Distribution

Très soluble dans l'eau, le n-propanol se distribue rapidement dans tout l'organisme et en particulier dans le foie et le cerveau (INRS 2016c). Une dose de 450 mg/kg p.c. de n-propanol administrée par voie intrapéritonéale chez le rat a résulté en des concentrations similaires dans le cerveau, le sang et le foie 5 min après administration, suggérant une distribution rapide (WHO 1990b). Dans l'étude chez le rat de Fabelblum & James (1979) précédemment mentionnée, le produit d'essai (2,9 mmol/kg p.c. de n-propanol) était marqué au C¹⁴. La distribution tissulaire a été évaluée 6 heures après administration du traitement *p.o.* et était la plus élevée au niveau du foie (1,3 µmol/g de tissu), suivie par les reins (0,7 µmol/g), le sang (0,4 µmol/g), le cœur (0,3 µmol/g) et le cerveau (0,2 µmol/g).

II.2.3.3. Métabolisme

Comme pour l'éthanol et l'isopropanol, la principale voie métabolique du n-propanol est oxydative (Fig. 3).

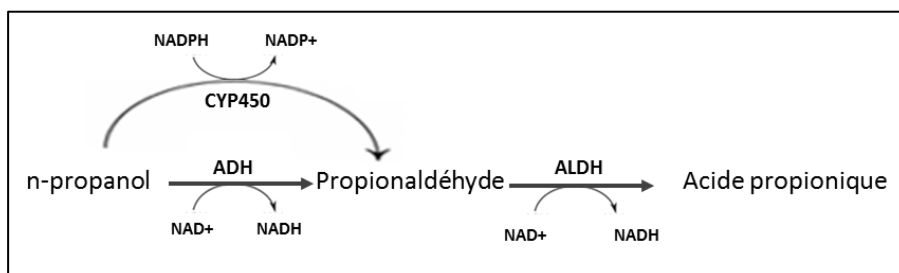


Figure 3 : Métabolisme oxydatif du n-propanol

Le n-propanol est oxydé dans le foie en propionaldéhyde majoritairement par l'alcool-déshydrogénase (ADH). L'activité de l'ADH constitue le facteur limitant du métabolisme. Dans une moindre mesure, et plutôt après exposition chronique, le n-propanol peut également être oxydé par le système d'oxydation microsomal impliquant des mono-oxygénases à cytochrome P450.

Le propionaldéhyde est ensuite oxydé par l'aldéhyde-déshydrogénase (ALDH) en acide propionique qui peut se conjuguer au co-enzyme A et entrer par différentes voies dans le cycle des acides tricarboxylique pour être catabolisé et finalement donner du dioxyde de carbone et de l'eau, ou participer à la synthèse de triglycérides (WHO 1990b, INRS 2016c).

Il a été démontré que l'affinité enzymatique de l'ADH et du système d'oxydation microsomal pour le n-propanol est supérieure à celle de l'éthanol ou de l'isopropanol. Le métabolisme de ces deux composés est donc retardé en présence de n-propanol (INRS 2016c). Ceci explique la cétonurie retardée observée chez un patient dans un cas d'intoxication par ingestion concomitante d'isopropanol et n-propanol rapporté par Vujasinović *et al.* (2007). Les analyses biochimiques ont révélé une acidose métabolique précoce et une élévation du trou anionique en raison de la métabolisation du n-propanol (production d'acide propionique et d'acide lactique), tandis que la cétonurie liée au métabolisme de l'isopropanol n'a été constatée qu'à un stade ultérieur 12 h après l'admission et 6 h après que le patient ait repris connaissance.

Il existe également un métabolisme non oxydatif du n-propanol qui peut se conjuguer à l'acide glucuronique pour ensuite être éliminé par voie urinaire (INRS 2016c).

La valeur systémique naturelle du n-propanol est très faible, rapportée comme comprise entre 0 et 48 µg/L (moyenne de 8 µg/L – données de 43 sujets) (Liebich *et al.* 1982).

II.2.3.4. Elimination

L'élimination du n-propanol est relativement rapide. La demi-vie sanguine est de 45 minutes chez le rat (INRS 2016c). Dans l'étude chez la souris de Maickel & Nash (1985) avec administration *p.o.* de 1, 2 ou 4 g/kg de n-propanol, l'élimination était complète (niveau sous la limite de détection) après 40 à 80 min selon la dose. La demi-vie d'élimination a été estimée à 57 min.

Le n-propanol est éliminé de l'organisme principalement par l'air expiré et dans une moindre mesure dans les urines.

Dans l'étude chez le rat avec administration orale de 2,9 mmol/kg *p.c.* de n-propanol marqué au C¹⁴, l'excrétion est principalement survenue *via* l'air expiré. Le 3^{ème} jour suivant le traitement, 74 % de la dose appliquée ont été excrétés par l'air, 5 % par l'urine et seuls 0,4 % ont été retrouvés dans les matières fécales (Fahelblum & James, 1979).

Le propyl-glucuronide a été mesuré dans l'urine du lapin (0,9 % d'une dose orale de 800 mg/kg) et du rat (0,13 % d'une dose orale de 2000 mg/kg). L'élimination urinaire est saturable au-delà de 1000 mg/kg par voie orale chez le rat et 1200 mg/kg par voie intrapéritonéale chez le lapin ; à des doses inférieures, l'élimination suit une cinétique d'ordre 1. Le n-propanol inchangé n'a pas été retrouvé dans les urines des animaux. (INRS 2016c)

Chez l'homme, dans une étude portant sur 10 volontaires ayant ingéré 3,75 mg/kg de n-propanol (et 1200 mg/kg d'éthanol) sur 2 heures, le n-propanol a été retrouvé dans l'urine, pour partie sous forme de glucuronide, avec un taux d'excrétion urinaire totale de 2,1 % de la dose. Cette excrétion diminue si la dose d'éthanol diminue. (WHO 1990b, INRS 2016c)

II.2.3.5. Résumé

Le n-propanol peut être absorbé par les voies digestives et respiratoires. Il peut également pénétrer dans l'organisme par voie cutanée. Cependant, en raison de l'évaporation de l'alcool, le taux d'absorption cutanée est faible, estimé à 2,9 % maximum dans un essai sur volontaires exposés au n-propanol par utilisation de produits hydro-alcooliques (PHA).

Le n-propanol absorbé est distribué dans tout l'organisme. Son métabolisme est majoritairement oxydatif par la voie de l'ADH, à l'origine de la formation de propionaldéhyde. Comme pour l'éthanol, il existe une voie d'oxydation secondaire impliquant des mono-oxygénases à cytochrome P450. Le propionaldéhyde formé est dégradé en acide propionique sous l'action de l'ALDH puis engagé dans la synthèse de triglycérides ou conjugué au co-enzyme A avant d'entrer dans le cycle des acides tricarboxylique pour finalement donner du dioxyde de carbone et de l'eau. Comme pour l'éthanol et l'isopropanol, il existe une voie auxiliaire de métabolisation par conjugaison directe avec l'acide glucuronique et élimination par voie urinaire. Une partie du n-propanol est également éliminée sous forme inchangée par l'air expiré.

L'affinité enzymatique de l'ADH pour le n-propanol est supérieure à celle de l'éthanol et de l'isopropanol. Il en est de même pour l'affinité du système d'oxydation microsomal vis-à-vis du n-propanol comparativement à l'éthanol.

En situation d'exposition professionnelle lors de l'utilisation des PHA, les études disponibles chez l'homme n'identifient pas d'exposition systémique significative compte tenu des faibles teneurs en n-propanol mesurées dans le sang.

II.3. Données toxicologiques

II.3.1. Toxicité aiguë

II.3.1.1. Ethanol

Le tableau 11 ci-dessous présente les résultats de plusieurs études de toxicité aiguë de l'éthanol.

Tableau 11 : Données de toxicité aiguë de l'éthanol (revue bibliographique)

Voie	Espèce et nombre	Doses	Observation	Résultat (DL ₅₀ /CL ₅₀)	Référence
Orale	Rats Sprague-Dawley 6 à 12 mâles par dose	Non précisé	7 j	Jeune rat (14 j) : 6 150 mg/kg p.c. Rat adulte : 17 750 mg/kg p.c. Adulte plus âgé : 11 520 mg/kg p.c.	Kimura et al. (1971)
Orale	Rats (Ratus Norvegicus) 8 femelles par dose	7 doses de 0,274 mmol à 0,377 mmol (16 à 22 mL/kg p.c.)	24 h	± 15 000 mg/kg p.c.	Youssef et al. (1992)
Orale	Rats Lapins Chiens	Non précisé	> 36 h	Rat : ± 10 200 mg/kg p.c. Lapin : ± 8 000 mg/kg p.c. Chien : ± 9 700 mg/kg p.c.	Lehman & Chase 1944
Orale	Souris SPF-NMRI 5 par dose/sexe	Au moins 3 doses administrées à 20 mL/kg	7 j	± 8350 mg/kg p.c.	Bartsch et al. (1976)
Inhalation	Souris CD-1 12 mâles par dose	40 000, 50 000 et 60 000 ppm durant 10 à 60 min (soit ± 76 500, 95 600 & 114 760 mg/m ³)	72 h	CL ₅₀ > 60 000 ppm (soit > ±114 760 mg/m ³)	Moser & Balster (1984)

Les valeurs de DL₅₀ orale s'étendent de 6 000 à 18 000 mg/kg chez le rat, en fonction des études et de l'âge de l'animal. La DL₅₀ orale est de l'ordre de 8 000 mg/kg chez la souris et le lapin et voisine de 10 000 mg/kg chez le chien. Une étude de toxicité aiguë par inhalation documente une valeur de CL₅₀ supérieure à 60 000 ppm chez la souris pour une heure d'exposition.

En complément, la fiche toxicologique de l'INRS sur l'éthanol rapporte des valeurs de DL₅₀ par voie orale comprises entre 5 et 20 g/kg pour les diverses espèces étudiées (souris, rats, cobayes, lapins, chiens) et des CL₅₀ par inhalation chez la souris voisines de 20 000 à 30 000 ppm (38 250 à 57 380 mg/m³) pour des expositions de 4 à 6 heures. ([INRS 2016a](#)).

Quelles que soient la voie d'administration et l'espèce considérées, les symptômes observés sont très semblables à ceux que l'on connaît chez l'homme. Ce sont essentiellement ceux d'une excitation puis d'une dépression du système nerveux central : ataxie, prostration, somnolence, paralysie et dyspnée. La mort survient par défaillance respiratoire ou circulatoire après baisse progressive de la tension artérielle. Dans le cas de l'inhalation, on note en plus une irritation des muqueuses respiratoires. L'examen anatomo-pathologique

révèle des lésions hépatiques : œdème des cellules périphériques des lobules, accumulation de lipides et notamment de triglycérides. (INRS 2016a)

Aucune étude de toxicité aiguë par voie dermale n'est disponible. Cependant, le rapport SIDS de l'OCDE portant sur l'évaluation initiale de l'éthanol mentionne une étude, estimant la DL₀ à 20 000 mg/kg chez le lapin. Cette étude donne un résultat cohérent avec le fait que l'absorption cutanée de l'éthanol est faible (OECD 2004b).

Chez l'homme, les manifestations observées en cas d'intoxication aiguë par ingestion sont essentiellement neuropsychiques (excitation intellectuelle et psychique, puis ivresse avec incoordination motrice, puis coma plus ou moins profond avec menace du pronostic vital par paralysie des centres respiratoires). Une atteinte des performances avec diminution du temps de réaction, de la coordination motrice et trouble du jugement est généralement observée à partir de concentrations sanguines d'éthanol de 0,2 g/L (INRS 2016a, Lachenmeier 2008).

En cas d'inhalation de vapeurs d'éthanol, les risques d'intoxication graves sont faibles car les effets anesthésiques se situent à un niveau de concentration où l'irritation provoquée est intolérable. Les essais réalisés sur volontaires ont permis de préciser les niveaux d'action suivants :

- 1380 ppm pendant 30 minutes : céphalée suivie d'un léger engourdissement ;
- 3340 ppm pendant 100 minutes : sensation de chaud et froid, irritation nasale, céphalée, engourdissement ;
- 5000 ppm : irritation immédiate des yeux et des voies aériennes supérieures (toux) disparaissant en 5 à 10 minutes ; odeur presque intolérable initialement mais acclimatation rapide ; très vite, céphalée, tension intra-oculaire, sensation de chaleur ; après 1 heure, engourdissement marqué ;
- 9000 ppm : en plus des symptômes ci-dessus, fatigue et somnolence après 30 minutes ;
- 20000 ppm : larmolement permanent, toux irrépressible, suffocation ; cette concentration n'est tolérable que pour de très courtes périodes.

Tous ces effets sont transitoires et disparaissent très vite après la fin de l'exposition. En cas d'expositions répétées, ou chez les sujets ingérant régulièrement de l'éthanol, un certain degré de tolérance apparaît : pour une même concentration atmosphérique, les symptômes sont moins sévères et le temps nécessaire pour les faire apparaître est plus long. (INRS 2016a)

II.3.1.2. Isopropanol

Le tableau 12 ci-dessous présente les résultats de plusieurs études de toxicité aiguë de l'isopropanol après exposition par voie orale, par inhalation ou par voie dermique.

Tableau 12 : Données de toxicité aiguë de l'isopropanol (revue bibliographique)

Voie	Espèce et nombre (si précisé)	Doses	Observation	Résultat (DL ₅₀ /CL ₅₀)	Référence
Orale	Rats Sherman 6 par dose	1 – 10 mL	Non précisé	5 840 mg/kg p.c.	Smyth & Carpenter (1948)
Orale	Rats Sprague-Dawley 6 à 12 mâles par dose	Non précisé	7 j	Jeune rat (14 j) 4 400 mg/kg p.c. Rat adulte : 4 700 mg/kg p.c. Adulte plus âgé : 5 350 mg/kg p.c.	Kimura <i>et al.</i> (1971)
Orale	Rats Lapins Chiens	Non précisé	> 36 h	Rat : ±5 300 mg/kg p.c. Lapin : ± 5 000 mg/kg p.c. Chien : ± 4 900 mg/kg p.c.	Lehman & Chase (1944)
Inhalation	Rats Sprague-Dawley 10 par dose par sexe	8000 à 26100 ppm durant 8 h (±19 900 à 65 100 mg/m ³)	15 j	Femelles : 19 000 ppm (± 47 400 mg/m ³) Mâles : 22 500 ppm (± 56 100 mg/m ³)	Laham <i>et al.</i> (1980)
Dermale	Lapins	Traitement occlusif de 24 h	Non précisé	16,4 mL/kg, soit 12 870 mg/kg p.c.	Smyth & Carpenter (1948)

Les valeurs de DL₅₀ orale s'étendent de 4 400 à 5 900 mg/kg chez le rat, en fonction des études et de l'âge de l'animal. La DL₅₀ orale est de l'ordre de 5 000 mg/kg chez le lapin et le chien. Une étude de toxicité aiguë par inhalation documente une valeur de CL₅₀ de 19 000 ppm chez le rat femelle et 22 500 ppm chez le rat mâle pour 8 heures d'exposition. Une étude par voie dermale chez le lapin documente une DL₅₀ voisine de 13 000 mg/kg.

En complément, la fiche toxicologique de l'INRS sur l'isopropanol documente des CL₅₀ par inhalation pour une exposition de 4 heures voisines de 30 000 ppm (72 600 mg/m³) chez le rat et 10 900 ppm (27 200 mg/m³) chez la souris. On y retrouve également des données complémentaires par voie dermale chez le rat et le chien, avec une DL₅₀ du même ordre de grandeur chez le rat que chez le lapin (12 800 mg/kg) mais plus basse chez le chien : 4 830 mg/kg (INRS 2016b).

Quelles que soient la voie d'administration et l'espèce considérées, les symptômes observés traduisent essentiellement une action sur le système nerveux central avec ataxie, prostration et coma. L'intensité et la rapidité d'apparition des signes toxiques sont fonction de l'importance des doses administrées et de la durée de l'exposition ; les animaux survivant à la narcose récupèrent totalement. À ces signes neurologiques sont associés parfois une hypothermie et des difficultés respiratoires, des vomissements en cas d'ingestion et une irritation sévère des muqueuses respiratoires en cas d'inhalation (INRS 2016b).

Chez le rat après exposition par inhalation à 8 000 ppm pendant 8 heures, l'examen anatomo-pathologique montre une congestion du foie, des poumons et de la rate. A 18 000 ou 20 000 ppm, une vacuolisation des cellules du foie, une pneumonie aiguë et un œdème de la rate ont été observés. A la dose de 21 000 ppm, un œdème pulmonaire et cérébral ainsi qu'une dégénérescence cytoplasmique sévère du foie ont également été observés. (Laham *et al.* 1980, INRS 2016b)

Chez l'homme, l'ingestion d'une solution aqueuse d'isopropanol (jusqu'à 40 mL d'une solution à 40 %) a provoqué, après quelques heures, des céphalées modérées à très sévères, transitoires à persistantes (jusqu'à 24 heures) et une sensation de dépression chez tous les sujets. Il n'y a ni euphorie ni incoordination des mouvements. L'ingestion simultanée d'une dose égale d'éthanol supprime les effets néfastes de l'isopropanol. L'ingestion accidentelle d'une dose massive de produit entraîne des troubles digestifs (vomissements répétés) et, 30 à 60 minutes après l'ingestion, un syndrome ébrieux pouvant aller jusqu'au coma calme, hypotonique et aréflexique, accompagné fréquemment d'hypothermie, de dépression respiratoire et d'hypotension ; celui-ci peut se compliquer d'hémorragie digestive ou d'insuffisance rénale aiguë. Des cas mortels ont été rapportés. L'étude anatomo-pathologique révèle alors des lésions stéatosiques du foie. (INRS 2016b)

Les patients avec des taux sanguins supérieurs à 1500 mg/L sont dans un profond coma. Dans 2 cas signalés d'intoxication par voie orale avec de l'isopropanol, les taux sanguins ont atteint 3150 mg/L et 4200 mg/L, doses mortelles en absence de soins intensifs (Petkovits *et al.* 1989). La dose de 500 mg/L est décrite comme générant une légère intoxication. Des cas précédemment rapportés d'intoxication aiguë suggèrent que les niveaux sanguins d'isopropanol inférieurs à 50 mg/L sont inoffensifs (Turner *et al.* 2004).

L'inhalation de vapeurs d'isopropanol à la concentration de 400 ppm n'a pas entraîné de perturbation des tests neuro-comportementaux pour une durée d'exposition de 8 heures. Des troubles posturaux ont néanmoins été constatés après 4 heures d'exposition. L'inhalation de concentrations élevées d'isopropanol peut entraîner des effets narcotiques sévères susceptibles de se compliquer de façon non spécifique d'un coma, d'une rhabdomyolyse, d'une défaillance rénale et, dans certains cas, d'un décès par dépression respiratoire. (INRS 2016b)

Douze sujets volontairement exposés à des vapeurs d'isopropanol pendant 3 à 5 minutes devaient évaluer les effets sur leurs yeux, nez et gorge (Nelson *et al.* 1943). Une irritation modérée des yeux, du nez et de la gorge ont été rapportés après 3 minutes d'exposition à 400 ppm. A 800 ppm, les effets n'étaient pas sévères, mais la majorité a déclaré l'atmosphère inconfortable. La plus forte concentration acceptable par la majorité des sujets pour une exposition de 8 heures était de 200 ppm.

En milieu industriel, aucune intoxication aiguë due à la seule inhalation de vapeurs d'isopropanol n'a été rapportée (INRS 2016b).

II.3.1.3. n-propanol

Le tableau 13 ci-dessous présente les résultats de plusieurs études de toxicité aiguë du n-propanol après exposition par voie orale, par inhalation ou par voie dermique.

Tableau 13 : Données de toxicité aiguë du n-propanol (revue bibliographique)

Voie	Espèce et nombre (si précisé)	Doses	Observation	Résultat (DL ₅₀ /CL ₅₀)	Référence
Orale	Rats Carworth-Wistar 5 mâles par dose	1 à 10 mL	14 j	± 1 870 mg/kg p.c.	<i>Smyth et al.</i> (1954)
Orale	Rats Osborne-Mendel ou Sherman 5 par dose par sexe	Non précisé	≤ 6 j	6 500 mg/kg p.c.	<i>Taylor et al.</i> (1964)
Inhalation	Rats albino 6 mâles	4 000 ppm durant 4 heures	14 j	> 9,8 mg/L (4000 ppm) (2 morts à cette dose)	<i>Smyth et al.</i> (1954)
Dermale	Lapin New Zealand 4 mâles par dose	Traitement occlusif de 24 heures sur 1/10 surface corporelle	14 j	± 4 023 mg/kg p.c.	<i>Smyth et al.</i> (1954)

Les valeurs de DL₅₀ orale s'étendent de 1 870 à 6 500 mg/kg chez le rat. Une étude de toxicité aiguë par inhalation conclut à une valeur de CL₅₀ supérieure à 4 000 ppm chez le rat mâle pour 4 heures d'exposition. Une étude par voie dermale chez le lapin documente une DL₅₀ voisine de 4 000 mg/kg.

Le rapport d'évaluation du risque de la commission européenne (ECB 2008) reprend des données complémentaires de toxicité aiguë par voie orale :

	<u>Rat</u>	<u>Lapin</u>	<u>Souris</u>
DL ₅₀ orale	8 000 mg/kg	2 823 mg/kg	5 467 mg/kg

En termes de toxicité par inhalation, aucune mortalité n'a été observée chez des rats exposés jusqu'à 13 548 ppm (33 870 mg/m³) (durée d'exposition non mentionnée - période d'observation de 14 jours). L'exposition à une concentration de 16 760 ppm (41 880 mg/m³) a été testée pendant 4 heures ou 6 heures (5 animaux par dose par sexe). Après une exposition de 4 heures, 2 mâles sont morts. Après une exposition de 6 heures, 5 mâles et 3 femelles sont morts. (ECB 2008)

Chez l'animal, l'effet majeur d'une exposition systémique au n-propanol est une dépression du système nerveux central. Les signes observés sont une incoordination motrice avec hypersalivation, ataxie, prostration, puis une narcose et un coma précédant la mort des animaux dans un intervalle de 2 à 18 heures après l'exposition. Chez les survivants, ces manifestations sont réversibles. L'autopsie des animaux morts après exposition orale révèle une inflammation des muqueuses digestives et une hyperémie du foie et des reins ; après inhalation, on observe un œdème pulmonaire avec des foyers hémorragiques. L'intensité et la rapidité d'apparition de la narcose sont liées à l'importance des doses : une narcose

profonde est observée chez la souris après inhalation d'une concentration de 50 mg/L pendant 2 heures et chez 50 % des lapins exposés par voie orale à 1440 mg/kg.

Le n-propanol augmente la perméabilité de la barrière méningée chez le chien : la concentration cérébrale d'une solution de fluorescéine, contenant 0,578 mg de n-propanol, injectée par voie intraveineuse, atteint un maximum en 10 minutes et revient à la normale en 3 heures.

Chez le rat, des doses orales de 3000 ou 6000 mg/kg provoquent une augmentation transitoire des triglycérides hépatiques liée à la présence d'une forte concentration sanguine en n-propanol. ([INRS 2016c](#))

Chez l'homme, l'ingestion de n-propanol serait responsable d'un effet irritant digestif avec nausées, vomissements, douleurs digestives, diarrhées et d'un effet dépressif du système nerveux central, sans stimulation préalable contrairement à l'éthanol. Sous forme de vapeurs, le n-propanol provoque une irritation des yeux, du nez et de la gorge. Le seuil d'irritation serait d'environ 400 ppm pour une exposition de 3 à 5 minutes chez des sujets sains et inaccoutumés. En cas d'inhalation de concentrations atmosphériques plus importantes, il peut apparaître des nausées, vertiges, céphalées et, au maximum, des effets dépressifs du système nerveux central. ([INRS 2016c](#))

II.3.1.4. Résumé et comparaison des alcools

En exposition aiguë, les 3 alcools présentent un niveau relativement faible de toxicité quelle que soit la voie d'exposition (voir négligeable par contact cutané pour l'éthanol).

A fortes concentrations, l'éthanol agit essentiellement sur le système nerveux central, induisant une excitation suivie d'une dépression avec somnolence, paralysie et dyspnée. Avec l'isopropanol et le n-propanol, la phase d'excitation n'est pas retrouvée. Ces 2 alcools agissent essentiellement sur le système nerveux central, induisant dépression et narcose.

Sur la base des valeurs de DL₅₀ ou CL₅₀ résumées dans le tableau 14 ci-dessous, l'éthanol semble présenter un niveau de toxicité aiguë moindre comparativement aux deux autres alcools, la toxicité de l'isopropanol apparaissant elle-même légèrement inférieure à celle du n-propanol.

Tableau 14 : Valeurs de DL₅₀/CL₅₀ de l'éthanol, isopropanol et n-propanol

	Espèce	Ethanol	Isopropanol	n-propanol
DL₅₀ orale	Rat	6 000 à 18 000 mg/kg selon l'âge	4 400 à 5 900 mg/kg selon l'âge	1 870 à 8 000 mg/kg
	Souris	8 350 mg/kg		5 467 mg/kg
	Lapin	8 000 mg/kg	5 000 mg/kg	2 823 mg/kg
	Chien	9 700 mg/kg	4 900 mg/kg	--
DL₅₀ dermique	Lapin	DL ₀ > 20 000 mg/kg	12 870 mg/kg	4 023 mg/kg
	Rat	--	12 800 mg/kg	--
	Chien	--	4 830 mg/kg	--
CL₅₀	Rat	--	72 600 mg/m ³ (4 h) 47 400 mg/m ³ (8 h - ♀) 56 100 mg/m ³ (8 h - ♂)	> 9 800 mg/m ³ (4 h)
CL₅₀	Souris	> 114 000 mg/m ³ (1 h) 38 250 mg/m ³ (4 h)	27 200 mg/m ³ (4 h)	--

II.3.2. Toxicité chronique/subchronique

II.3.2.1. Ethanol

II.3.2.1.1. Données chez l'animal

a) Toxicité par voie orale

Dans une étude de dose répétée sur 90 jours, des rats mâles Sprague-Dawley ont reçu de l'éthanol à un taux de 1, 2, 3, 4 ou 5% p/p dans leur alimentation ([Holmberg et al. 1986](#)). Aucun signe clinique et aucun effet sur le poids corporel n'ont été observés. Lors de l'autopsie, un jaunissement du foie a été observé chez certains animaux aux doses de 3 et 4 % et chez la plupart des animaux à la dose de 5 %. Le seul effet significatif observé dans les groupes à 1 % et 2 % était une stéatose centrolobulaire. Cependant, les animaux utilisés en tant que témoins caloriques et n'ayant reçu que du glucose présentaient également cet effet. Par conséquent, cette observation n'a pas été considérée comme un effet indésirable. Sur cette base, la NOAEL (dose sans effet indésirable observé) dérivée de cette étude était de 2 %, équivalent à une dose d'environ 3 900 mg/kg/j. La LOAEL (dose entraînant de faibles effets indésirables) était de 3%, équivalent à une dose d'environ 5 800 mg/kg/j.

Chez le rat Sprague-Dawley, l'administration pendant 90 jours d'éthanol dans l'eau de boisson à la concentration de 15 % (environ 10 g/kg) a provoqué un ralentissement de la croissance pondérale et une stéatose hépatique ([INRS 2016a](#)).

Les données disponibles sur le site de l'ECHA dans le cadre de l'enregistrement des substances au titre du règlement REACH reprennent les résultats d'une étude de toxicité chronique de l'uréthane chez la souris, incluant l'éthanol parmi les témoins ([ECHA, 2017b](#)). En effet, dans cette étude, deux groupes contrôles ont reçu de l'éthanol (5% dans l'eau de boisson) ou de l'eau pendant 90 jours. Chez les mâles, une augmentation du poids absolu et relatif du foie a été observée, ainsi qu'une augmentation du poids absolu du cœur, des reins et des poumons. Des signes accrus de néphropathie ont été retrouvés chez les souris mâles, mais l'augmentation n'était pas statistiquement significative. Le nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme était diminué d'environ 30 %. Les souris femelles n'ont montré aucun signe particulier en dehors d'une légère variation de la durée du dioestrus et pro-oestrus, mais la significativité biologique n'a pas été établie. La durée du cycle n'était pas significativement modifiée. Il ressort de cette étude, pour l'éthanol, une valeur de NOAEL supérieure à 5% (> 9 400mg / kg) pour les femelles et une LOAEL de 9 700mg / kg pour les mâles.

Chez le singe rhesus, l'ingestion d'éthanol (40 % de l'apport calorique) pendant 3 mois a entraîné une accumulation de triglycérides, de cholestérol et de phospholipides dans le sérum et le foie. Une augmentation des triglycérides et des esters de cholestérol ont également été retrouvés au niveau du muscle cardiaque ([Vasdev et al. 1975, INRS 2016a](#)).

Concernant les effets neurologiques de l'éthanol, pour un taux d'alcoolémie donné, la coordination neuromusculaire est meilleure chez les animaux ingérant régulièrement de l'éthanol que chez les animaux le consommant pour la première fois, en relation avec le développement d'une certaine tolérance. Il existe également une tolérance croisée avec d'autres alcools, dont l'isopropanol et le n-propanol (INRS 2016a).

b) Toxicité par inhalation

Dans une étude de toxicité à dose répétée par inhalation, des rats mâles Sprague-Dawley ont été exposés en continu à des vapeurs d'éthanol (dose de 20 mg/L (\pm 10 450 ppm) après une période d'acclimatation à 10 mg/L durant une semaine pour éviter une mortalité observée dans une étude précédente) pendant une durée allant jusqu'à 26 jours (Di Luzio & Stege 1979). Des groupes d'exposition intermédiaires ont été utilisés pour permettre de suivre les changements en termes de biochimie, d'histopathologie et de concentrations sanguines d'éthanol au cours du temps. L'étude a permis d'observer plusieurs effets transitoires (signes cliniques tels que léthargie et ataxie, légère vacuolisation des cellules hépatiques et des changements des paramètres biochimiques), mais chez les animaux exposés pendant la durée complète de 26 jours, le seul effet significatif observé était une augmentation des taux plasmatiques d'ALAT (alanine aminotransférases), qui n'a pas été considérée comme biologiquement significative. Il a pu être observé que les taux sanguins d'éthanol chez les animaux exposés pendant 26 jours étaient beaucoup plus faibles que ceux exposés pendant des durées plus courtes, en relation avec un métabolisme accru par induction enzymatique. La NOAEL dans cet essai était supérieure à 20 mg/L ($>$ 10 450 ppm).

Une autre étude de toxicité à dose répétée par inhalation sur 28 jours conduite chez le rat Sprague-Dawley n'a pas mis en évidence d'effet délétère significatif (Chu *et al.* 2005). Les animaux ont été exposés à des vapeurs d'éthanol de 0 ou 6 130 ppm (\pm 11 750 mg/m³), 6 heures/jour, 5 jours/semaine, pendant 4 semaines (15 animaux par groupe par sexe). Après exposition, seuls de légers effets adaptatifs généralement revenus à la normale après 4 semaines ont été observés. Aucun signe clinique de toxicité n'a été observé, ni changement tissulaire macroscopique ou microscopique sur les différents organes examinés (incluant le cœur, le foie, la rate, les reins, le cerveau, les testicules et le thymus). La NOAEL dans cet essai a été considérée supérieure ou égale à 6 130 ppm (\pm 11 750 mg/m³).

Chez les rats, cobayes, lapins, chiens et singes exposés par inhalation en continu à 46 ppm d'éthanol pendant 90 jours, comme chez les cobayes exposés 4 h/j, 6 j/sem, pendant 10 semaines à 3 000 ppm, aucune atteinte clinique, biologique ou histologique n'a été observée. Chez le rat et la souris, une inflammation et une nécrose hépatiques ont été observés après une exposition comprise entre 6 384 et 10 108 ppm pendant 9 jours. Dans des expérimentations plus anciennes réalisées à forte concentration, on a également signalé des atteintes hépatiques sévères (stéatoses, cirrhose, infiltrations péri-vasculaires

hémorragiques). Les effets sur le comportement ont disparu chez le rat après 8 jours d'exposition, 4 h/j à 24 000 ppm (INRS 2016a).

c) Toxicité par voie dermale

Aucune étude de toxicité subchronique ou chronique de l'éthanol par voie cutanée n'a été identifiée dans la littérature.

II.3.2.1.2. Données chez l'homme

Chez l'homme, les effets chroniques de l'éthylisme sont d'ordre neuropsychiques (polynévrite, atrophie cérébelleuse, troubles de la mémoire), digestifs (stéatose et cirrhose hépatiques, gastrite chronique, pancréatite), cardio-vasculaires (myocardiopathie, hypertension artérielle) et hématologiques (INRS 2016a).

Dans le cas d'inhalations répétées de vapeurs d'éthanol, des irritations des yeux et des voies aériennes supérieures, des céphalées, de la fatigue, une diminution des capacités de concentration et de vigilance ont été rapportées. Mais il n'est pas établi que cette inhalation chronique puisse avoir, notamment au niveau du foie et du myocarde, des répercussions semblables à celles d'ingestions excessives répétées. Toutefois, une étude portant sur 1282 travailleurs de l'industrie du caoutchouc et des pneumatiques, et comportant un suivi de 15 ans, a conclu à une association significative, chez les sujets de plus de 50 ans, entre exposition à l'éthanol et mortalité par cardiopathie ischémique ; chez ces sujets, manipulant une vingtaine de solvants, on a également trouvé un effet de l'exposition au disulfure de carbone et au phénol. Il semble actuellement qu'une consommation excessive d'alcool soit un facteur favorisant de l'athérosclérose et de ses conséquences, alors qu'une consommation faible aurait un pouvoir protecteur. Localement la répétition d'un contact cutané peut entraîner un érythème et un œdème, particulièrement s'il existe une occlusion gênant l'évaporation du produit (INRS 2016a).

II.3.2.2. Isopropanol

II.3.2.2.1. Données chez l'animal

a) Toxicité par voie orale

Les effets toxicologiques et neurotoxicologiques de l'isopropanol ont été étudiés chez des rats mâles SPF ayant reçu 0, 1, 2, 3 ou 5 % d'isopropanol dans leur eau de boisson pendant 12 semaines (22 rats par dose) (Pilegaard & Ladefoged 1993). La consommation moyenne était de 870 à 2 520 mg/kg/jour d'isopropanol. L'autopsie et les examens histopathologiques du foie, du cœur, de la rate, des testicules, des reins et des glandes surrénales ont été effectués. Le foie, les reins et les glandes surrénales avaient leur poids relatif augmenté de façon statistiquement significative et dose dépendante. Aucune anomalie n'a pu être attribuée au traitement, excepté de façon dose dépendante au niveau rénal (présence de gouttelettes hyalines dans les tubules proximaux). Le contenu de l'hippocampe dorsal en protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) a été mesuré de manière semi-quantitative par densitométrie. Aucune astrogliose n'a été détectée. Aucune dose sans effet indésirable n'a été déduite de cette étude. La LOAEL était de 870 mg/kg/j.

En termes de toxicité chronique par voie orale chez le rat (0, 600 ou 2300 mg/kg chez les mâles et 0, 1000 ou 3900 mg/kg chez les femelles dans l'eau de boisson pendant 27 semaines), les modifications observées sont un retard de croissance et des lésions rénales chez le mâle uniquement (INRS 2016b).

Dans ces études, la toxicité rénale n'ayant été observée que chez le rat mâle, on ne peut exclure qu'il s'agisse d'une néphropathie induite par l' α 2-microglobuline, sans transposition à l'homme. En effet, il est admis qu'une protéine spécifique du rat mâle, l' α 2 μ -globuline, joue un rôle crucial dans le développement des lésions rénales néoplasiques ou non néoplasiques chez cet animal. L' α 2-microglobuline est synthétisée principalement par le foie où son expression est régulée par des interactions complexes entre testostérone, glucocorticoïdes, insuline, hormones de croissance et hormones thyroïdiennes. Elle est facilement filtrée à travers les glomérules et environ 60% d' α 2-microglobuline du filtrat glomérulaire sont réabsorbés au niveau des tubules proximaux, le reste étant excrété. C'est une protéine urinaire majeure excrétée par le rat mâle adulte, représentant 30% de la totalité des protéines urinaires (Flamm & Lehman-McKeeman 1991).

b) Toxicité par inhalation

La toxicité subchronique de l'isopropanol par inhalation a été étudiée chez le rat (Fischer 344) et la souris (CD-1) (Burleigh *et al.* 1994). Les animaux ont été exposés à des vapeurs d'isopropanol à 0, 500, 1500 et 5000 ppm, 6 heures/jour, 5 jours/semaine, pendant 13 semaines (10 animaux par dose par sexe). La fonction neurocomportementale a

également été étudiée chez le rat aux mêmes doses d'exposition (groupes de 15 animaux par dose par sexe). Aucune mortalité imputable à l'isopropanol n'est survenue dans cette étude. Les effets narcotiques de l'isopropanol n'ont été observés qu'aux plus fortes doses de 1500 et 5000 ppm et ne perduraient pas après arrêt de l'exposition.

Chez le rat, les seuls signes cliniques de toxicité ont été retrouvés dans le groupe exposé à 5000 ppm, avec gonflement des tissus péri-oculaires, encrustations peri-nasales et ataxie. L'évaluation neurocomportementale n'a pas mis en évidence de changements notables, à l'exception d'une activité motrice accrue chez les femelles à 9 et 13 semaines de traitement. Après une semaine d'exposition à 5000 ppm d'isopropanol, une perte de poids absolu et relatif transitoire a été observée, suivie par la suite d'un gain de poids, comme pour le groupe exposé à 1 500 ppm d'isopropanol. A l'examen *post-mortem*, une augmentation notable du poids relatif du foie chez les rats mâles et femelles exposés à 5 000 ppm a été retrouvée, ainsi que des anomalies rénales microscopiques chez les rats mâles, mais de causalité avec le produit d'essai non établie en absence de relation dose-effet et du fait d'anomalies retrouvées également dans le groupe contrôle.

Chez la souris, les seuls signes cliniques de toxicité ont également été retrouvés avec la plus forte dose de 5000 ppm. Les femelles ont présenté une augmentation significative de leur poids corporel absolu et relatif. Leurs bilans sanguins ont présenté des anomalies hématologiques et biochimiques en relation avec une déshydratation. A l'examen *post-mortem*, une augmentation notable du poids relatif du foie chez les souris femelles exposés à 5 000 ppm a été retrouvée, mais sans altération histologique associée.

La concentration sans effet indésirable par inhalation dérivée de cette étude était de 5 000 ppm ($\pm 12\,470\text{ mg/m}^3$) chez le rat comme chez la souris. Il convient de mentionner que les auteurs n'ont pas déduit de dose sans effet indésirable dans la publication originale. Ces valeurs ont été publiées ultérieurement, après réévaluation des données par les auteurs ([Kapp et al. 1996](#)).

c) Toxicité par voie dermale

Aucune étude de toxicité subchronique ou chronique de l'isopropanol par voie cutanée n'a été identifiée dans la littérature.

II.3.2.2.2. Données chez l'homme

Dans une étude ancienne, chez des volontaires ingérant chaque jour 6,4 mg/kg d'isopropanol pendant 6 semaines, aucun signe clinique de toxicité, aucune anomalie hématologique ou urinaire (en dehors d'une cétonurie), aucune modification de la fonction excrétrice du foie n'ont été observés. Les examens ophtalmologiques ont montré que le champ et l'acuité visuels demeuraient normaux ainsi que le fond d'œil ([INRS 2016b](#)).

Une étude portant sur 60 femmes exposées à des vapeurs d'isopropanol (concentration atmosphérique médiane : 106 ppm - durée moyenne d'exposition : 4 ans et demi) n'a mis en évidence aucune anomalie clinique, comportementale ou hématologique ([INRS 2016b](#)).

II.3.2.3. n-propanol

II.3.2.3.1. Données chez l'animal

a) Toxicité par voie orale

Dans une étude sur 15 ou 120 jours exposant des rats mâles Wistar à des solutions d'éthanol ou de n-propanol (solutions de 1 M) (6 animaux par dose), aucun signe suggérant une plus grande toxicité du n-propanol par rapport à l'éthanol n'a été observé (Hillbom *et al.* 1974). La dose administrée a été estimée à 3 000 mg/kg/j, basée sur une consommation journalière de 20 mL d'eau, et un poids corporel moyen de 400 g (ECB 2008). Aucun effet significatif sur la consommation alimentaire ou le gain de poids corporel n'a été observé. Aucun signe d'inflammation ou de cirrhose du foie n'a été retrouvé. Une NOAEL de 3 000 mg/kg/j a été retenue pour cette étude.

Dans une autre étude visant à évaluer les dommages hépatiques provoqués par les alcools, des rats mâles Wistar ont reçu du n-propanol dans leur eau de boisson (32 % v/v) pendant une durée allant jusqu'à 3 mois (1, 5, 9 ou 12 semaines) (15 animaux par groupe) (Wakabayashi *et al.* 1991). Des lectures au microscope électronique ont révélé des mégamitochondries de forme irrégulière avec peu de crêtes ainsi que des mitochondries de taille normale mais de forme irrégulière avec un nombre réduit de crêtes. La dose administrée a été estimée à 16 000 mg/kg/j (ECB 2008). Les animaux traités se sont affaiblis et ont perdu du poids et l'appétit tout au long de l'étude. Dans cet essai, un groupe d'animaux a reçu de l'éthanol (32% v/v dans l'eau de boisson). Les observations étaient les mêmes.

b) Toxicité par inhalation ou par voie dermale

Aucune étude de toxicité subchronique ou chronique du n-propanol par inhalation ou par voie cutanée n'a été identifiée dans la littérature.

II.3.2.3.2. Données chez l'homme

Aucune étude n'a été retrouvée sur les effets chroniques systémiques liés au n-propanol.

II.3.2.4. Résumé et comparaison des alcools

Suite à une administration répétée par voie orale chez le rat (12 semaines), une toxicité hépatique est observée avec l'éthanol (15% dans l'eau de boisson estimés à 10 g/kg/j) et le n-propanol (32% v/v dans l'eau de boisson). Pour l'isopropanol, la toxicité observée (870 mg/kg/j) est rénale. Cependant, les effets ayant été observés chez le rat mâle uniquement, on ne peut exclure qu'il s'agisse d'une néphropathie induite par l' α 2-microglobuline, exclusive au rat mâle et sans transposition à l'homme.

La toxicité hépatique de l'éthanol n'a pas été retrouvée dans les études d'exposition par inhalation jusqu'à la dose de 20 000 mg/m³ durant 26 jours. Il en est de même pour la toxicité rénale chez le rat exposé à 12 470 mg/m³ d'isopropanol durant 13 semaines.

Aucune donnée de toxicité par inhalation avec le n-propanol n'est disponible.

Enfin, aucune étude de toxicité répétée par voie dermale n'a été retrouvée pour aucun des alcools étudiés.

Le tableau 15 ci-dessous résume les valeurs de NOAEL ou LOAEL par voie orale ou inhalation dérivées des expérimentations animales.

Tableau 15 : Valeurs de NOAEL/LOAEL de l'éthanol, isopropanol et n-propanol

	Ethanol	Isopropanol	n-propanol
NOAEL / LOAEL orale	Rat - 90 jours (13 semaines) NOAEL 3900 mg/kg/j Souris – 90 jours NOAEL > 9 400mg / kg ♀ LOAEL 9 700mg / kg ♂	Rat – 12 semaines LOAEL 870 mg/kg/j	Rat – 120 jours (17 semaines) NOAEL 3000 mg/kg/j
NOAEL inhalation	Rat – 28 jours ≥ 11 750 mg/m ³ /6h	Rat et souris – 13 semaines 12 470 mg/m ³ /6h	--

NOAEL : dose sans effet indésirable observé LOAEL : dose entraînant de faibles effets indésirables

Chez l'homme, aucune anomalie clinique, comportementale ou hématologique n'a été décrite chez des femmes exposées à des vapeurs d'isopropanol sur une période de 4 ans et demi (valeur médiane de 106 ppm).

Pour l'éthanol, des irritations des yeux et des voies aériennes supérieures, des céphalées, de la fatigue, une diminution des capacités de concentration et de vigilance ont été rapportées suite à une exposition répétée aux vapeurs d'éthanol (niveaux d'exposition associée non précisés).

Aucune donnée n'a été retrouvée pour le n-propanol.

II.3.3. Toxicité locale

II.3.3.1. Irritation cutanée

II.3.3.1.1. Ethanol

Localement, l'éthanol n'a pas d'effet irritant appréciable sur la peau du lapin, sauf si l'on prolonge le contact 24 heures sous pansement occlusif. Une faible irritation passagère est alors observée.

Dans un essai d'irritation cutanée chez le lapin (Jacobs & Martens 1992) conduit selon la ligne directrice de l'OCDE No 404, l'éthanol n'était pas classé irritant pour la peau. Aucun des 6 animaux d'essai n'a présenté d'œdème. Un léger érythème complètement réversible en 48 heures a été observé au niveau du site traité.

L'éthanol 95% faisait partie, avec l'eau distillée, des témoins solvants de 3 essais d'irritation cutanée effectués chez le lapin (Phillips *et al.* 1972). Les produits ont été appliqués par patch occlusif de 24 heures sur la face dorsale de chacun des lapins (4 lapins par produit). La lecture des réactions cutanées a été effectuée 30 min puis 48 heures après retrait des patchs selon le score de Draize (score maximum de 8, cotant la présence d'érythème et d'œdème sur des échelles respectives de 1 à 4). L'éthanol à 95% a entraîné une légère réaction (index d'irritation moyen de 0,5), mais à peine plus importante que celle observée au niveau du contrôle à l'eau distillée (index d'irritation moyen de 0,27).

Chez l'homme, l'éthanol présente un très faible potentiel d'irritation cutanée.

L'éthanol 95% a fait l'objet d'un essai d'irritation cutanée chez l'homme en tant que témoin solvant (Phillips *et al.* 1972). 4 groupes de 4 volontaires de sexe masculin ont tous reçus 3 substances et un contrôle sur la face interne de l'avant-bras, l'éthanol 95% étant l'un des deux contrôles utilisés dans au moins 3 groupes. Les produits ont été appliqués pendant une durée de 24 heures dans des conditions occlusives. La lecture des réactions a été effectuée 24 et 72 heures après retrait des patchs en utilisant le score de Draize. Aucune irritation n'a été observée (données sur un minimum de 12 volontaires).

Des essais complémentaires avec exposition répétée durant 21 jours ont été réalisés. Un volume de 0,2 mL de produit d'essai (dont l'éthanol 95% dilué à 10%) a été administré par patch occlusif quotidien au niveau du dos de 8 volontaires de sexe masculin. La réponse cutanée consécutive à l'application de la veille a été examinée avant chaque nouvelle application, 30 minutes après retrait du patch, selon une échelle de 0 à 4. En fin d'étude, l'index d'irritation cutanée cumulée a été calculé pour chaque volontaire (valeur de 0 à 84). L'index moyen pour l'éthanol était de 11,5. Les données individuelles présentées pour un volontaire, d'index d'irritation cumulée de 10, montrent une légère réaction d'irritation avec présence d'un érythème à compter du 15^{ème} jour (score de 1), couplé à une induration (épaississement et durcissement de la peau) à partir du 19^{ème} jour (score de 2) (Phillips *et al.* 1972).

Les propriétés irritantes de l'éthanol non dilué ont été évaluées chez l'homme par patch test (0,2 mL) de 4 heures sur 31 volontaires. La lecture a été effectuée 24, 48 et 72 heures après le retrait du patch. Un seul des 31 sujets a présenté une réponse jugée comme indicative d'une irritation ([Basketter et al. 2004](#)).

Les essais de sensibilisation cutanée chez l'homme informent également sur le potentiel irritant cutané d'un produit d'essai, au moment de la phase d'induction avec patch-tests répétés précédant la phase de déclenchement. Dans une étude de sensibilisation cutanée de deux produits hydro-alcooliques conduite chez 106 volontaires, l'éthanol 90% p/p dénaturé au butan-2-one (1%) a été utilisé en témoin ([Meyer et al. 2010](#)). Les participants ont reçu 12 patchs de 24 heures sur une première période de 3 semaines, à raison de 4 patchs par semaine (phase d'induction). Les réactions cutanées ont été évaluées après chaque retrait de patch. Après une phase de repos de 2 semaines, 4 patchs de déclenchement consécutifs de 24 heures chacun ont été appliqués sur un nouveau site, avec une lecture des réactions immédiatement après le retrait des patchs ainsi que 48 et 96 heures après le retrait du dernier patch. Sur toute la durée de l'étude, seules deux réactions cutanées de faible intensité (rougeur légère à modérée limitée à une partie de la zone traitée) ont été rapportés : l'une consécutive au retrait du 4^{ème} patch de la première semaine, et l'autre 24 heures après retrait du dernier patch de l'étape de déclenchement.

II.3.3.1.2. Isopropanol

L'isopropanol est peu ou pas irritant pour la peau intacte ou abrasée du lapin et du cobaye.

Dans une étude inter-espèces d'irritation cutanée, [Nixon et al. \(1975\)](#) ont étudié le potentiel d'irritation de l'isopropanol. Le produit pur a été appliqué par patch cutané de 4 heures sur peau intacte et peau abrasée de 6 lapins albinos et 6 cobayes Hartley. La réponse cutanée en termes d'érythème et d'œdème a été évaluée 4, 24 puis 48 heures après l'application des patchs en utilisant le score de Draize. Aucune réaction cutanée n'a été observée sur peau intacte comme abrasée des animaux.

L'isopropanol figure parmi les 176 substances inventoriées par [Bagley et al. \(1996\)](#) comme disposant de résultats d'irritation cutanée *in vivo* chez le lapin selon la ligne directrice OCDE 404 et dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire. Le produit d'essai a été appliqué sur la peau intacte de 3 animaux, par patch de 0,5 mL de 4 heures. La réponse cutanée en termes d'érythème et d'œdème, sur une échelle de 0 à 4 selon le score de Draize, a été évaluée 24, 48 et 72 heures après le retrait du patch. L'indice d'irritation primaire moyen (score maximal de 8 correspondant à la somme des deux scores moyens d'érythème et d'œdème) obtenu après application topique d'isopropanol sur la peau de 3 lapins était de 0,78, correspondant à une absence d'irritation cutanée.

Chez l'homme, l'isopropanol présente un très faible potentiel d'irritation cutanée.

[Nixon et al. \(1975\)](#) ont étudié le potentiel d'irritation de l'isopropanol chez l'homme par patch cutané de 4 heures sur peau intacte et peau abrasée de 6 volontaires. La réponse cutanée en termes d'érythème et d'œdème a été évaluée selon le score de Draize sur deux échelles de 0 à 4 (score maximum de 8), 4, 24 puis 48 heures après l'application des patchs. Une légère réaction cutanée a été observée sur peau abrasée uniquement, avec un score moyen de 0,8. Dans cet essai, l'isopropanol n'était pas irritant cutanée chez l'homme.

[Basketter et al. \(2004\)](#) ont également étudié les propriétés irritantes de l'isopropanol non dilué par patch test de 4 heures sur 31 volontaires. La lecture a été effectuée 24, 48 et 72 heures après retrait du patch. Aucune réaction cutanée n'a été observée.

Cependant, chez l'enfant prématuré, un cas de brûlures étendues après utilisation accidentelle de serviettes antiseptiques contenant de l'isopropanol a été rapporté ([Brayer et al. 2004](#)). Les lésions ont évolué vers un décollement cutané généralisé, entraînant le décès de l'enfant. L'intoxication à l'isopropanol par voie transcutanée a déjà été décrite chez le nouveau-né et le nourrisson. Sa toxicité l'a exclu de la composition des solutions antiseptiques couramment utilisées en néonatalogie.

II.3.3.1.3. n-propanol

Le n-propanol n'est pas irritant pour la peau du lapin. Une légère irritation cutanée imputable à l'alcool a été décrite chez le rat, mais les conditions d'exposition associées ne sont pas disponibles.

L'irritation cutanée primaire du n-propanol a été évaluée chez le lapin (n=5) sur peau rasée dans les 24 heures suivant l'application topique de 0,01 mL de produit (Smyth *et al.* 1954). La lecture a été faite selon une échelle de 1 à 10, 1 correspondant à une légère réaction localisée au niveau du site d'injection, 6 à une nécrose suite à l'application du produit pur, et 10 à une nécrose suite à l'application du produit d'essai dilué à 0,01%. Aucune propriété irritante du n-propanol n'a été retrouvée, avec un score de 1.

Le rapport d'évaluation du risque du n-propanol publié par l'Union Européenne rapporte une étude d'irritation cutanée chez le rat (BASF AG 1974) (ECB 2008). Les animaux ont été exposés par voie cutanée à des solutions de n-propanol non dilué (nombre d'animaux et quantité de produit non précisés). La durée de traitement variait de 1 minute et demie à 20 heures. Une légère rougeur a été observée 24 heures après l'exposition, ainsi qu'une légère desquamation avec présence de croûte le 8^{ème} jour.

Chez l'homme, il existe une étude concluant à l'altération de l'intégrité de la barrière cutanée après application de n-propanol à 100% (mais pas à 60%). L'état cutané préalable au traitement (présence d'irritation) peut influencer sur la réponse.

Lübbe *et al.* (2001) ont étudié le potentiel d'irritation cutanée du n-propanol chez 12 volontaires, dans un contexte de dermatite irritative légère pré-existante. Dans cet essai, chaque volontaire était son propre témoin, avec un bras pré-traité durant 14 heures par du sodium dodecyl sulfate (SDS) (solution à 0,3% administrée par 4 patchs de 0,1 ml chacun) en vue d'induire une légère irritation cutanée, l'autre bras étant traité de façon similaire avec de l'eau. 90 minutes après retrait des patchs, les produits d'essai (solution de n-propanol à 100% et 60% et eau) ont été appliqués à 3 reprises toutes les 30 minutes par friction douce à l'aide d'un écouvillon durant 5 minutes. L'évaluation a porté sur l'intégrité de la barrière cutanée par des mesures de la perte insensible en eau (TEWL - transepidermal water loss) et des mesures de cornéométrie, avant le début de l'essai (M_0), 90 min après le retrait des patchs (M_1), en fin de chaque cycle de 30 minutes ($M_{1/1}$, $M_{1/2}$, $M_{1/3}$), puis le lendemain de l'exposition (M_2). Sur peau pré-irritée, une augmentation statistiquement significative de la TEWL a été observée après traitement ($p < 0,02$), avec un effet nettement plus important suite au traitement par n-propanol à 100% comparativement aux traitements par n-propanol à 60% ou à l'eau. Au niveau des sites « contrôle » (avant-bras pré-traités à l'eau), seul le n-propanol à 100% a entraîné une augmentation de la TEWL ($p < 0,08$). Dans les deux schémas d'essai (pré-traitement par SDS comme à l'eau), le profil de réponse du n-propanol à 60% était le même que celui de l'eau.

En termes de mesures de cornéométrie, au niveau des sites pré-irrités, une augmentation significative des taux d'hydratation au fil des mesures ($M_{1/1}$, $M_{1/2}$, $M_{1/3}$ et M_2) comparativement aux mesures effectuées à M_1 ($p < 0,002$) a été observée avec le n-propanol à 60% et l'eau. Suite

au traitement par du n-propanol à 100%, une augmentation des valeurs de cornéométrie a également été observée aux temps de mesure $M_{1/1}$ et $M_{1/2}$, suivie d'une diminution. Les auteurs imputent l'augmentation de la capacitance (conductivité électrique de la peau) dans les groupes n-propanol 60% et 0% à la présence d'eau dans les produits d'essai, et au processus irritatif pour le traitement par n-propanol à 100%. Au niveau des sites contrôles, les mesures à M_1 étaient nettement supérieures à celles retrouvées sur les sites pré-irrités. Seul le traitement par l'eau a entraîné une augmentation significative des valeurs de capacitance ($p < 0,03$).

Les auteurs concluent à un potentiel d'irritation cutanée du n-propanol à 100%, comparativement à une solution de n-propanol à 60% dont le potentiel d'irritation dans cet essai n'a été observé que sur peau pré-irritée, sans être différent de celui de l'eau.

La fiche toxicologique de l'INRS rapporte une irritation cutanée provoquée par le n-propanol en application prolongée sur la peau ([INRS 2016c](#)).

II.3.3.1.4. Données chez l’homme issues d’études avec les 3 alcools

L’état d’hydratation de la peau semble constituer un facteur déterminant dans la réponse d’irritation aux alcools. La formation d’aldéhyde issue de la métabolisation de l’alcool (au moins pour l’éthanol et le n-propanol) semble contribuer aux réactions cutanées observées.

Haddock & Wilkin (1982) ont étudié la tolérance cutanée de l’éthanol, isopropanol et n-propanol par patchs occlusifs de 10 minutes appliqués au niveau de l’avant-bras de volontaires sur peau non hydratée ou préalablement hydratée. Différents protocoles ont été mis en œuvre :

- pour deux groupes de 12 patients sous thérapie contre l’alcoolisme (traitement aversif par disulfiram, inhibiteur de l’aldéhyde-déshydrogénase), avant et 7 à 14 jours après le début de la thérapie
 - 1/ patchs de 0,1 mL d’alcool (éthanol, isopropanol, n-propanol) à 100% et d’acétaldéhyde à 10% appliqués sur la peau telle quelle (patchs de 1,5 cm)
 - 2/ patchs de 0,3 mL d’alcool (éthanol, isopropanol, n-propanol) à 100% appliqués sur peau préalablement hydratée (patchs de 5 cm)
- pour deux groupes contrôles de 10 et 11 volontaires sans thérapie pouvant interférer avec le métabolisme de l’éthanol :
 - 3/ patchs de 0,3 mL d’alcool (éthanol, isopropanol, n-propanol) à 100% sur les 2 avant-bras, l’un appliqué sur la peau telle quelle (non hydratée), l’autre sur la peau préalablement hydratée (n=10) (patchs de 5 cm)
 - 4/ 5 patchs de 0,3 mL d’éthanol à 100, 80, 60, 40 et 20% appliqués sur la peau préalablement hydratée (n=11) (patchs de 5 cm) (l’isopropanol et le n-propanol n’ont pas été testés).

L’hydratation de la peau a été réalisée par immersion préalable de l’avant-bras dans l’eau à 33°C durant 10 minutes avant l’application des patchs. La lecture des réactions cutanées a été effectuée selon une échelle de 0 à 3 prenant en compte la présence d’érythème, son intensité et son étendue : 0 : *absence de réaction*,

1 : *érythème léger sur moins de 25% de la surface traitée*,

2 : *érythème modéré couvrant 25 à 75 % de la surface traitée*,

3 : *érythème notable sur 75% ou plus de la surface traitée*

Sur peau non hydratée (n = 22 volontaires - protocoles 1 et 3),

- aucun des 3 alcools n’a entraîné de réaction cutanée,
- un érythème notable en réponse à l’acétaldéhyde a été observé chez les 12 patients, que ce soit avant ou durant la thérapie par disulfiram (protocole 1)

Sur peau hydratée, les sujets ont présenté une réaction cutanée aux alcools.

- Dans le protocole 2, une réaction cutanée à l’éthanol, l’isopropanol et le n-propanol a été observée chez 12, 11 et 10 sujets respectivement, sans différence statistiquement significative d’effet avant et durant la thérapie. Pour l’éthanol, l’intensité de réponse était maximale pour 6 des 12 patients.
- Dans le protocole 3, une réaction à l’éthanol et l’isopropanol d’intensité maximale a été retrouvée chez 8 des 10 sujets. Avec le n-propanol, une réponse a été observée

chez 7 des 10 sujets (intensité maximale pour 2, égale à 2 pour 3 et égale à 1 pour 2 autres)

- Dans le protocole 4, la réponse cutanée à l’éthanol était d’autant plus importante que la teneur en alcool était élevée :

% éthanol	Score moyen \pm écart-type (n=11)
20	0,2 \pm 0,1
40	1,0 \pm 0,4
60	1,5 \pm 0,5
80	2,2 \pm 0,3
100	2,4 \pm 0,3

Les auteurs ont conclu qu’indépendamment du mécanisme d’action à l’origine de l’érythème cutané, l’état d’hydratation de la peau semble constituer un facteur déterminant dans la réponse d’irritation. Les réactions observées pourraient résulter d’un accroissement de la pénétration de l’alcool dans la peau sous l’effet de l’hydratation et d’un effet vasodilatateur direct de l’alcool sur la micro-vascularisation cutanée.

Des réactions cutanées à l’éthanol et au n-propanol sous forme d’érythème ont également été rapportées sur peau hydratée par [Wilkin & Stewart \(1987\)](#) et [Wilkin & Fortner \(1985\)](#). 25 μ L d’éthanol, de n-propanol et d’acétaldéhyde (tous trois à 75%) ont été appliqués par patch de 5 minutes sur peau préalablement hydratée (immersion de l’avant-bras dans de l’eau à 33°C pendant 10 min) chez 12 volontaires. Des réactions cutanées ont été retrouvées chez 5 des 12 sujets pour l’éthanol, chez 9 personnes pour le n-propanol et chez les 12 volontaires pour l’acétaldéhyde.

A des fins de compréhension du mécanisme d’action, des essais complémentaires avec les mêmes produits d’essai ont été conduits chez 5 volontaires, avec un prétraitement sur l’un des deux avant-bras avec un inhibiteur de l’alcool-déshydrogénase (pommade hydrophile à 40% de 4-méthylpyrazole), l’autre bras en contrôle n’ayant reçu que la pommade hydrophile sans 4-méthylpyrazole. Pour l’éthanol et le n-propanol, aucune réaction cutanée n’a été retrouvée sur le bras pré-traité, contre 2 réponses positives à l’éthanol et 4 au n-propanol sur le bras contrôle. Pour l’acétaldéhyde, le prétraitement a été sans effet, avec des réactions cutanées bilatérales chez les 5 participants. Ces données suggèrent l’implication de l’aldéhyde issu du métabolisme de l’alcool dans les réactions cutanées observées.

Par comparaison avec un détergent utilisé pour le lavage des mains à l’eau, l’éthanol, l’isopropanol et le n-propanol entraînent moins de réaction cutanée, et leur utilisation consécutive au lavage des mains n’accentue pas, voir atténue les réactions cutanées induites par le détergent. Ces alcools peuvent cependant être responsables d’une déshydratation des couches supérieures de l’épiderme.

[Löffler et al. \(2007\)](#) ont étudié la réponse cutanée chez l’homme induite par une solution d’éthanol, isopropanol ou n-propanol seule ou en association avec un agent lavant. L’intégrité de la barrière cutanée (mesure de la perte insensible en eau ou TEWL), le taux d’hydratation cutanée (mesures de cornéométrie) et la présence d’érythème cutané ont été évalués dans un essai par patchs occlusifs de 24 heures répétés sur 2 jours.

Un premier groupe de 15 volontaires a été traité les deux jours avec des patchs contenant 5 solutions d’éthanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80, 90 et 99 % (éthanol et isopropanol) ou 100 % (n-propanol).

Le deuxième groupe de 15 volontaires a été traité avec des patchs de sodium lauryl sulfate (SLS) à 0,5% et d’éthanol à 80%, isopropanol à 70 % ou n-propanol à 80 % : le site cutané ayant reçu le premier jour le SLS a reçu l’alcool le second jour tandis que le site traité par l’alcool le premier jour a reçu le SLS le second jour.

L’exposition aux alcools seuls n’a pas entraîné d’érythème cutané ni de modification de la barrière cutanée. En revanche, une diminution statistiquement significative du taux d’hydratation a été observée comparativement aux témoins (absence de traitement ou eau), avec une intensité d’effet un peu moins importante avec l’isopropanol comparativement à l’éthanol et au n-propanol.

Dans le test par patch alternant le SLS et l’alcool, la réponse cutanée induite par le SLS (diminution du taux d’hydratation cutanée, induction d’érythème et altération de la barrière cutanée) n’a pas été accentuée par l’application de l’alcool.

Les mêmes paramètres cutanés ont été étudiés avant et après différents protocoles de 7 jours de lavage par SLS et/ou désinfection par l’éthanol des avant-bras deux fois par jour (15 volontaires par protocole) :

Protocole	Avant-bras A	Avant-bras B
	2 fois/j pendant 7 jours	2 fois/j pendant 7 jours
1	Désinfection	Lavage (SLS 0,5%)
2	Désinfection	Lavage (eau)
3	Désinfection	Lavage (SLS 0,5%) et désinfection
4	Lavage (SLS 0,5%)	Lavage (SLS 0,5%) et désinfection
5	Lavage (SLS 0,5%) puis lavage (eau)	Lavage (SLS 0,5%) et désinfection

Le lavage consistait à appliquer 50 mL de solution de SLS à 0,5 % (ou d’eau de réseau pour le groupe contrôle) à l’aide d’un rouleau, avec rinçage consécutif à l’eau. La désinfection correspondait à l’application d’éthanol à 80%, avec séchage à l’air libre.

Les réactions cutanées mesurées suite à la désinfection par l’éthanol étaient de moindre intensité comparativement au lavage par SLS (hydratation de la peau - $p < 0,05$; érythème - $p < 0,05$; TEWL - $p < 0,001$) (protocole 1).

Les effets observés après désinfection étaient équivalents à ceux observés après lavage à l’eau (protocole 2).

Les réactions cutanées mesurées après lavage et désinfection étaient significativement plus importantes comparativement à celles obtenues après désinfection seule (protocole 3). Cet effet était encore visible, mais dans une moindre mesure, 3 jours après la fin du protocole.

Les effets après lavage et désinfection étaient d’intensité significativement inférieure aux effets observés après lavage seul (TEWL, $p < 0,05$; hydratation de la peau, $p < 0,05$; érythème, $p < 0,05$) (protocole 4).

Aucune différence n’a été retrouvée dans le groupe ayant eu un avant-bras lavé par SLS puis à l’eau, et l’autre avant-bras lavé par SLS puis désinfecté (protocole 5).

Les auteurs ont conclu que la friction hydro-alcoolique des mains engendrait moins d'irritation cutanée que le lavage des mains et était donc à préférer pour l'hygiène des mains du point de vue dermatologique. Une friction hydro-alcoolique peut même diminuer une irritation cutanée après lavage des mains plutôt que l'accentuer, par élimination partielle du détergent par effet mécanique.

II.3.3.1.5. Résumé sur l'irritation cutanée et comparaison des alcools

Au travers des données de la littérature, aucune différence notable entre les 3 alcools étudiés n'est retrouvée en termes d'irritation cutanée.

Les études chez l'animal concluent à une absence de propriétés irritantes de l'éthanol. Chez l'homme, l'éthanol appliqué par voie topique sur des durées de quelques heures à plusieurs jours présente un faible potentiel d'irritation cutanée (absence de réaction ou réponse de faible intensité).

Pour l'isopropanol, les études chez l'animal et chez l'homme concluent à une absence de propriétés irritantes sur peau intacte. Une légère réaction cutanée est possible sur peau abrasée. En revanche, une corrosion cutanée ne peut être exclue sur peau non mature.

Les études chez l'animal avec le n-propanol sont également en faveur d'absence de potentiel irritant de cet alcool. Chez l'homme, le n-propanol appliqué par voie topique jusqu'à 24 heures présente un faible potentiel d'irritation cutanée. Une irritation cutanée en cas d'application prolongée sur la peau est possible.

Pour les 3 alcools, l'état d'hydratation de la peau semble influencer la réaction d'irritation, au regard d'érythèmes cutanés rapportés sur peau préalablement hydratée et absents dans le cas contraire. Sur la base des données de tolérance cutanée disponibles pour l'éthanol et le n-propanol en présence d'inhibiteur d'ADH, l'aldéhyde issu du métabolisme de l'alcool semble être impliqué dans les réactions cutanées observées.

Un effet desséchant au niveau des couches supérieures de l'épiderme a été rapporté pour les 3 alcools, d'intensité légèrement moindre pour l'isopropanol.

II.3.3.2. Irritation oculaire

II.3.3.2.1. Ethanol

Sur l'œil de lapin, l'éthanol administré pur provoque une irritation oculaire modérée.

L'éthanol figure dans le rapport technique N° 48 d'ECETOC (European Centre For Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) inventoriant des données d'irritations oculaire de substances chimiques de référence suite à des essais *in vivo* chez le lapin selon l'OCDE 405 (ECETOC 1998). Le produit d'essai a été instillé en une seule dose dans l'un des yeux de l'animal (0,1 mL ou 0,1 g), l'oeil non traité servant de témoin. L'effet a été évalué 24, 48 et 72 heures après traitement en cotant sur des échelles de 0 à 4 la gravité des lésions affectant la conjonctive, la cornée et l'iris, à intervalles déterminés, avec une période d'observation pouvant atteindre 21 jours pour évaluer la réversibilité des effets. Dans cet essai réalisé sur 3 lapins, l'éthanol a entraîné des effets sur la cornée (opacification) et la conjonctive (rougeur modérée à sévère), suffisamment importants pour justifier une classification irritante (H319 : Provoque une irritation oculaire grave) selon les critères de classification donnés par le règlement CLP N° 1272/2008. Ces effets étaient réversibles en 14 jours.

L'éthanol a également été identifié comme irritant oculaire dans un essai chez le lapin mené conformément à la ligne directrice de l'OCDE No 405 (Guillot *et al.* 1982). Un rinçage de l'œil après exposition à l'éthanol ne diminue que légèrement l'intensité de la réponse immédiate mais réduit de façon significative la durée de l'effet.

Chez l'homme, la projection d'éthanol dans l'œil provoque immédiatement une douleur cuisante, un larmoiement, des lésions de l'épithélium cornéen et une hyperémie de la conjonctive ; la sensation de corps étranger peut durer 1 jour ou 2 mais, en général, la cicatrisation est spontanée, rapide et complète (INRS 2016a).

II.3.3.2.2. Isopropanol

Chez l'animal, l'isopropanol provoque une irritation oculaire

Dans un essai inter-laboratoires (n=10) portant sur l'irritation oculaire chez le lapin de 6 substances d'essai différentes, l'isopropanol à 70% a été testé en parallèle de chaque substance, en tant que contrôle (soit à 60 reprises) (Marzulli & Ruggles 1973). L'opacité cornéenne, les lésions de l'iris, la rougeur et l'œdème (chemosis) de la conjonctive ont été pris en considération pour l'évaluation. Sur un total de 70 évaluations réalisées 24 heures après le traitement, aucune des lectures n'a permis de conclure à l'absence de propriété d'irritation oculaire de l'isopropanol à 70%. La substance d'essai a été classée comme irritante pour les yeux à 62 reprises (irritation chez au moins 4 des 6 lapins). Dans les 8 autres cas, la classification irritante a été considérée comme limite (effet observé chez 2 ou 3 des 6 animaux). À 48 et 72 heures, le nombre d'essai concluant à des propriétés irritantes de l'isopropanol à 70% était encore important (49 et 41 respectivement), avec des résultats limites sur une part significative des évaluations (17 et 16). L'effet était nettement diminué mais encore présent dans plusieurs essais le 7^{ème} jour (4 lectures positives, 19 classifications limites et 45 lectures négatives).

Lors de travaux visant à optimiser les conditions d'essai d'irritation oculaire *in vivo*, Griffith *et al.* (1980) ont testé différents volumes d'isopropanol à 70% (0,01, 0,03 et 0,1 mL) administrés directement en surface de la cornée d'un seul œil de lapins. Les effets ont été observés sur la cornée, l'iris et la conjonctive (score de Draize) sur une période d'observation de 21 jours. Dans ces conditions d'essai, l'isopropanol a généré une irritation oculaire d'autant plus importante que le volume administré était élevé, avec une réversibilité de l'effet pouvant excéder 21 jours. Le délai médian de retour à la normale aux deux plus fortes doses était de 14 jours.

Morgan *et al.* (1987) ont étudié *in vivo* la prédictivité en termes d'irritation oculaire d'un essai de pachymétrie cornéenne (épaisseur de la cornée) mesurée 3 jours après administration de différentes substances d'essai dans l'œil de lapin. Un volume de 0,1 mL d'isopropanol pur a été instillé dans l'œil de 7 lapins. Les observations de la cornée, iris et conjonctive ont été effectuées avant le traitement puis régulièrement sur une période de 21 jours suivant l'administration. L'épaisseur de la cornée des deux yeux de chaque animal a été mesurée à l'aide d'un pachymètre pour déterminer le ratio traité/non traité. La classification en termes d'irritation oculaire a été effectuée selon les critères EPA (1981) à partir des observations sur la cornée et l'iris durant les 21 jours post traitement.

Dans cet essai, la pachymétrie cornéenne s'est révélée prédictive de la classification d'irritation oculaire, avec une classification corrosive dans les deux approches. La classification corrosive selon l'EPA correspond à une atteinte de la cornée avec une irritation ou des dommages oculaires persistants au-delà des 21 jours post traitement. La classification corrosive proposée selon le ratio d'épaisseur cornéenne correspond à une irritation persistante au-delà de 24 heures et un ratio moyen d'épaisseur cornéenne supérieur ou égal à 1,45. Dans cet essai, le ratio obtenu suite au traitement par 0,1 mL d'isopropanol était de 1,64.

Tout comme l'éthanol, l'isopropanol figure dans le rapport technique N° 48 d'ECETOC inventariant des données d'irritation oculaire de substances chimiques de référence suite à des essais *in vivo* chez le lapin selon l'OCDE 405 ([ECETOC 1998](#)). Le produit d'essai a été instillé en une seule dose dans l'un des yeux de l'animal (0,1 mL ou 0,1 g), l'oeil non traité servant de témoin. L'effet a été évalué 24, 48 et 72 heures après traitement en cotant sur des échelles de 0 à 4 la gravité des lésions affectant la conjonctive, la cornée et l'iris, à intervalles déterminés, avec une période d'observation pouvant atteindre 21 jours pour évaluer la réversibilité des effets. Dans cet essai réalisé avec l'isopropanol sur 4 lapins, les effets sur l'iris et la conjonctive étaient suffisamment importants pour justifier une classification irritante (H319 : Provoque une irritation oculaire grave) selon les critères de classification donnés par le règlement CLP N° 1272/2008. L'ensemble des effets était réversible en 10 jours.

Chez l'homme, l'isopropanol pur dans l'œil provoque une sensation de brûlure, mais pas de lésion si un lavage à l'eau intervient quelques secondes après le contact ([INRS 2016b](#)).

II.3.3.2.3. n-propanol

Chez le lapin, le n-propanol entraîne une irritation oculaire grave.

Différentes solutions de n-propanol ont été instillées dans l'œil de lapins (Smyth *et al.* 1954). Sur une échelle de 1 à 10 (1 correspondant à une très petite zone de nécrose suite à l'instillation de 0,5 mL de produit pur, 5 indiquant une brûlure dite sévère suite à l'instillation de 0,005 mL de produit pur, et 10 indiquant une brûlure sévère suite à l'instillation de 0,5 mL de produit dilué à 1 %), la blessure oculaire observée a été cotée 5, indiquant que le n-propanol est sévèrement irritant pour les yeux.

Le rapport d'évaluation du risque du n-propanol rapporte une étude d'irritation oculaire chez le lapin (BASF AG 1974) (ECB 2008). L'instillation de 50 mg de n-propanol dans l'œil de l'animal (durée du traitement et nombre d'animaux non précisé) a entraîné de graves dommages oculaires :

- le premier jour une décoloration grise partielle, une légère rougeur, un œdème important de la conjonctive et de la membrane nictitante, et une légère opacité de la cornée avec suppuration ont été observés ;
- le 8^{ème} jour, une forte rougeur, un œdème sévère et une forte opacité de la cornée associée à une vascularisation, suppuration et formation de cicatrice ont été observés.

Le n-propanol est classé H318 : provoque des lésions oculaires graves, au titre du règlement CLP N° 1272/2008.

Chez l'homme, le n-propanol peut être responsable d'une conjonctivite avec ulcérations cornéennes en cas de projection oculaire.

II.3.3.2.4. Résumé sur l'irritation oculaire et comparaison des alcools

Les données d'expérimentation animale disponibles concluent à des propriétés irritantes pour les yeux pour les 3 alcools, avec une sévérité de réponse plus importante avec le n-propanol.

Chez l'homme, ces 3 alcools sont également irritants pour les yeux.

II.3.3.3. Irritation respiratoire

II.3.3.3.1. Ethanol

Chez l'homme, une exposition durant 30 minutes à des concentrations d'éthanol comprises entre 2 600 et 3 400 mg/m³ (1 400 / 1 800 ppm) entraîne une toux transitoire, associée à des céphalées. À des concentrations plus élevées, l'éthanol est un irritant respiratoire pouvant aggraver certains symptômes associés à l'asthme (AFSSET 2010). A 5 000 ppm ou plus, l'irritation observée des voies aériennes supérieures reste transitoire, disparaissant en 5 à 10 minutes (INRS 2016a). La valeur moyenne d'exposition professionnelle (VME) à l'éthanol de 1 900 mg/m³ (1 000 ppm) en France vise à prévenir l'irritation oculaire et respiratoire des sujets exposés (AFSSET 2010). Dans certains pays¹, la valeur de VME est deux fois inférieure (950 mg/m³ - 500 ppm).

L'éthanol dispose également de VLCT¹ comprises entre 1 000 et 5 000 ppm (1 900 – 9 500 mg/m³). Sa valeur en France est de 5 000 ppm (INRS 2016d).

II.3.3.3.2. Isopropanol

L'isopropanol est un irritant respiratoire chez la souris. Une RD₅₀ (Respiratory Rate Decrease ou diminution de la fréquence respiratoire) a été déterminée à 5 000 ppm ou 17 693 ppm selon la souche. Une exposition à 400 ou 5 400 ppm pendant 24 heures provoque chez le cobaye des modifications de la muqueuse respiratoire et une détérioration de l'activité ciliaire dans la trachée et l'oreille moyenne ; cet effet est complètement réversible à la plus faible concentration en 2 semaines, mais irréversible à la plus forte concentration (INRS 2016b).

Chez l'homme, sous forme de vapeurs, l'isopropanol provoque une légère irritation des yeux, du nez et de la gorge après 3 minutes d'exposition à 400 ppm. La concentration de 800 ppm est considérée comme inconfortable, sans que l'irritation soit encore sévère. Pour un séjour de 8 heures, les volontaires considèrent 200 ppm comme la plus forte concentration acceptable (INRS 2016b).

L'isopropanol dispose de VLCT¹ comprises entre 400 et 500 ppm (1 000 à 1250 mg/m³) et de VME¹ variant de 200 à 400 ppm (500 à 1 000 mg/m³). En France, seule une VLCT de 400 ppm est publiée (INRS 2016d).

¹ Revue des données sur 8 pays : Allemagne, Belgique, France, Espagne, Pologne, République Tchèque, Slovaquie, Suisse

II.3.3.3.3. n-propanol

Une irritation respiratoire est observée chez la souris, avec des valeurs de RD₅₀ qui varient selon la souche et la durée de l'exposition (4 780 ppm/5 min, 12 704 ppm/10 min et 13 660 ppm/30 min) (INRS 2016c).

Chez l'homme, une exposition à 400 ppm de n-propanol durant 3 à 5 minutes provoque une irritation des yeux, du nez et de la gorge (INRS 2016c).

Le n-propanol dispose de VLCT¹ variant de 250 à 400 ppm (600 à 1000 mg/m³), et des VME variant de 100 à 200 ppm (250 à 500 mg/m³). En France, seule une VME de 200 ppm est publiée (INRS 2016d).

II.3.3.3.4. Résumé sur l'irritation respiratoire et comparaison des alcools

Les 3 alcools présentent des propriétés d'irritation respiratoire. Il n'existe pas suffisamment de données pour effectuer une comparaison précise des 3 alcools. Cependant, il ressort des données disponibles chez l'homme que la concentration entraînant une irritation respiratoire est plus faible pour l'isopropanol et le n-propanol, par comparaison à l'éthanol.

¹ Revue des données sur 8 pays : Allemagne, Belgique, France, Espagne, Pologne, République Tchèque, Slovaquie, Suisse

II.3.3.4. Sensibilisation cutanée

II.3.3.4.1. Ethanol

L'éthanol n'a pas été identifié comme sensibilisant cutané chez l'animal.

L'éthanol à 75% v/v a été utilisé comme solvant dans l'évaluation du potentiel sensibilisant d'un polyalkylglycol par le test de maximisation chez le cobaye de Magnusson et Kligman (GPMT). Aucune réaction cutanée n'a été induite lors de la phase d'induction ou de déclenchement (OECD 2004b).

Descotes *et al.* (1988) ont étudié le potentiel de sensibilisation de l'éthanol dans deux protocoles différents de sensibilisation sur l'oreille de souris (MESA ou Mouse ear sensitisation assay) :

- Induction de J0 à J14 par injection sous-cutanée au niveau scapulaire d'adjuvant complet de Freund à J0 et J7 et applications topiques multiples d'éthanol au niveau de l'abdomen rasé de J0 à J14, puis déclenchement à J26 par application topique du produit d'essai des deux côtés de l'oreille gauche, avec mesures de l'épaisseur de l'oreille avant et 24 et 48h après déclenchement
- Induction par application topique du produit d'essai des deux côtés de l'oreille droite à J0 et J2 et injection sous-cutanée au niveau scapulaire d'adjuvant complet de Freund à J2, et déclenchement à J9 par application topique du produit d'essai des deux côtés de l'oreille gauche, avec mesures de l'épaisseur de l'oreille avant et 24 h après déclenchement

Dans les deux protocoles, le degré de sensibilisation est déduit du gonflement de l'oreille. L'éthanol à 95% n'a entraîné aucune augmentation statistiquement significative de l'épaisseur d'oreille.

Dans des essais de sensibilisation chez la souris selon la méthode de stimulation locale des ganglions lymphatiques (LLNA ou Local Lymph Node Assay) évaluant l'effet de 4 substances parfumantes et leurs solvants (dont l'éthanol), aucune réaction de sensibilisation n'a été observée dans les groupes d'animaux témoins traités par l'éthanol (Lalko *et al.* 2004). Il est toutefois intéressant de noter que le potentiel de sensibilisation des différentes substances d'essai variait en fonction des solvants, avec un effet plus important en présence d'éthanol pour 2 des 4 substances d'essai (p-t-butyl- α -methylhydrocinnamic aldéhyde et géraniol), comparativement au diéthylphtalate.

Chez l'homme, l'éthanol est décrit comme pouvant être à l'origine de réactions allergiques immédiates ou retardées suite à une exposition endogène comme exogène, avec des réactions d'irritation, des dermatites de contact irritatives et des urticaires de contact non immunologiques (Ophaswongse & Maibach 1995). Cependant, la prévalence de ces effets reste faible et leur survenue correspond dans la plupart des cas à des situations d'exposition professionnelle, avec possibilité de réactions croisées avec d'autres alcools primaires et aldéhydes (Dutch Expert Committee on Occupational Standards 2006).

Dans une étude de sensibilisation sur 93 volontaires avec de l'éthanol en solution dans l'eau à 50% (Stotts & Ely 1977), 15 sujets ont présenté une réaction d'irritation lors de la phase de déclenchement (patch occlusif de 24 heures) 17 jours après la phase d'induction (expositions 3 fois par semaine durant 3 semaines). Pour 6 sujets, une dermatite de contact allergique a été constatée lors d'une phase de déclenchement retardée 2 mois après la phase d'induction.

Dans un test de diagnostic suite à une allergie de contact survenue chez deux assistants de laboratoire utilisant des tampons désinfectants imprégnés d'oxyde de propylène (1%) et d'isopropanol (70%), aucun des 25 volontaires ni des deux assistants de laboratoire n'ont présenté de réponse positive aux patchs d'éthanol à 99% (durée non précisée - lecture à 48 et 72h) (Jensen 1981).

Dans l'étude de sensibilisation cutanée de Meyer *et al.* (2010) incluant de l'éthanol à 90% p/p dénaturé au butan-2-one (1%) conduite sur 106 volontaires (12 patchs en 3 semaines pour l'induction, puis 4 patchs de déclenchement 2 semaines plus tard), aucune réaction allergique n'a été observée (voir paragraphe II.3.3.1.1 p. 54 traitant de l'irritation cutanée de l'éthanol).

II.3.3.4.2. Isopropanol

Dans le rapport technique N° 77 d'ECETOC (European Centre For Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) sur la sensibilisation cutanée et respiratoire, l'isopropanol figure parmi les substances de référence négatives pour la sensibilisation cutanée (ECETOC 1999). Ce rapport mentionne un essai de sensibilisation cutanée négatif chez l'animal après application d'isopropanol en solution aqueuse à 50% sur la peau faciale de rats durant 187 jours (Boughton, 1944).

Chez l'homme, quelques cas de sensibilisation cutanée ont été décrits.

Ludwig & Hausen (1977) ont rapporté un cas de sensibilisation à l'isopropanol chez une personne travaillant dans une industrie cosmétique, avec des antécédents d'exposition professionnelle à l'isopropanol. Les réactions cutanées ont été confirmées par 10 patch-tests de 24 heures avec différentes concentrations d'isopropanol (de 1 à 99,7%), avec des lectures positives à 24, 48 et 72 heures après retrait du patch pour toutes les concentrations, à l'exception de la dilution à 1%. Cette même personne a présenté un patch test positif au n-propanol et 1-butanol, tandis que les alcools primaires testés à moins de 3 atomes de carbone (dont l'éthanol) n'ont pas entraîné de réaction cutanée.

Dans un test de diagnostic d'allergie de contact survenu chez deux assistants de laboratoire utilisant des tampons désinfectants imprégnés d'oxyde de propylène (1%) et d'alcool isopropylique (70%), Ove Jensen a procédé à différents patchs cutanés (durée non précisée) incluant l'isopropanol à 70%, avec lecture à 48 et 72h (Jensen 1981). En plus des deux cas cliniques présentant l'allergie, 25 volontaires ont participé à l'essai. Parmi les 2 patients, l'un des deux a présenté une réponse positive. En revanche, aucun des 25 volontaires n'a présenté de réponse positive.

Vujevich & Zirwas (2007) ont rapporté un cas d'hypersensibilité retardée, diagnostiqué chez un patient au niveau du point de prélèvement sanguin préalablement désinfecté avec de l'isopropanol. Des patch-tests avec de l'isopropanol avec ou sans piqûre avec une aiguille ont été réalisés. Une réponse positive a été obtenue suite au patch avec piqûre.

Garcia-Garvin *et al.* (2011) ont publié les résultats de patchs cutanés de 48 heures à l'isopropanol, effectués à des fins de diagnostic d'allergie de contact. 1450 patients ont été testés sur une période de 1992 à 2011. Les patchs ont été réalisés et lus dans le respect des critères de l'ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group) (patchs de 48 heures avec lecture au retrait du patch puis 48 heures plus tard). 44 des 1450 sujets testés, soit 3 %, ont présenté une réponse clairement positive à l'isopropanol. Selon les auteurs, l'incidence des sensibilisations de contact liées à l'isopropanol est sous-estimée, cette molécule n'étant pas retenue dans les essais de diagnostic car non identifiée à ce jour comme agent sensibilisant cutané.

II.3.3.4.3. n-propanol

Des tests de sensibilisation cutanée du n-propanol chez la souris et chez le cobaye donnent des résultats négatifs.

Le n-propanol faisait partie des 71 substances testées pour le développement et validation du test de sensibilisation sur l'oreille de souris (MEST ou Mouse Ear Swelling Test) ([Gad et al. 1986](#)). 10 souris femelles (et 5 pour le contrôle) ont été traitées comme suit :

- induction de J0 à J3 par injection intradermique de 0,05 mL d'adjuvant complet de Freund à J0 et applications topiques de 100 µL de produit au niveau de l'abdomen rasé et strippé à J0, J1, J2 et J3,
- déclenchement à J10 par application topique de 20 µL de produit au niveau de l'oreille gauche,
- mesures de l'épaisseur de l'oreille avant et 24 et 48h après déclenchement.

Dans cet essai, le n-propanol à 100% n'a entraîné aucune augmentation statistiquement significative de l'épaisseur d'oreille. Dans leur publication, les auteurs rapportent également des résultats d'essai de sensibilisation négatifs avec le n-propanol à 100% dans deux autres approches expérimentales : le test de maximisation chez le cobaye (GPMT ou Guinea Pig Maximization Test) et le test de Buehler.

Il n'y a pas de preuves de réaction allergique au n-propanol chez l'homme. On peut cependant citer un cas de patch test positif au n-propanol (testé non dilué ou en solution à 50 % dans l'eau sous patch de 24 heures avec des lectures à 24, 48 et 72 heures après retrait du patch) chez une personne sensibilisée à l'isopropanol (personne travaillant dans une industrie cosmétique, avec des antécédents d'exposition professionnelle à l'isopropanol) ([Ludwig & Hausen, 1977](#)).

II.3.3.4.4. Résumé sur la sensibilisation cutanée et comparaison des alcools

L'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol ne sont pas considérés comme sensibilisants cutanés. Aucune différence notable entre les alcools ne ressort de cette revue bibliographique.

II.3.3.5. Données de tolérance cutanée aux produits hydro-alcooliques chez l'homme

Plusieurs études investiguant l'acceptabilité cutanée des produits hydro-alcooliques (PHA) utilisés pour la désinfection des mains ont conclu à une bonne tolérance cutanée de ces produits.

Dans une étude randomisée en double aveugle avec les sujets comme leur propre témoin, [Houben *et al.* \(2006\)](#) ont étudié les caractéristiques biophysiques de la peau après application répétée de PHA dans des conditions d'emploi représentatives de leur usage. 5 des produits testés étaient à base d'éthanol, et le 6^{ème} à base d'isopropanol :

<u>Gel</u>	<u>Ethanol (% v/v)</u>	<u>Isopropanol (% v/v)</u>	<u>Glycérine (% v/v)</u>
A	70		2
B	70		5
C	70		8
D	75		2
E	80		2
F		70	2

13 volontaires de sexe féminin ont eu un de leur avant-bras traité avec chacun des 6 produits sur des sites respectifs de 8 cm², à raison de 0,03 mL toutes les 20 minutes pendant 6 heures. Les évaluations ont été effectuées avant le début de l'essai puis une et 24 heures après la fin des applications et consistaient à mesurer la perte insensible en eau, l'hydratation des couches supérieures de l'épiderme, le pH apparent de la peau, le niveau de rougeur et le degré de desquamation de la peau.

Aucune altération de la barrière cutanée ni réaction d'irritation appréhendées par la perte insensible en eau et la mesure de la rougeur cutanée n'ont été retrouvées. Une augmentation du taux d'hydratation a été retrouvée pour les 6 produits aux deux temps de mesure, avec un effet d'autant plus important que la teneur en glycérine était élevée. Les six produits ont entraîné une diminution du pH de la peau 1 heure après la fin des applications, avec un retour à la normale 24 heures après, à l'exception du gel à base d'isopropanol (valeur de pH toujours diminuée mais dans une moindre mesure). Concernant la sécheresse cutanée, aucun effet mesuré par chromamétrie réalisée sur les squames prélevées par stripping puis colorés n'a été retrouvé pour 4 des 6 produits : seuls les produits à 75 et 80% v/v d'éthanol ont induit une légère différence dans les mesures, reflétant une légère desquamation imputable à ces produits.

Dans ce test d'usage mené sur 13 volontaires, les produits d'essai à base de 70 à 80% d'éthanol ou 70% d'isopropanol appliqués de façon répétée toutes les 20 minutes pendant 6 heures n'ont pas entraîné d'irritation cutanée.

Dans une étude menée sur volontaires, [Kampf *et al.* \(2002\)](#) ont investigué le potentiel irritant et sensibilisant d'un PHA formulé avec 85% p/p d'éthanol (Sterilium®) par patch tests occlusifs répétés (ROPT – repetitive occlusive patch test). 53 participants (8 hommes et 45 femmes) ont reçu 9 patchs de 24 heures sur 3 semaines, à raison de 3 patchs par semaine (phase d'induction). La présence d'érythème et d'œdème a été évaluée avant chaque pose de nouveau patch, soit 24 ou 48 heures après le retrait du patch. Après une phase de repos de 2 semaines, un patch de déclenchement de 24 heures a été appliqué sur un site non

préalablement exposé, avec une lecture des réactions immédiatement après le retrait du patch puis 48 et 72 heures après.

Durant la phase d'induction, aucune réaction en termes d'érythème ou d'œdème n'a été identifiée. Lors du déclenchement, un participant a présenté une réaction cutanée à peine perceptible à 48 et 72 heures, et un autre sujet a présenté un érythème d'intensité légère à 48 heures, atténué et à peine perceptible à 72 heures

L'impact du produit d'essai sur l'hydratation cutanée a également été étudié. 22 volontaires de sexe féminin se sont appliqués 2 fois par jour durant 14 jours le produit d'essai sur la face interne de l'avant-bras (surface délimitée de 7x7 cm), à raison de 3 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (± 150 $\mu\text{L}/\text{application}$), l'autre avant-bras non traité servant de témoin. Des mesures de cornéométrie ont été effectuées juste avant la première application, après 1 semaine de traitement puis en fin d'essai. Une augmentation significative de l'hydratation cutanée a été observée après 1 et 2 semaines de traitement.

Une autre étude retrouvée dans la littérature porte sur la tolérance cutanée d'un produit à base de 45% p/p d'isopropanol, 30% p/p de n-propanol et 0,2% p/p d'éthylsulfate de mecetronium, en présence d'agents émoullissants (Sterillium® – Bode Chemie GmbH) (Kampf & Muscatiello 2003). Dans cette étude, les potentiels irritant et sensibilisant du produit chez l'homme ont été évalués par un essai de patch-tests répétés. Durant la phase d'induction, 9 patchs occlusifs de 24 heures ont été appliqués au niveau du dos sur une période de 3 semaines. Après une période de repos de 2 semaines, l'épreuve déclenchante a été réalisée avec l'application d'un nouveau patch de 24 heures sur un site vierge. 24 ou 48 heures après le retrait des patchs durant la phase d'induction, et au moment du retrait du patch puis 48 et 72 heures après retrait lors de la phase de déclenchement, les réactions cutanées (érythème et œdème) étaient cotées selon une échelle standardisée.

Durant la phase d'induction, 2 des 55 sujets ont présenté un érythème minime à peine perceptible suite à l'un des 9 patchs. Les 53 autres sujets n'ont présenté aucune réaction cutanée durant cette phase. Lors de la phase de déclenchement, aucun des volontaires n'a présenté de réaction cutanée. Ces résultats sont en faveur d'une bonne tolérance cutanée du produit, avec absence de potentiel irritant et sensibilisant.

Des essais de tolérance cutanée avec plusieurs PHA (70 ou 80% d'éthanol) des Laboratoires Anios ont été réalisés (données non publiées). Ceux-ci incluaient notamment des patch-tests sur 10 volontaires, une évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée chez 50 à 100 volontaires, et des tests d'usage avec contrôle dermatologique chez 20 volontaires pour vérifier l'absence de réactions d'inconfort et/ou d'irritation liées à l'utilisation du produit en conditions normales d'utilisation (durée de 3 semaines minimum avec 5 applications ou plus de produits par jour). Le contrôle dermatologique permet l'appréciation de l'acceptabilité cutanée du produit sur la base d'examen cliniques de la peau (érythème, œdème, sécheresse, desquamation,...) et d'un interrogatoire permettant d'évaluer les signes fonctionnels (picotements, tiraillements, sensation de chaleur,...). Il est ressorti de ces essais une bonne à très bonne acceptabilité cutanée de ces produits. L'absence de propriétés déshydratantes des couches supérieures de l'épiderme liée à l'utilisation de ces produits a également été confirmée.

II.3.4. Génotoxicité/Mutagenèse

II.3.4.1. Ethanol

La génotoxicité de l'éthanol a été évaluée à de nombreuses reprises. On retrouve des essais *in vitro* sur bactéries (tests de mutation génique) et sur cellules de mammifères (tests de dommages primaires à l'ADN et de mutations géniques ou chromosomiques), ainsi que des tests *in vivo* de dommages primaires à l'ADN, de mutations chromosomiques et essais de mutations létales dominantes.

II.3.4.1.1. Tests *in vitro*

a) Dommages primaires à l'ADN

Plusieurs résultats positifs de test des comètes *in vitro* sur cellules de mammifères, suite à un traitement par l'éthanol, ont été publiés.

Blasiak *et al.* (2000) ont étudié les dommages potentiels à l'ADN induits par des solutions d'éthanol et d'acétaldéhyde sur des lymphocytes humains (LH) et des cellules humaines de muqueuse gastrique (GM) et muqueuse du colon (CM) issues de biopsies. Le test des comètes a été réalisé en conditions alcalines, suite à un traitement d'une heure par une solution d'éthanol (30 mM pour LH, 1 M pour GM et 10 mM pour CM) ou d'acétaldéhyde (3 mM pour LH et 100 mM pour GM et CM) effectué en absence de système d'activation métabolique. Le test a été réalisé après la fin du traitement (T0) puis sur une cinétique de 4 heures post-traitement (30 min, 1, 2, 3 puis 4 heures). Les essais ont été faits en *duplicate* et les lectures ont porté sur 100 cellules pour chaque essai. Sur les 3 modèles cellulaires, à T0, l'éthanol a entraîné une augmentation statistiquement significative de l'OTM (Olive tail moment: produit de la quantité d'ADN dans la queue par la longueur de la queue en μm) par comparaison aux cellules non traitées. La réponse était nettement plus importante sur GM que sur CM et LH, avec des amplitudes de réponses de 4,2, 1,5 et 1,2 fois celles du contrôle respectivement.

	LH	GM	CM
OTM Contrôle	9,09 ± 0,88	9,43 ± 2,01	13,07 ± 1,62
OTM Ethanol	11,08 ± 0,76 (p<0,05)	40,25 ± 5,17 (p<0,01)	20,4 ± 1,88 (p<0,01)

Un retour à des valeurs basales a été observé en moins d'une heure pour LH, et en moins de deux heures pour CM. Pour GM, 4 heures après le traitement, les valeurs d'OTM étaient toujours plus du double de la valeur des contrôles.

Avec l'acétaldéhyde, à T0, une diminution statistiquement significative des valeurs d'OTM a été observée comparativement aux cultures contrôles, avec des diminutions de réponses pour LH, GM et CM comparativement au contrôle d'un facteur 1,3, 3,8 et 5,2 respectivement.

	LH	GM	CM
OTM Contrôle	9,09 ± 0,88	9,43 ± 2,01	13,07 ± 1,62
OTM Acétaldéhyde	7,11 ± 0,83 (p<0,05)	2,45 ± 0,22 (p<0,05)	2,49 ± 0,31 (p<0,01)

Pour LH et GM, les valeurs d'OTM ont légèrement augmenté au cours des 4 heures, pour être du même ordre de grandeur que les cultures témoins. Pour CM, les valeurs étaient toujours inférieures après 4 heures.

Les auteurs expliquent la différence de résultats entre l'éthanol et l'acétaldéhyde par une différence d'effet, associant les résultats de l'éthanol à des cassures simple ou double brins de l'ADN, et ceux de l'acétaldéhyde à des pontages avec l'ADN.

Des dommages à l'ADN ont également été mis en évidence par [Lamarche et al. \(2003\)](#) sur des cultures de neurones de rats exposées à des solutions d'éthanol à 20, 50 ou 100 mM durant 6 heures en absence de système d'activation métabolique. Dans ces conditions, la viabilité neuronale n'était pas affectée. Le test des comètes a été réalisé en conditions alcalines après la fin du traitement (T0) ou après une période de recouvrement de 24 heures. Les essais ont été faits en *duplicate*, les lectures ont porté sur 200 cellules pour chaque essai et les résultats ont été exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue. Des dommages à l'ADN d'intensité dose-dépendante ont été observés, avec une augmentation statistiquement significative ($p < 0,0001$) aux doses de 50 et 100 mM (pourcentage d'ADN dans la queue d'environ 13,5 et 18,5%, *versus* 8% pour les cultures contrôles – valeurs estimées à partir de la représentation graphique de la publication). A 20 mM, le pourcentage d'ADN dans la queue n'était pas différent (voisin de 9%). 24 heures de recouvrement ont permis de retrouver le niveau basal, en relation avec la réparation des dommages à l'ADN selon les auteurs.

b) Mutations géniques sur bactéries

Aucune preuve de mutagenèse de l'éthanol sur bactéries (test d'Ames) n'a été établie, y compris pour des doses supérieures à celles préconisées dans la ligne directrice de l'OCDE No 471 (doses maximales de 5 mg ou 5 µL/boîte) ([OECD 1997](#)).

[De Flora et al. \(1984a\)](#) n'ont observé aucun effet dans le test d'Ames mené sur les souches de *Salmonella typhimurium* TA1535, 1537, 1538, 98 et 100, réalisé sur une gamme de dilutions d'éthanol (doses non communiquées mais dans la limite de la solubilité et/ou toxicité) en présence comme en absence de système d'activation métabolique.

Dans une autre étude menée sur les souches TA97 et TA102, une réponse faiblement positive à l'éthanol sur la souche TA102 a été observée ([De Flora et al. 1984b](#)). L'augmentation était inférieure au doublement du nombre de révertants, mais reproduite à deux reprises, aux doses de 160 et 240 mg d'éthanol par boîte (la publication ne précise pas si ces résultats sont en présence ou en absence d'activation métabolique).

Dans un essai avec pré-incubation incluant différents types d'activation métabolique exogène (deux origines de S9 : rat et hamster syrien induits par l'arochlor (inducteur enzymatique) et deux concentrations testées), [Zeiger et al. \(1992\)](#) ont obtenu des résultats négatifs à des concentrations comprises entre 1 et 10 000 µg/boîte d'éthanol sur les souches TA97, 98, 100, 104 et 1535, avec et sans activation métabolique.

On retrouve également plusieurs tests d'Ames publiés remplissant les critères d'acceptabilité de la ligne directrice No 471, avec des résultats négatifs, y compris pour des

doses d'éthanol 16 à 32 fois supérieures à la dose maximale recommandée (Cotruvo *et al.* 1978, Arimoto *et al.* 1982, Blevins & Taylor 1982, Blevins & Shelton 1983, Hayes *et al.* 1984, Hellmer & Bolcsfoldi 1992, Bingham *et al.* 2001).

Enfin, il est intéressant de mentionner que l'éthanol est souvent présent comme témoin négatif dans le test d'Ames en relation avec son utilisation comme solvant de dilution des substances d'essai. Les données historiques des Laboratoires Safepharm publiées par Phillips & Jenkinson (2001) pour l'éthanol (79 mg/boîte généralement) ne montrent aucun signe de mutagenèse, avec ou sans activation métabolique.

c) Mutations géniques sur cellules de mammifères

Les résultats publiés des essais de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifère avec l'éthanol sont négatifs, y compris à des doses supérieures à celles recommandées dans la version actuelle de la ligne directrice No 490 de l'OCDE publiée pour ce type d'essai (la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/mL ou 2 µL/mL) (OECD 2016i).

Dans un essai sur cellules de lymphome de souris S49 (mutants sélectionnés sur leur résistance à la dexaméthasone, la 6-thioguanine et l'ouabaïne), aucune augmentation de la fréquence de mutations n'a été observée suite à 4 heures d'exposition à l'éthanol (170 mM) en présence d'activation métabolique (Friedrich & Nass 1983).

Il en est de même dans un essai de mutation génique sur cellules de lymphome de souris L5178Y utilisant le gène de la Thymidine Kinase (MLA/TK-Mouse Lymphoma Assay sur le locus TK) (Amacher *et al.* 1980). L'essai a été réalisé en absence d'activation métabolique, avec une durée de traitement de 3 heures et des concentrations d'éthanol allant de 173 mM à 779 mM (35,9 mg/mL).

Wangenheim & Bolcsfoldi (1988) ont également publié des résultats de test MLA/TK pour l'éthanol avec une durée de traitement de 4 heures et des concentrations comprises entre 92 et 738 mM en absence d'activation métabolique, et 414 et 517 mM en présence d'activation métabolique.

En absence d'activation métabolique, une augmentation statistiquement significative du nombre de mutants pour 10^6 cellules a été observée aux doses minimale et maximale de 92 et 738 mM (4,2 et 34 mg/mL) comparativement aux contrôles (118 et 140 mutants *versus* 90, soit des fréquences de mutants induits (IMF) de +28 et +50). Les survies relatives associées étaient respectivement de 88 et 17%. Aux doses intermédiaires (184, 369 et 553 mM), la fréquence de mutants était comparable à celle des cultures contrôles.

En présence d'activation métabolique, seule la plus forte dose d'essai (517 mM, soit 24 mg/mL) a entraîné une augmentation statistiquement significative du nombre de mutants, avec 97 mutants pour 10^6 cellules *versus* 55 pour les contrôles (IMF de +42). A cette dose, le niveau de cytotoxicité associé était élevé, avec un taux de survie relative de 6% ne permettant pas l'exploitation de ce résultat.

Dans les deux conditions d'essai, compte tenue de la faible augmentation du nombre de mutants dans les cultures traitées (valeurs d'IMF très éloignées du FGE (facteur global

d'évaluation) fixé à +128 mutants pour 10^6 cellules, seuil de significativité biologique) et l'absence de relation dose-effet, l'éthanol est considéré comme négatif dans ce test.

Comme pour le test d'Ames, il est intéressant de mentionner que l'éthanol est souvent utilisé comme solvant de substances d'essai dans le test MLA/TK. [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#) ont publié les données historiques de l'éthanol des Laboratoires Safeparm (données sur 20 expérimentations – concentration généralement de 8 mg/mL (174 mM)). En absence comme en présence d'activation métabolique, l'éthanol est sans effet mutagène sur cellules de mammifère.

d) Mutations chromosomiques sur cellules de mammifères

Les tests de mutations chromosomiques sur cellules de mammifère renvoient aux tests d'aberrations chromosomiques (AC) et du micronoyau (MN) (lignes directrices No 473 et No 487 de l'OCDE respectivement). Concernant le test d'échanges de chromatides-soeurs (SCE) (OCDE No 479), par décision du Conseil de l'OCDE, la ligne directrice correspondante a été archivée le 2 avril 2014, en raison de résultats positifs étant plus en relation avec de la cytotoxicité que de la génotoxicité. Pour cette raison, les essais publiés de SCE avec l'éthanol ne sont présentés.

d.1) Test d'aberrations chromosomiques (AC) in vitro

La plupart des résultats publiés des tests d'AC avec l'éthanol sont négatifs, y compris pour des concentrations d'essai supérieures aux doses maximales préconisées dans la ligne directrice No 473 de l'OCDE publiée pour ce type d'essai (la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/mL ou 2 µl/mL) ([OECD 2016b](#)).

Dans un essai utilisant l'éthanol comme témoin solvant, [Banduhn & Obe \(1985\)](#) ont exposé des lymphocytes humains à une solution d'éthanol à 1% v/v (174 mM) durant 24 heures, uniquement en absence d'activation métabolique. Les résultats étaient négatifs, avec 3 et 4 AC pour 100 métaphases (lectures sur 100 et 200 métaphases respectivement, issues de 2 essais distincts avec des donneurs différents).

[Königstein et al. \(1984\)](#) ont également publié des résultats négatifs sur lymphocytes humains traités durant 24 ou 48 heures sans système d'activation métabolique avec des concentrations de 0,8 ou 1% v/v d'éthanol.

[Hsu et al. \(1991\)](#) et [Brown et al. \(1992\)](#) ont publié des résultats d'essais sur des cultures cellulaires issues de lignées lymphoïdes humaines. Les teneurs testées en éthanol étaient de 1 % ([Brown et al.](#)) ou 2% ([Hsu et al.](#)), sans système d'activation métabolique sur des durées de traitement courtes (2 heures à 1% et 5 heures ou moins à 2%). Dans les deux cas, les taux d'AC observés étaient similaires aux taux des cultures témoins non traitées.

Sur cellules CHO (cellules ovariennes de hamster chinois) exposées durant 3 heures à une solution d'éthanol à 4%, [Lin et al. \(1989\)](#) ont également rapporté des résultats négatifs. Cet essai n'incluait pas non plus de système d'activation métabolique.

Egalement, [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#) ont publié les données historiques des Laboratoires Safepharm relatives à l'éthanol en tant que témoin solvant dans l'essai d'AC mené sur lymphocytes humains ou cellules de poumon de hamster chinois (CHL), en absence comme en présence d'activation métabolique. La concentration finale en éthanol était de l'ordre de 8 mg/mL (174 mM). Parmi les données des 21 essais sans activation métabolique et des 11 essais avec activation métabolique, les taux d'AC suite au traitement par l'éthanol étaient comparables aux taux des 145 contrôles solvants, avec absence de mise en évidence de potentiel clastogène.

On retrouve cependant quelques études d'AC avec l'éthanol ayant donné des résultats positifs.

L'éthanol était l'une des substances testées dans un essai d'AC *in vitro* mené sur cellules CHO par [Darroudi & Natarajan \(1987\)](#). L'essai a été réalisé à deux reprises, en absence et en présence de système d'activation métabolique (S2 mix issu d'homogénat de feuille de maïs Zea), à la concentration de 160 mM en éthanol, et une durée de traitement de 30 minutes. En absence d'activation métabolique, l'éthanol à 160 mM était sans effet sur la fréquence d'AC. En présence d'activation métabolique, même si la seule présence du système d'activation métabolique a entraîné une augmentation de la fréquence des AC (24 *versus* 9 AC en absence de S2 mix pour 100 cellules), un effet nettement plus important et biologiquement significatif a été observé suite au traitement par l'éthanol (130 AC pour 100 cellules).

[Badr et al. \(1977\)](#) ont également étudié les propriétés mutagènes de l'éthanol par analyse des AC induites sur cultures de lymphocytes humains. Les cellules ont été exposées à 1,16, 2,32 et 3,48 mg/mL (25, 50 et 75 mM) d'éthanol en absence de système d'activation métabolique. La durée de traitement était de 50 heures. L'incidence d'AC dans les cultures traitées était supérieure à celle du témoin négatif de façon statistiquement significative ($p < 0,005$), avec des fréquences de 0,26, 0,31 et 0,4 pour les doses respectives de 1,16, 2,32 et 3,48 mg/L, contre un taux spontané moyen de 0,06.

Dans leur revue traitant des propriétés génotoxiques de l'éthanol, [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#) précisent que les doses d'essai sont nettement inférieures à celles usuellement utilisées pour l'éthanol en tant que témoin solvant négatif (8 mg/mL ou 174 mM) (données présentées plus haut) et formulent deux hypothèses pouvant expliquer ces résultats contradictoires des autres études publiées :

- la possible contamination de l'éthanol avec un agent mutagène
- une erreur de lecture des AC, au regard des photographies fournies dans la publication.

Ils précisent également qu'[Au & Badr \(1979\)](#) ont publié dans un abstract que l'éthanol n'induisait pas d'AC sur lymphocytes humains ni sur cellules CHO traitées pendant 12 à 48h avec des doses de 0,5 à 10 mg/mL (10,9 à 217 mM), tandis que l'éthanol en présence d'activation métabolique provoquait une augmentation dose dépendante des AC dans les cellules CHO, sans en mentionner l'amplitude.

[Lau et al. \(1991\)](#) ont rapporté un niveau élevé d'AC sur des embryons de souris au stade pré-implantatoire exposés *in vitro* pendant 24 heures à des concentrations d'éthanol comprises entre 1 et 30 mg/mL, soit l'équivalent de 22 à 650 mM (34,5, 29,4, 22,2 et 32,5%

d'AC aux doses respectives de 1, 3, 10 et 30 mg/mL, *versus* 7,7 pour les contrôles – $p < 0,001$). Aucune relation dose-effet n'a été observée dans cet essai.

d.2) Test du micronoyau (MN) in vitro

L'éthanol a également été décrit comme génotoxique dans un test du MN *in vitro*.

Des cellules MCL-5 (cellules lymphoblastoïdes humaines métaboliquement compétentes) ont été exposées pendant 22 heures à des solutions d'éthanol comprises entre 0,1 et 2 % v/v ou des solutions d'acétaldéhyde comprises entre 0,005 et 0,25 % v/v (Kayani & Parry 2010). Le traitement a été effectué en présence de cytochalasine B pour permettre la lecture des MN sur cellules bi-nucléées. Le test a été couplé à un marquage des kinétochores par immunofluorescence pour distinguer les effets clastogènes des effets aneugènes. 4500 à 5600 cellules par dose ont été lues.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

Dose (% v/v)	% cytostase	% cellules micronucléées	Proportion de MN K ⁺ & K ⁻		
			K ⁺	K ⁻	
Ethanol	0	--	0,99	0,52	0,48
	0,1	0	1,35	nt	nt
	0,2	5,88	1,35	nt	nt
	0,4	21,57	2,30*	0,74	0,26
	0,8	47,06	2,47*	0,80	0,20
	1,0	45,10	3,31*	0,87	0,13
	2,0	72,55	5,35*	0,92	0,08
Acétaldéhyde	0	--	0,85	0,47	0,53
	0,005	60	1,86*	nt	nt
	0,010	61,81	2,08*	0,46	0,54
	0,015	61,81	2,28*	0,33	0,67
	0,020	65,45	2,60*	0,34	0,66
	0,025	65,45	3,73*	0,32	0,68

K⁺ : kinétochore positif / K⁻ : kinétochore négatif nt : non testé

* $p < 0,05$

Suite au traitement par l'éthanol, une augmentation statistiquement significative du nombre de MN comparativement au témoin ($p < 0,05$) a été observée à partir de 0,4% v/v, avec un effet d'autant plus important que la dose était élevée. Cependant, à 2% v/v, la cytostase observée était supérieure au seuil maximum de cytotoxicité acceptable de 60%. Par ailleurs, à cette dose, le taux de nécrose était élevé (54,51%, *versus* des taux inférieurs à 10 % pour toutes les autres doses).

Suite au traitement par l'acétaldéhyde, une augmentation statistiquement significative du nombre de MN comparativement au témoin ($p < 0,05$) a également été observée. Les taux de cytotoxicité associés étaient élevés, excédant les 60 % pour 4 des 5 doses d'essai.

L'analyse par immunofluorescence a mis en évidence pour l'éthanol une proportion de MN K⁺ plus importante que K⁻, avec une légère augmentation de l'effet avec la dose. A l'inverse, pour l'acétaldéhyde, une proportion de MN K⁻ plus importante que K⁺ a été observée. Pour ces données, aucune analyse statistique associée n'est communiquée.

Ces données suggèrent un effet de l'acétaldéhyde indépendant de celui de l'éthanol, avec un mécanisme aneugène induit par l'éthanol, et un effet clastogène induit par l'acétaldéhyde.

II.3.4.1.2. Tests *in vivo*

a) Dommages primaires à l'ADN *in vivo*

a.1) Etudes chez le rongeur

Plusieurs études *in vivo* publiées rapportent des dommages à l'ADN consécutifs à une exposition systémique à l'éthanol. Les effets étaient généralement réversibles sur des durées relativement courtes.

Chez le rat, [Singh et al. \(1995\)](#) ont mis en évidence par électrophorèse en conditions alcalines des dommages à l'ADN induits par l'éthanol sur des cellules nerveuses. Trois groupes de 8 rats Sprague-Dawley ont reçu *per os* (intubation) 4 g/kg d'éthanol (solution d'éthanol à 20% v/v) puis ont été euthanasiés 2, 4 ou 6 heures après le traitement. L'essai incluait un groupe contrôle sans éthanol. Une augmentation statistiquement significative ($p < 0,01$) de la longueur moyenne de migration de l'ADN comparativement au groupe contrôle a été observée sur les noyaux de cellules nerveuses 4 heures post traitement (215 μm *versus* 150 μm – valeurs approximatives estimées à partir du graphe de la publication). A 2 et 6 heures, les valeurs mesurées étaient voisines du niveau basal.

Chez la souris, [Kido et al. \(2006\)](#) ont également mis en évidence des dommages à l'ADN consécutifs à l'exposition à l'éthanol. Des souris au 7^{ème} jour de gestation ont été traitées avec 4 ou 8 g/kg d'éthanol (4 souris par groupe – administration *per os* d'une solution à 20 % v/v d'éthanol) et le test des comètes a été réalisé 4 et 8 heures post-traitement sur différents organes (cerveau, poumon, foie, reins, estomac, colon, vessie) et sur les embryons. 50 cellules par tissu ou embryon ont été analysées par animal, avec détermination de l'index de dommage à l'ADN (longueur de la queue, correspondant à la longueur totale de la comète moins le diamètre de la tête). Des augmentations statistiquement significatives de la longueur de la queue ont été retrouvées au niveau du cerveau, des poumons et des embryons, aux deux temps de mesure pour les deux doses d'essai, avec des amplitudes de réponse plus importantes comparativement aux témoins d'un facteur 1,7 au minimum, généralement supérieur ou égal à 3. A l'exception des embryons, l'amplitude de réponse était moindre dans le groupe ayant reçu la dose de 8 g/kg. Des augmentations statistiquement significatives ont également été observées à la dose de 4 g/kg au niveau des reins à 4 heures post-traitement (facteur 4), et au niveau de l'estomac, du colon et de la vessie à 8 heures post-traitement (facteur 2 à 3). Aucun effet n'a été retrouvé au niveau du foie. Des investigations complémentaires ont été effectuées sur les organes cibles (cerveau, poumons), les embryons et le foie, en ajoutant la dose de 2 g/kg aux 4 et 8 g/kg et en ajoutant des temps d'analyse (12 et 24 heures en plus des 4 et 8 heures post traitement). Aucun effet n'a été retrouvé dans le groupe de traitement à 2 g/kg. Aucun dommage à l'ADN n'a été retrouvé au niveau du foie, quels que soient la dose et le temps d'analyse. Sur les organes cibles et les embryons, la dose de 8 g/kg a entraîné une rémanence plus importante des dommages à l'ADN comparativement à la dose de 4 mg/kg, sans augmenter significativement l'intensité de l'effet (sauf à 8 heures pour les embryons).

Des dommages à l'ADN induits par l'éthanol ont également été observés chez la souris (Swiss mice) par [Guo et al. \(2008\)](#) sur des leucocytes périphériques. Après une injection *i.p.* unique de 2,5 ou 5 g/kg d'éthanol (4 souris mâles par dose + un groupe contrôle traité avec une solution saline) des dommages à l'ADN exprimés par une augmentation de la longueur de la queue de fragmentation (lecture sur 100 cellules par animal, cinétique sur 24 heures) ont été observés ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$ selon le temps et/ou la dose), avec un effet maximal une heure après le traitement quelle que soit la dose, et une intensité de l'effet plus importante à la dose de 5 g/kg. Les valeurs mesurées à 24 heures étaient voisines du niveau basal.

Des groupes d'animaux ont également été traités sur une durée de 30 jours par gavage avec 0, 2,5 ou 5 g/kg d'éthanol (4 mâles par dose). Des analyses ont été effectuées à J1, J2, J5, J10, J20 et J30, ainsi que 1, 3 et 7 jours après la fin du traitement. Sur toute la durée du traitement, une augmentation statistiquement significative ($p < 0,001$) de la longueur moyenne de la queue a été observée pour les deux doses d'essai, comparativement au contrôle (amplitude augmentée d'un facteur 2 à 3), avec un effet légèrement moins important avec la plus faible dose. 24 heures après l'arrêt du traitement, des dommages à l'ADN étaient encore visibles. Un retour aux valeurs basales a été observé en 3 jours.

Les auteurs ont attribué les dommages à l'ADN à un processus oxydatif. Une augmentation significative de la teneur urinaire en 8OHdG (8 hydroxy 2' deoxyguanosine) des animaux traités a été observée (analyse sur les prélèvements d'urine dans les 6 heures suivant le traitement). Une augmentation statistiquement significative des espèces réactives de l'oxygène a également été détectée sur les prélèvements sanguins effectués 1 heure après le traitement.

Chez la souris, [De Oliveira et al. \(2012\)](#) ont également mis en évidence par le test des comètes des dommages à l'ADN sur le sang périphérique et les cellules du cerveau, consécutifs à une exposition par gavage à 5 g/kg d'éthanol (10 souris CF-1 (5 mâles et 5 femelles)). L'essai incluait un groupe contrôle traité avec de l'eau. Un prélèvement sanguin a été effectué 1 heure après le traitement, et 24 heures post traitement (au moment du sacrifice des animaux), en plus du prélèvement du cerveau. Pour chaque animal, les lectures ont été faites sur 100 cellules (2 fois 50 cellules issues de deux essais indépendants), avec la détermination d'un indice de dommage à l'ADN en relation avec la taille de la queue, selon une échelle de 0 à 4 (0 : aucun dommage / 4 : maximum de dommages), donnant par animal une valeur comprise entre 0 et 400. La proportion de cellules présentant des dommages à l'ADN a également été déterminée. Au niveau des cellules sanguines, une augmentation statistiquement significative ($p < 0,05$) de l'indice de dommages à l'ADN a été observée suite au traitement par l'éthanol (5g/kg) comparativement au groupe témoin, aux deux temps de mesure, avec des réponses évaluées 4,75 fois supérieures à 1 heure post traitement (score de 66,60 *versus* 14) et 3,4 fois supérieures à 24 heures post traitement (score de 58,60 *versus* 17). La proportion de cellules avec dommages à l'ADN était également augmentée de façon statistiquement significative (61,2 % *versus* 9,87% à 1 heure (facteur 6), et 40,2 % *versus* 12,6 % à 24 heures (facteur 3)). Sur les cellules du cerveau, un effet à 24 heures a également été retrouvé en termes d'intensité (score de 102 *versus* 62 pour le contrôle) et de fréquence (64,56% *versus* 49,63% pour le contrôle), de façon statistiquement significative pour l'indice de dommage à l'ADN ($p < 0,05$).

[Da Costa et al. \(2014\)](#) ont également mis en évidence par le test des comètes des dommages à l'ADN induits par l'éthanol sur sang périphérique de souris CF-1. Un groupe de 5

souris mâles a reçu pendant 3 jours consécutifs une injection *i.p.* de 2,5 g/kg d'éthanol. Le groupe contrôle a été traité avec une solution saline à 0,9%. Les animaux ont été sacrifiés le 4^{ème} jour. L'analyse effectuée était la même que pour l'étude de [De Oliveira et al. \(2012\)](#) ci-avant (indice de dommage à l'ADN par animal d'une valeur comprise entre 0 et 400 et proportion de cellules présentant des dommages à l'ADN). Dans cet essai, suite au traitement par l'éthanol, une augmentation statistiquement significative ($p < 0,05$) de l'indice de dommages à l'ADN comparativement au groupe témoin a été observée (score de 76,8 *versus* 50,4 - facteur 1,5). Il en a été de même de la proportion de cellules avec dommages à l'ADN (64,4% *versus* 42,5% - facteur 1,5 - $p < 0,05$).

Une étude *in vivo* chez le rat investiguant la formation d'adduits à l'ADN dans différents organes suite à un traitement chronique oral par l'éthanol a donné des résultats négatifs.

Un groupe de 7 femelles (rats BD₆) a reçu pendant 8 mois par voie orale 4,3 g/kg/jour d'éthanol (administration dans l'eau de boisson à 5% v/v) ([Izotti et al. 1998](#)). Le groupe témoin n'a reçu aucun traitement. Aucune augmentation des adduits à l'ADN évalués par radiomarquage au ³²P n'a été retrouvée au niveau de l'œsophage, du foie, des poumons et du cœur. L'analyse des liaisons protéiques par détection fluorométrique au niveau du foie, des poumons et du cœur n'a pas mis non plus en évidence d'effet. Dans cette étude, l'éthanol n'a pas entraîné d'augmentation significative du nombre d'adduits à l'ADN vis-à-vis des différents organes étudiés.

a.2) **Données chez l'homme**

Le test des comètes a été effectué sur cellules rectales humaines de 10 sujets masculins ayant une consommation excessive d'alcool ([Pool-Zobel et al. 2004](#)). Par comparaison aux sujets masculins contrôles, une diminution statistiquement significative ($p < 0,001$) des cassures de l'ADN évaluées par le pourcentage d'ADN dans la queue a été observée. Les auteurs expliquent ces résultats par un mécanisme de défense endogène avec augmentation des capacités de réparation de l'ADN lié à l'alcoolisme (induction d'enzymes anti-oxydantes telle que la superoxide-dismutase par exemple, protégeant de l'ion superoxyde issu du métabolisme de l'éthanol, ou encore induction de l'enzyme de phase II Glutathion-transferase, exprimée dans les cellules du colon). Cependant, dans cette étude, aucune mesure d'activité enzymatique n'a été effectuée pour confirmer cette hypothèse.

Dans sa monographie relative à la consommation de boissons alcoolisées, le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) a formulé l'hypothèse complémentaire de formation de pontages ADN-protéines liée à l'exposition à l'acétaldéhyde ([IARC 2012](#)).

b) **Mutations chromosomiques in vivo**

Les tests de mutations chromosomiques *in vivo* renvoient aux tests d'aberrations chromosomiques (AC) et du micronoyau (MN) (lignes directrices No 475 et No 474 de l'OCDE respectivement, [OECD 2016d & 2016c](#)). Certaines publications reprennent des résultats

d'essai d'échanges de chromatides sœurs (SCE) *in vivo*. Cependant, il n'existe pas de ligne directrice de test de SCE *in vivo* et la ligne directrice du test SCE *in vitro* (OCDE No 479) a été archivée le 2 avril 2014 par décision du Conseil de l'OCDE en raison de résultats positifs étant plus en relation avec de la cytotoxicité que de la génotoxicité. Pour cette raison, les essais publiés de SCE *in vivo* avec l'éthanol n'ont pas été retenus.

b.1) Test d'aberrations chromosomiques (AC) sur rongeurs

Les tests d'AC publiés portent sur des expositions sub-chroniques *p.o.* à l'éthanol (jusqu'à 46 semaines). Les résultats sont tous négatifs.

Des rats mâles Wistar ont reçu 10 ou 20 % v/v d'éthanol dans l'eau de boisson pendant 3 ou 6 semaines et n'ont présenté aucune augmentation significative du nombre d'AC dans la moelle osseuse ou les lymphocytes du sang périphérique (Tates *et al.* 1980). Le nombre d'animaux dans cet essai était faible (2 pour les groupes à 10%, et 1 pour les groupes à 20%).

Chez le hamster chinois, aucune augmentation significative du nombre d'AC n'a été retrouvée dans la moelle osseuse de 11 animaux après un traitement *p.o.* par éthanol ajouté dans l'eau de boisson à 10 % pendant 9 semaines (Korte *et al.* 1979).

Des résultats similaires ont été publiés dans un essai d'AC sur moelle osseuse chez le hamster chinois (groupes de 18 animaux) ayant reçu de l'éthanol dans l'eau de boisson à hauteur de 20% durant 12 semaines (Korte *et al.* 1981a).

Il en est de même dans une étude sur hamsters chinois ayant reçu de l'éthanol à 10 % dans l'eau de boisson durant 46 semaines (3 mâles et 2 femelles) (Korte *et al.* 1981b). L'étude des AC a été réalisée sur les lymphocytes. Aucun effet lié à l'éthanol n'a été mis en évidence.

Une étude plus récente chez le rat Wistar après traitement *p.o.* de 30 jours avec de l'éthanol à 20% v/v dans l'eau de boisson a également donné des résultats négatifs (Tavares *et al.* 2001). Une légère augmentation de la fréquence des AC sur cellules de moelle osseuse chez les animaux traités (n=10) par rapport aux animaux témoins (n=10) a été observée, mais n'était ni statistiquement ni biologiquement significative (4,4 AC pour 100 cellules *versus* 2,8 pour les mâles, et 2,4 AC pour 100 cellules *versus* 1,4 pour les femelles).

b.2) Test du micronoyau (MN) sur rongeurs

La plupart des résultats publiés de test du MN *in vivo* chez le rat ou la souris ayant reçu de l'éthanol sur des durées pouvant atteindre 33 semaines sont négatifs, y compris à des doses supérieures à celles recommandées dans la ligne directrice No 474 de l'OCDE publiée pour ce type d'essai (2 g/kg/j pour des durées inférieures à 14 jours, 1 g/kg/j pour des durées supérieures ou égales à 14 jours) (OECD 2016c).

De Oliveira *et al.* (2012) ont réalisé le test du MN sur cellules de moelle osseuse chez la souris CF-1 ayant reçu par gavage une dose unique de 5 g/kg d'éthanol (5 mâles et 5 femelles). Le groupe contrôle a reçu de l'eau sans alcool. Les animaux ont été sacrifiés 24 heures après le traitement. Dans cet essai, aucune augmentation statistiquement ni biologiquement

significative du nombre de MN n'a été observée suite au traitement par l'éthanol, comparativement au groupe témoin (lectures sur 2000 PCE par animal (érythrocytes polychromatophiles) (2 fois 1000 PCE issus de deux essais indépendants)).

Des résultats similaires ont été obtenus avec le test du MN sur moelle osseuse de souris CF-1 (5 mâles par groupe) après exposition systémique à l'éthanol par injection *i.p.* de 2,5 g/kg pendant 3 jours consécutifs (da Costa *et al.* 2014). Le groupe contrôle a été traité avec une solution saline à 0,9%. Les animaux ont été sacrifiés le 4^{ème} jour. Dans cet essai, aucune augmentation statistiquement ni biologiquement significative du nombre de MN n'a été observée suite au traitement par l'éthanol, comparativement au groupe témoin (évaluation de 2000 PCE par animal).

Le test du MN a également donné des résultats négatifs sur cellules de moelle osseuse chez la souris Swiss (5 mâles par groupe) après administration *p.o.* d'éthanol dans l'eau de boisson durant 26 jours (doses de 10% ou 20% les 6 premiers jours, augmentées à 20% ou 30% du 7^{ème} au 13^{ème} jour puis 30 ou 40% les 14 derniers jours) (Chaubey *et al.* 1977). Les animaux ont été sacrifiés le 27^{ème} jour. Quelle que soit la dose d'éthanol administrée, aucune augmentation du nombre de MN n'a été observée comparativement au groupe témoin (évaluation de 4000 PCE par animal). La plus forte dose d'essai dans cette étude a entraîné une mortalité (n=2) et était donc supérieure à la dose maximale tolérée, normalement utilisée comme dose maximale d'essai dans le respect de la ligne directrice No 474 de l'OCDE dans sa version actuelle (OECD 2016c).

Dans un essai évaluant l'effet génotoxique d'une consommation chronique d'éthanol chez la souris, les résultats du test du MN sur cellules de moelle osseuse étaient également négatifs (Ellahuene *et al.* 2012). 3 groupes de 6 souris mâles CF-1 ont reçu dans leur eau de boisson durant 33 semaines de l'éthanol à 5, 10 ou 15% v/v. L'étude comptait un groupe d'animaux témoins recevant de l'eau uniquement sur la même période. L'absence de cytotoxicité évaluée par le ratio PCE/NCE (érythrocytes normochromatophiles) a été confirmée dans cet essai et les résultats obtenus en termes de MN (2000 PCE évalués par animal) étaient négatifs.

Le test du MN a été effectué sur les macrophages alvéolaires pulmonaires et sur les érythrocytes polychromatiques de moelle osseuse de rats BD₆ (3 mâles par groupe) ayant reçu dans leur eau de boisson de l'éthanol à 5 % (équivalent à 2 g/kg/j) durant 10, 23 ou 30 jours, ou de l'éthanol à 10% (équivalent à 3,9 g/kg/j) durant 10 jours (Balansky *et al.* 1993). Le groupe contrôle a reçu de l'eau sans alcool. Quelle que soit la dose et la durée de traitement, aucune augmentation du nombre de MN n'a été observée (4000 macrophages et 2000 PCE évalués par animal).

Tates *et al.* (1980) n'ont rapporté aucune augmentation de la fréquence des MN dans les cellules hépatiques et cellules de moelle osseuse de rats Wistar ayant reçu pendant 3 ou 6 semaines 10 ou 20 % v/v d'éthanol dans leur eau de boisson (1000 hépatocytes et 1000 PCE évalués par animal). Le nombre d'animaux était faible : 4 et 2 rats pour les groupes à 10% pour les hépatocytes et les cellules de moelle osseuse respectivement, 1 seul animal pour les groupes à 20%).

Egalement, Phillips & Jenkinson (2001) ont publié les données historiques des Laboratoires Safeparm relatives à l'éthanol en tant que témoin solvant dans le test du MN *in vivo* sur

moelle osseuse de souris (administration *p.o.* à la dose de 2000 mg/kg). Dans les 60 essais rapportés, les résultats étaient négatifs.

On retrouve néanmoins deux études du MN *in vivo* publiées avec des résultats positifs. Des réserves sont toutefois formulées quant à l'exploitabilité de ces résultats.

Une augmentation statistiquement significative mais non dose dépendante du nombre de MN sur cellules de moelle osseuse de souris a été rapportée par [Badr et al. \(1977\)](#) après exposition systémique à l'éthanol. Des groupes de 8 animaux (4 mâles et 4 femelles de souris Parkes) ont reçu par voie *i.p.* durant deux jours consécutifs 0,3 mL d'éthanol à 20, 40 ou 60%, équivalent à 0,62, 1,24 et 1,86 g/kg. L'étude comptait un groupe d'animaux non traités. Les animaux ont été sacrifiés 6 heures après la seconde administration. 1000 PCE et 1000 NCE ont été analysés par animal. Les pourcentages de PCE micronucléés aux doses de 0,62, 1,24 et 1,86 g/kg étaient respectivement de 7,6 ($p < 0,05$), 7,5 et 6,29 % *versus* 5,6 % pour le groupe contrôle. Pour les NCE, les valeurs respectives étaient de 8,89 ($p < 0,01$), 8,68 ($p < 0,05$) et 7,38 % *versus* 4,63 %. Les auteurs expliquent la relation dose-réponse inversée comme pouvant résulter d'une toxicité excessive dans la moelle osseuse, sans que les rapports PCE/NCE permettant d'apprécier la cytotoxicité ne soient présentés dans l'article.

Dans leur revue traitant de la génotoxicité de l'éthanol, [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#) remettent en cause la fiabilité de cette étude. Les résultats présentés sous forme d'un tableau et d'un graphique semblent contradictoires entre les deux présentations. En outre, les données du tableau rapportent une fréquence moyenne de MN du groupe témoin de 4,63 % dans les NCE et de 5,6 % dans les PCE, valeurs 20 à 50 fois supérieures à celles normalement observées. Cette différence suggère que les souris dans cette étude étaient pour la plupart anormales à cet égard, à moins d'un problème de qualité technique des lames ou de méthode d'analyse utilisée. Les données indiquent également des fréquences semblables de MN dans les NCE et PCE. Ceci n'est pas cohérent avec la cinétique de développement des NCE à partir des PCE qui ne permet pas d'observer un nombre équivalent d'érythrocytes micronucléés des deux types sur un seul temps d'observation de 30 heures, tel que c'est le cas dans cette étude.

[Baraona et al. \(1981\)](#) ont effectué le test du MN chez le rat CD (20 mâles par groupe) après 6 semaines de régime alimentaire incluant 36% d'apport énergétique par l'éthanol (correspondant à une quantité d'éthanol comprise entre 12 et 16 g/kg/jour). Les éthanolémies obtenues étaient de l'ordre de 1,5 g/L, représentatives de celles observées chez des sujets alcooliques. Par comparaison au groupe contrôle, le traitement par éthanol a augmenté la fréquence de MN dans les érythrocytes de la moelle osseuse de 0,95 à 1,30 % dans les PCE (lectures sur 1200 et 1600 PCE par animal respectivement) et de 0,67 à 0,84 % dans les NCE (lectures sur 3500 et 5900 NCE par animal respectivement). L'augmentation de MN obtenue dans les PCE, bien que faible, était statistiquement significative ($p < 0,05$). Par contraste, aucune augmentation de MN n'a été rapportée par les auteurs après administration aiguë d'éthanol (deux intubations de 6 g/kg puis 3 g/kg 23 et 6 heures avant le sacrifice des animaux), suggérant que les effets observés nécessiteraient une exposition répétée à l'éthanol.

b.3) Données chez l'homme

Plusieurs études chez l'homme de test du MN ou d'AC sur lymphocytes humains de sujets alcooliques ont donné des résultats significatifs.

Dans une étude réalisée sur lymphocytes humains prélevés chez des sujets alcooliques (n=20) (+ un groupe contrôle de 20 volontaires), la fréquence de MN était significativement augmentée chez les sujets alcooliques comparativement aux contrôles ($12\pm 5,4$ versus $7,6\pm 1,6$; $p<0,05$). La nature des effets investigués par immunofluorescence a mis en évidence un taux significativement plus élevé de MN centromère-positifs ($8,2\pm 4,8$ versus $3,4\pm 1,4$; $p<0,05$), suggérant un mécanisme aneugène associé (Maffei *et al.* 2000).

Des résultats d'essai de MN et d'un test d'AC réalisés sur lymphocytes humains ont également été publiés par la même équipe (Maffei *et al.* 2002). Les prélèvements sanguins ont été réalisés chez des sujets alcooliques chroniques (A.chr) depuis 4 à 40 ans (n=20) et des anciens alcooliques (AA) depuis 1 à 5 ans (n=20) (+ un groupe contrôle (T) de 20 volontaires). Aucune différence n'a été observée entre (AA) et (T). En revanche, des différences ont été notées entre (AA) ou (T) et (A.chr). La fréquence de MN était significativement augmentée chez les sujets (A.chr) comparativement aux sujets (AA) et (T) ($12,05\pm 5,43$ versus $7,15\pm 2,64$ et $7,6\pm 1,57$ pour 1000 cellules binucléées ; $p<0,05$). Il en était de même pour la fréquence des AC ($4,10\pm 1,94$ versus $1,95\pm 1,10$ et $1,45\pm 0,83$ pour 100 cellules ; $p<0,001$).

Dans une autre étude réalisée sur lymphocytes humains prélevés chez des sujets alcooliques chroniques (A.chr) depuis 3 à 47 ans (n=29) et anciens alcooliques (AA) depuis 3 à 48 mois (n=11) (+ un groupe contrôle de 10 volontaires), la fréquence des AC était supérieure dans les deux groupes comparativement aux contrôles ($5,15\pm 0,37$ et $3,87\pm 0,34$ AC pour 100 cellules chez les A.chr et AA respectivement, versus $1,72\pm 0,52$ chez les contrôles – $p<0,001$) (Burim *et al.* 2004).

Dans la monographie du CIRC relative à la consommation de boissons alcoolisées (IARC 2012), une analyse combinée de 3 études de biomonitoring chez l'homme conclut à une faible augmentation de la fréquence de MN chez les consommateurs d'alcool versus les sujets contrôles, mais statistiquement significative (OR=1,24, IC95 : [1,01 – 1,53]). Chez les anciens alcooliques, la plupart des études n'ont pas montré d'augmentation des altérations chromosomiques par comparaison à des sujets contrôles, avec cependant quelques études concluant à des résultats positifs (3 autres études citées en plus de celle de Burim *et al.* (2004) présentée ci-dessus).

c) Essais de mutation létale dominante chez le rongeur

Plusieurs études de mutation létale dominante publiées donnent des résultats positifs.

Un niveau élevé de létalité dominante chez la souris exposée à de l'éthanol a été signalé dans une série d'études publiée par Badr *et al.* (Badr & Badr 1975 ; Badr *et al.* 1977).

8 souris mâles (CBA/Fa Cam) traitées avec de l'éthanol (1,24 g/kg) par voie orale pendant trois jours consécutifs ont été accouplées à des femelles à 8 reprises à 1 semaine d'intervalle.

L'examen des portées des femelles ayant mis bas a montré une diminution marquée de la taille moyenne de la portée comparativement au groupe témoin, limitée à la portée issue de la 3^{ème} semaine d'accouplement (jours 14 à 17). Aucun examen du contenu utérin n'a été effectué, mais ces résultats ont toutefois été considérés comme une preuve de perte post-implantation due à des mutations létales dominantes. Dans leur revue traitant de la génotoxicité de l'éthanol, [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#) précisent que la méthode utilisée pour calculer l'indice létal dominant (égal à 38,3 dans cet essai) n'est appropriée que pour les mutagènes très puissants. Ils précisent également que des effets non génétiques peuvent être à l'origine d'une réduction de la fréquence d'accouplement, de la fréquence de fécondation ou de la fréquence d'implantation et ces possibilités n'ont pas été prises en compte par les auteurs.

Dans une seconde expérimentation, des souris (CBA/J) ont été traitées par voie orale pendant trois jours consécutifs avec 1,24 g/kg d'éthanol (n=25) ou 1,86 g/kg (n=6) puis accouplées à des femelles à 8 reprises tous les 4 jours. Le groupe contrôle (n=20) a reçu 0,1 mL d'eau distillée. Les contenus utérins ont été examinés aux jours 13 à 15 de gestation. Les auteurs ont rapporté des augmentations significatives de la fréquence des implants morts et de l'indice létal dominant aux 2^{ème} et 3^{ème} temps d'accouplement, à savoir aux jours 4-8 et 9-13, pour les deux doses d'essai.

Toujours dans leur revue traitant de la génotoxicité de l'éthanol, [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#) précisent que cette réponse n'est pas cohérente avec les résultats de l'expérience précédente, pour laquelle l'effet n'a été observé qu'aux jours 14-17.

[Berryman et al. \(1992\)](#) ont également publié des résultats positifs d'une étude de mutation létale dominante chez la souris. 10 mâles (souris CF-1) ont reçu de l'éthanol par voie orale à hauteur de 28 % de l'apport calorique sur une durée de 5 semaines puis ont été accouplés à trois femelles chacun durant une semaine. L'éthanol était remplacé par du sucrose à iso-équivalence en termes d'apport calorique pour le groupe contrôle. Les mâles ont été sacrifiés en fin de période d'accouplement. Les femelles ont été sacrifiées au 14^{ème} jour de la gestation. Une diminution du poids des testicules ainsi qu'une augmentation significative des pertes pré-implantatoires (d'un facteur 3 environ) et de la mortalité fœtale (d'un facteur 2,5 environ) ont été rapportés. L'indice de mutation calculé dans cet essai était significativement augmenté (p<0,001). La dose administrée dans cet essai estimée à 22-25,5 g/kg/j était plus de 20 fois supérieure à la dose maximale recommandée dans la ligne directrice de l'OCDE No 478 ([OECD 2016f](#)).

Chez des rats exposés pendant 15 jours par voie orale à des doses d'éthanol atteignant 58 % de l'apport calorique (consommation estimée d'éthanol de 7,2 à 14,4 g/kg/j) (n=6) une augmentation des avortements précoces comparativement au groupe témoin pouvant être interprétée comme un effet létal dominant a été observée ([Klassen & Persaud 1976](#)). Cependant, seules six rates gestantes ont été examinées dans le groupe traité et les mâles ont été traités chroniquement avec de l'éthanol, de sorte que leur poids corporel était réduit de 40 % le 30^{ème} jour et leur performance reproductive était réduite à un niveau impactant l'étude en termes de données générées pour l'évaluation ([Phillips & Jenkinson 2001](#)).

Des augmentations de la fréquence des implants morts ont également été constatées lorsque des rats mâles Long-Evans (n=10) ont été traités avec 20 % v/v d'éthanol dans leur eau

de boisson pendant 60 jours avant accouplement ([Mankes et al. 1982](#)). L'examen histologique des rats traités à l'éthanol a révélé des changements significatifs au niveau des testicules, parfois macroscopiques et pathologiques, et les effets sur les portées pourraient être une résultante de la toxicité observée au niveau testiculaire.

On retrouve également des études publiées de mutation létale dominante avec des résultats négatifs.

[Rao et al. \(1994\)](#) n'ont pas mis en évidence d'effet létal dominant de l'éthanol suite à un traitement aigu par voie *i.p.* de 3 jours ou sub-chronique par voie orale de 11 semaines.

Des souris mâles (Swiss, C57BL6 et CBA) ont reçu par voie *i.p.* 0,1 mL d'éthanol à 40 % (dose approximative de 1,26 g/kg/j) pendant 3 jours (83 souris traitées et 71 témoins au total). Le groupe contrôle a reçu 0,1 mL d'eau distillée sur la même période. Après le traitement, les animaux ont été accouplés à des femelles Swiss vierges à 3 reprises sur des périodes de 4 jours (jours 1-4, 5-8 et 9-12). Dans cet essai, aucune augmentation de la létalité post-implantatoire imputable à l'éthanol n'a été observée.

Dans une autre étude, des souris mâles C57BL6 (n=46) ont reçu dans leur eau de boisson de l'éthanol durant 11 semaines (dose de 5% la première semaine progressivement augmentée à 40%, estimée à 0,13 g/jour à 5% et 1,04 g/jour à 40%). Le groupe contrôle a reçu de l'eau sans alcool. Les mâles ont ensuite été accouplés à des femelles C57BL6 vierges durant deux semaines. Les données n'ont montré aucun signe de létalité dominante pour l'éthanol.

Des résultats similaires chez la souris ont été publiés par [Ellahuene et al. \(2012\)](#). Deux groupes de 10 souris mâles CF1 ont reçu de l'éthanol par voie orale (eau de boisson à 15 ou 30% v/v d'éthanol) durant 20 semaines puis ont été accouplés à des femelles vierges (2 femelles par mâle sur une période de 3 jours). L'étude comptait un groupe d'animaux témoins recevant de l'eau uniquement sur la même période. Les femelles ont été sacrifiées au jour 12 post-accouplement. Dans cet essai, aucune augmentation de la létalité post-implantatoire n'a été observée, tandis qu'une réduction significative du nombre moyen d'implants a été rapportée, indiquant une perte pré-implantatoire.

Des résultats négatifs chez la souris ont également été obtenus dans le cadre d'une étude collaborative menée par la British Pharmaceutical Industry, impliquant 3 laboratoires différents ([James & Smith, 1982](#)). Des souris mâles (15 animaux par groupe) ont reçu 0, 0,16 ou 0,63 g/kg/j (dose maximale tolérée) d'éthanol par voie orale pendant 5 jours consécutifs puis ont été accouplées une fois par semaine, pendant 8 semaines consécutives, avec des femelles vierges non traitées. Toutes les femelles ont été sacrifiées et examinées 18 jours post-accouplement. Les données n'ont montré aucun signe de létalité dominante pour l'éthanol. Le protocole utilisé était conforme aux méthodes d'essai de l'OCDE No 478 ([Phillips & Jenkinson 2001](#)). Les auteurs de l'étude ont conclu que l'éthanol est peu susceptible de produire un effet létal dominant jusqu'à la dose maximale tolérée.

Dans une autre étude, des souris C3H ont reçu pendant 4 semaines de l'éthanol par voie orale (à hauteur de 20 ou 30 % de l'apport calorique) (5 animaux par dose + 1 groupe contrôle sans alcool), puis ont été accouplés à deux femelles chacune ([Randall et al. 1982](#)). L'apport d'éthanol mesuré dans cette étude était de 24 à 30 g/kg par semaine pour le régime à 30 % et de 14 à 17 g/kg pour le régime à 20 % ; les concentrations sanguines moyennes respectives

étaient de 0,8 et 0,57 g/L. Toutes les femelles ont été sacrifiées et examinées 18 jours post accouplement. Aucun effet létal dominant n'a été observé dans cet essai.

Des résultats négatifs chez la souris ont également été obtenus dans un schéma d'essai différent. [Machemer & Lorke \(1975\)](#) ont administré à des souris femelles (n=31) en pro-œstrus une dose orale unique d'éthanol (4 g/kg), puis les ont accouplées avec des mâles non traités (1 mâle pour deux femelles). Les femelles ont été sacrifiées au 14^{ème} jour post fécondation. Aucun effet létal dominant n'a été retrouvé dans cet essai.

Dans un test de mutation létale dominante chez le rat, [Chauhan *et al.* \(1980\)](#) n'ont observé aucun effet suite à l'exposition *p.o.* à l'éthanol. Deux groupes de rats mâles Wistar ont reçu une dose de 15 % v/v d'éthanol dans l'eau de boisson pendant 5 jours, augmentée progressivement à 20 % v/v ou 30 % v/v sur une durée totale de 35 jours. Un troisième groupe a reçu une dose de 30 % v/v d'éthanol pendant 4 jours seulement. 30 % d'éthanol équivalait à une dose d'environ 12 g/kg/j. L'étude comptait un groupe d'animaux contrôles recevant de l'eau uniquement. Après le traitement, les animaux ont été accouplés à des femelles vierges une fois par semaine pour 8 accouplements périodiques. Les femelles ont été sacrifiées 10 à 11 jours après leur séparation des mâles. Aucune différence significative entre les groupes traités par l'éthanol et les contrôles n'a été relevée en termes de nombres de décès et d'implants vivants et totaux, aux stades pré et post-implantatoires.

Les résultats des essais de mutation létale dominante sont nombreux et contradictoires. Cependant, prenant en considération la méthodologie d'essai telle que préconisée dans la ligne directrice de l'OCDE No 478 dans sa version actuelle ([OECD 2016f](#)), la plupart des études citées précédemment peuvent être critiquées en raison du nombre insuffisant d'animaux, de doses maximales d'essai élevées pouvant interférer avec le métabolisme et la fertilité et d'absence fréquente de témoin positif, compromettant l'interprétation des résultats. La revue bibliographique de [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#) incluant une analyse critique des différentes études conclut que l'essai le plus robuste est l'étude inter-laboratoires effectuée chez la souris publiée par [James & Smith \(1982\)](#), dont les résultats sont négatifs.

II.3.4.1.3. Mécanisme d'action

La monographie du CIRC relative à la consommation de boissons alcoolisées documente différents mécanismes d'actions génotoxiques impliqués dans la cancérogenèse associée aux boissons alcoolisées (IARC 2012).

Dans l'organisme, l'éthanol est converti par l'ADH et le CYP2E1 en acétaldéhyde, qui est oxydé en acétate par l'ALDH.

Plusieurs tests du MN chez l'homme confirment l'existence d'un polymorphisme des enzymes du métabolisme (ADH, CYP2E1 et ALDH) impactant l'incidence de formation des MN, indépendamment du taux de consommation d'alcool.

Une association entre les différentes formes de cancer et le polymorphisme au niveau des gènes impliqués dans l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde a été établie. Sur les dernières décennies, l'évidence épidémiologique du risque accru de cancer associé à la consommation de boissons alcoolisée par des sujets hétérozygotes porteurs d'une enzyme ALDH inactive s'est renforcée, en particulier pour le cancer de l'oesophage. Quasiment toutes les études conduites sur les populations d'Asie de l'est consommant des boissons alcoolisées montrent des OR significativement augmentés pour les porteurs de l'allèle ALDH inactif. De plus, plusieurs études ont démontré une association entre le polymorphisme sur l'ADH1B et le cancer des voies aéro-digestives supérieures, qui ont été expliqués soit par une ADH plus active conduisant à plus d'acétaldéhyde, soit à moins d'ADH entraînant une exposition à des taux moindres d'acétaldéhyde mais sur des durées plus longues.

L'acétaldéhyde induit des aberrations chromosomiques et des micronoyaux dans diverses cellules eucaryotes, y compris les lymphocytes humains (Obe & Anderson, 1987, Kayani & Parry 2010, INRS 2016e). Il est positif dans le test de mutation génique sur cellules de lymphome de souris (Wangenheim & Bolcsfoldi, 1988). Des études révèlent que l'acétaldéhyde réagit avec l'ADN isolé de l'épithélium nasal pour former des pontages ADN-protéines et ADN-ADN (IARC 2012, ANSES 2014). Des adduits à l'ADN spécifiques de l'acétaldéhyde ont été retrouvés chez des patients japonais dépendants à l'alcool (ANSES 2014).

Un mécanisme oxydatif secondaire suite à l'exposition à l'éthanol intervient également. L'induction par l'éthanol du CYP2E1 produit diverses espèces réactives de l'oxygène, conduisant à la formation de produits de peroxydation lipidique tel que le 4-hydroxy-nonenal et une situation de stress oxydant. Ceci altère l'ADN (cassures et/ou adduits) et affecte sa réparation, pouvant être à l'origine de l'initiation de tumeurs. Une association entre ces phénomènes et les cancers du sein, du foie et du pancréas a été établie. (IARC 2012).

II.3.4.1.4. Discussion sur la génotoxicité/ mutagenèse de l'éthanol

De nombreux essais de génotoxicité/mutagenèse sont disponibles pour l'éthanol, en relation avec le nombre important d'études investiguant les effets liés à l'alcoolisme, indépendamment de la nécessité de recourir à une batterie d'essais pour appréhender les différents mécanismes intervenant dans les processus de génotoxicité.

La multiplication du nombre d'essais augmente la probabilité de résultats discordants, avec des résultats positifs pouvant être en relation avec des propriétés génotoxiques, mais pouvant également être dus à un manque de spécificité du système d'essai ou de limite méthodologique. Il convient donc pour chaque étude d'effectuer une revue critique de l'approche méthodologique mise en œuvre pour identifier les biais pouvant entraîner de fausses réponses positives (Brusick *et al.* 2016, Nessler 2017).

Il n'existe pas aujourd'hui d'approche méthodologique standardisée pour l'évaluation de la génotoxicité. Cependant, plusieurs pré-requis sont admis, dont la nécessité d'affecter des poids différents aux résultats d'essai en fonction de leurs catégories, pour donner à un résultat un poids cohérent avec sa contribution à la démonstration globale (approche Weight of Evidence (WoE) ou « Poids de la preuve ») (Brusick *et al.* 2016). Il est ainsi possible d'effectuer une analyse des données publiées en appliquant les principes suivants :

- lors de l'évaluation du potentiel mutagène d'un produit chimique, il y a lieu de donner plus de poids à la mesure des changements permanents de l'ADN (c'est-à-dire aux mutations) qu'aux dommages réversibles de l'ADN,
- les résultats issus d'essais *in vivo* ont plus de poids que les essais *in vitro*, à l'exception des essais de mutagenicité sur bactéries.

Selon ces principes, le résultat du test d'Ames et ceux du micronoyau (MN) et d'aberrations chromosomiques (AC) et de mutation génique *in vivo* sont considérés comme ayant un poids élevé. Les résultats du test des comètes *in vivo*, d'induction de dommages oxydatifs *in vivo* et des effets sur la réparation de l'ADN *in vivo* ainsi que ceux des tests *in vitro* du MN, d'AC et de mutations géniques sur cellules de mammifère relèvent de la catégorie d'essais de poids modéré. Les résultats des essais de dommages primaires à l'ADN (tests « indicateurs ») sont des signes d'exposition mais sont insuffisants pour déterminer un effet. Leurs résultats sont donc affectés d'un poids faible. Pour l'effet, les données de test mesurant l'induction des mutations géniques ou des altérations chromosomiques stables, en particulier *in vivo* dans les systèmes de mammifère, sont à considérer. (Brusick *et al.* 2016)

La plupart des résultats publiés d'études de dommages primaires à l'ADN avec l'éthanol sont positifs (tableau 16).

Cependant, la majorité des résultats positifs restent d'interprétation limitée en raison de considérations méthodologiques. Pour le test des comètes, le paramètre de mesure identifié comme le plus approprié est le pourcentage d'ADN dans la queue (TI – tail intensity), corrélé linéairement aux dommages d'ADN sur une large gamme de dommages et qui est fonction

de la fréquence de cassure de l'ADN (Hartmann *et al.* 2003). Seules deux études (Lamarche *et al.* 2003 et Pool-Zobel *et al.* 2004) ont utilisé ce mode d'expression des résultats.

L'utilisation de la longueur de queue retrouvée pour 3 études (Singh *et al.* 1995, Kido *et al.* 2006, Guo *et al.* 2008) ne permet pas une différenciation quantitative des dommages à l'ADN pouvant se produire dans une même longueur.

Concernant l'utilisation de l'OTM (produit de la quantité d'ADN dans la queue par la longueur de la queue) (Blasiak *et al.* 2000), les résultats positifs peuvent être liés à une surestimation du niveau réel de fragmentation de l'ADN en raison de l'effet multiplicateur par la longueur (une même valeur d'OTM peut être le résultat de différentes multiplications reflétant des dommages à l'ADN différents). Dans cette étude, la dose d'essai particulièrement élevée de 1M (soit 46,7 mg/mL – 5%) pour les cellules de la muqueuse gastrique peut également être à l'origine d'effets indirects.

Egalement, les résultats des deux études exprimés en indice de dommage à l'ADN selon une échelle d'appréciation semi-quantitative (De Oliveira *et al.* 2012, Da Costa *et al.* 2014) restent discutables en raison du biais introduit par l'aspect subjectif de la cotation, en plus de la prise en compte des résultats des cellules apoptiques (ghost cells) surestimant la réponse en termes de dommages à l'ADN.

Par ailleurs, plusieurs de ces essais n'ont inclus qu'une dose d'essai, tandis que les critères d'interprétation de positivité du test des comètes *in vivo* incluent la relation dose-effet.

Tableau 16 : Etudes des dommages primaires à l'ADN induits par l'éthanol (revue bibliographique)

	Système d'essai	Conditions	Paramètre	Résultat et relation dose-effet	Référence
<i>In vitro</i>	Lymphocytes humains (LH) Muqueuse gastrique (GM) Muqueuse du colon (CM)	LH : 30 mM / GM : 1M / CM : 10 mM Sans activation métabolique	OTM (olive tail moment)	positif	Blasiak <i>et al.</i> (2000)
	Neurones de rat	20, 50 ou 100 mM, 6h Sans activation métabolique	TI (tail intensity)	positif avec relation dose-effet à 50 et 100 mM	Lamarche <i>et al.</i> (2003)
<i>In vivo</i>	Rat – cellules nerveuses	4 g/kg - <i>p.o.</i> 8 animaux	Longueur de queue 2, 4 et 6h post traitement	positif 4 h post traitement uniquement	Singh <i>et al.</i> (1995)
	Souris – cerveau, poumons, foie, reins, estomac, colon, vessie, embryons	4 et 8 g/kg - <i>p.o.</i> 4 animaux/dose	Longueur de queue	positif sauf sur le foie relation dose-effet uniquement sur embryons	Kido <i>et al.</i> (2006)
	Souris - leucocytes	2,5 et 5 g/kg – <i>i.p.</i> (dose unique) et <i>p.o.</i> 30 j 4 animaux/dose	Longueur de queue	positif avec relation dose-effet	Guo <i>et al.</i> (2008)
	Souris – sang et cerveau	5 g/kg - <i>p.o.</i> 10 animaux	Echelle de 0 à 4	positif	De Oliveira <i>et al.</i> (2012)
	Souris – sang	2,5 g/kg – <i>i.p.</i> – 3 j 5 animaux	Echelle de 0 à 4	positif	Da Costa <i>et al.</i> (2014)
	Rat - oesophage, foie, poumons, coeur	4,3 g/kg/j – 8 mois 7 animaux	Adduits à l'ADN	négatif	Izotti <i>et al.</i> 1998
	Homme – cellules rectales	10 sujets alcooliques	TI (tail intensity)	Diminution statistiquement significative	Pool-Zobel <i>et al.</i> (2004)

OTM : quantité d'ADN dans la queue x longueur de la queue

TI : % d'ADN dans la queue

Le seul test des comètes négatif identifié dans cette revue bibliographique est un test *in vivo* sur cellules rectales de sujets alcooliques. La diminution statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue est possiblement liée à des mécanismes de défenses mis en place en situation d'éthylisme avec induction d'enzymes anti-oxydantes (Pool-Zobel *et al.* 2004). Ces résultats peuvent aussi être la résultante des effets connus de l'acétaldéhyde responsable de pontages ADN-ADN et ADN-protéines limitant la migration de l'ADN endommagé (IARC 2012) et donc mal mis en évidence dans le test des comètes à moins d'adaptations méthodologiques adéquates.

Un autre essai *in vivo* chez le rat investiguant les adduits à l'ADN suite à un traitement chronique par l'éthanol a donné des résultats négatifs.

Sur la base de cette analyse, il n'existe que peu de données suggérant des dommages primaires à l'ADN induits directement par l'éthanol.

En termes de tests de mutagenèse, les résultats des essais publiés de mutation génique sur bactéries avec l'éthanol (poids élevé) sont tous négatifs, en absence comme en présence d'activation métabolique.

Il est toutefois intéressant de mentionner la réponse faiblement positive de l'éthanol publiée par De Flora *et al.* 1984b sur la souche TA102. En effet, par contraste aux 4 autres souches utilisées dans le test d'Ames qui comportent des paires de bases GC sur les sites primaires de réversion, cette souche présente une paire de bases AT au niveau de la mutation permettant de déceler certains mutagènes oxydants et agents pontants non mis en évidence avec les autres souches (Levin *et al.* 1982, OECD 1997). Cela peut être mis en relation avec les processus oxydatifs secondaires décrits dans les mécanismes d'action génotoxique de l'éthanol à forte dose avec induction enzymatique du CYP2E1, d'autant que les réponses ont été observées à des niveaux de dose élevée de 160 et 240 mg par boîte, ainsi qu'aux effets pontants connus de l'acétaldéhyde issu du métabolisme de l'éthanol.

Les essais publiés de mutation génique *in vitro* (poids modéré) sur cellules de lymphome de souris sont également négatifs (tableau 17).

Seules des augmentations statistiquement significatives du nombre de mutants pour 10^6 cellules ont été rapportées par Wangenheim & Bolcsfoldi (1988) en absence et en présence d'activation métabolique mais l'augmentation du nombre de mutants dans les cultures traitées comparativement aux témoins était très éloigné du FGE fixé à +128 mutations pour 10^6 cellules (seuil de significativité biologique) et aucune relation dose-effet n'a été retrouvée. De plus, en présence d'activation métabolique, la réponse positive n'a été observée qu'à une dose entraînant un niveau élevé de cytotoxicité, excluant l'exploitation de ce résultat.

Tableau 17 : Essais de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifère avec l'éthanol (revue bibliographique)

Système d'essai	Conditions	Résultat	Référence
Lymphome de souris S49	éthanol à 170 mM avec activation métabolique 4 h	négatif	Friedrich & Nass (1983)
Lymphome de souris L5178Y	éthanol de 173 à 779 mM sans activation métabolique 3 h	négatif	Amacher <i>et al.</i> (1980)
Lymphome de souris L5178Y	éthanol de 92 à 738 mM sans activation métabolique éthanol à 414 et 517 mM avec activation métabolique 4 h	négatif	Wangenheim & Bolcsfoldi (1988)
Lymphome de souris L5178Y	éthanol à 174 mM 20 essais avec et sans activation métabolique	négatif	Phillips & Jenkinson (2001)

Concernant les essais d'AC, l'ensemble des essais *in vivo* chez l'animal (résultats de poids élevé) avec l'éthanol a donné des résultats négatifs. La plupart des essais *in vitro* (résultats de poids modéré) a également donné des résultats négatifs. Les deux études *in vivo* avec des résultats positifs sont des essais chez des sujets alcooliques (tableau 18).

Tableau 18 : Essais d'aberrations chromosomiques avec l'éthanol (revue bibliographique)

	Système d'essai	Conditions	Résultat	Référence
<i>In vitro</i>	lymphocytes humains	1% v/v (174 mM) - 24 h Sans activation métabolique	négatif	Banduhn & Obe (1985)
		0,8 ou 1% v/v - 24 ou 48 h Sans activation métabolique	négatif	Königstein <i>et al.</i> (1984)
		1,16, 2,32 et 3,48 mg/mL (25, 50 et 75 mM) - 50 h - Sans activation métabolique	positif avec relation dose-effet	Badr <i>et al.</i> (1977)
	lignées lymphoïdes humaines	2% - ≤ 5 h Sans activation métabolique	négatif	Hsu <i>et al.</i> (1991)
		1% - 2 h Sans activation métabolique	négatif	Brown <i>et al.</i> (1992)
	cellules CHO	4% - 3 h Sans activation métabolique	négatif	Lin <i>et al.</i> (1989)
		160 mM - 30 min Avec et sans activation métabolique (S2 mix)	S2- : négatif S2+ : positif	Darroudi & Natarajan (1987)
lymphocytes humains & cellules CHL	8 mg/mL (174 mM) 21 essais sans activation métabolique 11 essais avec activation métabolique	négatif	Phillips & Jenkinson (2001)	
embryons de souris	1 à 30 mg/mL (22 à 650 mM) - 24 h Sans activation métabolique	positif sans relation dose-effet	Lau <i>et al.</i> (1991)	
<i>In vivo</i>	Rat / moelle osseuse et lymphocytes	10 & 20% (<i>p.o.</i>) (eau de boisson) - 3 & 6 sem. 2 animaux à 10% et 1 animal à 20%	négatif	Tates <i>et al.</i> (1980)
	Hamster chinois / moelle osseuse	10% (<i>p.o.</i>) (eau de boisson) - 9 sem. 11 animaux	négatif	Korte <i>et al.</i> (1979)
		20% (<i>p.o.</i>) (eau de boisson) - 12 sem. 18 animaux	négatif	Korte <i>et al.</i> (1981a)
	Hamster chinois / lymphocytes	10% (<i>p.o.</i>) (eau de boisson) - 46 sem. 5 animaux	négatif	Korte <i>et al.</i> (1981b)
	Rat / moelle osseuse	20% (<i>p.o.</i>) (eau de boisson) - 30 j. 10 animaux	négatif	Tavares <i>et al.</i> (2001)
Homme / lymphocytes	20 sujets alcooliques	positif	Maffei <i>et al.</i> (2002)	
	29 sujets alcooliques	positif	Burim <i>et al.</i> 2004	

Trois essais d'AC *in vitro* publiés rapportent des résultats positifs. Cependant, l'étude de [Badr et al. \(1977\)](#) sur lymphocytes humains en absence d'activation métabolique est fortement remise en cause dans la revue bibliographique effectuée par [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#), qui attribuent la réponse positive à la possible contamination de l'éthanol avec un agent mutagène et/ou à une erreur de lecture des AC, au regard des images fournies dans la publication.

Des réserves peuvent être formulées sur les résultats positifs de l'étude de [Darroudi & Natarajan \(1987\)](#) obtenus en présence d'activation métabolique. En effet, celle-ci a été réalisée sur cellules CHO aujourd'hui reconnues comme pouvant être à l'origine de résultats faussements positifs en raison d'une mutation génique sur la séquence codant la protéine p53 et des dysfonctionnements dans le contrôle du cycle cellulaire (absence de « G1 check point ») ([Nesslany 2017](#)). De plus, le système d'activation métabolique utilisé d'origine végétale (S2 mix issu d'homogénat de feuille de maïs Zea) a entraîné à lui seul une augmentation importante du taux d'AC spontané. Egalement, la dose d'essai unique de 160 mM n'a pas permis de rechercher une relation dose-effet et cette concentration très élevée (nettement supérieure aux 10 mM préconisés en dose maximale dans la version actuelle de la ligne directrice de l'OCDE No 473) peut être à l'origine de résultats faussement positifs ([Nesslany 2017](#)).

Des réserves peuvent également être émises sur l'étude de [Lau et al. \(1991\)](#) menée sur embryons de souris, les réponses obtenues étant sans relation dose-effet et les doses testées étant relativement élevées (22 à 650 mM), pouvant interférer avec les réponses observées ([Brusick et al. 2016](#), [Nesslany 2017](#)).

Les autres essais *in vitro* ont tous donné des résultats négatifs. Cependant, à l'exception des données historiques des Laboratoires Safepharm ([Phillips & Jenkinson 2001](#)) disponibles en présence et en absence de système d'activation métabolique, ces essais n'incluaient pas de système d'activation métabolique exogène, limitant le poids de ces résultats négatifs.

Par ailleurs, il est intéressant de mentionner que les 5 études *in vivo* identifiées sur cellules de moelle osseuse et/ou lymphocytes de rat ou hamster chinois, après des expositions *p.o.* sub-chroniques à l'éthanol (jusqu'à 6 semaines chez le rat et 46 semaines chez le hamster) ont toutes donné des résultats négatifs. Les doses administrées, estimées par extrapolation à partir de données d'autres publications, étaient relativement élevées, de l'ordre de 4 à 8 g/kg/jour. Par contre, on retrouve quelques limites méthodologiques, notamment l'absence de plusieurs doses d'essai pour 4 études, et un nombre d'animaux particulièrement faible pour la seule étude incluant deux doses d'essai.

Concernant les deux études *in vivo* chez l'homme identifiées dans cette revue bibliographique avec des résultats positifs, il convient de préciser que ceux-ci proviennent de lymphocytes humains de sujets alcooliques, pour lesquels des mécanismes génotoxiques secondaires ne peuvent être exclus en relation avec une exposition chronique à des taux élevés d'éthanol.

En résumé, il n'existe que très peu de données issues de l'expérimentation *in vitro* ou *in vivo* sur rongeurs suggérant des propriétés génotoxiques de l'éthanol dans les essais d'aberrations chromosomiques, avec une majorité d'études concluant à des résultats négatifs. On ne peut exclure l'implication de mécanismes génotoxiques directs mais aussi secondaires pour expliquer les propriétés génotoxiques de l'éthanol mises en évidence dans le test d'AC sur lymphocytes humains de sujets alcooliques.

De nombreux tests du MN ont été effectués avec l'éthanol (résultats de poids élevé *in vivo* et de poids modéré *in vitro*) (tableau 19).

Tableau 19 : Tests du MN avec l'éthanol (revue bibliographique)

	Modèle	Traitement (dose et durée si précisé) Conditions	Résultat	Référence
<i>In vitro</i>	cellules MCL-5	0,1 à 2% v/v - 22 h Sans ajout de système d'activation métabolique exogène	positif (+ relation dose-effet)	(Kayani & Parry 2010)
<i>In vivo</i>	Souris / moelle osseuse	5g/kg (gavage) - 1 j. 10 animaux	négatif	De Oliveira <i>et al.</i> (2012)
		2,5g/kg (<i>i.p.</i>) - 3 j. 15 animaux	négatif	Da Costa <i>et al.</i> (2014)
		7 progressive de 10 à 30 ou 20 à 40% (<i>p.o.</i>) (eau de boisson) - 26 j. 5 animaux	négatif	Chaubay <i>et al.</i> (1977)
		5, 10 ou 15% v/v (eau de boisson) - 33 sem. 6 animaux	négatif	Ellahuene <i>et al.</i> (2012)
		0,62, 1,24 ou 1,86 g/kg (<i>i.p.</i>) - 2 j. 8 animaux	positif	Badr <i>et al.</i> (1977)
	Rat / macrophages alvéolaires et moelle osseuse	2 g/kg/j (<i>p.o.</i>) (5% eau de boisson) - 10, 23 & 30 j. 3,9 g/kg/j (<i>p.o.</i>) (10% eau de boisson) - 10 j. 3 animaux	négatif	Balansky <i>et al.</i> (1993)
	Rat / hépatocytes et moelle osseuse	10% ou 20% (<i>p.o.</i>) (eau de boisson) - 3 ou 6 sem. 10% : 4 animaux (foie) et 2 animaux (moelle osseuse) 20% : 1 animal	négatif	Tates <i>et al.</i> (1980)
	Rat / moelle osseuse	12 à 16 g/kg/j (<i>p.o.</i>) - 6 sem. 20 animaux	positif	Baraona <i>et al.</i> (1981)
Homme / lymphocytes	20 sujets alcooliques	positif	Maffei <i>et al.</i> (2000 & 2002)	
	20 sujets alcooliques	positif		

Des résultats positifs du test du MN *in vitro* avec l'éthanol ont été obtenus sur cellules lymphoblastoïdes humaines MCL-5 (Kayani & Parry, 2010). En excluant la plus forte dose d'essai en raison d'une cytotoxicité trop importante, la réponse obtenue, bien que de faible amplitude (x3 au maximum), était dose dépendante sur les 3 concentrations de 4, 8 et 10 µL/mL. Une comparaison par rapport aux témoins historiques permettrait de mieux appréhender le poids de ce résultat positif. Les cellules MCL-5 sont des cellules humaines génétiquement modifiées exprimant les enzymes du métabolisme CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1 et CYP3A4 en plus du CYP1A1 exprimé de façon native (Crespi *et al.* 1991). Les résultats positifs observés peuvent donc provenir de l'effet de l'éthanol comme de l'acétaldéhyde issu du métabolisme de l'éthanol sous l'effet du CYP2E1. Cependant, dans cet essai, les résultats suggèrent un effet spécifique de l'éthanol en raison de résultats de cytogénétique par marquage des centromères différents avec l'acétaldéhyde, suggérant un effet de l'aldéhyde

indépendant de celui de l'éthanol, avec un mécanisme aneugène induit par l'éthanol, et un effet clastogène induit par l'acétaldéhyde

Beaucoup de tests du MN *in vivo* chez la souris et le rat ont été publiés, avec des expositions variables, de l'aigu / sub-aigu (1 à 3 jours) au chronique / sub-chronique (jusqu'à 6 semaines chez le rat et 33 semaines chez la souris). Ces essais ont pour la plupart été réalisés à des doses supérieures à la limite maximale recommandée dans la version actuelle de ligne directrice de l'OCDE No 474 (2 g/kg/j pour des durées inférieures à 14 jours, 1 g/kg/j pour des durées supérieures ou égales à 14 jours). Seuls deux des 8 essais publiés ont donné des résultats positifs.

Les résultats positifs de l'étude de Badr *et al.* ne sont pas d'un niveau de fiabilité élevé, en relation avec les réserves sur la recevabilité de l'étude telles que reprises par Phillips & Jenkinson (2001) (incohérence dans les résultats repris dans la publication entre le tableau de résultats et le graphe, fréquence moyenne de MN du groupe témoin 20 à 50 fois supérieure à celles normalement observée suggérant que les souris dans cette étude étaient pour la plupart anormales à cet égard, à moins d'un problème de qualité technique des lames ou de méthode d'analyse utilisée, fréquences semblables de MN dans les NCE et PCE, incohérent avec la cinétique de développement des NCE à partir des PCE qui ne permet pas d'observer un nombre équivalent d'érythrocytes micronucléés des deux types sur le seul temps d'observation de 30 heures dans cette étude), l'absence de relation dose-effet, et la lecture sur 1000 PCE par animal (*versus* 4000 dans la version actuelle de la ligne directrice de l'OCDE).

L'autre étude ayant conclu à des propriétés génotoxiques de l'éthanol (Baraona *et al.* 1981) a quant à elle été réalisée avec une dose élevée visant à étudier des niveaux d'éthanolémies de sujets alcooliques, 12 à 16 fois supérieure à la dose maximale recommandée de 1g/kg/j dans la version actuelle de la ligne directrice de l'OCDE. Dans ces conditions, les résultats peuvent avoir été affectés par des perturbations du métabolisme donnant lieu à des effets génotoxiques secondaires.

Deux tests du MN chez l'homme ont conclu à un effet génotoxique sur lymphocytes humains de sujets alcooliques par comparaison aux données issues d'un groupe contrôle. Il est intéressant de mentionner la publication de Fenech (1998) rapportant des fréquences basales moyennes de MN sur lymphocytes chez 53 volontaires non fumeurs âgés de 20 à 45 ans et en bonne santé de l'ordre de 10 MN pour 1000 cellules bi-nucléées. Dans cet article, les valeurs basales de 126 hommes et 166 femmes sont également communiquées par tranche d'âge, indiquant des valeurs moyennes variant de $7,9 \pm 3,3$ à $24,2 \pm 14,4$ chez les hommes et entre $9,3 \pm 4,2$ et $34,9 \pm 16$ chez les femmes. Dans les deux essais identifiés lors de cette revue chez l'homme, les taux de MN chez les sujets alcooliques n'excédaient pas une moyenne de $12 \pm 5,4$ et $12,05 \pm 5,43$ pour 1000 cellules bi-nucléées. Quoiqu'il en soit, comme pour les résultats du test d'AC sur lymphocytes humains de sujets alcooliques, l'effet observé ne peut pas être dissocié de mécanismes génotoxiques secondaires en relation avec une exposition chronique à des taux élevés d'éthanol.

En résumé, un nombre important de tests du MN *in vivo* a donné des résultats négatifs. Il existe une étude *in vitro* et deux études *in vivo* chez le rongeur en faveur de propriétés génotoxiques de l'éthanol. Cependant, les données *in vivo* sont à relativiser, l'une des deux études ayant utilisé des doses élevées d'éthanol, l'autre étude n'étant pas considérée comme exploitable. Comme pour le test d'AC, il existe des essais de MN positifs sur lymphocytes humains de sujets alcooliques. On ne peut exclure l'implication de mécanismes génotoxiques secondaires en plus des effets directs de l'éthanol et l'acétaldéhyde pour expliquer les effets observés.

L'éthanol a également été testé à de nombreuses reprises dans l'essai de mutation létale dominante. Les données obtenues se répartissent quasi équitablement entre résultats positifs et négatifs. Cependant, en s'appuyant sur l'analyse effectuée par [Phillips & Jenkinson \(2001\)](#), les données les plus robustes sont en faveur de l'absence de potentiel mutagène de l'éthanol dans cet essai, en référence aux résultats négatifs de l'étude inter-laboratoires effectuée dans le respect des lignes directrices de l'OCDE.

Aucune étude de génotoxicité *in vivo* de l'éthanol administré par voie topique n'a été identifiée dans cette revue bibliographique.

Au final, il existe peu d'éléments de preuves issus d'expérimentation *in vitro* ou *in vivo* sur rongeurs concluant aux propriétés mutagènes de l'éthanol.

Il convient cependant de rappeler l'existence de mécanismes génotoxiques contribuant au risque accru de cancer associé à la consommation de boissons alcoolisées (à côté d'autres mécanismes liés aux hormones sexuelles, au déficit métabolique en folate induit par l'éthanol, au tabagisme ou spécifiquement pour le cancer hépatique, aux altérations structurales du foie). Ces effets renvoient aux propriétés mutagènes de l'acétaldéhyde issu du métabolisme oxydatif de l'éthanol, ainsi qu'à un mécanisme oxydatif secondaire suite à l'exposition à l'éthanol responsable d'altérations de l'ADN pouvant être à l'origine de l'initiation de tumeurs ([IARC 2012](#)).

La difficulté de mise en évidence des propriétés génotoxiques de l'éthanol dans les modèles expérimentaux relève vraisemblablement de plusieurs facteurs, notamment

- l'existence d'un polymorphisme des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'éthanol, qui conduira pour certains phénotypes à l'accumulation d'acétaldéhyde, alors qu'aucune accumulation d'acétaldéhyde n'est normalement attendue en relation avec l'activité enzymatique hépatique de l'ALDH supérieure à celle de l'ADH, permettant la transformation de l'acétaldéhyde formé en acide acétique ;

- l'implication de mécanismes oxydatifs secondaires à l'exposition à l'éthanol, associés à l'induction enzymatique du CYP2E1 vraisemblablement associée à un niveau seuil d'éthanol possiblement couplé à une durée d'exposition ;
- la mise en place de système de défense de l'organisme limitant la probabilité de mise en évidence de l'effet en situations expérimentales *in vivo* ;
- pour les essais *in vitro*, le recours fréquent au système d'activation métabolique issu de fractions microsomales hépatiques de rat, qui n'est peut-être pas le plus adéquate au regard des résultats positifs observés dans le test d'AC avec le S2 d'origine végétale.

II.3.4.2. Isopropanol

Les essais de génotoxicité avec l'isopropanol retrouvés dans la littérature sont peu nombreux, par comparaison à ceux disponibles pour l'éthanol. On retrouve des tests *in vitro* de mutation génique sur bactéries et cellules de mammifères, un test *in vitro* d'échange de chromatiques sœurs (SCE) ainsi qu'un test *in vivo* du micronoyau (MN).

II.3.4.2.1. Tests *in vitro*

a) Mutations géniques sur bactéries

Aucune preuve de mutagenèse de l'isopropanol sur bactéries n'a été établie.

La mutagenèse de l'isopropanol a été évaluée sur des souches de *Salmonella typhimurium* histidine-dépendantes (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) avec et sans activation métabolique à la dose de 3 µmole/plaque (Florin *et al.* 1980). Dans cet essai, l'isopropanol n'était pas mutagène.

Dans un autre essai de mutagenèse effectué sur des souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* histidine-dépendantes (TA98, TA100, TA1535, TA1537 et TA1538) et d'*Escherichia coli* tryptophane-dépendantes (WP2uvrA), l'isopropanol a été testé à des doses comprises entre 5 et 5000 µg/boîte avec et sans activation métabolique (Shimizu *et al.* 1985). L'isopropanol n'était pas mutagène dans ces essais.

b) Mutations géniques sur cellules de mammifères

Les résultats publiés d'un essai de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères avec l'isopropanol sont négatifs en absence comme en présence d'activation métabolique.

Le potentiel mutagène de l'isopropanol a été évalué dans le test *in vitro* de mutation génique sur cellules CHO (cellules ovariennes de hamster chinois), au niveau du *locus* de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (gène Hprt) (Kapp *et al.* 1993). L'essai a été réalisé avec et sans activation métabolique, avec une durée de traitement de 4 heures et des concentrations d'isopropanol comprises entre 0,5 mg/mL et 5 mg/mL. Dans cet essai, aucune augmentation de mutants n'a été obtenue avec l'isopropanol, quelle que soit la dose d'essai.

c) Mutations chromosomiques sur cellules de mammifères

Aucun test *in vitro* d'aberrations chromosomiques (OCDE No 473) ou de micronoyau (OCDE No 487) n'a été retrouvé dans la littérature pour l'isopropanol. Le seul essai identifié est un test de SCE mené sur cellules V79 (von der Hude *et al.* 1987). Les résultats de cet essai étaient négatifs avec et sans activation métabolique (concentrations testées comprises entre

3,3 et 100 mM, avec une durée de traitement de 3h en présence d'activation métabolique, et 28h sans activation métabolique).

II.3.4.2.2. Tests de mutations chromosomiques *in vivo*

On retrouve un test du MN *in vivo* sur moelle osseuse de souris pour l'isopropanol, dont les résultats sont négatifs.

[Kapp et al. \(2012\)](#) ont réalisé le test du MN sur cellules de moelle osseuse chez la souris ICR après exposition systémique à l'isopropanol par injection *i.p.* de 350 mg/kg, 1 173 mg/kg et 2 500 mg/kg (15 mâles et 15 femelles par dose). Le groupe contrôle a été traité avec une solution saline à 0,9%. Les animaux ont été sacrifiés 24, 48 ou 72 heures après le traitement (5 par sexe). Dans cet essai, quelle que soit la dose et le temps d'analyse, aucune augmentation significative du nombre de MN n'a été observée suite au traitement par l'isopropanol, comparativement au groupe témoin (lectures sur 1000 PCE par animal).

II.3.4.2.3. Discussion sur la génotoxicité / mutagenèse de l'isopropanol

Peu d'études investiguant la génotoxicité de l'isopropanol a été publié. Il existe cependant suffisamment de données portant sur les différents aspects à prendre en considération pour l'évaluation de la génotoxicité (essais *in vitro* de mutations géniques sur bactéries et sur cellules de mammifères, en absence et en présence d'activation métabolique, et test du MN *in vivo*).

Les tests de mutation génique sur bactéries sont négatifs en absence comme en présence d'activation métabolique.

L'essai de mutation génique a donné des résultats clairement négatifs dans les deux conditions d'essai et aux deux doses testées.

Le test de mutation chromosomique *in vitro* a donné des résultats négatifs. Cependant, il s'agit d'un test de SCE (OCDE No 479), dont la ligne directrice correspondante a été archivée le 2 avril 2014, en raison de résultats positifs étant plus en relation avec de la cytotoxicité que de la génotoxicité. Ces résultats négatifs ne permettent donc pas de se prononcer sur l'absence de propriétés génotoxiques de l'isopropanol.

Toutefois, un test du MN *in vivo* est disponible, dans lequel l'isopropanol n'est pas génotoxique y compris lorsqu'il a été administré à une dose légèrement supérieure aux 2 g/kg/j recommandés en dose maximale dans la version actuelle de la ligne directrice No 474 de l'OCDE pour des durées de traitement de moins de 14 jours ([OECD 2016c](#)).

Sur la base de ces données, il est possible de conclure à l'absence de propriétés génotoxiques de l'isopropanol.

II.3.4.3. n-propanol

Les essais de génotoxicité avec le n-propanol retrouvés dans la littérature sont encore moins nombreux que ceux identifiés pour l'isopropanol. On ne retrouve que des tests *in vitro* de mutation génique sur bactéries et mutations chromosomiques sur cellules de mammifère. Un test *in vivo* d'aberrations chromosomiques (AC) sur moelle osseuse de rat a été publié ; cependant, cette étude n'est pas considérée comme exploitable, en absence de données suffisantes pour valider sa recevabilité (ECB 2008).

II.3.4.3.1. Tests *in vitro*

a) Mutations géniques sur bactéries

Le n-propanol n'est pas mutagène dans les essais de mutation génique sur bactéries.

Les données disponibles sur le site de l'ECHA dans le cadre de l'enregistrement des substances au titre du règlement REACH reprennent les résultats d'un test d'Ames mené en 2009 selon la ligne directrice de l'OCDE No 471, sur des souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* histidine-dépendantes (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) et une souche d'*Escherichia coli* tryptophane-dépendante (WP2uvrA). Le n-propanol a été testé avec et sans activation métabolique à des doses de 20 à 5000 µg/boîte sans pré-incubation et de 312,5 à 5000 µg/boîte avec pré-incubation. Le n-propanol n'était pas mutagène dans cet essai. (ECHA, 2017a)

Deux autres études conduites sur des souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* histidine-dépendantes (TA 98 et TA100 pour l'une, TA 100 uniquement pour l'autre) avec et sans activation métabolique rapportent également des résultats négatifs (ECB 2008).

Un essai de mutation reverse sur *Escherichia coli* s'est révélé positif sans activation métabolique, suite à un traitement par n-propanol à une dose importante de 32 000 µg/mL. Cependant, les résultats de cet essai ne sont pas considérés valides, en raison notamment d'un niveau de cytotoxicité associé important (ECB 2008).

b) Mutations chromosomiques sur cellules de mammifères

On retrouve dans la littérature trois essais négatifs de mutations chromosomiques *in vitro* avec le n-propanol : un test d'aberrations chromosomiques (AC), un test du micronoyau (MN) et un test d'échange de chromatides-soeurs (SCE).

Les résultats étaient négatifs dans un test d'AC *in vitro* mené sur cellules V79 avec des doses de n-propanol jusqu'à 600 µg/mL (10 mmol/L) avec et sans activation métabolique (ECB 2008).

Le n-propanol a également donné des résultats négatifs dans un test du MN *in vitro* en absence d'activation métabolique (essai sur cellules V79 à la dose de 50 µL/mL pendant 1 heure) (ECB 2008).

Le n-propanol était l'une des substances d'essai dans un test de SCE *in vitro* mené sur cellules V79 par von der Hude *et al.* (1987). Les concentrations d'essai testées étaient comprises entre 3,3 et 100 mM de n-propanol, avec une durée de traitement de 3h en présence d'activation métabolique, et 28h sans activation métabolique. Tous les résultats ont été confirmés par la réalisation d'essais indépendants. Aucune induction de SCE suite au traitement par le n-propanol n'a été identifiée.

II.3.4.3.2. Discussion sur la génotoxicité / mutagenèse du n-propanol

Les seuls essais retrouvés dans la littérature investiguant la génotoxicité du n-propanol sont des études *in vitro* en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol.

Sur bactéries, l'essai ayant donné des résultats positifs concerne un test de mutation reverse sur *Escherichia coli* considéré non exploitable. Les résultats de l'essai de mutation génique sur bactéries mené selon les recommandations de la ligne directrice de l'OCDE No 471 sont clairement négatifs en absence et en présence d'activation métabolique.

Les résultats de l'ensemble des essais de mutations chromosomiques étaient tous négatifs, en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol. Cependant, le seul essai réalisé en présence d'activation métabolique est l'essai de SCE, dont la ligne directrice a été archivée le 2 avril 2014, en raison de résultats positifs étant plus en relation avec de la cytotoxicité que de la génotoxicité. Les résultats négatifs de cet essai ne permettent donc pas de se prononcer avec un niveau élevé de confiance sur l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol.

Il n'y a pas d'étude adéquate *in vivo* étudiant la génotoxicité du n-propanol.

Un essai *in vitro* de mutations chromosomiques dans le respect des lignes directrices actuelles constituerait un élément de preuve supplémentaire quant à l'absence de propriétés génotoxiques de cet alcool.

II.3.5. Potentiel cancérigène

Bien que constituant un volet majeur de la toxicologie, la présente revue bibliographique de la cancérogénèse des 3 alcools a été effectuée de façon plus succincte, en relation avec le sujet de recherche. En effet, le risque cancérogène avéré pour l'éthanol est associé à la consommation de boissons alcoolisées, responsable d'une exposition systémique de l'organisme à cet alcool dans des proportions aucunement comparables à celles pouvant être induites lors de l'utilisation des produits hydro-alcooliques (cf II.2.1.1 – absorption de l'éthanol). Concernant l'isopropanol et le n-propanol, aucun risque cancérogène associé n'est aujourd'hui décrit.

II.3.5.1. Ethanol

II.3.5.1.1. Données chez l'animal

Selon l'évaluation du CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) en 2007 ([IARC 2007](#)), il existe des preuves suffisantes de la cancérogénicité de l'éthanol chez l'animal. De nombreuses études, relativement anciennes, ont été menées en utilisant des doses massives d'éthanol dans l'eau de boisson et montrent des résultats divergents. Plus récemment, chez le rat, aucun effet cancérogène n'a été identifié à 676 et 2 028 mg/kg/j alors que l'éthanol à 6 760 mg/kg/j a provoqué l'augmentation de l'incidence des tumeurs mammaires, des carcinomes de la cavité orale, carcinomes du pré-estomac chez le mâle et la femelle, et d'autres sites chez le mâle. Enfin, une augmentation dose-dépendante de l'incidence des tumeurs hépatiques a été observée chez la souris. Aucune étude adéquate n'a été réalisée par inhalation ([INRS 2016a](#)).

II.3.5.1.2. Données chez l'homme

Les boissons alcoolisées sont classées cancérogènes pour l'homme (CIRC Groupe 1) par le CIRC en relation avec le lien de causalité établi entre la consommation de boissons alcoolisées et le cancer de la cavité buccale, du pharynx (excepté du nasopharynx), du larynx, de l'œsophage et du foie ([IARC 1988](#)). Plus récemment, le cancer du sein chez la femme et le cancer colorectal ont été ajoutés à cette liste ([IARC 2007 & 2012](#)). Une causalité est suspectée dans le cas des cancers du pancréas et du poumon ([IARC, 1988 ; Boffetta & Hashibe, 2006](#)).

En revanche, les propriétés cancérogènes de l'éthanol dans le cadre des expositions professionnelles à des vapeurs d'éthanol ne sont pas établies et il n'existe pas de données épidémiologiques évaluant le rôle possible de l'inhalation de vapeurs d'éthanol dans la survenue de cancers ([INRS 2016a](#)).

[Bevan et al. \(2009\)](#) ont effectué une évaluation du risque dans ce contexte. Par extrapolation des données d'exposition par voie orale, une exposition par inhalation à 1 000 ppm d'éthanol pendant 8 heures (VLEP ou valeur limite d'exposition professionnelle au Royaume-Uni) a été estimée comme équivalente à l'ingestion de 10 g d'éthanol par jour (soit environ un verre d'alcool). En outre, bien que l'absorption cutanée en milieu professionnel pourrait augmenter le niveau d'exposition systémique à l'éthanol, le risque cancérogène supplémentaire d'une telle exposition est jugé négligeable au regard des données d'absorption cutanée disponibles pour l'éthanol. Dans l'ensemble, il y a donc peu de raisons permettant de supposer qu'une exposition professionnelle équivalente ou inférieure aux VLEP actuelles soit associée à une augmentation significative du risque de cancer.

Dans sa revue portant sur l'évaluation de la sécurité de l'éthanol après application topique, [Lachenmeier \(2008\)](#) conclut également qu'il n'y a pas assez de preuves pour associer l'utilisation d'éthanol topique à l'augmentation du risque de cancer de la peau. L'analyse réalisée par l'AFSSAPS dans le cadre de l'évaluation des risques après exposition à l'éthanol en relation avec l'utilisation des produits hydro-alcooliques, dans des conditions d'utilisation normale chez l'homme, n'a pas permis non plus d'identifier de risque supplémentaire cancérogène par voie cutanée ou par inhalation ([Afsaps, 2011](#)).

II.3.5.2. Isopropanol

II.3.5.2.1. Données chez l'animal

L'isopropanol n'a pas montré d'effet cancérrogène chez la souris et le rat par voie respiratoire, cutanée et sous-cutanée.

Des souris CD-1 exposées à des vapeurs d'isopropanol à 0, 500, 2500 et 5000 ppm (0 - 1225 - 6125 - 12 250 mg/m³) (55 souris par sexe par dose), 6 h/j, 5 j/sem., pendant 78 semaines n'ont pas présenté d'effet sur le gain de poids, la mortalité ou l'apparition de lésion néoplasique. Des rats Fisher 344, exposés à des concentrations identiques pendant 104 semaines (65 rats par sexe par dose), ont présenté, chez les mâles uniquement, une augmentation de la mortalité due aux lésions rénales chroniques, ainsi qu'une augmentation liée à la dose du taux des adénomes des cellules interstitielles testiculaires. Cependant, ces lésions ont été considérées comme non liées au traitement, en raison d'une fréquence inhabituellement basse dans le groupe témoin. Aucune incidence accrue de lésions néoplasiques n'a été notée chez les femelles. Dans cette étude, en absence d'effet cancérrogène, la dose sans effet indésirable pour la cancérogénicité a été déduite comme supérieure à 5 000 ppm chez le rat et la souris ([Burleigh-Flayer et al. 1997](#), [INRS 2016b](#)).

Des applications cutanées (badigeonnage 3 fois par semaine pendant un an) ou des injections sous-cutanées (20 mg par semaine pendant 20 à 40 semaines) n'ont pas induit de tumeurs chez la souris ; toutefois, des insuffisances méthodologiques dans ces études limitent la signification de ces résultats. ([INRS 2016b](#))

II.3.5.2.2. Données chez l'homme

Plusieurs études réalisées dans des établissements fabriquant de l'isopropanol à partir de propylène par un procédé « acide fort » ont montré chez les travailleurs exposés un excès de risque de cancer des sinus paranasaux et peut-être du larynx. La nature du facteur cancérrogène n'a pas été élucidée, les huiles isopropyliques formées par ce procédé, le sulfate de diisopropyle et d'autres facteurs pouvant être suspectés. Il semble exclu que l'isopropanol lui-même soit en cause. Les données sur des installations de fabrication utilisant d'autres procédés sont insuffisantes pour une évaluation certaine des risques de ces procédés. Il n'existe pas d'étude épidémiologique permettant de se prononcer sur un éventuel pouvoir cancérrogène de l'isopropanol lors de son utilisation. ([INRS 2016b](#))

II.3.5.3. n-propanol

II.3.5.3.1. Données chez l'animal

La fiche toxicologique de l'INRS sur le n-propanol ([INRS 2016c](#)) précise que les études de cancérogénicité disponibles montrent une augmentation des tumeurs bénignes et malignes mais sont inadéquates vu leurs protocoles.

Deux études de cancérogenèse ont été réalisées chez le rat, l'une en administration par voie digestive à raison de 240 mg/kg, deux fois par semaine pendant 71 semaines, l'autre en administration sous-cutanée, à raison de 48 mg/kg, deux fois par semaine pendant 85 semaines. Dans les deux cas, il est apparu des tumeurs malignes chez les animaux traités (touchant les tissus hématopoïétiques, hépatiques, rénaux, utérins et vésicaux), non constatées dans le lot témoin, et une augmentation de l'incidence des tumeurs bénignes. Des atteintes hépatiques et hématologiques non tumorales ont été relevées au cours de ces expériences. Cependant, les défauts de protocole (peu d'animaux, une seule dose, manque d'évaluation statistique, ...) ne permettent pas de conclure sur l'éventuel effet cancérogène du n-propanol.

II.3.5.3.2. Données chez l'homme

Aucune donnée n'existe chez l'homme sur les effets cancérogènes du n-propanol ([INRS 2016c](#)).

II.3.5.4. Résumé sur le potentiel cancérigène et comparaison des alcools

L'éthanol présente des propriétés cancérigènes avérées chez l'homme, en relation avec la consommation excessive de boissons alcoolisées. En revanche, les propriétés cancérigènes de l'éthanol dans le cadre des expositions professionnelles à des vapeurs d'éthanol ne sont pas établies. Aucune des données disponibles n'identifie de risque supplémentaire cancérigène par voie cutanée ou par inhalation en relation avec l'utilisation des produits hydro-alcooliques.

Aucune étude disponible ne conclut à un potentiel cancérigène de l'isopropanol.

Il n'existe pas d'étude de cancérogenèse exploitable pour le n-propanol.

III. Etudes expérimentales

Cette section s’articule en deux chapitres. Le premier, « Matériel et méthodes », présente les produits à l’essai, incluant les données relatives aux matières premières (MP), aux compositions et aux contrôles analytiques réalisés, ainsi que le principe et la méthodologie expérimentale des différentes études mises en œuvre (irritation cutanée, phototoxicité, tests d’Ames, test du micronoyau et test des comètes). Le second chapitre présente les résultats de chacun de ces essais.

III.1. Matériel et méthodes

III.1.1. Produits à l’essai

III.1.1.1. Matières premières (MP)

Le tableau 20 ci-dessous présente les différentes MP utilisées pour formuler les produits d’essai (dénomination commerciale, N° de lot utilisé, composition et principales spécifications physicochimiques) à partir des données reprises dans les certificats d’analyse et/ou fiches de données de sécurité. Pour des raisons de confidentialité, les noms des MP et fournisseurs des différents co-formulants ne sont pas communiqués. Les noms de code MP1, MP2, MP3 et MP4 ont été utilisés.

Tableau 20 : Données sur les matières premières utilisées pour formuler les produits d’essai

Matière Première	Lot(s)	Identité chimique (matière active)	% p/p matière active	% p/p eau	Densité	T° ébullition	Pression de vapeur à 20°C	Coefficient de partage Octanol/eau Log P _{o/w}
ETHANOL SURFIN	A14071506	éthanol	94,377	5,623	0,809	78 - 78,5 °C	5900 Pa (20°C)	- 0,31
ISOPROPANOL	A12111403	isopropanol	99,974	0,026	0,786	82 à 83 °C	4200 Pa (20°C)	0,05
PROPANOL	A14070902 A14071603	n-propanol	99,961	0,039	0,807	97,1 °C	1940 Pa (20°C)	0,25 à 0,34
Propane-1-ol pour la chromatographie en phase liquide LiChrosolv®	JA037024	n-propanol	≥ 99,8	≤ 0,02				
MP1	20140526	confidentiel (agents hydratants, émoullient et protecteur)	99,5	ND	1,26	290°C	0,1 Pa (20°C)	-1,76/2,6
MP2	148498		100	0,03	0,97	nd	nd	nd
MP3	11027797V0		85,5	ND	0,92	287°C	160 Pa (110°C)	4,8
MP4	14070640		99,22	0,1	1	121°C	2,8 Pa (25°C)	- 0,6
Dimethyl sulfoxyde – BioReagent, for molecular biology	SHBF2128V	Dimethyl sulfoxyde	≥ 99,9	< 0,1	nd	189 °C	55 Pa	-1,349

nd : donnée non disponible

L’ETHANOL SURFIN, l’ISOPROPANOL et le PROPANOL ont été approvisionnés auprès de BRABANT Global Solvant (Groupe Brabant – 59152 Tressin – France). Le « Propane-1-ol pour la chromatographie en phase liquide LiChrosolv® » provient de chez Merck (62471 Darmstadt – Allemagne). Le DMSO (Dimethyl sulfoxide) a été approvisionné auprès de SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, MO 63103, USA).

L’ensemble des MP a été conservé à l’obscurité au sein du Centre de Recherche des Laboratoires ANIOS, en flacon PEHD translucides pour les alcools et en flacons de verre pour les autres MP. Un seul lot de chacune des MP a été utilisé pour formuler les produits d’essai, à l’exception du PROPANOL, pour lequel deux lots différents ont été utilisés, en relation avec un nombre plus important d’essais réalisés avec cet alcool. L’équivalence des deux lots utilisés en termes de profil chromatographique a été vérifiée avant utilisation.

III.1.1.2. Compositions

III.1.1.2.1. Alcools seuls

Les 3 alcools ont été formulés en dilution dans l’eau pour disposer de 6 concentrations finales de 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p pour chacun des 3 alcools.

Les 6 concentrations d’essai n’ont pas toujours été testées. L’information est précisée dans les sections propres à chaque expérimentation. Par ailleurs, certains essais complémentaires ont été réalisés avec des dilutions de 55 et 65 % p/p d’éthanol.

III.1.1.2.2. Co-formulants

Les co-formulants correspondent aux MP1, MP2, MP3 et MP4 présentés ci-avant. Ils ont été testés seuls ou en mélange. Pour ce dernier, une teneur cumulée totale de 10% p/p a été mise en solution dans le DMSO (concentration maximale pour une formulation stable et non trouble). Cette teneur est près de 11 fois (10,88) la teneur utilisée pour formuler un produit hydro-alcoolique commercialisé par les Laboratoires Anios ; la proportion des différents co-formulants dans le mélange a été conservée à l’identique du produit commercialisé, variant de 0,65% à 5,20% en fonction des co-formulants. Ce mélange est repris sous l’abréviation CoF₁₀.

III.1.1.2.3. Solutions hydro-alcooliques (SHA)

Les solutions hydro-alcooliques testées ont été formulées aux mêmes concentrations en éthanol, isopropanol ou n-propanol que les alcools seuls (60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p).

Les abréviations utilisées pour ces produits sont SHA_EtOH, SHA_IPA et SHA_nPro selon que l’alcool utilisé était l’éthanol, l’isopropanol ou le n-propanol.

Dans ces produits, la teneur en co-formulant était en quantité moindre comparativement au mélange CoF₁₀, tout en conservant les mêmes proportions. La teneur a été ajustée en relation avec les contraintes méthodologiques de certaines expérimentations. L’information est documentée dans les sections traitant des différentes méthodologies d’essai. A des fins d’interprétation des résultats en termes de comparaison et d’impact possible de concentrations croissantes d’alcool, pour un test donné, la teneur en co-formulants dans les SHA était la même quels que soient l’alcool et sa concentration.

Comme pour les alcools seuls, les 6 concentrations d’essai n’ont pas toujours été testées. L’information est documentée en conséquence dans les sections propres à chaque expérimentation.

III.1.1.3. Contrôle des concentrations d’alcool

Des contrôles analytiques pour quantifier les teneurs en alcool des différents produits d’essai ont systématiquement été réalisés, pour s’assurer que les concentrations étaient dans une limite de $\pm 5\%$ de la concentration recherchée. En cas d’utilisation des produits plus de 6 mois après la date de formulation, un nouveau contrôle analytique a été effectué préalablement.

L’ensemble des analyses a été effectué par chromatographie en phase gazeuse (CPG) équipée d’un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Pour les 3 alcools, les dosages ont été effectués avec des méthodes validées sur leur linéarité, spécificité et leur exactitude avec une incertitude élargie de 1%.

Pour l’ensemble des essais, le système chromatographique a été calibré sur 5 points répartis de 0,1 à 0,5 % de l’alcool dosé à partir des éléments de référence repris dans le tableau 21 ci-dessous et avec de l’eau ultra-pure (eau de résistivité supérieure à 18,2 M Ω générée au laboratoire, ci-après Eau UP).

Tableau 21 : Éléments de référence pour les analyses des alcools par CPG

Alcool dosé	Ethanol	Isopropanol	n-propanol
Description	Ethanol Absolu de qualité analytique	2-Propanol (isopropanol) de qualité analytique	Propane-1-ol pour la chromatographie en phase liquide LiChrosolv® (n-propanol de qualité pharmacopée européenne)
Fournisseur	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich
Aspect	Solution limpide incolore	Solution limpide incolore	Solution limpide incolore
Pureté	$\geq 99,8\%$	$\geq 99,8\%$	$\geq 99,5\%$
Solvant de dilution	Mélange Eau UP / Isopropanol (50/50 ; v/v): préparation extemporanée	n-propanol	isopropanol

Chaque échantillon dosé a été préalablement dilué à 0,4 % p/p dans le même solvant de dilution que celui utilisé pour la calibration.

Le matériel utilisé était le même pour l’ensemble des analyses, quel que soit l’alcool. Les conditions chromatographiques mises en œuvre sont reprises dans le tableau 22 ci-après.

Tableau 22 : Conditions chromatographiques utilisées pour le dosage des alcools

Chromatographe		C.G. 6890N (Agilent Technologies)
Injecteur	Volume injecté	1 µL
Paramètres d’injection	Température	220°C
	Pression	3 psi
	Injection	Split
	Ratio de split	15
	Solvant de rinçage	Ethanol et n-propanol : Mélange Eau UP / Propan-2ol (50/50 ; v/v) Isopropanol : Eau UP
Colonne	Type	Restek
	Phase stationnaire	RTX-1301
	Longueur	30 m
	Diamètre interne	0,53 mm
	Epaisseur du film	3,0 µm
	Débit de la colonne	3 ml/min
Four	Température initiale	70°C pendant 6 min
	Gradient	30°C/min
	Température finale	150°C pendant 3 min
Détecteur	Type	FID
	Température	260°C
	Gaz vecteur	Helium
	Gaz détecteur	Air - débit 450 mL/min Hydrogène - débit 45 mL/min

La concentration en alcool (substance) (p/p) a été obtenue à partir de la courbe de calibration, selon l’équation suivante :

$$C_{\text{dilution}} = \frac{(A_{\text{dilution}} - b)}{a}$$

avec :

C_{dilution} = Concentration de l’échantillon dilué exprimée en % (p/p)

a = Pente de la courbe de calibration

b = Ordonnée à l’origine de la courbe de calibration

A_{dilution} = Aire obtenue pour l’échantillon dilué

La concentration finale de l'échantillon a été calculée selon l'équation suivante :

$$C_{\text{Echantillon}} = \frac{(C_{\text{dilution}} \times P_{\text{t dilution}})}{P_{\text{Echantillon}}}$$

avec :

$C_{\text{Echantillon}}$ = Concentration finale de l'échantillon exprimée en % (p/p)

C_{dilution} = Concentration de l'échantillon dilué exprimée en % (p/p)

$P_{\text{t dilution}}$ = Poids total de l'échantillon dilué exprimé en g

$P_{\text{Echantillon}}$ = Poids de l'échantillon prélevé exprimé en g

III.1.1.4. Impuretés

Une analyse chromatographique des alcools utilisés a été effectuée par CPG pour identifier la présence possible d'impuretés.

Les 3 alcools ont été injectés sans dilution préalable dans les mêmes conditions chromatographiques que celles décrites pour la détermination des concentrations en alcool dans les produits d'essai.

III.1.2. Test d’irritation cutanée *in vitro*

III.1.2.1. Considérations générales

Historiquement, le potentiel d’un produit chimique à induire des irritations cutanées était évalué chez le lapin, par un essai proposé il y a plus de 70 ans par Draize *et al.* (1944) et repris depuis 1981 sous la ligne directrice No 404 de l’OCDE (révisée en 1992, 2002 et 2015) ([OECD 2015a](#)).

Depuis 2010, cette évaluation est réglementairement possible par une méthodologie *in vitro*, avec la 1^{ère} publication de la ligne directrice No 439 de l’OCDE en juillet 2010, révisée depuis à deux reprises (dernière version en vigueur du 28 juillet 2015) ([OECD 2015b](#)).

Le développement de cette méthodologie s’inscrit dans la mise en pratique de l’approche des 3R (remplacer, raffiner, réduire) et cette ligne directrice constitue, dans certains cas, une méthode de substitution à part entière remplaçant l’essai d’irritation cutanée *in vivo*, pour identifier les dangers présentés par les produits chimiques irritants (substances et mélanges) conformément à la Catégorie 2 du système général harmonisé (GHS - Globally harmonised system) de classification et d’étiquetage de l’ONU ([UN 2013](#)). Dans certains cadres réglementaires tels que l’adoption de la catégorie 3 du GHS (substances et mélanges légèrement irritants), cette méthodologie ne se substituera parfois que partiellement aux essais *in vivo*, avec une démarche expérimentale séquentielle comportant des essais d’irritation *in vitro* complétés d’essais *in vivo*, dont la réalisation doit être justifiée.

La méthodologie *in vitro* s’appuie sur un épiderme humain reconstitué (RhE ou reconstructed human epidermis) à partir de kératinocytes issus de donneurs humains, mis en culture en interface air-liquide (IAL). Les épidermes reconstitués obtenus présentent une structure tridimensionnelle voisine de l’épiderme *in vivo* en termes d’histologie (couche basale, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* et *stratum corneum* multi-couches), et expriment également certaines capacités métaboliques ([Luu-The *et al.* 2009](#), [Van Eijl *et al.* 2012](#), [Hewitt *et al.* 2013](#)). Ils font l’objet d’une caractérisation avant utilisation, notamment en termes de fonction de barrière cutanée : le *stratum corneum* doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques de référence telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction barrière est évaluée en déterminant la concentration à laquelle une substance de référence réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d’exposition donné, ou en définissant le temps d’exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE₅₀) après application de la substance de référence à une concentration fixe déterminée ([OECD 2015b](#)).

L’utilisation d’épidermes humains reconstitués présente plusieurs avantages. Elle permet notamment de disposer de résultats sur des cellules de peau humaine plus pertinents dans l’évaluation du danger possible pour l’homme comparativement aux essais sur cultures

cellulaires d’origine animale. Ces modèles issus de culture apportent également un niveau de variabilité moins important que l’utilisation de peau humaine, et les cellules sont plus facilement isolées, facilitant ainsi les analyses.

Le principe du test consiste à appliquer sur l’épiderme humain reconstitué le produit à tester pendant une durée définie, puis, après une période d’incubation à 37°C, de déterminer la viabilité cellulaire. Celle-ci est mesurée par l’activité enzymatique de la succinate-déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, qui réduit le colorant vital MTT (1-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-3,5-diphényltétrazolium bromide) en sel de formazan bleu, quantifié par spectrophotométrie après son extraction des tissus (Faller *et al.* 2002, Mosmann 1983). L’essai inclut des contrôles pour valider la fonction barrière et sensibilité tissulaire du modèle de peau par un témoin positif, et déterminer la viabilité cellulaire du modèle utilisé par un témoin négatif. La viabilité cellulaire dans les tissus traités est exprimée en pourcentage relatif comparativement à la viabilité cellulaire des épidermes traités par témoin négatif.

Les produits chimiques considérés comme irritants sont identifiés par leur capacité à réduire la viabilité cellulaire en dessous d’un seuil défini (inférieur ou égal à 50% pour la Catégorie 2 du GHS ONU). Les produits chimiques qui induisent des viabilités cellulaires au-dessus du seuil défini, peuvent être considérés comme non irritants (*i.e.* > 50%).

III.1.2.2. Aspects méthodologiques

III.1.2.2.1. Epidermes humains reconstitués (RhE)

Deux modèles différents d’épiderme humain reconstitué ont été utilisés.

Le modèle choisi en première intention est l’EpiSkin™ SM de chez Episkin SNC (Lyon, France) (Fig. 4). Il s’agit d’un modèle validé par l’ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) en 2007 et recommandé par la ligne directrice de l’OCDE No 439 (OECD 2015). En plus d’une structure histologique voisine de l’épiderme *in vivo*, l’EpiSkin™ SM dispose pour partie de capacités métaboliques existantes au niveau de la peau humaine native. Y sont notamment exprimées les protéines de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des alcools (ADH3, ALDH2, ALDH3A2, ALDH9A1) (Van Eijl *et al.* 2012). Leur production est standardisée, fiabilisée par un système qualité certifié ISO 9001. Par ailleurs, ce modèle est utilisé depuis de nombreuses années par le laboratoire de toxicologie de l’IPL notamment pour des essais d’irritation cutanée, confirmant leur compétence technique pour la réalisation de ce type d’essai.

Ces épidermes proviennent de cultures en IAL de 13 jours sur une matrice de collagène de kératinocytes humains issus de plasties mammaires chez l’adulte. Les cellules utilisées proviennent de plusieurs donneurs, contrôlés négatifs vis-à-vis des virus HIV1 et HIV2,

hépatites B et C. Un contrôle d’absence de contamination bactérienne, virale et mycoplasmique est effectué.

Les cultures sont effectuées en inserts ayant une surface de 0,38 cm². Les RhE ont été achetés prêts à l’emploi par plaques de 12 inserts chez Episkin SNC (Lyon, France), avec les milieux de culture et de maintenance nécessaires à leur correcte utilisation. Chaque lot a été livré avec un certificat d’analyses incluant le contrôle histologique (effectué par coloration HES (Hematoxylin-Eosin-Safran)) confirmant un épiderme bien différencié avec un *stratum corneum* épais, la confirmation d’une valeur de CI₅₀ suite à l’exposition au SDS conforme aux spécifications attendues (≥ 1,5 mg/mL), en plus des données de sécurité biologique (contrôles sanguins des donneurs et contrôles sur les cellules cultivées).

Le second modèle d’épiderme reconstruit utilisé est celui développé par THOR Personal Care dénommé VitroDerm (Fig. 4). Par comparaison au modèle EpiSkinTM SM, il s’agit d’un modèle de R&D développé à partir de la méthode de [Poumay et al. \(2004\)](#), consistant à la mise en culture durant 16 jours en IAL de cellules primaires humaines de prépuce (Lonza, Suisse) sur une membrane de polycarbonate (Millipore) dans des conditions exemptes de produits d’origine animale. Leur surface est plus grande, égale à 0,60 cm².

Un contrôle histologique ainsi que la mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER - trans epithelial resistance) et la détermination de l’ET₅₀ avec triton X-100 ont été effectués pour caractériser le lot de tissu et confirmer le niveau acceptable de la fonction barrière. Le lot de cellules primaires a été testé avant son utilisation pour vérifier la stérilité virale, bactérienne, fongique et mycoplasmique. La culture des épidermes a été réalisée sans antibiotiques pour éviter les contaminations cachées.

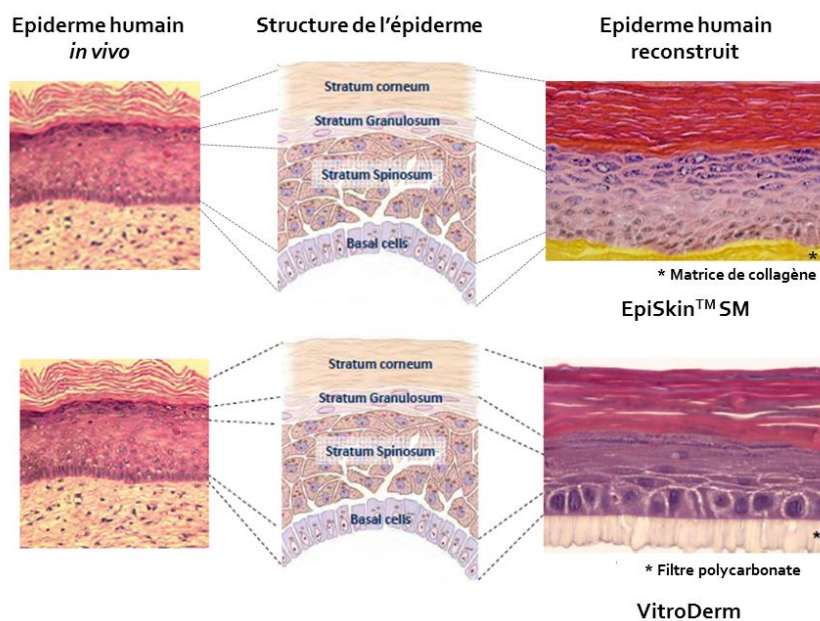


Figure 4 : Histologie comparée des modèles d’épiderme humain reconstruit EpiSkinTM SM et VitroDerm, comparativement à l’épiderme humain *in vivo*

III.1.2.2.2. Traitements et doses d’essai

Le tableau 23 présente les produits d’essai testés.

Tableau 23 : Produits d’essai testés en fonction du modèle d’épiderme humain reconstitué

		EpiSkin™ SM	VitroDerm
Alcools seuls	Ethanol (% p/p)	60, 70, 80, 85	--
	Isopropanol (% p/p)		--
	n-propanol (% p/p)		60, 70, 80, 85
	Propane-1-ol LiChrosolv® ¹	60	--
Mélange de Co-formulants ² CoF ₁₀		5 dilutions au ½ de 100 à 6,25%	25%
SHA ³ sur base	Ethanol (% p/p)	60, 70, 80, 85 en présence de 1,25% ou 2,5% p/p cumulé de co-formulants	--
	Isopropanol (% p/p)		--
	n-propanol (% p/p)		60, 70, 80, 85 en présence de 2,5% p/p cumulé de co-formulants

¹ Propan-1-ol (n-propanol) pour la chromatographie en phase liquide

² CoF₁₀ : MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange, de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

³ Solutions hydro-alcooliques

A l’exception du mélange de co-formulants, les produits d’essai ont été testés tels quels, au volume recommandé dans la ligne directrice de l’OCDE No 439, c’est-à-dire 10 µL par épiderme pour EpiSkin™ SM, et 16 µL pour VitroDerm, correspondant dans les deux cas à ± 26 µL/cm².

Le mélange de co-formulants CoF₁₀ a été testé sur 5 concentrations. Le but de cet essai était de déterminer une toxicité potentielle du mélange de co-formulants sur le système d’essai, et a permis de définir la teneur de 2,5 % de co-formulants à utiliser dans les SHA testés. Des essais complémentaires ont également été effectués avec des SHA formulés avec deux fois moins de co-formulants, soit 1,25%.

III.1.2.2.3. Contrôles

Chaque essai a inclus un contrôle négatif (PBS, phosphate buffer saline) permettant de confirmer la viabilité cellulaire du modèle et donnant la valeur de viabilité cellulaire de référence (100%). Chaque fois que le plan expérimental le permettait, un contrôle positif (SDS 5%, Biorad) a également été réalisé pour démontrer la fonction barrière et la sensibilité des tissus.

Des témoins supplémentaires peuvent être nécessaires afin de corriger les interférences si le produit d’essai est lui-même un agent réducteur du MTT ou s’il est coloré ou se colore durant l’essai :

↳ Recherche d'interaction possible avec le MTT et le produit

Avant le traitement, une plaque 12 puits a été remplie avec 2 mL d'une solution de MTT à 0,3 mg/mL. Les produits d'essai (50 µL) ont été ajoutés et la plaque a été incubée pendant 2,5 heures à l'abri de la lumière (37°C, 5 % CO₂, 95 % d'humidité). Une coloration bleue ou violette indique une interaction possible du produit d'essai avec le MTT, tandis qu'une légère coloration grise indique qu'il n'y a pas d'interaction avec le MTT. En cas de coloration bleue ou violette, des épidermes morts traités et non traités sont ajoutés à l'essai pour déterminer la valeur d'absorbance non spécifique.

↳ Recherche d'interférences de couleur avec le produit

Les produits d'essai ont été testés pour identifier s'ils se coloraient au contact de l'eau. 100 µL de produit ont été ajoutés à 900 µL d'eau, mélangés puis laissés 15 minutes à température ambiante. En cas de coloration de la solution après le temps de contact, des contrôles supplémentaires durant l'essai peuvent être ajoutés pour déterminer la valeur d'absorbance non spécifique liée à la coloration. Ceci se fait par ajout d'épidermes traités et non traités auxquels l'incubation au MTT est remplacée par une incubation avec du milieu d'essai.

Pour nos essais, aucun contrôle supplémentaire n'a été nécessaire, en absence d'interaction des produits d'essai avec le MTT et absence de potentiel de coloration des produits d'essai.

III.1.2.2.4. Protocole du test d'irritation *in vitro*

a) Pré-cultures et traitement

En dehors de l'étape de maintenance des épidermes EpiSkin™ SM à réception, en raison de leur acheminement par voie postale, le protocole était le même pour les deux modèles d'épidermes.

A réception des épidermes EpiSkin™ SM, les inserts d'épidermes reconstitués ont été transférés dans des plaques 12 puits contenant 2 mL de milieu de maintenance EpiSkin™ et incubés à 37 °C sous 5 % CO₂ avec 95 % d'humidité, durant 18 à 24 heures.

Les produits ont été appliqués et étalés à l'aide d'un filtre en nylon pour favoriser l'uniformité de traitement. Après 15 minutes de contact, les épidermes ont été rincés deux fois au PBS (le premier rinçage par immersion de l'insert et le deuxième en versant du PBS préchauffé en quantité importante directement sur l'épiderme).

Les épidermes ont ensuite été transférés dans des puits contenant 2 mL de milieu de maintenance et incubés pendant 42 heures (37 °C, 5 % CO₂, 95 % d'humidité).

Un essai indépendant sur EpiSkin™ SM a également été réalisé avec les alcools seuls en conditions occlusives pour mettre en évidence un quelconque effet occulté en relation avec

l’évaporation des alcools. Pour ce faire, le traitement a été réalisé avec la fermeture des inserts par du parafilm juste après l’administration du traitement. Après les 15 minutes de traitement, le Parafilm a été retiré et les épidermes ont été rincés comme expliqué ci-dessus.

Chaque produit d’essai, y compris les témoins positif et négatif, a été testé en *triplicate*.

b) Test au MTT

Après incubation, les inserts ont été transférés dans des puits contenant 2 mL de solution de MTT (à 0,3 mg/mL dilué dans le milieu d’essai). Les plaques ont ensuite été incubées pendant 2,5 à 3 heures (37 °C, 5 % CO₂, 95 % d’humidité). Après ce temps de contact, les épidermes ont été séchés puis placés dans des tubes Ependorf contenant 0,5 mL d’isopropanol acidifié (EpiSkin™ SM) ou 1 mL d’isopropanol (VitroDerm). Les tubes ont été placés à température ambiante à l’abri de la lumière pendant 4 heures, ou conservés à 5°C à l’abri de la lumière jusqu’à 72 heures. Passé ce délai, les tubes ont été agités, et 2 x 0,2 mL par puit ont été transférés dans une plaque à fond plat, pour mesure des densités optiques (DO) à 550 nm (EpiSkin™ SM) ou 570 nm (VitroDerm) à l’aide d’un spectrophotomètre.

La figure 5 ci-dessous illustre la méthodologie d’essai du test d’irritation *in vitro*.

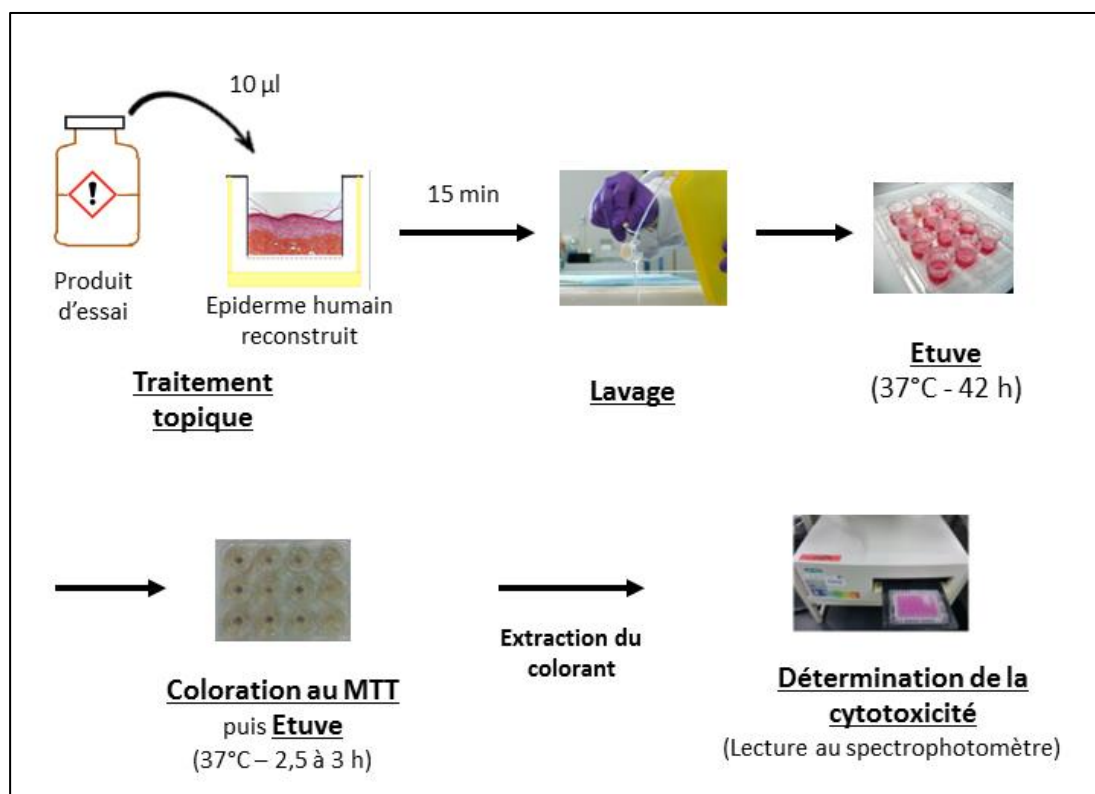


Figure 5 : Schéma récapitulatif du test d’irritation *in vitro* sur épiderme humain reconstitué

c) Expression des résultats et interprétation

Pour chaque épiderme, la moyenne des densités optiques (DO) a été calculée :

$$\text{DO corrigée} = \text{DO}_{\text{traité}} - \text{DO}_{\text{blanc}}^*$$

* : solvant d'extraction seul (isopropanol acidifié pour EpiSkin™ SM ; isopropanol pour VitroDerm)

La moyenne des DO corrigées des 3 inserts du témoin négatif (TN) correspond à 100 % de viabilité cellulaire.

Le pourcentage de viabilité cellulaire relative de chaque épiderme traité a été déterminé à partir de la DO corrigée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = \frac{\text{DO}_{\text{Corrigée traité}}}{\text{Moyenne DO}_{\text{Corrigée TN}}} \times 100$$

La viabilité cellulaire moyenne et l'écart-type ont été calculés pour les 3 épidermes traités par un même produit d'essai et utilisés pour déterminer le potentiel irritant.

Les critères d'acceptabilité du test étaient ceux de l'OCDE :

- valeur moyenne de densité optique du solvant d'extraction (DO_{blanc}) inférieure à 0,1
- densité optique corrigée moyenne du témoin négatif (moyenne $\text{DO}_{\text{corrigée TN}}$) comprise entre 0,6 et 1,5, écart-type inférieur à 18, et valeur cohérente avec les données historiques du laboratoire
- viabilité moyenne du contrôle positif inférieure à 40%, écart-type inférieur à 18 et valeur cohérente avec les données historiques du laboratoire.

Les résultats limites, incohérents ou équivoques ont été clarifiés par des essais complémentaires.

L'élément d'essai a été considéré comme irritant pour la peau selon les critères de l'OCDE No 439 si la viabilité cellulaire après traitement était inférieure ou égale à 50%. L'élément d'essai a été considéré comme non irritant pour la peau si la viabilité cellulaire après traitement était supérieure à 50%.

Des analyses statistiques à l'aide de tests non paramétriques ont été réalisées lorsque des données issues de plusieurs essais indépendants étaient disponibles. Une différence d'effet entre les produits ou entre les concentrations d'essai d'un même alcool a été recherchée à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Ces tests ont été réalisés à l'aide du logiciel SAS/STAT® 14.2. Le seuil de 5% a été retenu pour la significativité statistique ($p < 0,05$).

III.1.2.3. Résumé de l’approche méthodologique

Le tableau 24 résume les conditions expérimentales mises en œuvre pour les essais d’irritation.

Tableau 24 : Résumé des conditions expérimentales et données d’interprétation des essais d’irritation *in vitro*

	Alcools seuls ¹	CoF ₁₀ ²	SHA ³
Modèle RhE⁴	EpiSkin™ SM VitroDerm (uniquement n-propanol)	EpiSkin™ SM	EpiSkin™ SM VitroDerm (uniquement SHA sur base n-propanol)
Conditions d’essai	± 26 µL/cm ² (10 µL pour EpiSkin™ SM / 16 µL pour VitroDerm) - 15 min		
	Traitement en ouvert et en occlusif	Dilutions au ½ (100 à 6,25%) sur EpiSkin™ SM Traitement en ouvert	Traitement en ouvert
Gamme de dilutions	Non	Oui	Non
Témoins	Témoin négatif (PBS) et témoin positif (SDS 5%)		
Réplicats	<i>Triplicate</i>		
Paramètre de mesure	Viabilité cellulaire relative (test au MTT)		
Interprétation (sous réserve de la validité de l’essai)		Non irritant	Irritant
	Viabilité cellulaire	> 50%	≤ 50%

¹ Ethanol, Isopropanol ou n-propanol (60, 70, 80 ou 85% p/p)

² CoF₁₀ : co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

³ SHA : solutions hydro-alcooliques sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol (60, 70, 80 ou 85% p/p) formulées avec 1,25 ou 2,5% p/p cumulé de co-formulants (MP1, MP2, MP3 et MP4)

⁴ RhE : épiderme humain reconstitué

III.1.3. Test de phototoxicité *in vitro*

III.1.3.1. Considérations générales

La phototoxicité est définie comme un effet toxique déclenché ou accentué après exposition de la peau à la lumière, lié à une substance appliquée par voie topique ou après exposition systémique.

Les effets phototoxiques sont à relier à la capacité du produit à absorber l'énergie lumineuse dans la plage de la lumière solaire. Le rayonnement absorbé doit être suffisamment énergétique pour permettre à la molécule d'atteindre un état moléculaire activé (état instable réactif avec les molécules des tissus biologiques), mais pas trop pour ne pas transformer complètement la molécule qui devient différente mais stable. Le retour à l'état fondamental se fait par transfert d'énergie, d'électrons ou d'hydrogène aux molécules voisines, avec possibilité de création d'espèces réactives de l'oxygène responsables d'altérations cellulaires (Adamski *et al.* 2008).

Les ultraviolets se situent dans la gamme de longueurs d'ondes du spectre solaire impliquées dans les réactions de phototoxicité. Les UVA (longueur d'onde 315-400nm) sont moins énergétiques que les UVB (longueur d'onde 290-315), mais ils pénètrent profondément la peau, jusqu'au niveau du derme (contrairement aux UVB qui sont arrêtés à 70% par l'épiderme, et qui atteignent le derme seulement pour 10% d'entre eux) et sont souvent absorbés par les molécules organiques comportant un groupement cyclique. De plus, les UVA ne sont pas filtrés par les vitres, et leur intensité varie peu en fonction des saisons et des heures d'exposition. Ainsi l'exposition aux UVA est potentiellement plus délétère que les autres fractions du spectre solaire, même si ces dernières peuvent parfois être impliquées dans les réactions phototoxiques (visible, infrarouge, UVB, UVC) (Bourrain 2010).

Il existe un test *in vitro* validé pour prédire le potentiel de phototoxicité *in vivo* d'une substance chimique. Il s'agit de l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU, repris dans la ligne directrice No 432 de l'OCDE et dans le règlement (CE) n° 440/2008 établissant les méthodes d'essai dans le cadre de REACH (OECD 2004a, EU. B.41. 2008). Dans cet essai, seuls les UVA sont utilisés pour l'irradiation, pour ne pas induire un niveau de cytotoxicité trop important aux cultures cellulaires, ni apporter trop d'énergie aux substances d'essai. Un filtre permet d'éliminer les UVB du spectre UV créé par la lampe. La dose d'irradiation utilisée doit être non cytotoxique pour permettre la mise en évidence d'un éventuel potentiel phototoxique. Cette dose efficace, dite dose UVA efficace subtoxique, correspond à la dose d'irradiation pour laquelle la viabilité cellulaire reste supérieure ou égale à 80% de la viabilité cellulaire des cultures non irradiées. Cette dose doit également donner un résultat positif pour la substance de référence phototoxique testée concomitamment (témoin positif).

Des études comparatives des résultats de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU d'une substance avec les résultats *in vivo* de phototoxicité aiguë chez l'animal et chez l'homme ont confirmé

la fiabilité de cette méthode *in vitro* (Spielmann *et al.* 1998, Spielmann *et al.* 1994, OECD 2004a, Anon 1998) pour la prévision des effets phototoxiques aigus.

Bien que les kératinocytes soient les premières cellules cibles, le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU se réalise sur des fibroblastes murins de la lignée cellulaire BALB/c 3T3. Ceux-ci ont été préférés aux cellules cutanées pour des raisons de sensibilité, tel que démontré dans l'étude de pré-validation de l'ECVAM et du COLIPA (Spielmann *et al.* 1995). Le potentiel phototoxique d'une substance est évalué par la mesure de sa cytotoxicité, en exposant les cellules à huit concentrations différentes de la substance testée, en présence et en absence d'exposition aux UVA.

La viabilité cellulaire est mesurée par la technique de relargage du colorant vital rouge neutre (NRU – Neutral red uptake) (Borenfreund and Puerner 1985). Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui s'accumule dans les lysosomes des cellules vivantes. En cas d'altération de la membrane lysosomale, la capacité de fixation du rouge neutre est diminuée du fait de la présence de cellules mortes ou abîmées. Le rapport des CI₅₀ obtenues (concentration qui provoque 50% de mortalité cellulaire) en absence et en présence d'UVA permet de déterminer le potentiel phototoxique de la substance.

Un essai préalable est préconisé pour déterminer le coefficient d'extinction/d'absorption molaire du produit d'essai dans l'UV/lumière visible, qui, s'il est inférieur à 10 L/mole/cm, est en faveur de l'absence de potentiel photoréactif (OECD 2004a).

L'essai n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets nocifs susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la photogénotoxicité, la photo-allergie, et la photocancérogénicité, et il ne permet pas non plus d'évaluer la puissance phototoxique.

Cet essai n'est pas conçu pour étudier les effets des mélanges, la phototoxicité d'un ingrédient pouvant être masquée par d'autres ingrédients. Dans ce cas, il convient d'effectuer l'essai sur chacun des composants à des fins d'interprétation des résultats obtenus sur le mélange.

III.1.3.2. Aspects méthodologiques

Avant la réalisation de l'essai de phototoxicité *in vitro*, les spectres d'absorption UV / VIS des différents éléments de test (alcools et MP1, MP2, MP3 et MP4) ont été déterminés.

III.1.3.2.1. Spectre UV/VIS

Les spectres d'absorption UV / VIS (220-1000 nm) ont été mesurés selon la ligne directrice No 101 de l'OCDE (OECD 1981) à l'aide d'une cuvette de quartz de 10 mm de longueur placée dans le Spectromètre à absorbance ultra-rapide SPECTROstar NANO (BMG LABTECH) interfacé avec un PC pour le traitement des données (logiciel d'analyse de données MARS).

Chaque fois que possible, les coefficients d'extinction molaire maximum ont été calculés selon l'équation :

Absorbance = coefficient d'extinction x longueur de trajet x concentration molaire.
--

III.1.3.2.2. Essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (3T3 NRU-PT)

a) Cellules

La lignée cellulaire utilisée a été intégrée dans l'étude de validation de la ligne directrice OCDE 432. Il s'agit de cellules BALB/c 3T3, clone 31, provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) et conservées au laboratoire à -180°C dans de l'azote liquide.

Seuls les lots ne contenant pas de mycoplasmes (vérification à l'aide du kit Mycoalert mycoplasma detection (Cambrex Bio Science Rockland, inc)) et ayant une sensibilité satisfaisante aux UV ont été utilisés pour les tests. Les cellules ont été cultivées en milieu de culture MEM (Modified Eagle's Medium) complet : milieu enrichi avec 10% de sérum de veau nouveau-né, de la L-Glutamine et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Une semaine avant les essais, une ampoule conservée dans de l'azote liquide contenant environ 1 à 2.10^6 cellules a été remise en suspension dans 30 mL de milieu de culture. Après centrifugation (6 minutes à 1000 tours/min), le surnageant a été retiré et remplacé par 30 mL de MEM complet. Les cellules ($3,3$ à $6,6.10^4$ /mL) ont été remises en suspension par aspiration-refoulement puis transférées dans un flacon de culture. Les cellules ont ensuite été incubées en étuve (37°C, 5% de CO₂ et 95% d'humidité) pendant 3 jours.

Un passage a ensuite été effectué pour disposer de cellules à confluence sous 2 jours :

- retrait du milieu de culture et rinçage à deux reprises du tapis cellulaire par ± 5 mL d'HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)
- décollement des cellules par trypsination (ajout de ± 3 mL de solution stérile de trypsine à 0,25 % puis mise à l'étuve quelques minutes à 37°C pour favoriser l'action enzymatique)
- remise en suspension des cellules par aspiration-refoulement après arrêt de la réaction enzymatique (ajout de 8 mL de milieu de culture)
- ensemencement des cellules en flacons stériles à raison de $2,5 \cdot 10^5$ à $1 \cdot 10^6$ cellules dans un volume total de 30 mL de milieu MEM complet.

En raison d'une sensibilité accrue des cellules aux radiations avec le nombre de passages, celle-ci est vérifiée tous les 5 passages. L'essai consiste à traiter les cellules avec différentes solutions représentatives des diluants et solvants usuellement utilisés pour préparer les dilutions des produits d'essai (HBSS, DMSO, éthanol, eau distillée). Les cultures sont ensuite exposées à des doses croissantes d'UVA ($2,5$ à 30 J/cm²) (1 dose par plaque) (voir §

irradiation ci-après) après une heure de traitement. Les cellules répondent aux critères de qualité si leur viabilité après irradiation à la dose non cytotoxique la plus élevée (5 J/cm²) est suffisante ($\geq 80\%$ de la viabilité cellulaire des cultures maintenues à l'obscurité) pour permettre de classer correctement les substances phototoxiques de référence.

Note générique relative au comptage cellulaire

Les cultures ont nécessité des comptages afin de déterminer les quantités de culture cellulaire à prélever en vue des ré-ensemencements ou réalisations des essais. Ceux-ci ont été effectués par dépôt d'environ 1 μ L de culture cellulaire (après homogénéisation par aspiration/refoulement) sur cellules de Malassez. Celles-ci comportent un quadrillage d'un volume total de 1 mm³, divisé en 100 unités rectangulaires égales, certaines étant subdivisées en 20 carrés pour faciliter le dénombrement des cellules. Le comptage a été réalisé par lecture au microscope à l'objectif x40.

b) Traitements et doses d'essai

Les produits d'essai testés étaient les suivants :

- les 4 co-formulants seuls, MP1, MP2, MP3 et MP4,
- le mélange de co-formulants CoF₁₀ (10% p/p cumulé de MP1, MP2, MP3 et MP4 dans le DMSO),
- des solutions hydro-alcooliques (SHA) sur base d'éthanol, isopropanol ou n-propanol, aux 4 concentrations : 60, 70, 80 et 90% p/p, en présence de 1 ou 2 % p/p cumulé de co-formulants en mélange. Ces teneurs correspondent aux doses déterminées comme non cytotoxiques ou faiblement cytotoxiques dans le test de phototoxicité effectué avec le mélange CoF₁₀, afin de ne pas introduire un niveau de cytotoxicité incompatible avec la réalisation de l'essai.

Pour les co-formulants seuls ou en mélange (CoF₁₀), la concentration maximale d'essai a été déterminée suite à un essai préliminaire également appelé DRF (Dose Range Finding).

Celui-ci a été mené sur une gamme de dilutions au demi dans le DMSO pour disposer de 8 concentrations d'essai :

0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 - 0,0312 - 0,0015 - 0,0078 et 0,0039 % v/v.

Le but de cet essai était de déterminer la gamme de concentrations pour le test définitif de sorte d'encadrer l'IC₅₀.

Les SHA ont été testés sans gamme de dilution, et sans réalisation d'essai préliminaire.

A l'exception des SHA testés à 1% v/v, les traitements ont été administrés à 0,5 % dans de l'HBSS (solution saline tamponnée physiologiquement équilibrée, exempte de constituants protéiques qui absorbent la lumière afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation).

L'utilisation d'HBSS permet d'éviter l'alcalinisation des milieux de culture pendant la période d'irradiation, celle-ci se faisant en dehors de l'incubateur CO₂.

L'absence de précipité ou de solution trouble a été vérifiée pour l'ensemble des conditions d'essai. La stabilité des dilutions durant toute la durée de l'essai a également été vérifiée.

L'absence d'impact significatif sur les conditions de culture cellulaire afin d'éviter de faux positifs a été vérifiée en termes de stress pH et/ou osmotique pour les trois plus fortes concentrations d'essai :

- pH des solutions d'essai compris entre 6,5 et 7,8
- variation de l'osmolalité de moins de 10 mOsmol/kg comparée au milieu de culture ou au contrôle solvant.

En parallèle, le DMSO utilisé comme solvant des co-formulants a également été testé en tant que témoin négatif, à la concentration de 0,5% dans l'HBSS.

Toutes les préparations des produits chimiques ont été réalisées extemporanément. La manipulation des produits a été effectuée dans des conditions d'éclairage minimal permettant d'éviter la photo-activation ou la dégradation de l'élément de test avant l'irradiation.

Pour les essais définitifs, la gamme de dilutions, déterminée à partir des résultats de l'essai préliminaire, était plus étroite. Sa préparation s'est faite en appliquant les mêmes principes que ceux décrits pour l'essai préliminaire.

c) Irradiation

Les cellules ont été irradiées à la dose de 5 J/cm² d'UVA sur une durée de 25 minutes environ.

L'irradiation a été réalisée au moyen de l'irradiateur solaire BIOSUN (Vilbert Lourmat RMX3W). Le BIOSUN est un appareil d'irradiation UV programmable contrôlé par microprocesseur (le système surveille en permanence l'émission de lumière UV). L'irradiation est arrêtée automatiquement lorsque la quantité totale d'énergie reçue correspond à celle programmée.

Avant la réalisation de chaque essai, un étalonnage du BIOSUN a été réalisé pour s'assurer de la justesse de la dose administrée (5 J/cm² d'UVA). L'irradiation a été mesurée à l'aide d'un radiomètre externe (VLX-3W avec un capteur UVA (365-CX) ou UVB (312-CX)), et le biais a été déterminé.

Les écarts admis étaient de $\pm 10\%$ pour la dose d'UVA, avec moins de 2,5% d'UVB.

d) Contrôles

Chaque essai a inclus des témoins négatifs et positifs :

- le solvant utilisé pour la dissolution de l'élément d'essai, ou l'HBSS en absence de dilution, ont été utilisés comme témoin négatif, avec et sans irradiation,
- la chlorpromazine (CPZ) connue comme substance chimique phototoxique a été testée en parallèle comme témoin positif sur deux plaques indépendantes. Les 8 concentrations utilisées, avec et sans irradiation, étaient de 120 - 40 - 20 - 10 - 2 - 1 - 0,2 et 0,1 µg/mL dans l'HBSS.

e) Protocole du test de phototoxicité

Les essais ont été réalisés sur 3 jours. Les essais préliminaire (DRF) et définitif suivent le même protocole, à l'exception du nombre de cultures : une seule pour le DRF et deux cultures pour l'essai définitif.

Le 1^{er} jour, deux plaques 96 puits ont été préparées avec 1.10^4 cellules par puit, de manière à ce que les cultures ne soient pas à confluence à 48H, lors de la mesure de la viabilité cellulaire. Seuls les 60 puits centraux ont étéensemencés. Les 36 puits périphériques ont reçu 100 µL de milieu de culture (blancs pour le test de viabilité cellulaire).

Les cultures en plaques ont été incubées à l'étuve pendant environ 24 heures jusqu'à atteindre une monocouche semi-confluente.

Le 2^{ème} jour, le milieu de culture a été éliminé par retournement et les produits d'essai ont été administrés : 12 puits pour le contrôle solvant (DMSO 0,5% ou HBSS en fonction des produits d'essai) et 6 puits par condition d'essai (8 conditions par plaque). Les 36 puits périphériques ont reçu 100 µL de milieu de culture pour le blanc.

Les plaques ont ensuite été incubées à l'étuve à l'abri de la lumière directe pendant 60 minutes.

Une des deux plaques préparées pour chaque produit d'essai et pour le témoin positif a été choisie de manière aléatoire pour la détermination de la cytotoxicité (plaque sans irradiation Irr-), et l'autre pour la détermination de la phototoxicité (plaque avec irradiation Irr+).

Les plaques Irr+ ont été irradiées à température ambiante à la dose de 5 J/cm² (25 minutes environ). Pendant ce temps, les plaques Irr- ont été gardées à température ambiante dans l'obscurité.

Après cette étape, les surnageants de traitement ont été éliminés par retournement et les cellules ont été lavées avec 150 µL d'HBSS avant de remettre 100 µL de milieu de culture/puit. Les plaques ont ensuite été incubées à l'étuve pendant 18 à 22 heures.

Le 3^{ème} jour, les évaluations ont été effectuées.

Les cellules ont été examinées au microscope à contraste de phase pour l'évaluation de la croissance, la morphologie et l'intégrité de la monocouche. Les changements morphologiques et les effets sur la croissance cellulaire ont été enregistrés comme suit :

0 : aucun dommage cellulaire

1 : dommages morphologiques légers mais significatifs, avec réduction de la densité cellulaire

2 : dommages morphologiques importants avec réduction importante de la densité cellulaire

3 : perte de la forme cellulaire et/ou perte de 50 % du tapis cellulaire

4 : totalité des cellules traitées mortes, lysées ou détachées

Le milieu de culture a ensuite été éliminé par retournement, puis 100 µL de solution de rouge neutre (NR) (milieu de culture complété par du sérum et contenant 50 µg/mL de Rouge Neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine hydrochloride)) ont été ajoutés dans les puits, avant de remettre les plaques à incuber pendant 3h (37°C, 5% de CO₂, 95% d'humidité).

Après cette période, le milieu NR a été éliminé, puis les cellules ont été lavées à deux reprises avec 150 µL d'HBSS, en vue de procéder à l'extraction du colorant et sa quantification par spectrophotométrie. 150 µL de solution éthanol / acide acétique fraîchement préparée (49% d'eau + 50 % d'éthanol absolu + 1% d'acide acétique) ont été ajoutés dans chaque puit, puis les plaques ont été agitées doucement pendant 10 minutes, à des fins d'extraction du Rouge Neutre des cellules (formation d'une solution homogène). L'absorbance a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 550 nm.

La figure 6 illustre la méthodologie d'essai du test de phototoxicité.

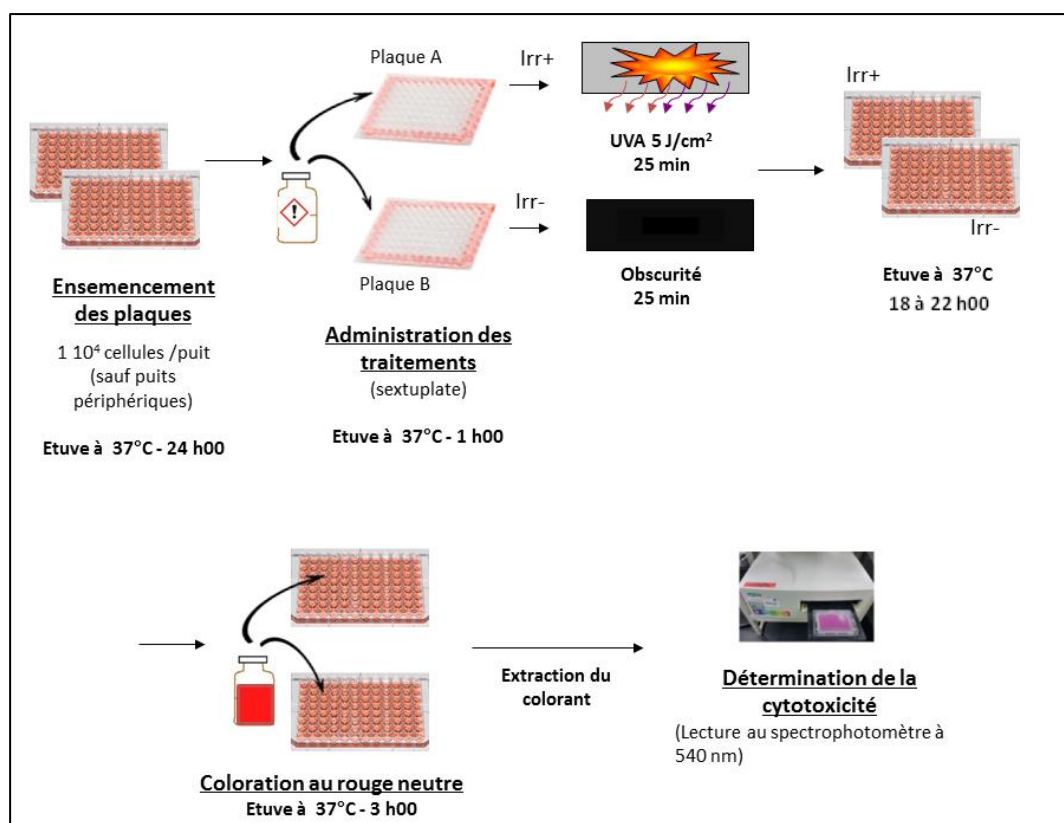


Figure 6 : Schéma récapitulatif du test de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3

f) Expression des résultats et interprétation

A l'issue de chaque essai,

- les pourcentages de viabilité cellulaire avec et sans irradiation (Irr- et Irr+) ont été calculés pour chaque concentration de substance d'essai :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{DO}_{\text{traité}} - \text{DO}_{\text{blanc}}}{\text{DO}_{\text{contrôle}} - \text{DO}_{\text{blanc}}} \times 100$$

Avec : **DO_{traité}** : moyenne des valeurs d'absorbance des cellules traitées par l'élément d'essai

DO_{contrôle} : moyenne des valeurs d'absorbance des cellules traitées par le témoin négatif

DO_{blanc} : moyenne des valeurs d'absorbance des puits périphériques sans cellules

Pour les essais avec une gamme de dilutions,

- la concentration provoquant une inhibition de 50 % de la viabilité cellulaire (CI₅₀) avec et sans irradiation (Irr- et Irr+) a été déterminée par régression linéaire
- le facteur de photo-irritation (PIF) a été calculé

$$\text{PIF} = \frac{\text{CI}_{50} (\text{Irr-})}{\text{CI}_{50} (\text{Irr+})}$$

Lorsqu'aucune CI_{50} n'a pu être déterminée (produit peu cytotoxique), le PIF n'a pas pu être calculé. Dans ce cas, le photo-effet moyen (MPE ou mean photo effect) a été déterminé à partir de la comparaison point par point des courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation.

Pour ces essais, les calculs de CI_{50} , PIF et MPE ont été effectués à l'aide de l'application Phototox version 2.0 (OECD, 2004a).

Pour les essais menés sans dilution, les viabilités cellulaires moyennes relatives des cultures avec irradiation comparativement à celle des cultures sans irradiation ont été calculées.

Pour chaque essai, les critères d'acceptation du test étaient celles reprises dans la ligne directrice de l'OCDE :

- sensibilité des cellules aux UV satisfaisante et cohérence avec les données historiques du laboratoire
- viabilité des témoins négatifs irradiés supérieure ou égale à 80 % de celle des témoins négatifs non irradiés pour les plaques contenant l'élément d'essai comme pour les plaques contenant le témoin positif
- moyenne des absorbances des cellules des témoins négatifs (DO_{550}) supérieure à 0,4, indiquant que les 10^4 cellules mises en culture par puits se sont développées avec un temps de doublement normal pendant les deux jours de l'essai
- pour le témoin positif (CPZ), une phototoxicité confirmée remplissant les critères ci-dessous :

CPZ	Irr+	Irr-
CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	[0,1 - 2,0]	[7,0 - 90,0]
PIF	> 6	

Pour les produits d'essai testés sur une gamme de dilutions, lorsque les critères de validité étaient remplis, l'interprétation des résultats en termes de prédiction de phototoxicité a été effectuée à partir de la valeur du PIF et du MPE, conformément à la ligne directrice de l'OCDE No 432 :

	PIF	ou	MPE
Non phototoxique	< 2		< 0,1
Phototoxique probable	[2 - 5]		[0,1 - 0,15]
Phototoxique	> 5		> 0,15

Pour les SHA, en absence de gamme de dilutions, la conclusion s'est faite à partir des valeurs de viabilités moyennes relatives des cultures irradiées comparativement aux cultures non irradiées. Une valeur voisine de 100 % a été considérée en faveur de l'absence de potentiel phototoxique du produit d'essai. Un résultat significativement inférieur à 100 a été considéré comme un résultat possiblement significatif, pouvant nécessiter des investigations complémentaires, tel qu'un essai sur une gamme de dilutions.

III.1.3.2.3. Résumé de l'approche méthodologique

Le tableau 24 résume les conditions expérimentales mises en œuvre pour les essais de phototoxicité.

Tableau 25 : Résumé des conditions expérimentales et données d'interprétation des essais de phototoxicité

		Co-formulants seuls ¹	CoF ₁₀ ²	SHA ³												
Type cellulaire		BALB/c 3T3 clone 31														
Conditions d'essai		2 plaques de 96 puits par substance d'essai Plaque Irr+ avec irradiation à 5 J/cm ² (dose UVA non cytotoxique) (± 25minutes) Plaque Irr- sans irradiation (conservation à l'obscurité)														
Essai préliminaire		Oui 6 puits par dose (sauf témoins solvants n=12) 1 culture		--												
Essai définitif	Gamme de dilutions	Oui	Oui	Non												
	Témoins	Témoin solvant (12 puits) et témoin positif (8 concentrations en <i>sextuplate</i>)														
	Réplicats	6 puits par dose														
	Cultures	2														
	Paramètre de mesure	$PIF = \frac{CI_{50} (Irr-)}{CI_{50} (Irr+)} \text{ (facteur de photo-irritation)}$ et/ou MPE (photo-effet moyen)		viabilité relative des cultures Irr+ / ^t aux cultures Irr-												
Interprétation (sous réserve de la validité de l'essai)		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PIF</th> <th>MPE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Non phototoxique</td> <td>< 2</td> <td>ou < 0,1</td> </tr> <tr> <td>Phototoxique probable</td> <td>[2 – 5]</td> <td>ou [0,1 - 0,15]</td> </tr> <tr> <td>Phototoxique</td> <td>> 5</td> <td>ou > 0,15</td> </tr> </tbody> </table>		PIF	MPE	Non phototoxique	< 2	ou < 0,1	Phototoxique probable	[2 – 5]	ou [0,1 - 0,15]	Phototoxique	> 5	ou > 0,15	Viabilité moyenne relative Irr+ : voisine de 100 % : non phototoxique significativement inférieure à 100% : possiblement phototoxique	
	PIF	MPE														
Non phototoxique	< 2	ou < 0,1														
Phototoxique probable	[2 – 5]	ou [0,1 - 0,15]														
Phototoxique	> 5	ou > 0,15														

¹ Co-formulants seuls : MP1, MP2, MP3 et MP4

² CoF₁₀ : co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

³ SHA : solutions hydro-alcooliques sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol (60, 70, 80 ou 90% p/p) formulées avec 1% ou 2% p/p cumulé de co-formulants (MP1, MP2, MP3 et MP4)

Le protocole suivi a légèrement différé de la ligne directrice de l'OCDE No 432 :

- le milieu de culture utilisé était du MEM (Modified Eagle's Medium) à la place du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium),
- pour éviter le détachement des cellules, les lavages avant traitement et avant coloration n'ont pas été réalisés,
- la durée d'irradiation avec le Biosun était d'environ 25 minutes au lieu de 50 minutes,
- le rouge neutre a été dilué à 50 µg/mL dans du milieu avec sérum pour éviter la formation de cristaux,
- la densité optique de l'extrait de rouge neutre a été lue à 550 nm au lieu de 540 nm.

Ces déviations à la ligne directrice sont jugées sans conséquence sur la validité de l'essai de phototoxicité. En effet, les mêmes déviations ont été appliquées lors de l'essai de validation du test mené dans le laboratoire sur 8 substances (5 phototoxiques et 3 non phototoxiques), et étaient sans impact identifié sur les critères de validité des essais menés, comme sur la classification des substances.

III.1.4. Test d'Ames (test de mutation génique)

III.1.4.1. Considérations générales

Le test d'Ames est utilisé pour mesurer l'activité mutagène d'un composé avec ou sans activation métabolique (Ames 1971). Il est décrit dans la ligne directrice de l'OCDE No 471 (OECD 1997).

Ce test utilise des souches bactériennes de type *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) ou *Escherichia coli* (*E. coli*), mutées au niveau d'un des gènes responsables de la synthèse de l'histidine (*his*⁻) (*S. typhimurium*) ou du tryptophane (*trp*⁻) (*E. coli*), les rendant auxotrophes pour cet acide aminé essentiel à leur croissance bactérienne. Ces bactéries sont donc incapables de croître sur un milieu sélectif pauvre pour cet acide aminé. En présence d'un agent mutagène, par mutation reverse, ces bactéries redeviennent prototrophes *his*⁺ ou *trp*⁺, de nouveau capables de synthétiser l'acide aminé essentiel à leur croissance dans le même milieu sélectif. Différentes souches portant différentes mutations permettent de mettre en évidence en particulier les mutations ponctuelles par substitution de paires de bases et les mutations «frameshifts» par insertion ou par délétion d'une ou plusieurs paires de bases dans l'ADN.

Le produit sera considéré mutagène si le nombre de révertants observés en présence de celui-ci est au moins deux ou trois fois plus important que le nombre de révertants spontanés en fonction de la souche considérée (Ames *et al.* 1973, Ames, McCann and Yamasaki 1975).

Le test d'Ames est une méthode de référence internationale utilisée dans le cadre du développement de nouvelles molécules. Ceci est lié à la bonne corrélation entre les mutations géniques détectées par ce modèle et la cancérogenèse chimique expérimentale effectuée sur mammifères. La bonne prédictivité de cet essai est notamment due à l'incorporation dans certaines souches du plasmide pKM 101 porteur de gènes permettant une réparation « error-prone » de l'ADN, augmentant la réponse de nombreux mutagènes. Cette corrélation est également due au fait que les bactéries peuvent être traitées *in vitro* en présence d'enzymes de biotransformation. En effet, de nombreuses substances deviennent mutagènes uniquement après transformation enzymatique qui génère une espèce électrophile capable de se lier de façon covalente à l'ADN et entraîner ainsi des mutations. La fraction S9, majoritairement issue de foies de rongeurs prétraités par un inducteur enzymatique (soit par l'arochlor 1254 soit par un mélange phénobarbital/5,6-benzoflavone) (OECD 1997), est généralement utilisée pour provoquer la métabolisation de ces produits chimiques. On peut ainsi définir si le produit chimique est un mutagène direct (positif sans S9) ou un pro-mutagène nécessitant une étape de métabolisation (positif avec S9).

III.1.4.2. Aspects méthodologiques

III.1.4.2.1. Souches bactériennes

Les essais ont été conduits avec des souches de *S. typhimurium*, validées par de nombreuses études internationales et bien standardisées (OECD 1997, Maron and Ames 1983, EU B.13/14 2008). Les souches de *S. typhimurium* sont préférées aux souches d'*E. coli* en raison d'une meilleure perméabilité de la paroi bactérienne aux agents chimiques en raison de la présence de la mutation *rfa* (voir ci-après), non retrouvée sur les souches d'*E. Coli*.

Les 5 souches utilisées sont celles recommandées dans l'OCDE : TA1535, TA1537, TA98, TA100 et TA102 (souches de collection fournies par le Professeur B.N. Ames - Université de California, Berkeley - U.S.A., conservées dans l'azote liquide). Le tableau 26 résume les différentes mutations présentées par chacune de ces souches.

Tableau 26 : Mutations présentées par les différentes souches de *S. typhimurium* utilisées pour le test d'Ames

Souches	Mutation du gène histidine	Autres mutations	Type de mutation
TA98	his D 3052	<i>rfa</i> , <i>uvrB</i> ⁻ , Facteur R	frameshift
TA100	his G 46	<i>rfa</i> , <i>uvrB</i> ⁻ , Facteur R	substitution
TA102	his G 428	<i>rfa</i> , Facteur R, pAQ1	substitution
TA1535	his G 46	<i>rfa</i> , <i>uvrB</i> ⁻	substitution
TA1537	his C 3076	<i>rfa</i> , <i>uvrB</i> ⁻	frameshift

La mutation his G 46 porte sur une substitution de paire de bases (G-C à la place de A-T) tandis que la mutation his G 428 est une mutation de type ochre (T-A-A). Les bactéries portant ces mutations permettent de détecter des produits provoquant des mutations « reverse » par substitution de paires de bases, mais aussi dans le cas de la mutation de type ochre, les mutations par petites délétions et certains mutagènes oxydants et agents pontants.

Les mutations his C 3076 (boucle de plusieurs cytosines) et his D 3052 (séquence de 4 paires de bases cytosine-guanine) provoquent quant à elles un décalage du cadre de lecture du code génétique, correspondant aux mutations « frameshift ».

Deux autres types de mutations *uvrB*⁻ et *rfa* augmentent la sensibilité des souches aux agents génotoxiques : *uvrB*⁻ rend les souches déficientes en mécanismes de réparation de l'ADN par excision – resynthèse et la mutation *rfa* induit une altération de la structure des lipopolysaccharides (LPS) de paroi, à l'origine d'une plus forte perméabilité de la paroi bactérienne.

Le facteur R est présent sur le plasmide pKM 101 et augmente la sensibilité aux agents mutagènes par l'intermédiaire de mécanismes de réparations fautives ("error-prone"). Le plasmide pAQ1, présent en multicopies (20 à 30 par bactérie) sur la souche TA102, porte la mutation his G428 responsable d'une plus grande sensibilité également. Les plasmides pKM

101 et pAQ1 portent un gène résistant aux antibiotiques (ampicilline et tétracycline respectivement), permettant la sélection des bactéries lors de leur isolement et de leur culture.

Un contrôle régulier des souches est effectué pour vérifier :

- leur exigence en histidine
- leur sensibilité aux agents mutagènes de référence
- la perte des lipopolysaccharides de paroi : mutation *rfa* (sensibilité au cristal violet)
- la mutation *uvrB*⁻ (sensibilité aux uvB), à l'exception de la TA102
- la présence du plasmide pKM 101 (résistance à l'ampicilline) pour les souches TA98, TA100 et TA102
- la présence du plasmide pAQ1 (résistance à la tétracycline) pour la souche TA102.

Ces souches sont utilisées depuis de nombreuses années au sein de l’IPL, permettant de disposer de données historiques en termes de taux de mutations des différentes souches pour les témoins négatifs et positifs, nécessaires à l’interprétation des essais.

III.1.4.2.2. Système d’activation métabolique

Pour mettre en évidence les propriétés génotoxiques de composés nécessitant une métabolisation pour exprimer leurs effets, les essais ont été réalisés en présence de système d’activation métabolique.

Les fractions S9 utilisées pour la préparation du système d’activation métabolique étaient des préparations congelées, préparées à l’Institut Pasteur de Lille, en suivant la méthode décrite par [Ames et al. \(1975\)](#) sur le rat Sprague Dawley OFA mâle induit par l’arochlor 1254 (origine : Monsanto, Saint-Louis, Etats-Unis). Le mélange S9 mix a été préparé en deux étapes, avec la préparation, le matin du test, de la quantité nécessaire de mix, puis l’ajout en conditions stériles, juste avant l’essai, du S9 décongelé. La composition de 1mL de S9mix est présentée dans le tableau 27 ci-dessous ([Kirkland et al. 1989](#)).

Tableau 27 : Composition de 1 mL de S9 mix (test d’Ames)

Composant	
MgCl ₂ 0,4M*	0,02 mL
KCl *	0,02 mL (solution à 1,65M)
Tampon phosphate 0,2M pH 7,4*	0,5 mL
NADP *	0,04 mL (solution à 0,1M)
Glucose-6-phosphate 1M*	0,005 mL (solution à 1M)
Eau stérile	0,315 mL
S9	0,1 mL

*co-facteurs en mélange filtrés sur membrane stérilisante avant ajout.

Le S9 mix préparé a été conservé dans de la glace pendant toute la durée des tests.

III.1.4.2.3. Traitements et doses d'essai

Les produits d'essai testés étaient les suivants :

- les 3 alcools seuls (éthanol, isopropanol et n-propanol) aux concentrations de 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p,
- le mélange de co-formulants CoF₁₀ (10% p/p cumulé de MP1, MP2, MP3 et MP4 dans le DMSO),
- des solutions hydro-alcooliques (SHA) sur base d'éthanol, isopropanol ou n-propanol, aux 6 concentrations : 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p, en présence de 0,1 % p/p cumulé de co-formulants en mélange. Cette teneur correspond à la concentration déterminée comme non cytotoxique ou faiblement cytotoxique dans le test d'Ames effectué avec le mélange CoF₁₀, afin de ne pas introduire un niveau de cytotoxicité incompatible avec la réalisation de l'essai.

Les alcools seuls ont été testés tels quels, sans aucune gamme de dilutions, et sans réalisation d'essai préliminaire de cytotoxicité.

Le mélange CoF₁₀ a été testé sur une gamme de 6 dilutions à partir d'une concentration maximale déterminée par un essai préliminaire. Celui-ci suit le même protocole que celui de l'essai de mutagenèse (voir ci-après), à l'exception du nombre de boîtes par dose (une boîte par dose au lieu de trois) et l'absence de témoins positifs.

Les SHA ont été testés tels quels, sans aucune gamme de dilutions. Un essai préliminaire visant à s'assurer d'un niveau de cytotoxicité acceptable a été réalisé pour confirmer la possibilité de tester les produits tels quels, sans nécessité de dilution.

Les différents produits ont été administrés à hauteur de 100 µL/boîte. Les doses d'alcool testées, exprimées en mg par boîte, étaient de l'ordre de 50 à 75 mg, soit 10 à 15 fois la teneur maximale de 5 mg/boîte préconisée dans la ligne directrice de l'OCDE. A ces doses, les produits d'essai étaient bien solubilisés (absence de précipité) et aucune cytotoxicité significative n'a été observée, permettant l'exploitation des résultats indépendamment de cette déviation.

L'ensemble des essais a été effectué en *triplicate* en présence et en absence d'activation métabolique, sauf pour l'essai préliminaire (1 boîte/dose).

III.1.4.2.4. Contrôles

A des fins de contrôle et validation expérimentale, chaque essai a inclus des témoins négatifs et positifs spécifiques des conditions d'essai et des différentes souches bactériennes, de manière à démontrer la sensibilité des souches testées et l'efficacité du système d'activation métabolique. Ceux-ci sont résumés dans le tableau 28 ci-après.

Tableau 28 : Témoins négatifs et positifs pour les différentes souches de *S. typhimurium* dans le test d'Ames

Souche	Témoin négatif	Témoin positif	
		Sans activation métabolique	Avec activation métabolique
TA1535	Solvant de dilution : Eau ou DMSO ¹	Azide de sodium (1 µg/boîte)	2-anthramine (2 µg/boîte)
TA1537		9-amino-acridine (50 µg/boîte)	
TA98		2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	
TA100		Azide de sodium (1 µg/boîte)	
TA102		Mitomycine C (0,125 µg/boîte)	benzo[a]pyrene (2 µg/boîte)

¹ Eau pour les alcools seuls et les SHA ; DMSO pour pour les co-formulants

Par ailleurs, un contrôle de stérilité des milieux, du mélange S9 mix et des produits d'essai utilisés a été effectué.

III.1.4.2.5. Protocole du test d'Ames

a) Ensemencement des bactéries sur gélose et administration des traitements

Pour chaque produit (ou chaque dose de produit) et chaque souche bactérienne :

0,1 mL de suspension bactérienne provenant d'une culture agitée pendant une nuit à $\pm 37^\circ \text{C}$ et 0,1 mL du produit d'essai ont été ajoutés à 2 mL de gélose de surface contenant 10 % d'une solution d'histidine biotine 0,5 mM, maintenue en surfusion à $\pm 45^\circ \text{C}$. Après agitation, ce mélange a été étalé dans une boîte de Pétri contenant 20 mL de gélose de fond.

Pour les essais en présence d'activation métabolique, 0,5 mL de S9 mix ont été ajoutés au mélange avant agitation, juste avant l'étalement.

b) Comptage des colonies

Les boîtes ont ensuite été placées à $\pm 37^\circ \text{C}$ pendant environ 44 heures, puis le nombre de colonies révertantes a été déterminé pour chaque boîte. La cytotoxicité a été appréciée par examen de la pousse de fond au microscope, et documentée comme suit :

-	:	non toxique
+	:	faiblement toxique
++	:	moyennement toxique
+++	:	fortement toxique
N	:	pas de pousse bactérienne.

La présence éventuelle de précipité a également été documentée comme suit :

- : absence de précipité
- + : léger précipité
- ++ : précipité modéré
- +++ : précipité important empêchant le comptage des révertants.

Le même protocole a été appliqué pour les témoins solvants et témoins positifs. Les témoins négatifs ont toujours été réalisés sur 6 boîtes ([Gatehouse et al. 1994](#)) et les témoins positifs sur 3 boîtes.

Le schéma présenté en figure 7 illustre la méthodologie d’essai du test d’Ames en présence de système d’activation métabolique.

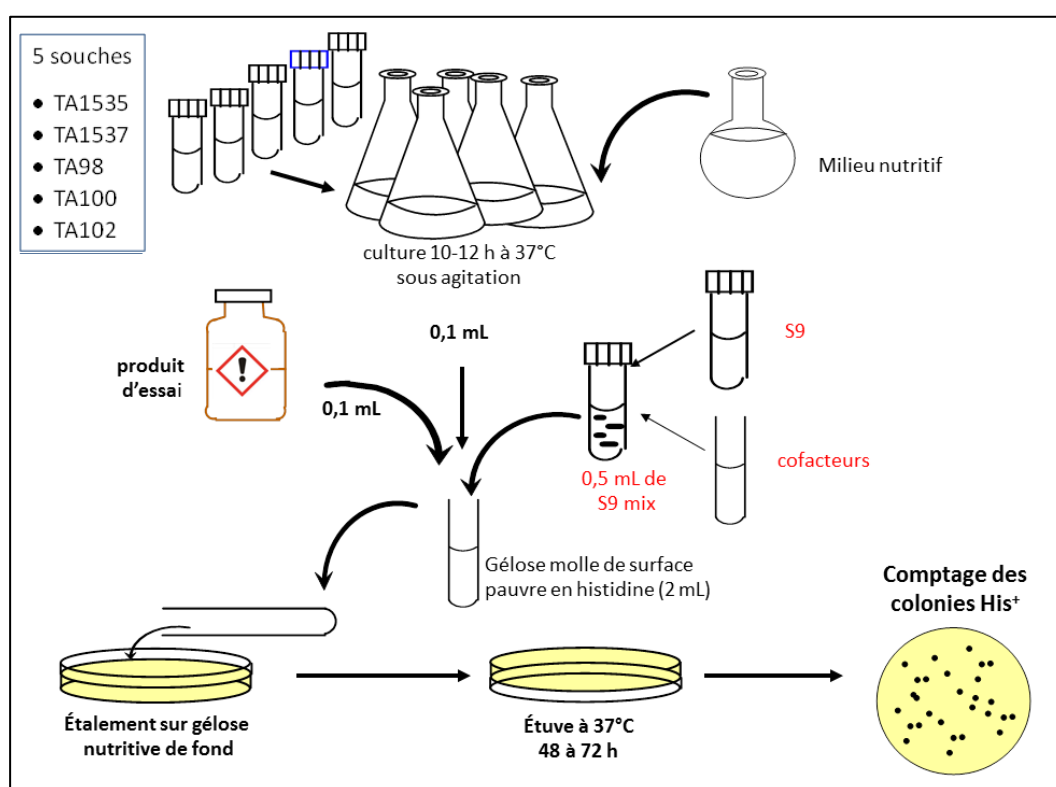


Figure 7 : Schéma du test d’Ames en présence d’activation métabolique

En parallèle, les contrôles de stérilité des milieux gélosés et du mélange S9 mix utilisés ont été effectués. Des boîtes ne contenant que les géloses de fond et de surface, ou le mélange S9 mix sur gélose de fond ont été incubées dans les mêmes conditions que l’essai pour identifier le développement d’une éventuelle pousse de micro-organismes (3 boîtes par contrôle). De la même façon, pour le mélange CoF₁₀ et les SHA, un contrôle de stérilité des produits à l’essai (limité aux 3 plus fortes concentrations pour le mélange CoF₁₀) a été effectué par incubation de boîtes ayant reçu le produit d’essai en mélange dans la gélose de surface (3 boîtes par contrôle).

Les données de la littérature ne décrivant aucun effet mutagène des alcools mis en évidence dans le test d'Ames, les résultats négatifs n'ont pas fait l'objet d'une confirmation par un second essai.

c) Expression des résultats et interprétation

A l'issue des \pm 44h d'incubation, les colonies formées ont été dénombrées manuellement et la moyenne du nombre de colonies par boîte a été calculée.

Pour chaque produit d'essai et les témoins positifs, le rapport d'induction comparativement au solvant a été calculé.

$$\text{Rapport d'induction} = \frac{\text{Nombre moyen* de colonies par boîte en présence du produit}}{\text{Nombre moyen* de colonies par boîte en présence du solvant seul}}$$

* moyenne de 6 boîtes pour les témoins solvants, 3 boîtes sinon (sauf pour l'essai préliminaire – une seule valeur)

En complément, les résultats ont fait l'objet d'une analyse statistique (Mahon *et al.* 1989) par la méthode de DUNNETT pour comparer la moyenne des valeurs par dose étudiée à celle du témoin solvant.

Pour chaque essai, les critères d'acceptabilité du test étaient ceux de la ligne directrice de l'OCDE No 471 :

- contrôles de stérilité conformes
- observation d'un taux correct de révertants spontanés pour les témoins négatifs,
- augmentation significative du nombre de révertants en présence des témoins positifs, d'au moins un facteur 2 ou 3 comparativement aux témoins négatifs,
- cohérence avec les données historiques du laboratoire.

Lorsque les critères de validité étaient remplis, un rapport d'induction d'une valeur supérieure ou égale à 3 pour les souches TA1535, TA1537 ou à 2 pour les souches TA98, TA100, TA102 a été considéré comme un résultat positif, sous réserve de reproduction du résultat dans au moins 1 essai indépendant.

La significativité statistique a également été prise en considération.

Si, dans aucune des conditions testées, aucun de ces critères n'a été atteint, l'élément d'essai a été considéré comme négatif, soit incapable d'induire des mutations dans le système d'essai.

III.1.4.3. Résumé de l’approche méthodologique

Le tableau 29 ci-après résume les conditions expérimentales mises en œuvre pour le test d’Ames.

Tableau 29 : Résumé des conditions expérimentales et données d’interprétation du test d’Ames

Produits d’essai		Alcools seuls¹	CoF₁₀²	SHA³
Souches bactériennes		<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100 et TA102		
Conditions d’essai		S9- et S9+ ⁴ 100 µL/boîte		
Essai préliminaire		Non	Oui 1 boîte par dose	Non
Essai définitif	Gamme de dilutions	Non	Oui	Non
	Témoins	Témoin solvant (6 boîtes par souche) et témoins positifs (3 boîtes par témoin positif)		
	Contrôles	stérilité des milieux et du S9 mix	stérilité des milieux, du S9 mix et des produits	
	Réplicats	3 boîtes par dose		
	Paramètre de mesure	Rapport d’induction = $\frac{\text{Nombre moyen de colonies par boîte en présence du produit}}{\text{Nombre moyen de colonies par boîte en présence du solvant seul}}$		
	Essai 2	Uniquement en cas de résultat positif ou ambigu lors du 1 ^{er} essai		
Interprétation (sous réserve de la validité de l’essai)		Rapport d’induction		Interprétation
		TA98/TA100/TA102	TA1535/ TA1537	
		< 2	< 3	Non mutagène
		≥ 2	≥ 3	Mutagène (si résultat reproduit dans un 2 ^{ème} essai indépendant)

¹ Ethanol, isopropanol ou n-propanol (60, 70, 75, 80, 85 ou 90% p/p)

² CoF₁₀ : co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

³ SHA : solutions hydro-alcooliques sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol (60, 70, 75, 80, 85 ou 90% p/p) formulées avec 0,1% p/p cumulé de MP1, MP2, MP3 et MP4

⁴ S9- : sans système d’activation métabolique / S9+ : avec système d’activation métabolique

III.1.5. Test du micronoyau *in vitro* (test de mutations chromosomiques)

III.1.5.1. Considérations générales

Le test du micronoyau (MN) *in vitro* sur cellules de mammifères permet la détection de produits génotoxiques induisant des mutations chromosomiques de nombre ou de structure, par le dénombrement des cellules contenant un ou plusieurs MN formés dans le cytoplasme de cellules en interphase. Ces MN résultent de fragments acentriques (fragments de chromosome sans centromère) ou de chromosomes entiers, lesquels sont incapables de migrer avec le reste des chromosomes lors de l'anaphase de la division cellulaire (Fenech & Morley, 1985).

Ce test dispose d'une ligne directrice de l'OCDE validée No 487 (OECD 2016g). Il peut être réalisé sur différentes lignées cellulaires issues de rongeurs (CHO, V79, CHL, L5178Y) mais également sur lymphocytes humains en culture primaire ou d'autres lignées cellulaires humaines telles que les cellules lymphoblastoïdes TK6, et cellules hépatiques HepG2.

Les cellules en culture sont exposées au produit d'essai en absence et en présence d'activation métabolique, en utilisant la fraction S9 de foie de rat induite par l'arochlor 1254, contenant des microsomes et des enzymes du cytosol, permettant ainsi de détecter les agents clastogènes ou aneugènes directs et les pro-clastogènes ou pro-aneugènes. Après exposition, les cellules sont remises en culture pendant une période suffisante pour engendrer une mitose et permettre la formation de MN dans des cellules en interphase en cas de lésions chromosomiques ou d'altération de la ségrégation des chromosomes (Fig. 8).

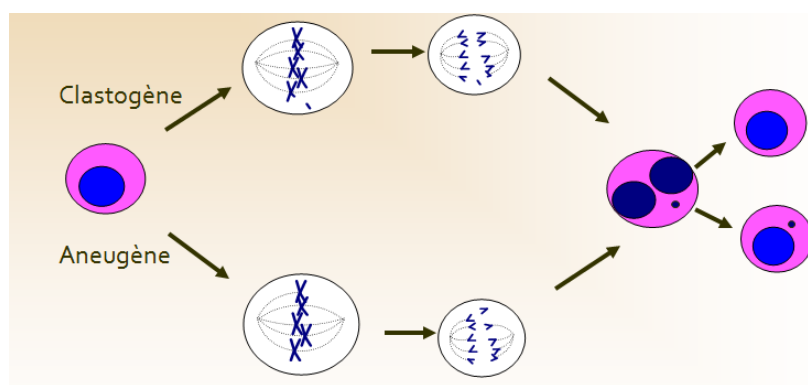


Figure 8 : Représentation schématique de la formation d'un micronoyau

Pour les essais sur lymphocytes humains, le test est réalisé avec un inducteur de division cellulaire (Phytohémagglutinine A), avec ajout de cytochalasine-B au moment de la cytokinèse, pour générer des lymphocytes binucléés ayant subi une seule division cellulaire complète au cours de laquelle pourrait se former le MN induit (Fenech & Morley 1985). La cytochalasine B, extraite de filtrats de culture d'*Helminthosporium dematioideum*, est un peptide naturel qui fragmente les microfilaments d'actine et empêche leur polymérisation bloquant ainsi le clivage cytoplasmique.

Les cellules récoltées subissent un choc hypotonique, sont fixées, étalées sur lames puis colorées, en vue du dénombrement des cellules micronucléées par examen microscopique.

Couplé à des techniques de cytogénétique (hybridation *in situ*), ce test permet de distinguer les agents clastogènes des agents aneugènes. C'est le principe du test FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridation) qui utilise des sondes spécifiques, par exemple des séquences centromériques qui permettent de distinguer rapidement les MN contenant un fragment de chromosome issu d'un événement de clastogénèse et les MN contenant un chromosome entier issu de l'aneuploïdie (Farooqi, Darroudi and Natarajan 1993, Schuler, Rupa and Eastmond 1997). Il est également possible d'utiliser des anticorps CREST (*Calcinosis Raynaud Esophagus Sclerodactyly Telangiectasia*), dirigés contre les protéines kinétochoriennes, à l'exception près d'une absence de détection des composés susceptibles de modifier les kinétochores (Miller *et al.* 1991). Enfin, il est également possible d'utiliser des sondes dites chromosome-spécifiques, afin d'étudier plus spécialement les phénomènes de non-disjonction, événement précoce d'aneuploïdie.

III.1.5.2. Aspects méthodologiques

III.1.5.2.1. Lignées cellulaires

Les essais ont été réalisés sur 2 lignées cellulaires différentes : TK6 et NCI H292, provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) et exemptes de contamination par des mycoplasmes (vérification grâce au kit Mycoalert mycoplasma detection (Cambrex Bio Science Rockland, inc)).

a) Cellules TK6

Il s'agit d'une lignée continue de cellules lymphoblastoïdes humaines isolées d'une culture de lymphoblastes spléniques WIL2 spontanés immortalisés possédant un statut p53 normal et stable (p53^{+/+}). Cette lignée cellulaire est l'une de celles recommandées par la ligne directrice de l'OCDE No 487 (OECD 2016g). Elles ont un caryotype stable (47, XY, 13+) et un temps de doublement de 16 à 18 heures.

Les cellules ont été cultivées en étuve à *ca* 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'humidité, dans du RPMI 10, milieu de croissance RPMI 1640 (encore appelé RPMI 0, contenant du bicarbonate de sodium, des acides aminés non-essentiels, des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et de l'acide chlorhydrique), auquel ont été ajoutés 10% v/v de sérum de cheval décomplémenté, de l'acide pluronique, de la L-Glutamine, du pyruvate de sodium et un antifongique (Amphotéricine B).

Une semaine avant les essais, une ampoule conservée dans de l'azote liquide contenant environ 4 à 6.10⁶ cellules a été décongelée puis remise en suspension dans 30 mL de milieu RPMI 10. Après centrifugation et retrait du surnageant afin d'éliminer le DMSO contenu dans

le liquide de congélation, les cellules ont été remises en suspension dans 30 mL de RPMI 10 par aspiration-refoulement puis transférées dans un flacon de culture. Le flacon a été incubé en étuve pendant 24 à 48 heures, afin d'obtenir une densité cellulaire de l'ordre de 5 à 7.10^5 cellules/mL. Les cellules ont ensuite été réensemencées afin d'obtenir une densité de 4 à 5.10^5 cellules/mL la semaine suivante.

b) Cellules NCI H292

Il s'agit d'une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines issue du carcinome mucoépidermoïde d'une femme de 32 ans ayant un statut p53+. A la différence de la lignée cellulaire TK6, les cellules NCI H292 sont des cellules adhérant à leur support de culture.

Ces cellules ont un caryotype quasi-diploïde (XX, 47 dans 36% des cellules) et un temps de doublement de 32 à 34 heures.

Ce modèle cellulaire présente un haut niveau d'homologie d'expression des gènes encodant les protéines impliquées dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques, par comparaison avec des cellules primaires, ainsi qu'un nombre relativement bas d'expression de gènes de dérégulation, par comparaison avec des tissus pulmonaires non tumoraux (Courcot *et al.* 2012). Les gènes codant les enzymes du métabolisme des alcools y sont notamment exprimés. Ceci les positionne en modèle de choix pour des études toxicologiques *in vitro*, notamment lorsqu'il est techniquement impossible ou difficile d'ajouter un système d'activation métabolique exogène durant un essai.

Les cellules ont été cultivées en étuve à *ca* 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'humidité, dans du RPMI 10 SVF (RPMI 0 enrichi de 10% de sérum de veau fœtal, de L-Glutamine, de pyruvate de sodium et d'Amphotéricine B).

Comme pour les cellules TK6, une semaine avant les essais, des cellules H292 ont été mises en culture en étuve dans du RPMI 10 après décongélation d'une ampoule cryogénique contenant environ 4 à 6.10^6 cellules, avec changement du milieu de culture tous les deux jours. A confluence, les cellules ont été rincées au PBS (phosphate buffer saline), décollées par trypsination (voir ci-après) puis ré-ensemencées dans du RPMI 10, à raison de 5.10^5 cellules par flasque et mises à l'étuve.

Les cellules pulmonaires ont également été mises en culture en interface air-liquide (IAL) sur des plaques 6 puits, à l'aide d'inserts formés d'une membrane poreuse (Transwell® Permeable Support, Corning) (Fig. 9). Les cellules ont été ensemencées sur l'insert (8.10^4 cellules/insert) et cultivées en immersion durant 3 jours (Fig. 9 A). Le milieu de culture du compartiment supérieur a ensuite été retiré (Fig. 9 B) et la culture a été poursuivie durant 4 jours avec du milieu de culture uniquement sous l'insert (2 mL par puit). Les milieux des compartiments inférieurs et supérieurs ont été changés tous les 2 jours.

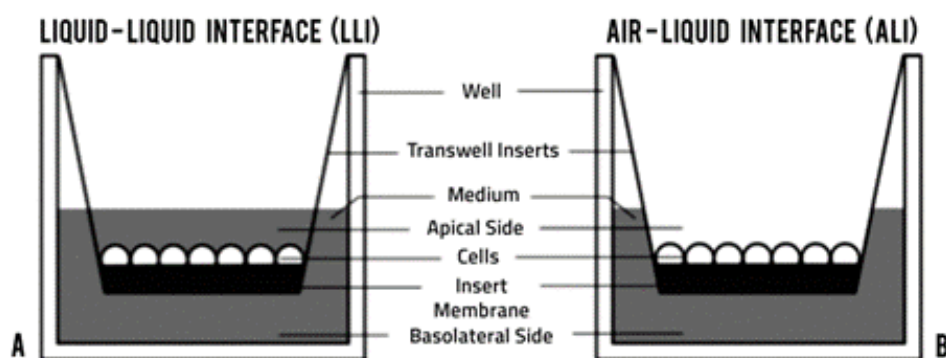


Figure 9 : Représentation schématique de la culture en interface air-liquide

(figure extraite de la publication de [Lee et al. 2016](#))

Note générale relative au comptage et viabilité cellulaire :

Quel que soit le type cellulaire, les cultures ont nécessité des comptages afin de déterminer les quantités de culture cellulaire à prélever en vue des ré-ensemencements ou réalisations des essais, et également déterminer les viabilités cellulaires.

Les comptages ont été effectués sur cellules de Malassez (cf. note en fin de section a) du III.1.3.2.2. p. 128).

En raison de l'adhérence des cellules NCI H292 au support, une étape de trypsination visant à décoller les cellules a systématiquement été effectuée au préalable. Les milieux de culture ont été éliminés par retournement ou aspiration. De la Trypsine-EDTA (Sigma) préchauffée a été ajoutée directement sur le tapis cellulaire (500 μ L/puit pour les cultures en plaque 6 puits ; 5 mL pour les passages cellulaires effectués en flasques) et laissée en contact pour une durée de 3 à 4 minutes à 37°C. L'action de la trypsine a ensuite été stoppée par ajout de milieu de culture en quantité double de celle de la trypsine.

Pour déterminer la viabilité cellulaire et en déduire la cytotoxicité, la technique au bleu de trypan a été utilisée. Le bleu de trypan est un colorant vital d'exclusion, qui colore en bleu les cellules mortes tandis que les cellules ayant conservé leur intégrité membranaire sont incapables d'absorber le colorant.

La technique consiste à prélever 100 μ L de suspension cellulaire, y ajouter 20 μ L d'une solution de Bleu Trypan 0,4 % en PBS (5:1) et effectuer un comptage sur cellule de Malassez. Les cellules viables (réfringentes) et cellules mortes (bleues) sont dénombrées, et le résultat est exprimé en nombre de cellules par mL, ajusté pour prendre en compte la dilution apportée par les 20 μ L de bleu de trypan ajoutés.

III.1.5.2.2. Système d'activation métabolique

Afin de mettre en évidence les propriétés génotoxiques de composés nécessitant une métabolisation pour exprimer leurs effets, les essais ont été réalisés chaque fois que possible en présence de système d'activation métabolique.

Les fractions S9 utilisées étaient les mêmes que celles pour le test d'Ames (*cf.* III.1.4.2.2. p. 137). La composition de 1 mL de S9mix est présentée dans le tableau 30 ci-après. Le mix a été préparé le matin du test et le S9 a été ajouté en conditions stériles juste avant l'essai.

Tableau 30 : Composition de 1 mL de S9 mix (test du micronoyau)

Composant	
KCl *	0,2 mL (solution à 150 mM)
NADP *	0,2 ml (solution à 25 mg/mL)
Glucose-6-phosphate 1M*	0,2 mL (solution à 180 mg/mL)
S9	0,4 mL

*co-facteurs en mélange filtrés sur membrane stérilisante avant ajout.

III.1.5.2.3. Traitements et doses d'essai

Différents modes de traitement ont été utilisés :

- traitement en immersion,
- traitement topique liquide,
- traitement par vapeurs.

a) Traitement en immersion

Ce mode de traitement consiste à administrer le produit d'essai directement dans le milieu de culture cellulaire.

Les produits d'essai testés sur les cellules TK6 étaient les suivants :

- les 3 alcools seuls (éthanol, isopropanol et n-propanol) aux concentrations de 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p,
- le mélange de co-formulants CoF₁₀ (10% p/p cumulé de MP1, MP2, MP3 et MP4 dans le DMSO),
- des solutions hydro-alcooliques (SHA) sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol, aux 6 concentrations : 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p, en présence de 0,1 % p/p cumulé de co-formulants en mélange. Cette teneur correspond à la concentration déterminée comme non cytotoxique ou faiblement cytotoxique dans le test du MN effectué avec le mélange CoF₁₀, afin de ne pas introduire un niveau de cytotoxicité incompatible avec la réalisation de l'essai.

Pour les cellules NCI H292, les tests n'ont été réalisés qu'avec les alcools seuls, en relation avec l'exposition des voies respiratoires aux seuls composés volatils des SHA.

Les alcools seuls ont été utilisés tels quels, dans la limite de 1% v/v dans le milieu de culture, en accord avec les préconisations de la ligne directrice OCDE No 487 en présence de solvants organiques.

L'essai avec le mélange CoF₁₀ a été réalisé sur une gamme de dilutions de 3 doses, avec une dose maximale de 0,015% v/v et un pas de dilution adapté selon les conditions d'essai de façon à tester des concentrations les plus élevées possibles tout en respectant les préconisations de la ligne directrice (plage de concentration produisant une cytotoxicité maximale de 55 ± 5 % tout en couvrant des concentrations pour lesquelles une cytotoxicité nulle à modérée est observée). La dose maximale a été déterminée par mesure de la prolifération cellulaire relative (*cf.* III.1.5.2.5.b p. 159 ci-après) dans un essai préliminaire, mené sur une gamme de dilutions de 11 doses de progression géométrique au demi en partant d'une dose maximale de 1% v/v en raison de la présence de solvant organique (DMSO).

Pour les différents produits d'essai (limité aux 3 doses les plus fortes pour l'essai sur le mélange CoF₁₀), un contrôle de pH et osmolarité pour s'assurer de valeurs acceptables a été effectué (valeurs de pH comprises entre 6 et 8,5, et variation de l'osmolarité de moins de 50 mOsmol par comparaison au milieu de culture). L'absence de précipité a été vérifiée.

Le jour de l'essai, les cellules ont été mises en plaque 6 ou 12 puits dans leur milieu de culture respectif,

- à raison de 2.10⁵ cellules/mL de RPMI 10 pour les cellules TK6, en plaques 12 puits, 2 mL par puit,
- à raison de 83.33 10³ cellules/mL de milieu RPMI 10 SVF pour les cellules NCI H292, en plaques 6 puits, 3 mL par puit (250 000 cellules/puit),

puis incubées pendant un minimum de 2h (37°C, 5% CO₂, 95% d'humidité).

Les traitements ont ensuite été réalisés. Pour les essais réalisés en présence d'activation métabolique, 5% de S9-mix ont été ajoutés dans le milieu de culture pour une concentration finale de 2% de S9.

Après légère agitation, les plaques ont été incubées à l'étuve sur la durée de traitement prévue.

3 schémas de traitement ont été mis en œuvre :

- sans activation métabolique sur une durée de traitement courte (3h),
- avec activation métabolique sur une durée de traitement courte (3h),
- sans activation métabolique sur une durée de traitement longue (1,5 à 2 cycles cellulaires soit 27h pour les TK6 et 51h pour les NCI H292)

Les essais ont été réalisés en *duplicate*.

L'arrêt du traitement a été fait par élimination du milieu de culture contenant le produit d'essai puis double lavage des cultures. Pour les cellules TK6, s'agissant de cellules en

suspension, le lavage a été effectué après transfert des cultures dans des tubes et centrifugation à 1000 tours/minute pendant 6 minutes.

Le tableau 31 ci-dessous résume les schémas de traitement appliqués en fonction du modèle cellulaire, pour les traitements en immersion.

Tableau 31 : Traitements et doses d’essai pour le test du micronoyau – administration en immersion

Modèle cellulaire Produit d’essai	TK6 (S9-/S9+) ¹		NCI H292 (S9-/S9+) ¹	
	Traitement en immersion (1% v/v) en <i>duplicate</i>			
Alcools ² seuls	60, 70, 75, 80, 85 & 90 % p/p		60, 70, 75, 80, 85 & 90 % p/p	
	S9-	S9+	S9-	S9+
SHA ⁴ sur base alcool en présence de 0,1% p/p de CoF	TC ³ 3h	TC 3h	TC 3h	TC 3h
	TL ³ 27h		TL 51h	
CoF ₁₀ ⁵	Test en dilution		--	
	S9-	S9+	--	
	TC 3h	TC 3h		
	TL 27h			

¹ S9- : sans activation métabolique / S9+ : avec activation métabolique

² Ethanol, isopropanol et n-propanol,

³ TC : traitement court / TL : traitement long,

⁴ SHA : solution hydro-alcoolique sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol

⁵ CoF₁₀ : MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

b) Traitement indirect par application topique sur épidermes humains reconstitués

Pour être plus représentatif des conditions d'exposition en relation avec l'application topique des produits d'essai, le test du MN *in vitro* a également été réalisé en utilisant un modèle d'épiderme humain reconstitué (RhE) et des cellules cibles mises en culture en dessous. Cet essai a été réalisé en seconde intention pour compléter les résultats d'essai en traitement par immersion obtenus avec les solutions d'éthanol dans l'eau.

Ce mode d'évaluation vise à reproduire pour partie la fonction barrière cutanée ainsi que le métabolisme cutané. Dans ce contexte, EpiskinTM SM a été utilisé comme RhE pour tester le produit d'essai en traitement topique. EpiskinTM SM est un épiderme humain reconstitué *in vitro* à partir de kératinocytes humains adultes cultivés sur une matrice de collagène composite en interface air-liquide. Ce modèle biologique est histologiquement similaire à l'épiderme humain *in vivo* et est déjà validé et utilisé dans les tests de corrosion ou irritation cutanée. Par ailleurs, ce modèle dispose pour partie de capacités métaboliques existantes au niveau de la peau humaine native. Y sont notamment exprimées les protéines de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des alcools (ADH3, ALDH2, ALDH3A2, ALDH9A1) (Van Eijl *et al.* 2012). Ils ont été achetés prêts à l'emploi par plaques de 12 RhE chez Episkin

SNC (Lyon, France), avec les milieux de culture et de maintenance nécessaires à leur correcte utilisation. Chaque lot a été livré avec un certificat d'analyse incluant le contrôle histologique confirmant un épiderme bien différencié et une fonction barrière suffisante.

Plus d'informations sur ce modèle Episkin™ SM sont données en section III.1.2.2.1. (p. 118) traitant des essais d'irritation cutanée.

La figure 10 donne une représentation schématique du modèle de co-culture

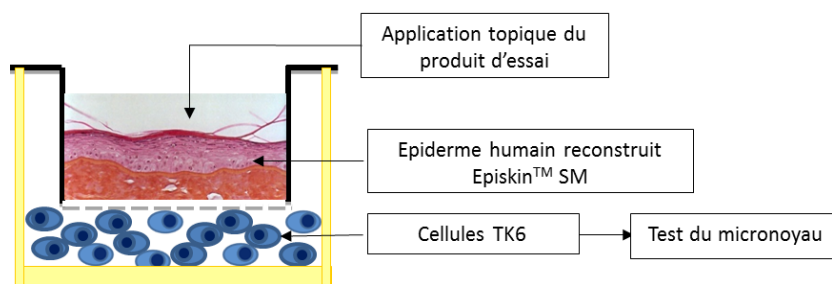


Figure 10 : Schéma du modèle de co-culture utilisé pour le test du micronoyau sur cellules TK6

Les produits d'essai testés sur le modèle en co-culture se sont limités aux solutions d'éthanol dans l'eau à 60, 70, 75, 80 et 85% p/p.

Le jour de l'essai, les cellules TK6 ont été mises en plaque 12 puits dans le milieu de culture Episkin (EpiSkin™ SM assay culture medium) à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/mL, 2 mL par puit. Les inserts portant les épidermes ont été placés sur les puits et les plaques ont été mises à l'étuve pendant un minimum de 2h avant de procéder aux traitements.

Pour le traitement, 20 μ L de produit d'essai par épiderme ont été appliqués et étalés à l'aide d'un filtre en nylon pour favoriser l'uniformité de traitement sur les épidermes.

2 schémas de traitement ont été mis en œuvre :

- sans activation métabolique sur une durée de traitement de 24h,
- avec activation métabolique durant 3h après 21h de traitement.

Pour les essais en présence d'activation métabolique, après 21h de traitement, 5% de S9-mix ont été ajoutés directement au milieu de culture contenant les cellules TK6 (100 μ L/puit), soit une concentration finale de 2% de S9. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 3 heures.

Les essais ont été réalisés en *duplicate*.

Aucun essai préliminaire n'a été effectué, cette méthodologie d'essai ayant déjà été éprouvée dans le cadre de travaux menés conjointement par L'OREAL et l'IPL (Ouedraogo *et al.* 2014). Il est intéressant de préciser que celle-ci fait actuellement l'objet de discussions en vue de son adoption en tant que méthode alternative.

Le tableau 32 ci-après résume les produits et conditions d'essai appliquées sur le modèle de co-culture.

Tableau 32 : Traitements et doses d'essai pour le test du micronoyau sur TK6 en co-culture

Produit d'essai	Modèle cellulaire	TK6 en co-culture ¹ (S9-/S9+) ²
		Traitement indirect (20 µL/épiderme) en <i>duplicate</i>
Ethanol dans l'eau		60, 70, 75, 80 & 85 % p/p
		S9- S9+
	24h	21h + 3h avec du S9+ dans le milieu de culture

¹ cellules TK6 mises en co-culture avec Episkin™ SM;

² S9- : sans activation métabolique / S9+ : avec activation métabolique

c) *Traitement par vapeurs*

Ce mode de traitement a été utilisé pour l'évaluation de la génotoxicité sur le modèle pulmonaire NCI H292 cultivé en interface air-liquide (IAL), afin d'exposer les cellules aux vapeurs d'alcools et ainsi être le plus représentatif possible des conditions d'exposition des voies respiratoires des utilisateurs lors de l'utilisation de produits hydro-alcooliques

c.1) *Présentation du dispositif utilisé*

La génération des vapeurs d'alcools et l'exposition des cultures à ces vapeurs ont été réalisées à l'aide de l'équipement Vitrocell® (VITROCELL Systems GmbH, Waldkirch, Allemagne) installé au sein du Laboratoire de toxicité de l'Université de Lille 2 (EA 4483 – Lille). Il s'agit d'une technologie permettant une exposition directe des cultures cellulaires à l'atmosphère d'essai. Le système permet la circulation en débit contrôlé d'une atmosphère chargée du produit d'essai dans des modules spécialement conçus pour un contact direct entre les cellules et l'atmosphère de test.

Des photos de l'installation d'essai sont présentées en figure 11. Une représentation schématique du module de traitement et flux de l'atmosphère d'essai au sein du module est présentée en figure 12.

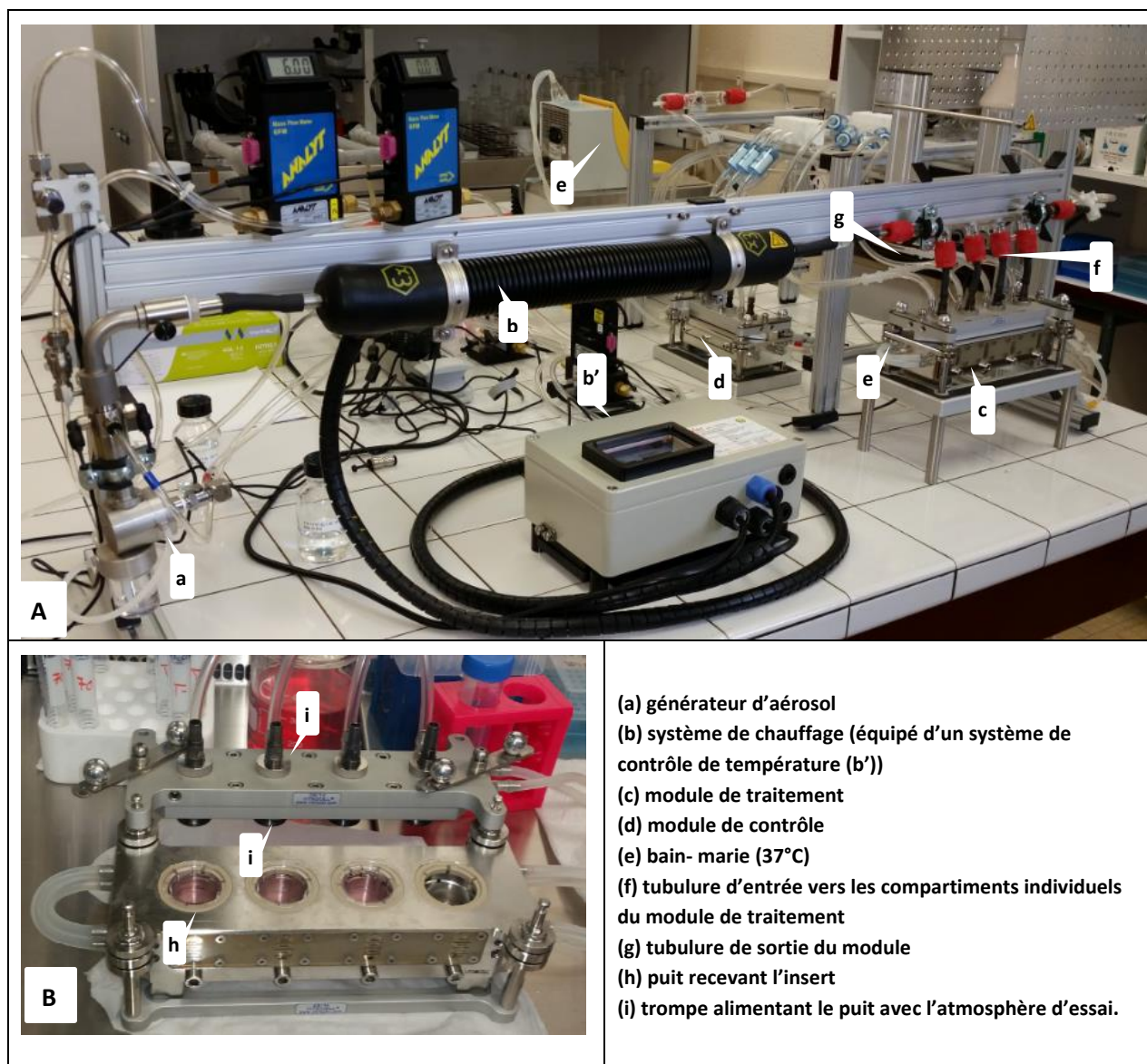


Figure 11 : Photos de l'équipement VITROCELL utilisé pour les traitements par vapeurs d'alcool.

(A) vue d'ensemble, (B) module de traitement avant mise en place des inserts portant les cultures

2 modules d'exposition Vitrocell® 6 CF ont été utilisés pour une exposition simultanée des cultures, soit aux vapeurs d'alcools, soit à de l'air propre, avec un débit d'air fixe de 5 mL/min contrôlé par un débitmètre (mass flow controller - Analyt-MTC GmbH, Mülheim, Allemagne) relié à une pompe à vide. Ce taux a été choisi en accord avec la littérature existante (Persoz *et al.* 2010, Tang *et al.* 2012, Frohlich *et al.* 2013, Kilford *et al.* 2014) et conformément aux instructions VITROCELL Systems GmbH. Les modules étaient maintenus à 37°C par l'intermédiaire d'un bain marie circulant.

Les vapeurs d'alcool ont été générées à l'aide d'un générateur d'aérosol (bioaerosol generator VITROCELL Systems GmbH, Waldkirch) relié à un système de chauffage (prototype prêté par VITROCELL Systems GmbH) à température contrôlée (T° controller Winkler.eu,

WEXRBL25-2302E000, Heidelbergh, Germany). Le produit d'essai, placé dans le réservoir du générateur d'aérosol d'une capacité de 15 mL, a été aérosolisé en particules de diamètre approximatif de 0,7 à 2,5 μm sous un faible débit de 6L/min contrôlé par débitmètre (mass flow controller - Analyt-MTC GmbH, Mülheim, Allemagne) et injecté dans le système de chauffe réglé à $\pm 87^\circ\text{C}$ pour se transformer en vapeurs par effet de la température. L'atmosphère d'essai générée non délivrée au module était expulsée vers l'extérieur.

Les connexions entre les différents éléments de l'équipement ont été établies conformément aux instructions d'utilisation fournies par VITROCELL.

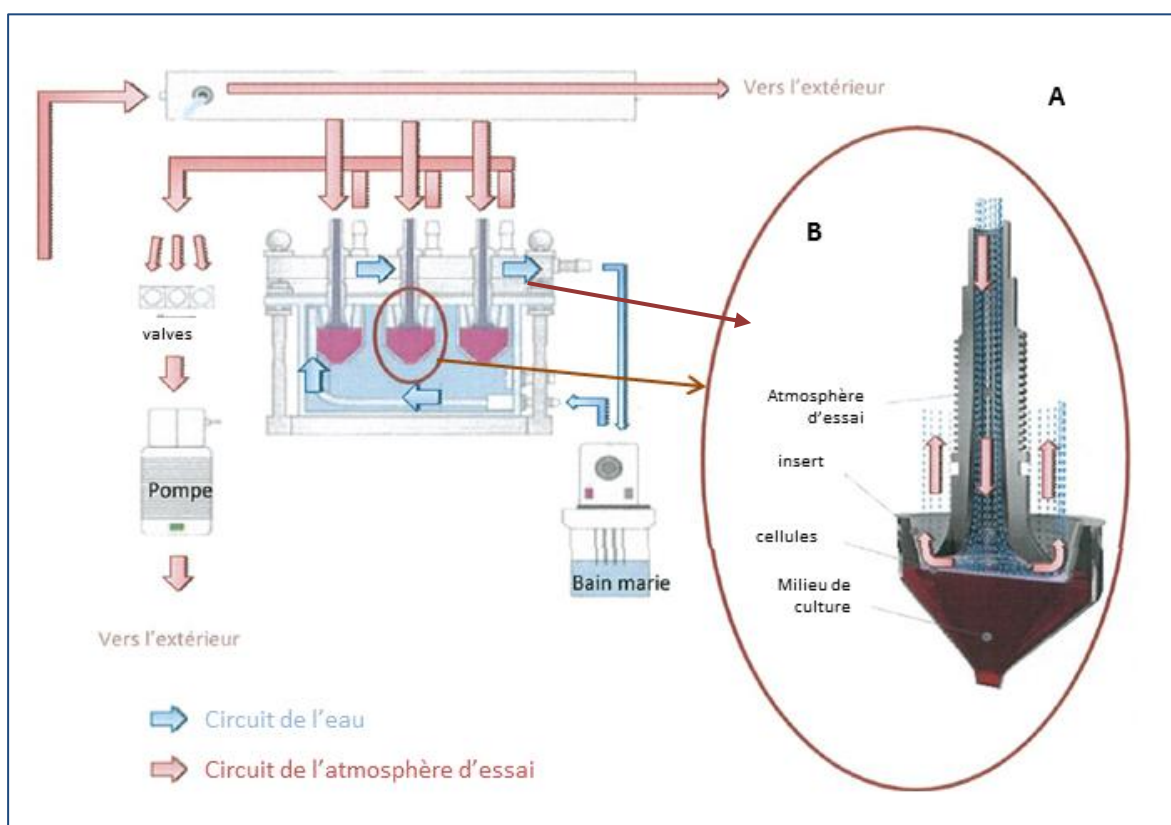


Figure 12 : Equipement VITROCELL (A) Représentation schématique du module de traitement et circuits associés, (B) Représentation du flux de l'atmosphère d'essai au sein du module

c.2) Détermination des niveaux d'exposition aux vapeurs d'alcool

Au cours d'un essai indépendant réalisé sans cultures, des mesures ont été réalisées pour déterminer les niveaux d'expositions des cultures aux vapeurs d'alcool.

Les mesures ont été réalisées par prélèvements actifs des vapeurs d'alcool. Un premier essai réalisé avec une pompe Dräger et des tubes réactifs colorimétriques (Dräger Alcohol 25/a – domaine de mesure de 25 à 2000 ppm pour l'éthanol et 25 à 5000 pour l'isopropanol et le n-propanol) connectés en sortie du module n'a pas permis de déterminer les niveaux

d'exposition en raison d'une saturation des tubes. De fait, une seconde série de mesures a été réalisée à l'aide d'une pompe GilAir Plus Personal Air Sampling Pump (AD Air Solutions, Metz, France) calibrée à 0,1 L/min, connectée en sortie du système Vitrocell. L'utilisation du débitmètre du Vitrocell a permis de contrôler l'absence d'impact du système de prélèvement sur les flux. Les vapeurs ont été collectées sur des tubes contenant du charbon actif (Tubes C / Anasorb CSC / 800+200mg / Tecora, Fontenay Sous Bois, France). Un volume approximatif de 0,6 L (0,0006 m³) a été prélevé pour chaque prélèvement.

Les prélèvements suivants ont été réalisés :

- Blanc tube : tube non ouvert
- Blanc terrain : tube ouvert sur le terrain mais non branché au système
- Vapeurs générées à partir d'éthanol à 60, 70, 80 et 85% p/p
- Vapeurs générées à partir d'isopropanol à 60, 70, 80 et 85% p/p
- Vapeurs générées à partir de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p

Pour les vapeurs, les prélèvements ont été réalisés en *triplicate*.

Afin de maintenir l'intégrité des prélèvements, les tubes ont été conservés à 4°C sur une durée maximale de 8 jours avant analyse.

La désorption des vapeurs collectées a été réalisée par mise en contact du charbon actif sous ultra-sons avec 10 mL de solvant de désorption (n-propanol pour l'éthanol et l'isopropanol et isopropanol pour le n-propanol) durant 15 min. Le rendement de désorption a été évalué sur un tube préalablement contaminé par 50 mg d'éthanol, d'isopropanol ou de n-propanol. Les résultats obtenus ont conclu à un rendement supérieur à 90% pour chacun des alcools.

L'éluat obtenu a été analysé par CPG selon la même méthodologie que celle effectuée pour les contrôles analytiques des produits d'essai (*cf.* § III.1.1.3. p. 114). La concentration en alcool (substance) (p/p) a été obtenue à partir de la courbe de calibration, selon l'équation suivante :

$$C_{\text{dilution}} = \frac{(A_{\text{dilution}} - b)}{a}$$

avec :

C_{dilution} = Concentration de l'éluat dilué exprimée en % (p/p)

a = Pente de la courbe de calibration

b = Ordonnée à l'origine de la courbe de calibration

A_{dilution} = Aire obtenue pour l'éluat dilué

La concentration finale de l'éluat exprimée en % p/p a été calculée comme suit :

$$C_{\text{Eluat}} = \frac{(C_{\text{dilution}} \times P_{\text{t dilution}})}{P_{\text{Eluat}}}$$

avec :

C_{Eluat} = Concentration finale de l'échantillon exprimée en % (p/p)

C_{dilution} = Concentration de l'échantillon dilué exprimée en % (p/p)

$P_{\text{t dilution}}$ = Poids total de l'échantillon dilué exprimé en g

P_{Eluat} = Poids de l'échantillon prélevé exprimé en g

La concentration atmosphérique finale dans le prélèvement exprimée en mg/m^3 a été calculée selon l'équation suivante :

$$C_{\text{Atmo}} = \frac{(C_{\text{Eluat}} \times d_{\text{solvent}} \times V_{\text{désorb.}})}{V_{\text{Prélèvement}}}$$

avec :

C_{Atmo} = Concentration finale de l'échantillon en mg/m^3

C_{Eluat} = Concentration de l'éluat dilué exprimée en mg/g

d_{solvent} = Densité du solvant de désorption

$V_{\text{désorb.}}$ = Volume de l'éluant de désorption exprimé en ml

$V_{\text{Prélèvement}}$ = Volume de prélèvement exprimé en m^3

Le résultat obtenu a été converti en ppm selon l'équation :

$$[\text{ppm}] = \frac{[\text{mg}/\text{m}^3] \times \text{Volume molaire}}{\text{Masse molaire}}$$

avec :

$[\text{mg}/\text{m}^3]$ = concentration atmosphérique en mg/m^3

Volume molaire = 24,45 L/mole à 25°C

Masse molaire = 46,1 g/mole pour l'éthanol et 60,1 g/mol pour l'isopropanol et le n-propanol

La concentration atmosphérique moyenne et l'écart-type ont été calculés à partir des 3 prélèvements réalisés pour chaque produit d'essai.

c.3) **Administration des traitements et protocole d'utilisation**

Pour les essais, les cultures en IAL ont été utilisées dans les 24 à 72 heures suivant leur préparation. Juste avant le traitement, les cultures ont été rincées à deux reprises avec du PBS stérile et transférées dans les puits du module d'exposition contenant 3,5 mL de milieu de culture chacun, pour permettre la nutrition des cellules par leur face basale durant toute la durée de l'exposition. Trois inserts ont été utilisés pour chaque module (traitement ou contrôle), et les trompes délivrant l'atmosphère d'essai étaient placées à une distance de 0,5 cm des inserts.

Deux schémas de traitement différents ont été appliqués :

- une exposition continue aux vapeurs d'alcool sur une durée de 30 minutes avec un débit de 5 mL/min,
- une exposition de 2 minutes réitérée toutes les 5 minutes sur une durée totale de 60 minutes avec un débit à 5 mL/min.

Le second schéma d'exposition a été choisi à partir des travaux publiés de [Hautemanière et al. \(2013b\)](#), utilisant cette séquence d'utilisation des produits hydro-alcooliques en unité de soins intensifs pour évaluer l'exposition du personnel de soins aux vapeurs d'alcool durant leur utilisation (Fig. 13).

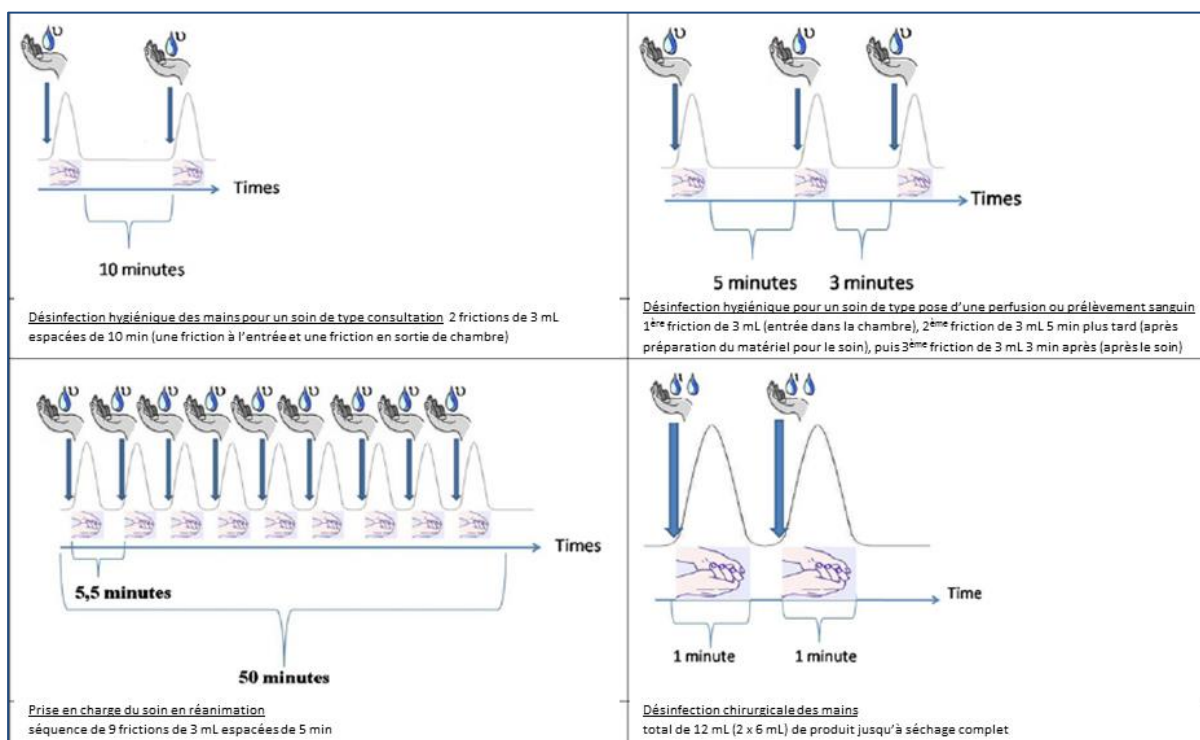


Figure 13 : Séquences d'utilisation des PHA en situations de soins, d'après la publication d'Hautemanière et al. (2013)

L'ensemble de ces essais a été effectué sans ajout de système d'activation métabolique.

Les essais ont été réalisés en *triplicate*.

Juste après traitement, les milieux de culture ont été éliminés et les cultures ont été rincées à deux reprises avec du PBS stérile et transférées dans des plaques 6 puits en présence de milieu de culture RPMI10 et replacées à l'étuve dans l'attente de la réalisation des tests.

Des études expérimentales pilotes ont été réalisées au préalable afin de confirmer un niveau acceptable de cytotoxicité sur des durées d'une heure pour des cultures maintenues dans le module d'exposition sans changement de milieu de culture.

L'utilisation de cet équipement nécessite de se conformer strictement au protocole d'utilisation fourni par VITROCELL Systems GmbH afin de ne pas stresser les cultures cellulaires avec risque de cytotoxicité importante. Le protocole détaillé est présenté en annexe 2.

Le tableau 33 ci-après résume les schémas de traitement appliqués par vapeurs d'alcools.

Tableau 33 : Traitements par vapeurs d'alcool des cellules NCI H292 cultivées en IAL pour le test du micronoyau

Modèle cellulaire Produit d'essai	NCI H292 en IAL ¹ essai en <i>triplicate</i>
Vapeurs d'alcool ² (5 mL/min)	S9- ³ - 30 min - 2 min toutes les 5 min pendant 60 min

¹ Interface air-liquide

² vapeurs générées à partir de solutions d'éthanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80 et 85 % p/p d'alcool

³ S9- : sans activation métabolique

III.1.5.2.4. Contrôles

A des fins de contrôle et de validation expérimentale, chaque essai a inclus des témoins négatifs et positifs spécifiques des conditions d'essai de manière à démontrer la sensibilité des cellules testées et l'efficacité du système d'activation métabolique lorsqu'il a été utilisé.

Pour les essais en solution dans le milieu de culture, le témoin négatif était le solvant utilisé pour formuler les produits d'essai.

Pour les essais en IAL, simultanément aux cultures exposées aux vapeurs d'alcool, des cultures témoins ont été exposées à un flux d'air propre de 5mL/min, exempt de vapeurs d'alcool. Pour des raisons de sécurité, afin de ne pas contaminer l'installation VITROCELL avec un agent génotoxique et l'atmosphère du local d'essai, le contrôle de sensibilité des cultures en IAL a été effectué en parallèle de l'essai, par application en traitement topique du témoin positif et maintien des cultures en étuve durant la durée d'exposition.

Le tableau 34 précise les différents contrôles étudiés.

Tableau 34 : Témoins négatifs et positifs utilisés pour les tests du micronoyau

Type cellulaire	Témoin négatif	Témoin positif	
		Sans activation métabolique	Avec activation métabolique
TK6	Eau stérile à 1%	TC : Mitomycine C (0,5 µg/mL) TL : Mitomycine C (0,1 µg/mL) Griséofulvine (10 µg/mL)	TC : CPA (10 µg/mL)
NCI H292	Eau stérile à 1%	TC : Mitomycine C (0,25 µg/mL) TL : Mitomycine C (0,05 µg/mL)	TC : CPA (10 µg/mL)
H292 en IAL	Air propre en dynamique (5 mL/min – 30 ou 60 min)	MMS 15µg/mL (4h de traitement topique en étuve)	--
TK6 en co-culture	Eau sterile (20 µL par épiderme)	Mitomycine C (50 µL/épiderme pour une dose finale de 7 µg) (27h)	CPA (50 µL/épiderme pour une dose finale 200 µg) (21h de traitement puis 3h de S9mix dans le milieu de culture)

TC : traitement court (3h)/ TL : traitement long (27h pour les TK6 et 51h pour les NCI H292)

CPA : cyclophosphamide - MMS : méthyl méthanesulfonate

La mitomycine C est un agent clastogène et la griséofulvine est un agent aneugène, tous deux exprimant leur activité génotoxique en absence d'activation métabolique.

La cyclophosphamide (CPA) est un agent clastogène nécessitant une métabolisation pour exprimer son activité génotoxique.

Le méthyl méthanesulfonate (MMS) est un agent alkylant induisant des adduits à l'ADN par ajout de groupements méthyl sur la 7-guanine préférentiellement mais aussi sur la 3-adenine et la 3-guanine.

III.1.5.2.5. Protocole du test du micronoyau

a) Période de recouvrement

La mise en évidence des lésions chromosomiques structurales ou numériques peut nécessiter une division cellulaire complète. Durant l'exposition au produit d'essai (temps long) ou juste après (temps court), les cellules ont donc été mises en culture pendant une période suffisante couvrant 1,5 à 2 cycles cellulaires.

a.1) Traitement en immersion dans le milieu de culture

Pour la durée de traitement court avec et sans activation métabolique, après les 3 heures de traitement, le milieu de culture a été retiré. Après deux lavages successifs avec du PBS, les cellules ont été remises en culture (2 mL/puit pour les TK6 et 3 mL/puit pour les NCI H292) et incubées à l'étuve pour 24 heures pour les TK6 et 48 heures pour les NCI H292 avant d'être récoltées.

Aucune période de recouvrement n'a été effectuée après le traitement long, celui-ci couvrant la période des 1,5 à 2 cycles cellulaires.

a.2) Traitement indirect par application topique sur épiderme reconstruit

A la fin du traitement (incluant les 3 heures avec S9 pour la condition d'essai en présence d'activation métabolique), le milieu de culture a été retiré. Après deux lavages successifs avec du PBS, les cellules ont été remises en culture dans du RPMI 10 en plaques 12 puits (2 mL/puit) et ré-incubées à 37 °C pour une durée de 20 heures.

a.3) Traitement par vapeurs

Après le traitement, le milieu de culture a été retiré. Après deux lavages successifs avec du PBS, les cultures ont reçu du nouveau milieu de culture sous les inserts puis ont été incubées à l'étuve pour 48 heures avant d'être récoltées.

b) Cytotoxicité et récolte

Une fois la période de recouvrement passée (2^{ème} jour d'essai pour les TK6 ou 3^{ème} jour pour les NCI H292), un comptage cellulaire a été effectué au bleu de Trypan pour évaluer la cytotoxicité (*cf.* note en fin de § III.1.5.2.1. p. 146) puis la récolte des cellules a été effectuée après 2 lavages successifs par PBS.

L'évaluation de la cytotoxicité a également été faite à l'aide de mesures tenant compte de la proportion de cellules ayant effectué une division. Le résultat de viabilité cellulaire a été exprimé en RPD (Doublement relatif de la population ou *Relative Population Doubling*), selon l'équation suivante :

$$\text{RPD} = \frac{\text{Nombre de PD dans les cultures traitées}}{\text{Nombre de PD dans les cultures contrôles}} \times 100$$

avec : PD = doublement de population cellulaire

$$\text{PD} = \frac{\text{Log (Nombre de cellules récoltées/ml / Nombre de cellules au début du traitement/mL)}}{\text{Log 2}}$$

nombre de cellules récoltées/mL= nombre de cellules viables/ $\mu\text{L} \times 10^3 \times 1,2^*$

nombre de cellules au début du traitement /mL

* prise en considération de la dilution apportée par les 20 μL de bleu trypan

Pour les essais en co-culture, à la fin du traitement d'essai, une évaluation de la cytotoxicité sur les épidermes humains reconstitués a également été effectuée selon la technique au MTT proposée par [Mosmann \(1983\)](#). La section III.1.2.2.4.b (p. 122) traitant du protocole d'essai d'irritation détaille les aspects méthodologiques de ce test.

Pour chaque produit d'essai, la viabilité moyenne relative des épidermes a été calculée.

$$\% \text{ moyen viabilité cellulaire} = \frac{\text{Moyenne DO}_{\text{traité}}}{\text{Moyenne DO}_{\text{TN}}} \times 100$$

Un produit d'essai a été considéré comme étant trop cytotoxique en cas de valeur de viabilité moyenne au niveau des épidermes inférieure à 50%.

c) Choc hypotonique et fixation

En vue de provoquer un choc hypotonique, les cellules récoltées ont été mises en contact durant 4 minutes à température ambiante avec 2 mL d'un mélange de milieu de culture RPMI 0 contenant 1% d'acide pluronique et d'eau distillée (1:1) incorporés sous légère agitation.

Une étape de pré-fixation a été réalisée par addition de 0,5 mL d'un mélange de Carnoy-éthanol : éthanol – acide acétique (3 :1) avec légère agitation. Après centrifugation (6 minutes à 1000 tours/minute), le surnageant a été éliminé. Les cellules ont été fixées pendant au moins une nuit à +5°C, en ajoutant 2 mL du mélange de Carnoy-éthanol incorporés sous légère agitation.

Le lendemain, après centrifugation, le surnageant a été éliminé et remplacé par 0,5 mL du mélange Carnoy-éthanol. Les cellules ont été remises en suspension par aspiration refoulement, puis étalées sur des lames préalablement gravées (5 ou 6 gouttes par lame, 2 lames par culture), et laissées à l'air libre pour séchage durant au moins une nuit à température ambiante.

d) Coloration

Après séchage, une coloration des cellules a été effectuée par immersion des lames dans une solution de colorant Giemsa à 2 % dans l'eau pour les TK6 ou à 4% pour les NCI H292, durant 10 minutes.

Après un rinçage soigneux à l'eau du robinet pendant 1 minute puis à l'eau distillée par immersion, une lamelle a été fixée sur chaque lame avec de l'Eukitt.

e) Lecture

Après codage des lames par une personne non impliquée dans l'étude pour une lecture en aveugle, les cellules ont été examinées au microscope à immersion et le nombre de MN dans les cellules mononucléées a été compté parmi 1000 cellules, soit une lecture de 2 à 3000 cellules mononucléées par condition d'essai, selon que l'essai a été réalisé en *duplicate* ou *triplicate*.

Les MN ont été identifiés selon les critères de Fenech *et al.* (Fenech *et al.* 2000, Fenech *et al.* 2003). Ils sont morphologiquement similaires aux noyaux, bien que plus petits. Ils doivent répondre aux caractéristiques suivantes :

- diamètre normalement compris entre $1/16^{\text{ème}}$ et $1/3$ du diamètre moyen du noyau principal ;
- MN non réfringents et facilement distingués d'artefacts comme des particules de coloration ;
- MN ni reliés ni connectés au noyau principal ;
- MN pouvant toucher le noyau principal sans le chevaucher, et limite du MN distincte de la limite du noyau ;
- même intensité de coloration que le noyau principal ou plus claire, cependant une coloration plus intense est occasionnellement possible.

Les schémas en figure 14 illustrent les méthodologies d'essai mises en œuvre pour le test du MN en présence d'activation métabolique : essai avec traitement en immersion dans le milieu de culture (Fig. 14A) et essai en co-culture (Fig. 14B).

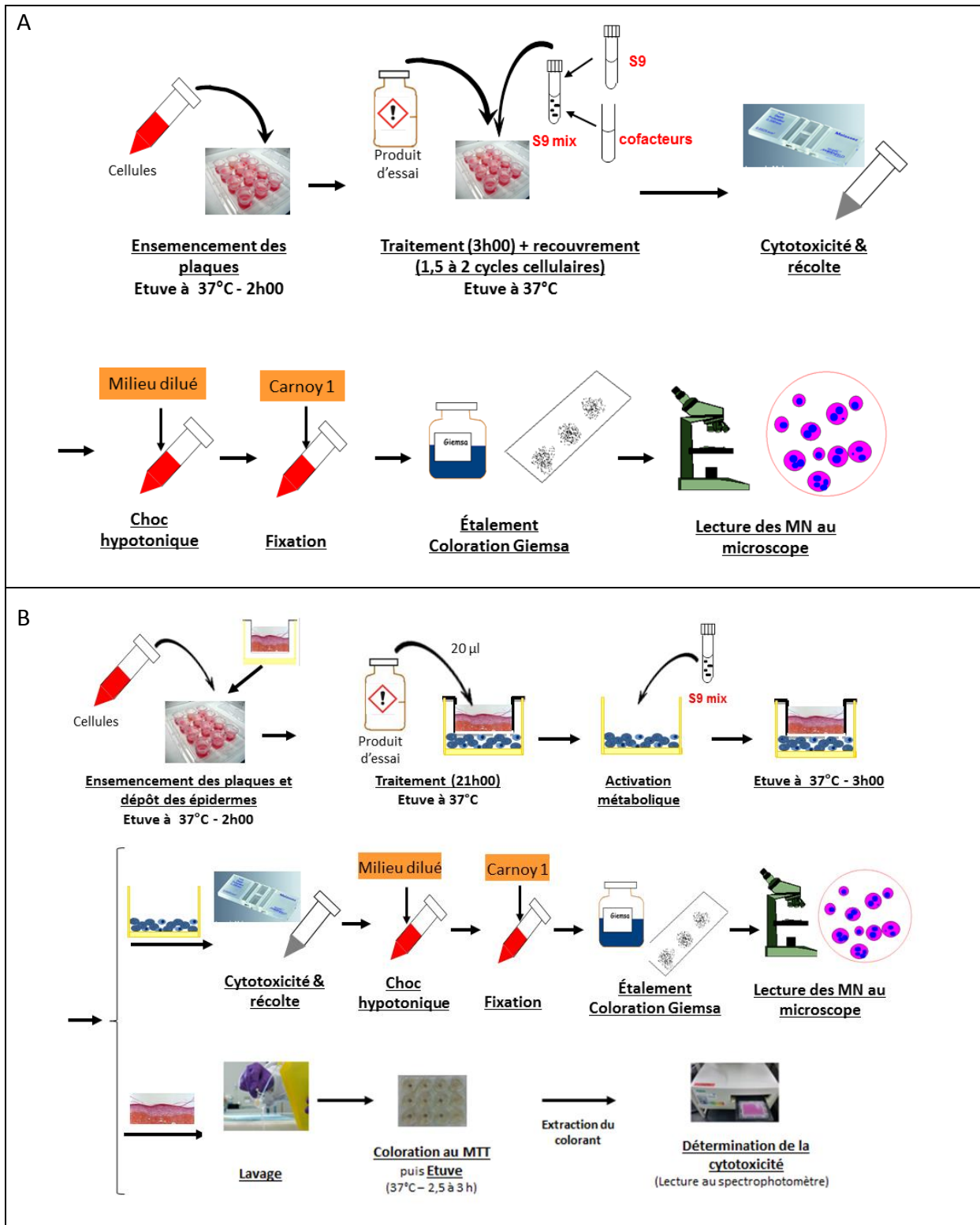


Figure 14 : Schémas récapitulatifs du test du micronoyau : (A) traitement en immersion dans le milieu de culture, avec activation métabolique (B) essai en co-culture, avec activation métabolique

f) Expression des résultats et interprétation

Les résultats obtenus lors des différents schémas de traitement ont été restitués par la moyenne du nombre de MN pour 2000 cellules mononucléées, ainsi que le RPD par condition d'essai.

En complément, les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique en utilisant le test du χ^2 pour comparer la moyenne des MN suite aux différents traitements à celle du témoin solvant. Pour le produit d'essai testé sur une gamme de dilutions, un test de tendance ANOVA a également été réalisé grâce à l'application statistique Stat view®, version 5.

Pour chaque essai, les critères d'acceptation du test étaient ceux de la ligne directrice de l'OCDE No 487 :

- niveau maximum de cytotoxicité (100-RPD) de $55 \pm 5\%$,
- faible fréquence de MN pour les témoins négatifs (5-25 MN / 1000 cellules),
- augmentation statistiquement significative du nombre de cellules micronucléées parmi les mononucléées en présence des témoins positifs, comparativement aux témoins négatifs,
- cohérence avec les données historiques du laboratoire.

Lorsque les critères de validité étaient remplis, un produit a été considéré positif (capable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai) en cas d'augmentation statistiquement significative (χ^2) du nombre de MN comparativement au témoin négatif correspondant, sous réserve d'une significativité biologique (augmentation supérieure aux données historiques des témoins négatifs), d'une augmentation du nombre de MN dose-reliée dans au moins une condition expérimentale et de résultats reproduits dans un second essai indépendant.

Un produit a été considéré comme incapable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai

- en absence d'augmentation statistiquement significative du nombre de MN comparée au témoin négatif correspondant, pour les différents schémas de traitement utilisés
- et si l'intégralité des résultats se situait à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques du laboratoire.

Le résultat du test de tendance a également été pris en considération pour le produit d'essai testé sur une gamme de dilutions.

III.1.5.3. Résumé de l'approche méthodologique

Le tableau 35 ci-dessous résume les conditions expérimentales mises en œuvre.

Tableau 35 : Résumé des conditions expérimentales et données d'interprétation du test du micronoyau

Produits d'essai		Alcools seuls ¹	CoF ₁₀ ²	SHA ³	Vapeurs d'alcool ⁴ (5 mL/min)	Ethanol dans l'eau ⁵
Mode de traitement		Traitement direct en immersion dans le milieu de culture			Traitement direct par vapeurs	Traitement indirect sur épiderme reconstruit
Modèle cellulaire		TK6 NCI H292	TK6	TK6	NCI H292 en IAL	TK6 en co-culture ⁶
Conditions d'essai⁷		S9- TC /TL S9+ TC			S9- 30 min ou 2 min toutes les 5 min pendant 60 min	S9- TL S9+ TL
Essai préliminaire		Non	Oui	Non	Oui	Non
Essai définitif	Gamme de dilutions	Non	Oui	Non	Non	Non
	Témoin négatif	Eau stérile	Eau stérile	Eau stérile	Air propre (5 mL/min)	Eau sterile
	Témoins positifs	Mitomycine et Griséofulvine (S9-) Cyclophosphamide (S9+)			MMS ⁸ (S9-)	Mitomycine (S9-) Cyclophosphamide (S9+)
	Réplicats	<i>Duplicate</i>	<i>Duplicate</i>	<i>Duplicate</i>	<i>Triplicate</i>	<i>Duplicate</i>
	Paramètre de mesure	Nombre de MN / 2000 cellules				
	Essai 2	Uniquement en cas de résultat positif ou ambigu lors du 1 ^{er} essai				
Interprétation (sous réserve de la validité de l'essai)		Augmentation statistiquement et biologiquement significative du nombre de micronoyaux par rapport au témoin négatif et relation dose-effet				

¹ Ethanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 75, 80, 85 ou 90% p/p

² CoF₁₀ : co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

³ SHA : solutions hydro-alcooliques sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol (60, 70, 75, 80, 85 ou 90% p/p) formulées avec 0,1% p/p cumulé de MP1, MP2, MP3 et MP4

⁴ Vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'éthanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80 et 85 % p/p

⁵ Ethanol à 60, 70, 75, 80 ou 85% p/p

⁶ Test du MN effectué sur cellules TK6 mises en co-culture avec EpiskinTMSM, après traitement topique sur EpiskinTMSM

⁷ S9- : sans activation métabolique / S9+ : avec activation métabolique – TC : traitement court / TL : traitement long

⁸ MMS : méthyl méthanesulfonate

III.1.6. Test des comètes *in vitro*

III.1.6.1. Considérations générales

Le test des comètes ou « Single Cell Gel Electrophoresis » (SCGE) est une technique rapide et très sensible d'évaluation quantitative des dommages de l'ADN au niveau de cellules (Ostling and Johanson 1984, Singh *et al.* 1988, Olive, Banath and Durand 1990). Il consiste à faire migrer l'ADN sur gel d'agarose et sous l'action d'un champ électrophorétique afin d'observer son éventuelle fragmentation résultant de lésions induites par des agents génotoxiques. Les noyaux non endommagés se présentent sous une forme sphérique, en général de 25 à 35 μm de diamètre, alors que les noyaux présentant des cassures de l'ADN migrant dans le gel donnent une forme de comètes (Fig. 15).

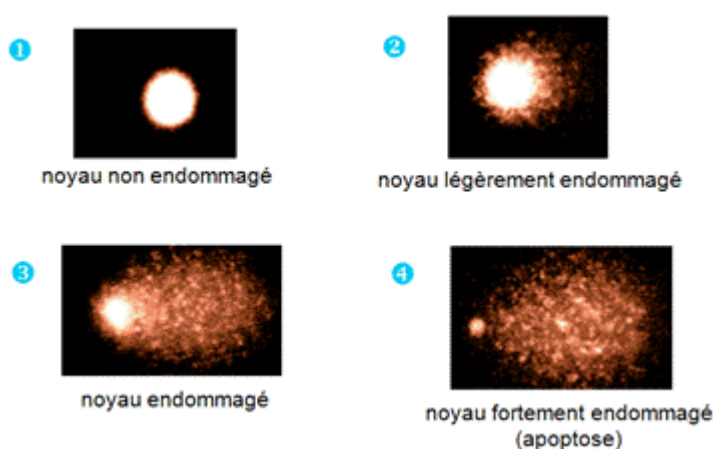


Figure 15 : Grandes catégories de cellules lors du test des comètes

Contrairement à d'autres tests de génotoxicité, il peut s'appliquer aussi bien à des cellules quiescentes qu'à des cellules en division. En outre, il est applicable à tout type cellulaire ou tissu à condition qu'une suspension de cellules individualisées puisse être obtenue.

Le principe de l'essai *in vitro* consiste à traiter les cellules, puis à la fin de la période de traitement, de les inclure dans un gel d'agarose sur des lames de microscope. Les cellules sont ensuite soumises à des étapes de lyse membranaire, de déroulement de l'ADN et d'électrophorèse. Après une étape de neutralisation, un marquage fluorescent de l'ADN est effectué afin de quantifier la migration de l'ADN par analyse d'image. Il existe différents paramètres de mesure indépendants pour estimer la fragmentation de l'ADN, tels que le pourcentage d'ADN dans la queue (ou intensité de la queue / TI : tail Intensity), la longueur de la queue ou encore le moment caudal (ou OTM : olive tail moment), prenant en compte le centre de gravité de la tête, la longueur de la queue et le pourcentage d'ADN contenu dans la queue. Cependant, le paramètre de mesure identifié comme le plus approprié au cours de l'Atelier international sur les procédures d'essai de génotoxicité à San Francisco en 2005 est le pourcentage d'ADN dans la queue (TI). Celui-ci est corrélé linéairement aux dommages d'ADN sur une large gamme de dommages, et est fonction de la fréquence de

cassure de l'ADN (Hartmann *et al.* 2003). Il présente par ailleurs l'avantage d'être indépendant des réglages des seuils du programme d'analyse d'image et donne une idée correcte de ce à quoi ressemble une comète (Collins, 2004). Ce paramètre est par ailleurs celui recommandé dans la ligne directrice de l'OCDE No 489 relative au test des comètes *in vivo* (OECD 2016h).

Bien qu'il n'y ait pas de ligne directrice harmonisée de l'OCDE pour cet essai lorsqu'il est réalisé *in vitro*, la méthodologie d'essai s'appuie sur plusieurs recommandations internationales qui définissent les conditions optimales de sa mise en œuvre (Tice *et al.* 2000, Hartmann *et al.* 2003, Burlinson *et al.* 2007). Les conditions de pH sont déterminantes dans la détection des différents dommages à l'ADN. Les cassures double-brins de l'ADN sont détectés à pH 7,8, auxquels s'ajoutent les cassures simple-brins à un pH de 12,1, puis les sites de réparation à pH 12,4 et les sites alcali-labiles à un pH supérieur ou égal à 13 (Klaude *et al.* 1996). Ainsi, la réalisation de l'essai en conditions alcalines (pH>13) est le plus souvent privilégiée pour couvrir les différents types de lésions primaires possibles. *In vitro*, le traitement s'effectue pendant 3 à 6 heures, en absence mais aussi en présence d'un système d'activation métabolique (fraction S9) afin de déterminer le rôle de la métabolisation. Une mesure de la viabilité cellulaire est systématiquement effectuée en parallèle pour s'assurer d'un niveau de cytotoxicité acceptable, ne devant pas excéder 30 % (Tice *et al.* 2000).

Pour la mise en évidence d'agents pontants, la durée de l'électrophorèse pourra être augmentée pour permettre une extension de la migration de l'ADN dans le groupe contrôle (témoin négatif) et parallèlement amplifier le retard de migration de l'ADN dans les groupes traités avec un agent pontant.

Pour la détection de lésions oxydatives de l'ADN, le test peut être modifié avec l'utilisation d'enzymes de réparation de l'ADN spécifiques. Les enzymes d'origine bactérienne les plus fréquemment utilisées sont l'endonucléase III (ENDOIII), qui reconnaît les pyrimidines oxydées, et la formamidopyrimidine-ADN glycosylase (FPG) qui reconnaît notamment les purines oxydées, dont la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) et les sites apuriques et apyrimidiques. La 8-OxoGuanine Glycosylase 1 humaine (hOGG1), analogue mammalien de la FPG bactérienne, est également utilisée et présente une plus grande spécificité de substrat vis-à-vis de la 8-oxoGua. Toutes ces enzymes contribuent à l'élimination des lésions par clivage de l'ADN au niveau des bases oxydées, entraînant des cassures simple-brin et donc une augmentation de la réponse du test (Collins 2009).

Ce test présente une forte sensibilité pour la détection des agents cancérigènes mais sa spécificité reste limitée (Anderson, Yu & McGregor 1998). L'étude d'Anderson *et al.* (1998) a montré que le test des comètes présente une sensibilité de détection des agents cancérigènes de 88 % (74 sur 84 composés testés) et une spécificité de détection des agents non cancérigènes de 64 % (7 sur 11 composés testés).

III.1.6.2. Aspects méthodologiques

III.1.6.2.1. Lignées cellulaires

Les mêmes lignées cellulaires que pour le test du micronoyau ont été utilisées pour le test des comètes. Il s'agit des cellules TK6 (cellules lymphoblastoïdes humaines) et cellules NCI H292 (cellules épithéliales pulmonaires humaines). Il y a lieu de se référer à la section III.1.5.2.1. (p. 144) pour plus d'informations sur ces cellules.

III.1.6.2.2. Système d'activation métabolique

Afin de mettre en évidence les propriétés génotoxiques de composés nécessitant une métabolisation pour exprimer leurs effets, les essais ont également été réalisés en présence de système d'activation métabolique.

Le S9 mix utilisé était de composition identique à celui utilisé pour le test du micronoyau (*cf.* III.1.5.2.2. p. 147)

III.1.6.2.3. Traitements et doses d'essai

Deux modes de traitement différents ont été utilisés en fonction du modèle cellulaire:

- Traitement en immersion
- Traitement par vapeurs

Des précisions sur ces modes d'administration sont données en section a) du § III.1.5.2.3. (p. 147) relatif au test du micronoyau.

Les schémas de traitement appliqués sont présentés dans le tableau 36 ci-dessous pour les différents produits d'essai :

Tableau 36 : Traitements et doses d'essai pour le test des comètes

Modèle cellulaire Produit d'essai	TK6		NCI H292 en IAL ²
	Traitement liquide en immersion (1% v/v) en <i>duplicate</i>		Traitement par vapeurs (5 mL/min) en <i>triplicate</i>
Alcools ¹ dans l'eau	60, 70, 75, 80 & 85 % p/p		60, 70, 80 & 85 % p/p S9-
	S9- 3h	S9+ 3h	- 30 min - 2 min toutes les 5 min pendant 60 min

¹ Ethanol, isopropanol et n-propanol

S9- : sans activation métabolique / S9+ : avec activation métabolique

Les essais avec traitement en immersion ont été réalisés en *duplicate* tandis que les essais sur les cultures en interface air-liquide (IAL) ont été réalisés en *triplicate*.

III.1.6.2.4. Contrôles

Les contrôles inclus dans les essais sont présentés dans le tableau 37 ci-après.

Tableau 37 : Témoins négatifs et positifs utilisés pour les tests des comètes

Type cellulaire	Témoin négatif	Témoin positif (sans activation métabolique)
TK6	Eau stérile à 1% (3h)	MMS ¹ 20µg/mL (3h)
H292 en IAL ²	Air propre en dynamique (5 mL/min – 30 ou 60 min)	MMS ¹ 15µg/mL (4h de traitement en étuve)

¹MMS : méthyl méthanesulfonate ²IAL : interface air-liquide

III.1.6.2.5. Détermination de la cytotoxicité

Juste après traitement, la cytotoxicité a été évaluée par la technique au Bleu de Trypan (*cf.* note générique en fin de § III.1.5.2.1 p. 146).

III.1.6.2.6. Protocole du test des comètes

Le protocole était le même quel que soit le type cellulaire, à l'exception de la récolte des cellules après traitement, nécessitant une étape de trypsination pour les cellules NCI H292 en raison de leur adhésion à un support de culture (*cf.* note en fin de § III.1.5.2.1 p. 146).

Le test se déroule en plusieurs étapes, démarrant par la préparation des lames la veille de l'essai, tel que décrit ci-après.

a) Préparation des lames de microscopie

- Préparation des agaroses

Deux types de gel ont été utilisés : un gel à point de fusion normal (NA = Normal Agarose) et un gel à bas point de fusion (LMPA = Low Melt Point Agarose) (Bio-rad). Ceux-ci sont préparés dans du PBS (phosphate buffer saline). Les solutions sont fondues au micro-onde. Le NA est préparé aux deux concentrations de 1,5 % et 0,8 %. Le LMPA est préparé à la concentration de 0,5 %.

Le jour du test, le NA 0,8 % a été maintenu dans un bain-Marie à 45°C et le LMPA à 0,5 % dans un bain-Marie à 37°C, le temps de leur utilisation.

- Préparation des lames

Des lames de microscopie non lavées non dégraissées ont été utilisées pour permettre une bonne adhésion du gel à leur surface.

La veille de l'essai, un pré-coating a été effectué par trempage des lames dans une solution de gel d'agarose (NA à 1,5%) de façon à les recouvrir au $\frac{3}{4}$ d'un film de gel. Après essuyage de la face inférieure pour retirer l'agarose en excès, elles ont été séchées à température ambiante puis identifiées par gravage. Ce pré-coating permet l'attachement et le maintien des couches suivantes sur la lame.

Le jour de l'essai, une autre couche de gel d'agarose a été déposée, par dépôt de 85 μ L de NA à 0,8 %, étalés de façon homogène en déposant une lamelle par-dessus. Après solidification du gel (5 minutes à température ambiante), les lamelles ont été retirées délicatement en prenant soin de conserver l'intégrité du gel.

Deux lames par puit de culture cellulaire ont été préparées.

b) Incorporation des cellules

Juste après traitement, les cellules en quantité suffisante en fonction du nombre de lames prévues ont été remises en suspension dans du LMPA à 0,5%, à raison de $1,5 \cdot 10^4$ cellules pour 75 μ L de LMPA, puis déposées délicatement sur les lames sur les gels d'agarose ($1,5 \cdot 10^4$ cellules/lame) puis recouvertes d'une lamelle. Les lames ont ensuite été placées 3 à 5 minutes au réfrigérateur pour permettre la solidification du gel.

4 lames par traitement ont été préparées pour les essais avec traitement en immersion (essais en *duplicate*), 6 lames pour les essais en traitement topique aux vapeurs d'alcool (essais en *triplicate*).

c) Lyse des membranes cellulaires et nucléaires

Après solidification de la couche supérieure d'agarose, les lamelles ont été retirées délicatement puis les lames placées sur un portoir ont été immergées pendant au moins 1 heure dans une solution de lyse à pH10 maintenue à +5°C environ. Cette étape s'est déroulée dans l'obscurité, afin d'éviter toute lésion additionnelle de l'ADN.

La solution de lyse est composée de NaCl (Sigma) à 2,5 mM, EDTA (Sigma) à 100mM, Trizma base (Sigma) à 10mM et de NaOH (Merck) à 12g/L à laquelle sont ajoutés 10% de DMSO (Sigma) et 1% de Triton X-100 (Sigma).

d) Dénaturation de l'ADN et électrophorèse

Après un rinçage par immersion et agitation douce dans un bain d'eau distillée, les lames ont ensuite été déposées dans des cuves d'électrophorèse préalablement remplies de tampon d'électrophorèse à pH>13 pour une durée de 20 minutes. Ce tampon est composé de 75mL de NaOH à 10N, de 12,5 mL d'EDTA à 200mM dans de l'eau distillée à 4°C qsp 2,5 L par cuve. Cette étape permet le relâchement de la structure super-enroulée de l'ADN et la séparation des deux brins d'ADN.

L'étape suivante a consisté à effectuer l'électrophorèse dans la même solution tampon et toujours à basse température en appliquant un courant électrique de 25 V / 200 mA pendant 20 minutes. Ces deux étapes se sont déroulées dans l'obscurité.

e) Neutralisation et déshydratation

Une fois la migration terminée, les lames ont été immergées à deux reprises durant 5 minutes à température ambiante dans une solution de neutralisation à pH 7,5 (0,4 mM de Trizma base dans de l'eau distillée) pour permettre le ré-appariement des brins d'ADN.

Les lames ont ensuite été déshydratées dans un bain d'éthanol absolu pendant 5 minutes puis séchées à l'air libre afin de permettre une longue conservation des lames. Elles ont ensuite été stockées à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'au jour de lecture (délai de conservation indéfini) (Klaude *et al.* 1996).

f) Coloration et analyse des lames

En vue de la lecture des lames, une coloration de l'ADN a été effectuée par dépôt de 25µL d'une solution à 20 µg/mL d'iodure de propidium (fluorochrome) sur chaque lame. La lecture a eu lieu immédiatement après coloration, en raison de l'extinction de la fluorescence et de la diffusion du fluorochrome dans le gel pouvant gêner l'analyse.

Chaque lame a été examinée au grossissement 200 à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica Microsystems SAS) couplé à une caméra (Allied Vision technologies).

100 cellules ont été analysées par lame. La lecture a été réalisée en aveugle.

La fragmentation de l'ADN a été estimée à l'aide du pourcentage d'ADN dans la queue (ou intensité de la queue / TI : tail intensity) :

$$TI = \frac{\% \text{ fluorescence dans la queue}}{\% \text{ fluorescence totale}} \times 100$$

Sa détermination a été effectuée à l'aide du logiciel Comet Assay IV Image Analysis, version 4.11 sous Windows XP Pro (Perceptive Instruments Ltd, Suffolk, UK).

Un seul essai a été réalisé à moins de résultats positifs ou ambigus.

Le schéma en figure 16 ci-dessous illustre la méthodologie d'essai du test des comètes.

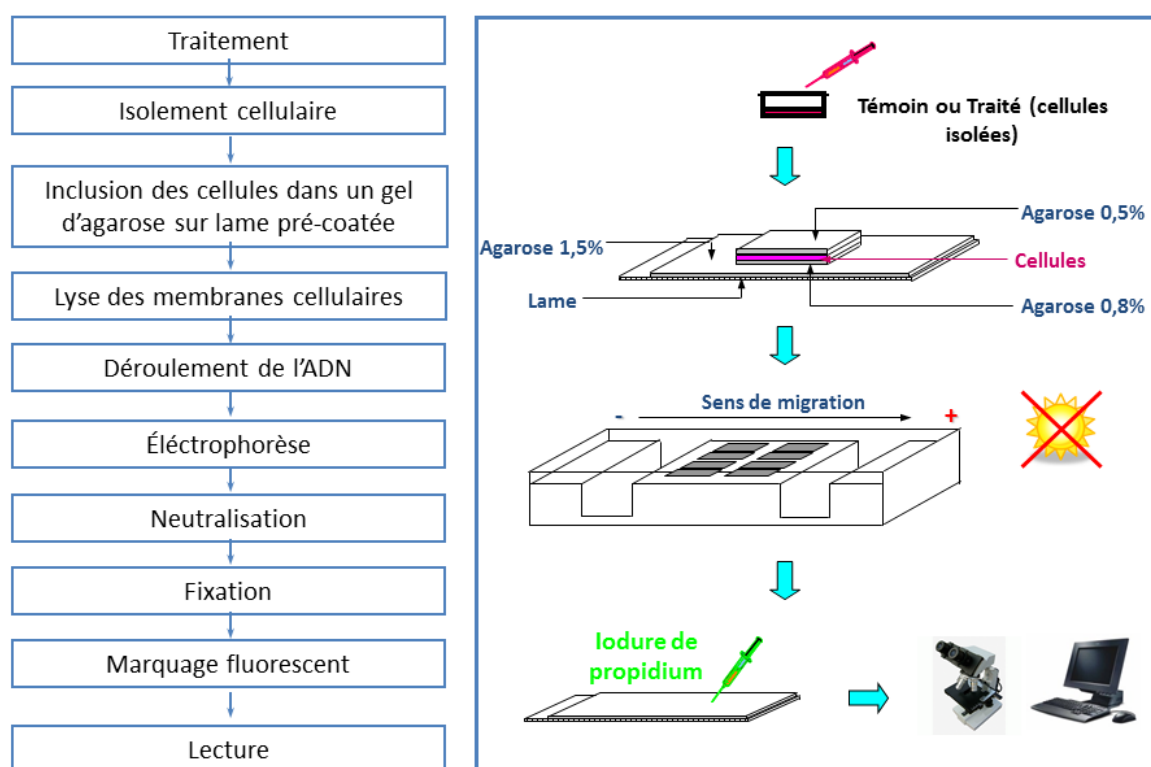


Figure 16 : Schéma récapitulatif du test des comètes

g) Expression des résultats et interprétation

Pour chaque culture, la médiane des TI sur 100 cellules a été calculée à partir de 200 cellules (moyenne des médianes des 2 lames – 100 cellules / lame).

Pour chaque condition d'essai, la moyenne des médianes des différentes cultures (2 à 3 cultures en fonction des essais, correspondant à 400 ou 600 cellules) a également été calculée.

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests non paramétriques, les valeurs de TI ne suivant pas une distribution gaussienne (Bauer *et al.* 1998). Le test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer chacun des groupes exposés au groupe contrôle. Une différence d'effet entre les concentrations d'essai d'un même alcool a été recherchée avec le test de Kruskal-Wallis. Ces tests ont été réalisés en utilisant le logiciel statistique Stat View[®] version 5 (Software Institute SAS). Le seuil de significativité statistique a été fixé à 5% ($p < 0,05$).

Les critères d'acceptabilité étaient les suivants :

- cytotoxicité à chaque concentration testée inférieure à 30% par rapport au contrôle négatif,
- pourcentages d'ADN dans la queue du témoin positif statistiquement supérieurs à ceux du témoin négatif,

- pourcentages d'ADN dans la queue des groupes témoins positifs et négatifs cohérents avec les données historiques.

Un produit a été considéré comme présentant des propriétés génotoxiques vis-à-vis de la lignée cellulaire cible en cas d'augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue par rapport au témoin négatif avec une relation dose-effet, sous réserve d'une significativité biologique (valeurs supérieures aux limites des données historiques des témoins négatifs).

Dans le cas contraire, le produit d'essai a été considéré négatif.

En cas de résultat positif (c'est-à-dire augmentation biologiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue) sans relation dose-effet, le produit d'essai a été considéré équivoque.

III.1.6.3. Résumé de l'approche méthodologique

Le tableau 38 ci-après résume les conditions expérimentales mises en œuvre :

Tableau 38 : Résumé des conditions expérimentales et données d'interprétation du test des comètes

Produits d'essai	Alcools seuls ¹	Vapeurs d'alcool ² (5 mL/min)
Mode de traitement	Traitement direct en immersion dans le milieu de culture	Traitement direct par vapeurs
Modèle cellulaire	TK6	NCI H292 en IAL ³
Conditions d'essai	S9- et S9+ ⁴ 3 heures	S9- 30 min ou 2 min toutes les 5 min pendant 60 min
Témoin négatif	Eau stérile	Air propre (5 mL/min)
Témoins positifs	MMS ⁵	MMS ⁵
Réplicats	<i>Duplicate</i>	<i>Triplicate</i>
Paramètre de mesure	% ADN dans la queue (TI=tail intensity)/100 cellules	
Essai 2	Uniquement en cas de résultat positif ou ambigu lors du 1 ^{er} essai	
Interprétation (sous réserve de la validité de l'essai)	Augmentation statistiquement et biologiquement significative de la valeur moyenne du TI par rapport au témoin négatif	

¹ Ethanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 75, 80 ou 85% p/p

² Vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'éthanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80 et 85 % p/p

³ IAL : interface air-liquide

⁴ S9- : sans activation métabolique / S9+ : avec activation métabolique

⁵ MMS : méthyl méthanesulfonate

III.2. Résultats

III.2.1. Tolérance cutanée

L'objectif des essais réalisés était de faire une évaluation comparative de la tolérance locale des 3 alcools couramment utilisés dans les produits d'hygiène des mains en utilisant des méthodes alternatives validées *in vitro*. L'irritation cutanée et la phototoxicité ont ainsi été étudiées avec la mise en œuvre d'essais selon les lignes directrices de l'OCDE No 439 : "Irritation cutanée *in vitro* : essai sur épiderme humain reconstitué » et l'OCDE No 432 « Essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ». Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication « Comparative assessment of local tolerance of alcohols commonly used in alcohol-based hand rubs for hand hygiene. » dans le journal *Toxicology in vitro*, présentée en annexe 3 ([Manche et al. 2017](#)).

III.2.1.1. Irritation cutanée

Les tests réalisés en première intention ont utilisé le modèle d’épiderme humain reconstitué (RhE) EpiSkin™ SM. Des essais complémentaires ont été réalisés avec le modèle Vitroderm (RhE de Thor Personal Care).

Les 3 alcools (éthanol, isopropanol et n-propanol) en solution dans l’eau (alcools seuls) ou formulés en présence de co-formulants (SHA ou solutions hydro-alcooliques) ont été testés. 4 concentrations de chaque alcool (60, 70, 80 et 85%) visant à encadrer les concentrations usuellement rencontrées dans les produits d’hygiène des mains ont été testées.

En raison du nombre important de produits d’essai, et des contraintes expérimentales limitant à 24 le nombre de RhE utilisé par expérimentation, plusieurs essais indépendants sur EpiSkin™ SM ont été nécessaires. Dans une approche comparative, afin de prendre en compte la variabilité inter-lots possible des RhE, la plupart des essais incluait les 3 types d’alcool. Par ailleurs, pour les SHA, en raison d’interactions possibles entre les alcools et les co-formulants, chaque essai a inclus des témoins complémentaires correspondants aux alcools et co-formulants seuls à iso-concentration.

Pour certains essais réalisés sur EpiSkin™ SM, les plans expérimentaux définis n’incluaient pas de témoin positif, en relation avec la quantité stricte de 12 épidermes fournis par unité de commande (plaque 12 puits). Dans ces essais, la validation s’est limitée aux données des témoins négatifs, permettant de confirmer la viabilité cellulaire du modèle, et nécessaires pour donner la valeur de viabilité cellulaire de référence (100%). L’absence de témoin positif dans ces essais n’a pas été considérée comme préjudiciable, en raison

- de la production standardisée des épidermes chez EpiSkin, fiabilisée par un système qualité certifié ISO 9001,
- des contrôles réalisés par EpiSkin avant libération des lots fabriqués, incluant notamment la confirmation d’une valeur de CI_{50} suite à l’exposition au SDS (sodium dodecyl sulfate) conforme aux spécifications attendues ($\geq 1,5$ mg/mL),
- de l’expérience acquise au sein du laboratoire avec le type d’épiderme reconstitué utilisé, où la fonction barrière et la sensibilité tissulaire n’ont jamais été mis en défaut.

A cette exception près, pour tous les essais, les critères d’acceptabilité des tests rappelés ci-dessous étaient remplis :

- valeur moyenne de densité optique du solvant d’extraction (DO_{blanc}) inférieure à 0,1
- densité optique corrigée moyenne du témoin négatif comprise entre 0,6 et 1,5, écart-type inférieur à 18, et valeur cohérente avec les données historiques du laboratoire
- lorsque présent, viabilité moyenne du contrôle positif (SDS à 5%) inférieure à 40%, écart-type inférieur à 18 et valeur cohérente avec les données historiques du laboratoire.

III.2.1.1.1. Alcools seuls

Les concentrations d’alcools dans les produits d’essai ont été vérifiées par analyse chromatographique en phase gazeuse et ont toutes été confirmées comme égales à la concentration théorique à moins de 5% près (tableau 39).

Tableau 39 : Concentrations en alcool dans les produits d’essai pour le test d’irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM

% p/p théorique	Concentration (% p/p) [Ecart par rapport au % théorique]		
	éthanol	isopropanol	n-propanol
60	61,3 [+2,17%]	59,98 [-0,03%]	60,7 [+1,17%]
70	71,2 [+1,71%]	71,02 [+1,46%]	70,9 [+1,29%]
80	81,0 [+1,25%]	81,25 [+1,56%]	80,4 [+0,5%]
85	86,4 [+1,65%]	86,25 [+1,47%]	86,3 [+1,53%]

Selon les concentrations d’alcool, deux ou trois essais indépendants ont été réalisés (3 pour les alcools à 60 et 80% p/p et 2 pour les alcools à 70 et 85% p/p). Les résultats en termes de viabilité moyenne relative des épidermes (moyenne \pm écart type) dans chacun de ces essais sont présentés dans les graphes en figure 17.

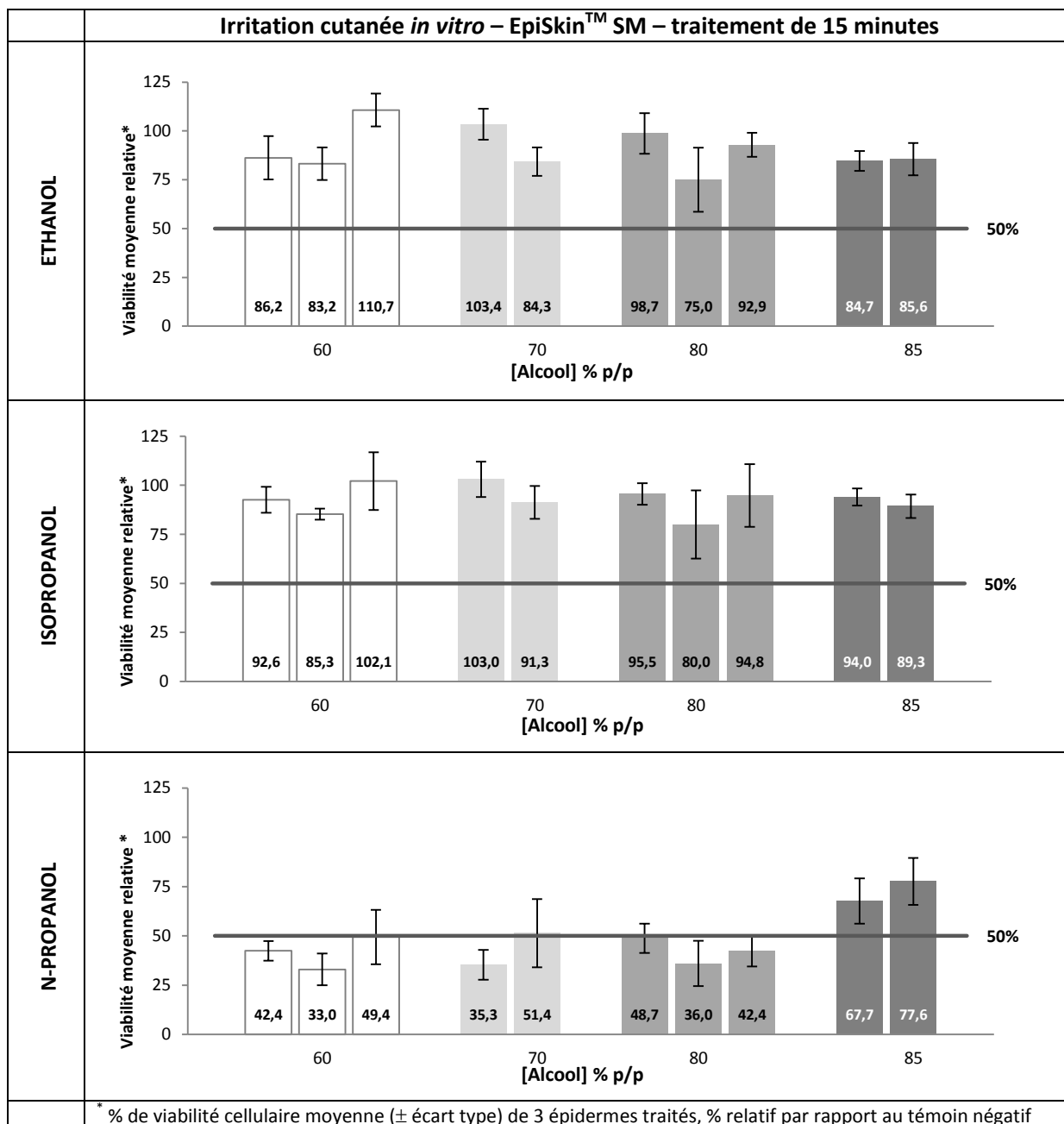


Figure 17 : Test d’irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM - traitement par des solutions d’éthanol, d’isopropanol ou de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p

Quelle que soit la teneur en éthanol ou isopropanol, aucun effet significatif n’a été observé sur la viabilité des épidermes après traitement de 15 min par 10 µL de solution d’alcool, avec des valeurs moyennes de viabilité relative toutes nettement supérieures à 50%.

Un profil de réponse différent a été observé avec le n-propanol. Les viabilités moyennes des épidermes étaient significativement diminuées suite au traitement par du n-propanol à 60, 70 et 80% p/p, avec des valeurs voisines de 50% ou inférieures. Pour les épidermes traités avec du n-propanol à 85%, les viabilités moyennes étaient également diminuées mais de façon non biologiquement significative (valeurs supérieures à 50%).

Le graphe en figure 18 présente les résultats consolidés des différents alcools, avec restitution des moyennes des différents essais.

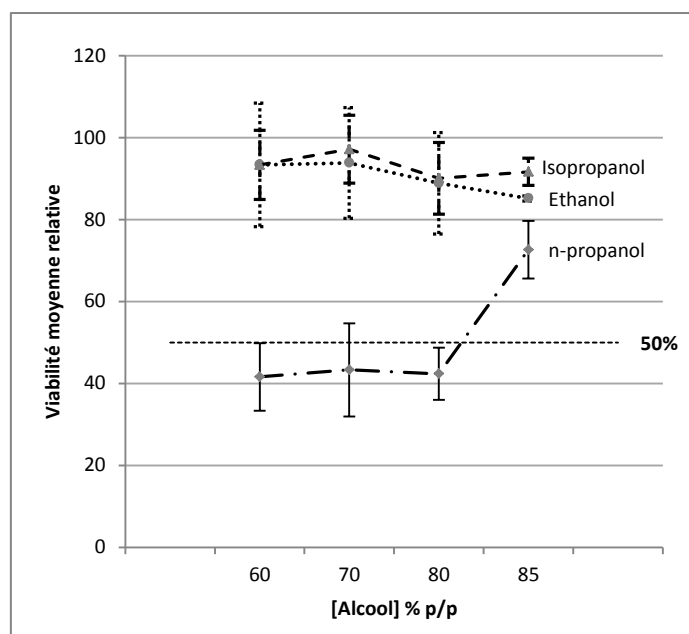


Figure 18 : Test d'irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM - traitement par des solutions d'éthanol, d'isopropanol ou de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p

(viabilités moyennes issues de 3 expérimentations indépendantes à 60 et 80% p/p, et 2 à 70 et 85% p/p).

L'analyse statistique réalisée sur ces données a confirmé qu'au moins une valeur parmi les 12 moyennes était statistiquement différente des autres ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis). Cependant, les analyses complémentaires effectuées pour faire des comparaisons entre les différents alcools à une même concentration ou entre les différentes concentrations d'un même alcool n'ont pas montré de différences statistiquement significatives, vraisemblablement en relation avec un manque de pouvoir lié à une quantité de données insuffisante.

Néanmoins, sur le plan de la significativité biologique en termes d'irritation, il ressort des essais réalisés sur le modèle d'épiderme EpiSkin™ SM une différence de réponse entre les alcools, avec, selon les critères d'interprétation de l'OCDE No 439, un possible effet irritant du n-propanol. Cependant, cette donnée n'est pas en accord avec les données disponibles dans la littérature sur le n-propanol en termes de propriétés d'irritation cutanée aiguë chez l'homme. Plusieurs hypothèses pour expliquer cette incohérence ont été formulées et pour partie investiguées, tel que présenté ci-après.

Une première hypothèse étudiée était en relation avec les produits d'essai, avec une interrogation sur la possible présence d'impuretés dans le n-propanol utilisé pour formuler les produits d'essais.

Une analyse chromatographique des 3 alcools utilisés a donc été réalisée. Les chromatogrammes correspondants sont présentés en figure 19 ci-après.

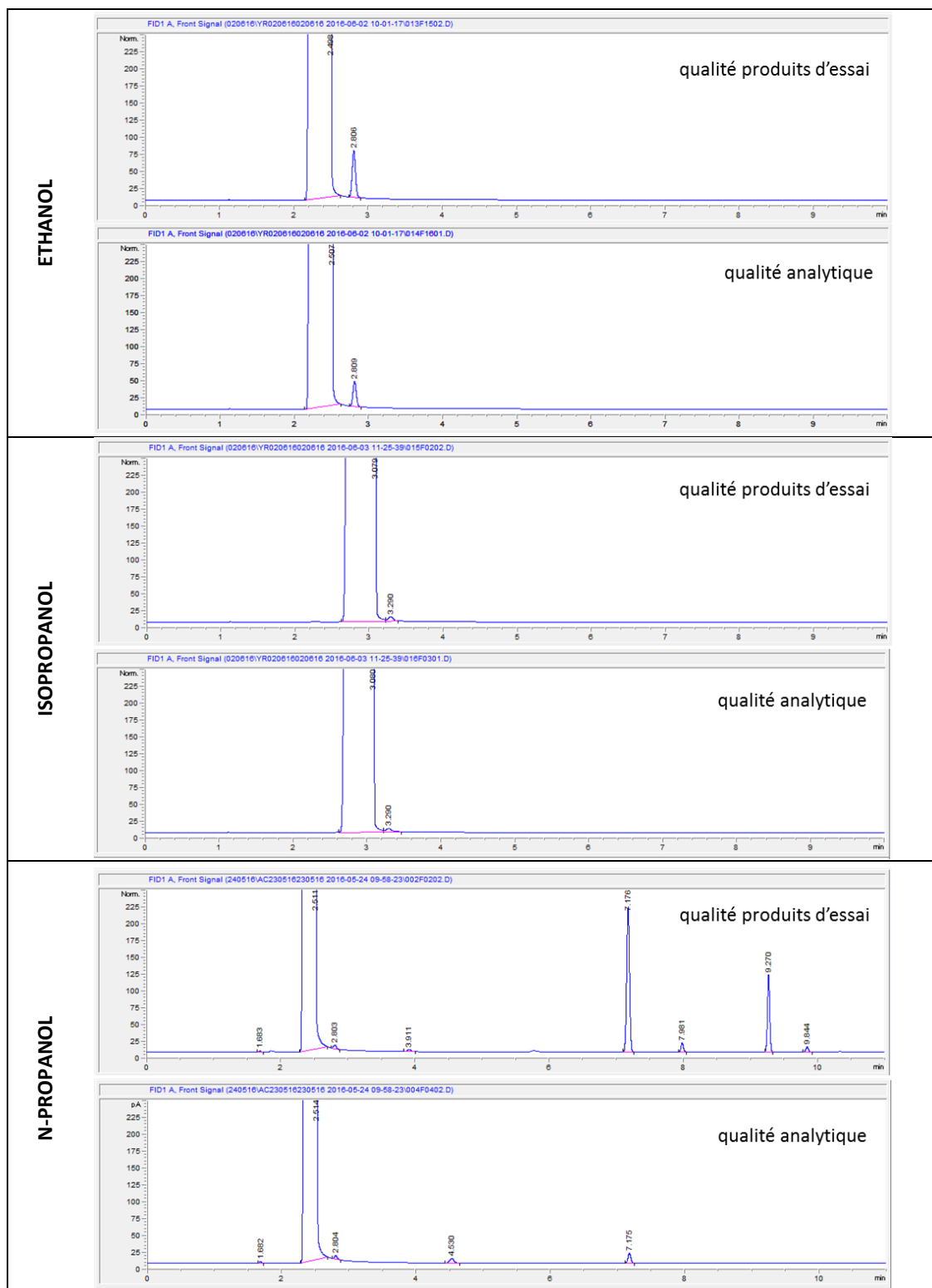


Figure 19 : Chromatogrammes des différentes sources d’alcool utilisées, analysées par CPG

Des profils chromatographiques similaires entre les deux qualités d’alcool (qualité utilisée pour formuler les produits d’essai et qualité analytique) ont été retrouvés pour l’éthanol et l’isopropanol. En revanche, pour le n-propanol, le chromatogramme de la qualité utilisée pour formuler les produits d’essai a révélé la présence de plusieurs impuretés de poids

moléculaire supérieur à celui du n-propanol, en référence aux temps de rétention plus longs (7,176, 7,981, 9,270 et 9,844 min).

Au regard de ces résultats, une démarche d’identification des impuretés a été engagée (Annexe 4), et un nouvel essai d’irritation avec les deux qualités de n-propanol a été réalisé pour établir une relation de causalité éventuelle entre les résultats obtenus et les impuretés dans l’alcool. Cet essai n’a été réalisé qu’avec la concentration d’alcool de 60% p/p, s’agissant d’une des 3 concentrations ayant donnée une cytotoxicité significative sur les épidermes. Comme pour les autres produits d’essais, la teneur en n-propanol (qualité réactif de laboratoire) dans le produit nouvellement formulé a été vérifiée comme étant égale à la concentration théorique à moins de 5% près (59,7%, soit -0,5% de la concentration recherchée).

Les résultats sont présentés dans le tableau 40 ci-dessous.

Tableau 40 : Test d’irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM - traitement par deux qualités différentes de n-propanol

n-propanol à 60%	Viabilité moyenne relative *
Qualité produits d’essai ¹	42,4 ± 11,4
Qualité réactif de laboratoire ²	36,3 ± 8,4

% de viabilité cellulaire moyenne (± écart type) de 3 épidermes traités, % relatif par rapport au témoin négatif

¹ PROPANOL - BRABANT Global Solvant

² Propane-1-ol pour la chromatographie en phase liquide LiChrosolv® - Merck

Dans cet essai, les viabilités des épidermes étaient significativement impactées, sans différence significative liée à la qualité de l’alcool. L’hypothèse de causalité entre les résultats obtenus avec les solutions de n-propanol et la présence d’impuretés a donc été rejetée.

Une autre hypothèse investiguée en relation avec les produits d’essai a porté sur l’impact possible des différences de volatilité des 3 alcools, le n-propanol étant l’alcool le moins volatil des trois (tableau 41).

Tableau 41 : Profils de volatilité de l’éthanol, isopropanol et n-propanol

	éthanol	isopropanol	n-propanol
Température d’ébullition	78 – 78,5 °C	82 à 83 °C	97,1 °C
Pression de vapeur à 20°C	5,9 kPa	4,2 kPa	1,94 kPa
Volatilité*	très volatile	volatile	modérément volatile

* classification basée sur la pression de vapeur (P exprimée en Pascal) proposée par l’INRS (P<5: très peu volatil ; 5<P<1000 modérément volatil; 1000<P<5000: volatil; P>5000: très volatil) (INRS 2012).

Un nouvel essai d’irritation a donc été réalisé avec les 3 alcools en effectuant un traitement en conditions occlusives (fermeture des inserts par du Parafilm juste après l’administration du traitement), pour mettre en évidence un quelconque effet occulté en relation avec l’évaporation des alcools. Pour cet essai, les concentrations choisies étaient les deux concentrations minimale et maximale d’essai (60 et 85 % p/p). Les résultats sont présentés dans le tableau 42 ci-dessous.

Tableau 42 : Test d’irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM – traitement en conditions occlusives par des solutions d’alcool à 60 ou 85% p/p.

	Viabilité moyenne relative*	
	60 % p/p	85% p/p
Ethanol	70,8 ± 5,6	66,7 ± 10,2
Isopropanol	71,3 ± 4,3	76,1 ± 23,4
n-propanol	32,9 ± 6,4	55,7 ± 14,6

* % de viabilité cellulaire moyenne (± écart type) de 3 épidermes traités, % relatif par rapport au témoin négatif

Quel que soit l’alcool, le traitement en conditions occlusives a conduit à une viabilité moyenne des épidermes inférieure à celle obtenue en conditions non occlusives (figures 17 & 18), sans toutefois modifier de manière significative les profils de réponse. En effet, à 60 et 85%, les viabilités des RhE pour l’éthanol et l’isopropanol étaient encore nettement supérieures à 50%, tandis que le traitement avec 60% p/p de n-propanol a réduit significativement les viabilités des épidermes, avec une viabilité moyenne inférieure à 50%. À 85% p/p de n-propanol, la viabilité était légèrement supérieure à 50%. Les résultats de cet essai ne supportent pas l’hypothèse de résultats différents entre les alcools en raison de différence de volatilité.

Une autre hypothèse investiguée était en relation avec la spécificité du modèle d’épiderme humain reconstitué utilisé. Afin de s'assurer que l'effet cytotoxique observé avec le n-propanol n'était pas spécifiquement lié à EpiSkin™ SM, une expérimentation indépendante a été réalisée à l'aide d'un autre modèle de RhE. De nouvelles solutions de n-propanol ayant été formulées pour cet essai, les concentrations ont été vérifiées et confirmées égales aux concentrations théoriques recherchées à moins de 5% près (concentrations dosées de 60,96, 71,32, 79,53 et 85,83% p/p, soit +1,6, +1,89, -0,59 et +0,98% des concentrations théoriques de 60, 70, 80 et 85% p/p)

La figure 20 présente les résultats du test d’irritation *in vitro* réalisé sur Vitroderm.

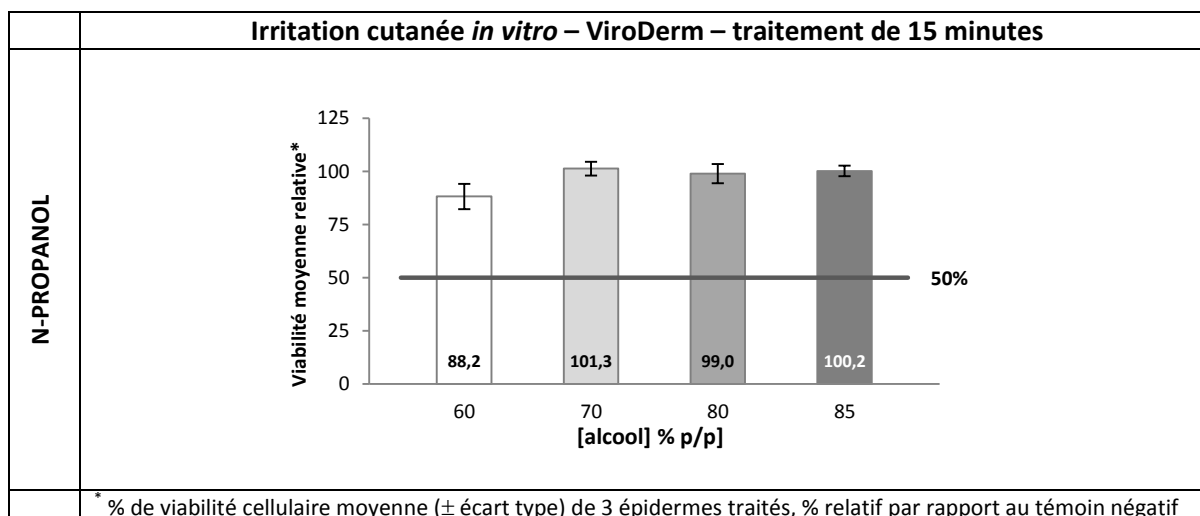


Figure 20 : Test d'irritation cutanée *in vitro* sur VitroDerm - traitement par du n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p

Dans cet essai, le n-propanol, quelle que soit sa concentration, était sans impact sur les viabilités relatives des épidermes, avec des moyennes proches de 100%. Les résultats obtenus dans cet essai sont en faveur d’un manque de spécificité du premier modèle d’épiderme utilisé pour cet alcool.

III.2.1.1.2. Conclusion sur les essais d’irritation avec les alcools seuls

L’objectif de ces essais était d’identifier les différences possibles entre les 3 alcools et/ou entre différentes concentrations d’alcool comprises entre 60 et 85% p/p en termes d’irritation cutanée appréciée par le test *in vitro* selon la méthodologie de l’OCDE No 439.

Dans les études réalisées, l’absence connue de propriétés irritantes pour la peau de l’éthanol et de l’isopropanol a été confirmée. En revanche, les premiers résultats obtenus avec le n-propanol sur le modèle d’épiderme EpiSkinTM SM ont montré un niveau de cytotoxicité significatif pour les concentrations à 60, 70 ou 80% p/p, avec des valeurs moyennes proches de 40% (aucun impact significatif n’a été observé à 85% p/p). Les études complémentaires réalisées (avec deux qualités différentes de n-propanol suite à l’identification d’impuretés, et essai en conditions occlusives en raison de propriétés volatiles différentes des alcools) ont permis de rejeter les hypothèses d’implication des impuretés du n-propanol dans les effets observés, et de différence de volatilité entre les 3 alcools. La réalisation du test d’irritation cutanée *in vitro* sur un autre modèle de RhE (ViroDerm) n’a pas reproduit les résultats obtenus avec EpiSkinTM SM. Considérant les données disponibles dans la littérature en faveur d’absence de propriétés irritantes pour la peau du n-propanol, il est raisonnable de conclure que les résultats cytotoxiques observés sur le modèle EpiSkinTM SM sont le résultat d’un

manque de spécificité de ce modèle pour cet alcool. Des investigations complémentaires restent cependant nécessaires pour expliquer les observations obtenues, l’effet du n-propanol sur le modèle EpiSkinTM SM lorsqu’il est dilué à la concentration de 85% p/p dans l’eau n’ayant pas donné les mêmes résultats, avec une absence d’impact significatif sur la viabilité des épidermes.

Considérant les résultats de viabilités impactées comme un manque de spécificité du modèle EpiSkinTM SM vis-à-vis du n-propanol, les résultats obtenus sont en faveur de l’absence de propriétés irritantes pour la peau des 3 alcools. Par ailleurs, aucun effet lié à la concentration n’a été mis en évidence.

III.2.1.1.3. Solutions hydro-alcooliques (SHA) et mélange de co-formulants (CoF₁₀)

Pour déterminer la teneur en co-formulants à utiliser pour formuler les SHA à tester, un essai préalable sur le mélange de co-formulants seuls (CoF₁₀ : teneur cumulée totale de 10% p/p en solution dans le DMSO) a été réalisé pour évaluer la cytotoxicité induite à différentes concentrations.

a) Mélange CoF₁₀

Les résultats de l’essai d’irritation cutanée *in vitro* mené sur une gamme de 5 concentrations différentes du mélange CoF₁₀ (dilutions au ½) sont présentés en figure 21 ci-dessous.

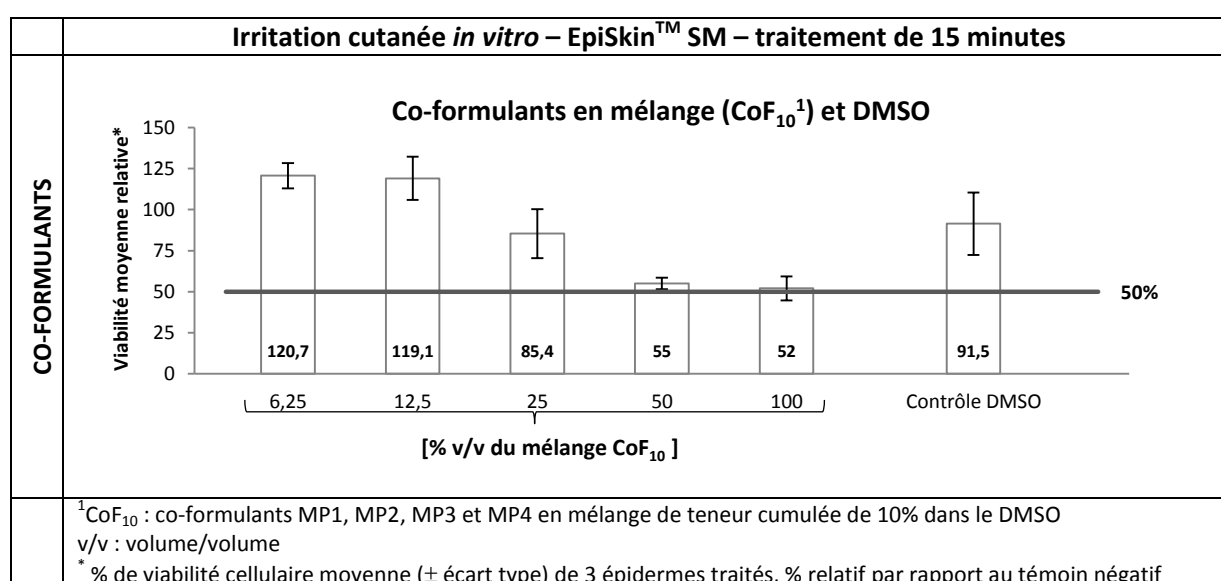


Figure 21 : Irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM - traitement par le mélange CoF₁₀

Le mélange CoF₁₀ appliqué pur ou dilué à 50% sur les épidermes humains reconstitués a entraîné une diminution de la viabilité cellulaire voisine de 50% (valeurs moyennes de 52 ± 7,3% et 55,0 ± 3,6%). Aux doses de 25 et 12,5% v/v du mélange de CoF₁₀, des valeurs respectives de viabilité moyenne de 85,5 ± 14,9% et de 119,1 ± 13,2 ont été obtenues.

Sur la base de ces résultats, la teneur maximale de 2,5 % de co-formulants, en tant que première dose identifiée sans effet notable sur la viabilité des RhE (25% de CoF₁₀ contiennent 2,5% de co-formulants) a été retenue pour formuler les SHA d’essai. Cependant, cette dose étant nettement supérieure à la quantité utilisée pour formuler les produits hydro-alcooliques commercialisés, des SHA avec 1,25% de co-formulants ont également été testés. Aux doses de 2,5 et 1,25% de co-formulants, ceux-ci étaient 2,72 et 1,36 fois supérieurs à la teneur utilisée pour formuler un produit hydro-alcoolique actuellement commercialisé par les Laboratoires Anios.

b) SHA ou solutions hydro-alcooliques

Comme pour les alcools seuls, les concentrations d’alcools dans les SHA d’essai ont été vérifiées par analyse chromatographique en phase gazeuse et ont toutes été confirmées comme égales à la concentration théorique souhaitée à moins de 5% près (tableau 43).

Tableau 43 : Concentrations en alcool dans les SHA d’essai pour le test d’irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM

	% p/p théorique	Concentration (% p/p) [Ecart par rapport au % théorique]		
		éthanol	isopropanol	n-propanol
SHA_CoF2,5 ¹	60	60,83 [+1,38]	60,64 [+1,07]	60,23 [+0,38]
	70	70,96 [+1,37]	72 [+2,86]	70,01 [+0,01]
	80	80,7 [+0,88]	81,62 [+2,03]	79,38 [-0,78]
	85	86,34 [+1,58]	86,35 [+1,59]	85,49 [+0,58]
SHA_CoF1.25 ¹	60	61,89 [+3,15]	59,91 [-0,15]	61,15 [+1,92]
	80	82,04 [+2,55]	81,07 [+1,34]	79,55 [-0,56]

¹SHA : solution hydro-alcoolique à base d’éthanol, isopropanol ou n-propanol en présence de 2,5% (SHA_CoF2,5) ou 1,25% p/p (SHA_CoF1.25) en teneur cumulée de co-formulants (mélange de MP1, MP2, MP3 et MP4)

Les graphes repris en figure 22 présentent les résultats du test d’irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM après traitement par des solutions hydro-alcooliques sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol, formulées avec 2,5 % p/p ou 1,25 % p/p de co-formulants.

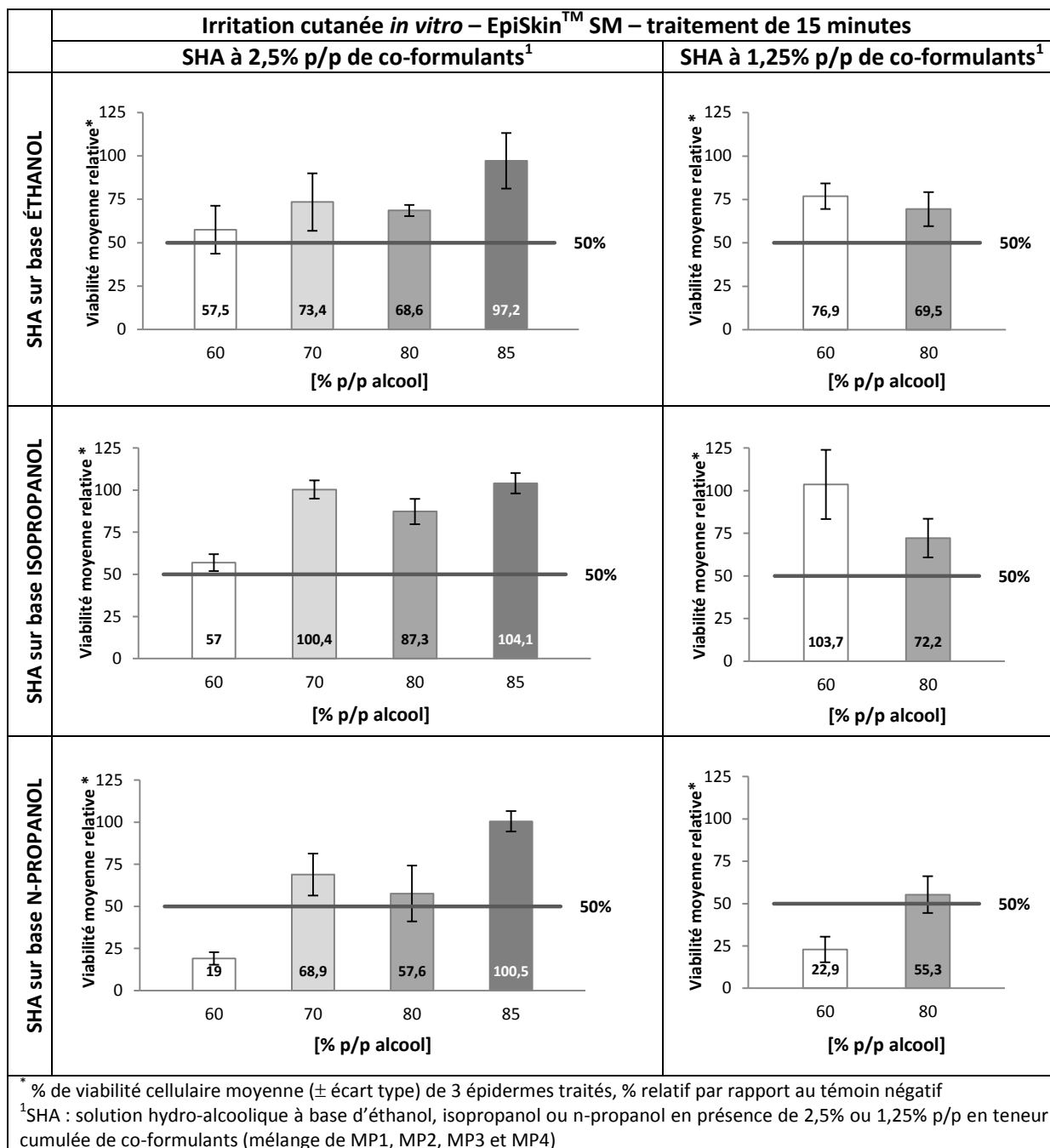


Figure 22 : Irritation cutanée *in vitro* sur EpiSkin™ SM - traitement par des solutions hydro-alcooliques à base de 60, 70, 80 et 85 % p/p d'éthanol, isopropanol ou n-propanol

Les viabilités relatives des épidermes reconstitués étaient toutes supérieures à 50% pour les SHA à base d'éthanol et d'isopropanol. La teneur en co-formulants dans les SHA n'a pas impacté le profil de réponse des épidermes pour les SHA à 80% d'alcool. En revanche, les viabilités obtenues avec les SHA à 60% d'alcool en présence de 1,25% de co-formulants étaient plus élevées que celles obtenues à 2,5% de co-formulants (76,9±7,3 versus 57,5±13,8

respectivement pour les SHA à base d’éthanol et $103,7 \pm 20,8$ *versus* 57 ± 5 respectivement pour les SHA à base d’isopropanol).

Pour les SHA à base de n-propanol, à l’exception de la concentration la plus faible à laquelle la viabilité des épidermes a été significativement impactée (valeur de l’ordre de 20%), les viabilités des épidermes reconstitués étaient toutes supérieures à 50%. La teneur en co-formulants dans les SHA à base de n-propanol n’a pas impacté le profil de réponse quelle que soit la concentration d’alcool.

Dans les essais complémentaires réalisés avec le n-propanol à des fins de compréhension des résultats obtenus sur les alcools seuls, le test réalisé sur le modèle de RhE VitroDerm incluait également, en produits d’essai, le n-propanol formulé en présence de 2,5% de co-formulants. Pour cet essai, la teneur en alcool dans les SHA formulés a également été confirmée comme égale à la concentration théorique souhaitée à moins de 5 % près (teneurs dosées de 59,51, 69,98, 79,55 et 84,74 % p/p, soit -0,82, -0,03, -0,56 et -0,31% des concentrations théoriques de 60, 70, 80 et 85% p/p).

La figure 23 présente les résultats de cet essai d’irritation sur VitroDerm.

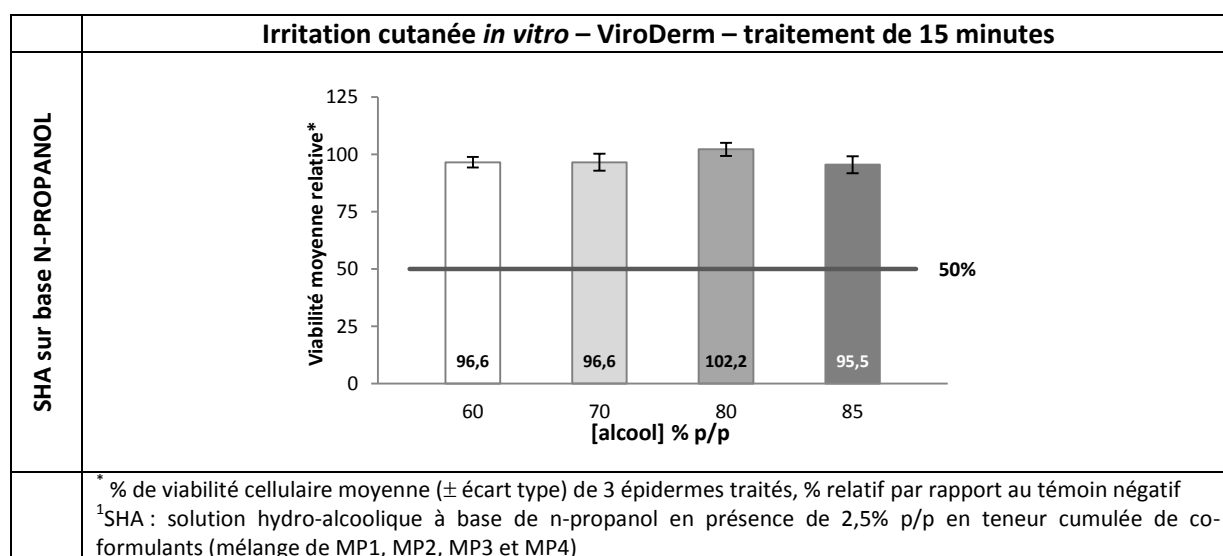


Figure 23 : Test d’irritation cutanée *in vitro* sur VitroDerm - traitement par des solutions hydro-alcooliques à base de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p

Dans cet essai réalisé avec le modèle de RhE VitroDerm, les SHA à base de n-propanol, quelle que soit la concentration en alcool, étaient sans impact sur les viabilités relatives des épidermes, avec des moyennes proches de 100%. Le résultat significatif obtenu à la concentration de 60% dans le SHA lorsque celui-ci était appliqué sur le modèle EpiSkinTM SM n’a pas été reproduit, suggérant également un manque de spécificité du premier modèle d’épiderme utilisé pour ce produit d’essai.

III.2.1.1.4. Conclusion sur les solutions hydro-alcooliques

Suite au traitement par des SHA sur base éthanol ou isopropanol, toutes les viabilités des épidermes humains reconstitués (EpiSkin™ SM) étaient supérieures à 50%. Les résultats obtenus ont varié en fonction de la teneur en alcool (60% *versus* 70, 80 et 85%) et de la teneur en co-formulants en présence de 60% d’alcool, suggérant une spécificité de réponse liée à la composition des mélanges testés.

Comme pour les alcools seuls, les SHA sur base n-propanol ont donné les moins bons résultats. Cependant, à l’exception de la concentration la plus faible (60%) à laquelle la viabilité des épidermes était significativement impactée (valeur moyenne de $\pm 20\%$), la présence de co-formulants a donné des viabilités des épidermes plus élevées comparativement au n-propanol seul. Par ailleurs, les mêmes produits d’essai (SHA avec 2,5% de co-formulants) testés sur un autre modèle d’épiderme (VitroDerm) n’ont entraîné aucun effet sur la viabilité des épidermes. Le résultat significatif obtenu à la concentration de 60% dans le SHA d’essai lorsque celui-ci était appliqué sur le modèle EpiSkin™ SM est donc vraisemblablement le résultat d’un manque de spécificité de ce modèle d’épiderme utilisé pour ce produit d’essai. Comme pour les alcools seuls, des investigations complémentaires restent nécessaires pour expliquer les observations obtenues, l’effet observé sur EpiSkin™ SM du n-propanol à 60 % en présence de co-formulants n’ayant pas été retrouvé lorsque la concentration d’alcool était augmentée.

Considérant les résultats de viabilités impactées comme un manque de spécificité du modèle EpiSkin™ SM, ainsi que la teneur en excès des co-formulants présents dans les SHA d’essai (près de 3 fois la quantité actuellement utilisé dans un produit déjà commercialisé pour les SHA avec 2,5% de co-formulants), les résultats obtenus sont en faveur de l’absence de propriétés irritantes pour la peau de ces produits.

III.2.1.2. Phototoxicité

III.2.1.2.1. Spectres UV/VIS

Avant la réalisation du test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU, les spectres d'absorption UV/VIS des 3 alcools (éthanol, isopropanol et n-propanol) et des 4 matières premières (MP1, MP2, MP3 et MP4 – co-formulants présents dans les solutions hydro-alcooliques ou SHA d'essai) ont été déterminés (Fig. 24), la réalisation du test de phototoxicité n'étant pertinente que pour les produits chimiques qui absorbent dans les longueurs d'ondes de l'UV/visible (220 à 1000 nm).

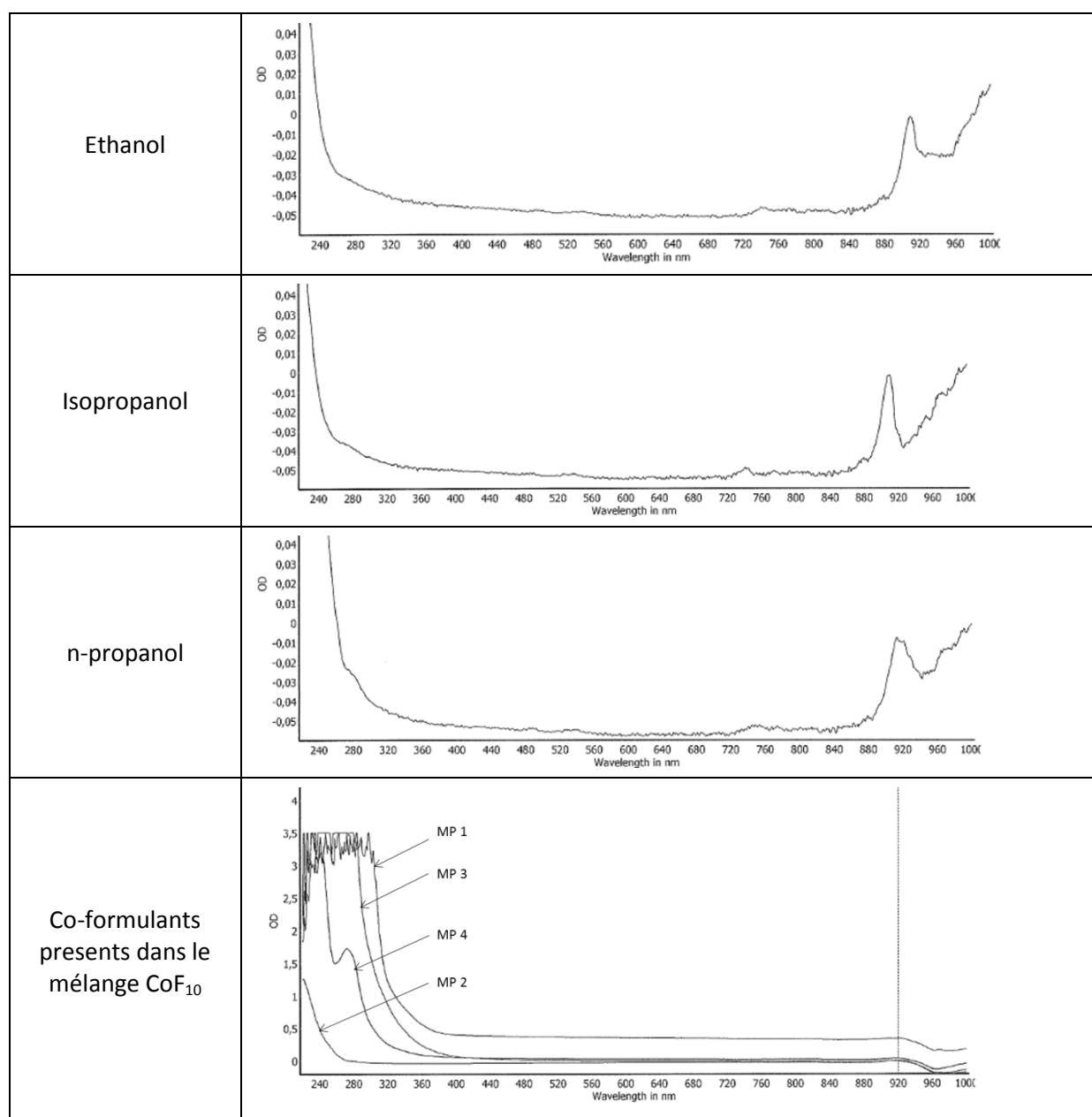


Figure 24 : Spectres d'absorption UV/VIS des alcools et matières premières (MP1, MP2, MP3 & MP4)

Comme attendu, les spectres d'absorption des 3 alcools n'ont pas montré d'absorbance dans l'UV/visible, avec des valeurs de densité optique (DO) quasiment nulles quelle que soit la longueur d'onde. Concernant les co-formulants MP1 à MP4, une faible absorbance a été observée dans les UVB/UVC avec des valeurs maximales de DO de 3,5 aux longueurs d'onde comprises entre 250 et 310 nm pour MP1, entre 220 et 290 nm pour MP3 et à 240 nm pour MP4. Pour MP2, l'absorbance était plus faible, avec une valeur de DO inférieure à 1,3 à 220 nm.

Les coefficients d'extinction molaire maximum ont été estimés à 0,99 pour MP1, 0,11 pour MP2 et 0,22 pour MP4. Ce coefficient n'a pas pu être calculé pour MP3 en raison de la donnée de poids moléculaire non communiquée par le fabricant.

III.2.1.2.2. Test *in vitro* 3T3 NRU-PT

Au regard des résultats de spectre d'absorption, les alcools seuls n'ont pas été testés dans l'essai 3T3 NRU-PT. Chacun des co-formulants isolément (MP1, MP2, MP3 et MP4), en mélange dans le DMSO (CoF₁₀) et en présence d'alcool (SHA) ont été testés.

Les essais ont été réalisés selon la ligne directrice de l'OCDE No 432, avec quelques modifications mineures sans conséquence sur la validité des études, ces modifications faisant suite à l'essai de validation du test mené dans le laboratoire (voir III.1.3.2.3 p. 134).

La dose d'irradiation appliquée dans tous les essais était de 5 J/cm².

Pour les différents essais réalisés, les critères de validité rappelés ci-dessous étaient remplis :

- sensibilité des cellules aux UV satisfaisante et cohérence avec les données historiques du laboratoire
- viabilité des témoins négatifs irradiés supérieure ou égale à 80 % de celle des témoins négatifs non irradiés
- moyenne des absorbances des cellules des témoins négatifs supérieure à 0,4
- phototoxicité confirmée du témoin positif (CPZ) :

CPZ	Irr+	Irr-
Cl ₅₀ (µg/mL)	[0,1 - 2,0]	[7,0 - 90,0]
PIF	> 6	

Les données correspondantes ne sont pas présentées, à l'exception des données de viabilité cellulaire relative des cultures irradiées (Irr+) comparativement aux cultures non irradiées (Irr-) des témoins solvant, et des résultats du témoin positif.

a) Co-formulants seuls

Les 4 co-formulants ont été testés séparément à la dose de 0,5 % v/v au cours d'un même essai. Les données de viabilité cellulaire des témoins solvants et résultats du témoin positif sont présentées dans le tableau 44 ci-dessous.

Tableau 44 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l'essai préliminaire de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 avec les 4 co-formulants

	Viabilité cellulaire relative ¹ (témoins solvants)	CI ₅₀ (Irr-) µg/mL	CI ₅₀ (Irr+) µg/mL	PIF ²	MPE ³
Témoin positif (chlorpromazine)	87	24,67	0,55	44,929	0,4
MP1	86	--			
MP2	91				
MP3	98				
MP4	76				

¹ % moyen (± écart type) de viabilité cellulaire des cultures irradiées (Irr+) comparativement à la viabilité des cultures non irradiées (Irr-)

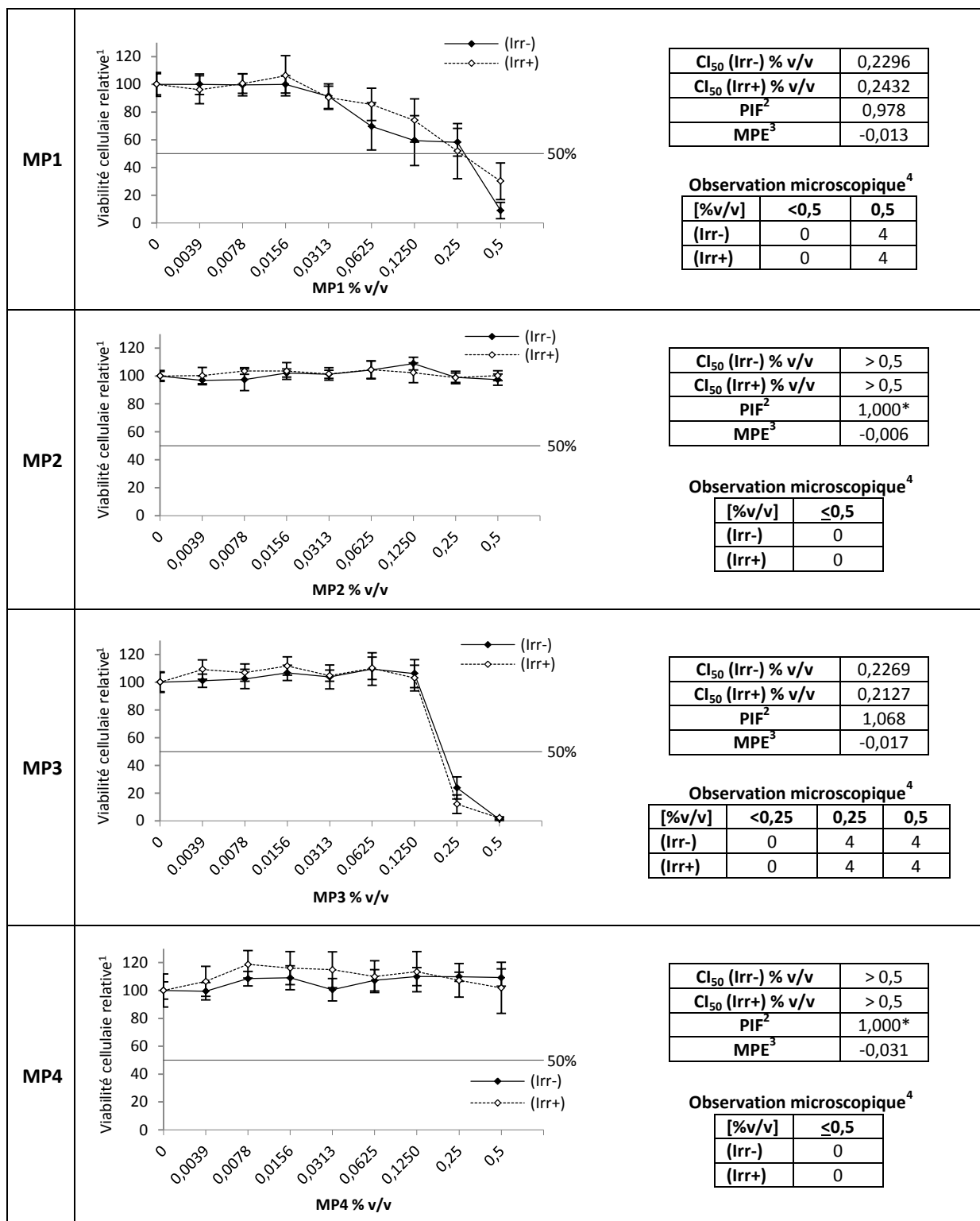
²PIF (facteur de photo-irritation) : CI₅₀ (Irr-)/ CI₅₀ (Irr+)

³MPE (photo-effet moyen)(comparaison point par point des courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation)

Dans cet essai, les données du témoin positif étaient conformes, confirmant la sensibilité des cultures d'essai.

Concernant les viabilités cellulaires relatives des cultures irradiées des témoins négatifs (contrôles solvants), les valeurs étaient toutes conformes (supérieures à 80%) à l'exception de celle de la plaque ayant reçu la MP4 (valeur de 76%). Cette valeur était proche du seuil minimal requis de 80%, les données d'absorbance avec et sans irradiation étaient cohérentes avec les données historiques des témoins négatifs du laboratoire, et l'évaluation de la toxicité au microscope n'a pas identifié de dommages cellulaires. L'écart a donc été considéré comme acceptable et sans impact sur la qualité et l'intégrité de l'étude.

Les résultats de l'essai préliminaire pour chacun des co-formulants, restitués sous forme de courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation sont présentées avec les valeurs de PIF (facteur de photo-irritation) et MPE (photo-effet moyen) correspondantes. Les données de l'examen microscopique direct pour évaluer la toxicité sont également présentées (Fig. 25).



¹ % moyen (± écart type) de viabilité cellulaire comparativement à la viabilité du témoin solvant (essai en *sexuplate*)

² PIF (facteur de photo-irritation) : CI_{50} (Irr-)/ CI_{50} (Irr+) (Irr- : cultures non irradiées, Irr+ : cultures irradiées)

³ MPE (photo-effet moyen) : comparaison point par point des courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation

⁴ échelle de 1 à 4 : 0 : aucun dommage cellulaire ; 1 : dommages morphologiques légers mais significatifs, avec réduction de la densité cellulaire ; 2 : dommages morphologiques importants avec réduction de la densité cellulaire ; 3 : perte de la forme cellulaire et/ou perte de 50 % du tapis cellulaire ; 4 : totalité des cellules traitées mortes, lysées ou détachées

* valeur indicative en raison de l'absence de valeur de CI_{50}

Figure 25 : Essai préliminaire de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 – traitement par les co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4

Dans cet essai, les profils de toxicité étaient les mêmes pour les deux matières premières (MP1 et MP3) quelle que soit la condition d'essai ((Irr+) et (Irr-)). L'évaluation de la cytotoxicité par la méthode au rouge neutre a montré une relation dose-effet dans les deux conditions d'essai sur les 5 ou 3 plus fortes concentrations, avec une cytotoxicité d'autant plus importante que la dose était élevée. Les valeurs de CI_{50} résultantes, avec et sans irradiation, étaient du même ordre de grandeur (0,23 & 0,24 % v/v pour MP1 et 0,22 ou 0,21 % v/v pour MP3), donnant des valeurs de PIF proches de 1 (0,978 pour MP1 et 1,068 pour MP3). Les valeurs de MPE étaient nulles. L'examen microscopique direct était bien corrélé aux mesures de viabilité par la méthode au rouge neutre, avec une forte toxicité du produit d'essai à la plus forte dose testée pour MP1 et aux deux plus fortes doses pour MP3 (score maximum de 4). Aux concentrations inférieures, aucun dommage cellulaire n'était visible au microscope.

Pour les 2 autres MP (MP2 et MP4), dans les conditions d'essai (Irr+) et (Irr-), aucune cytotoxicité n'a été observée quelles que soient la dose testée et la méthode d'évaluation utilisée (observation microscopique ou détermination des viabilités cellulaires par la technique au rouge neutre). Les viabilités des cultures étaient toutes voisines de 100%. En absence de CI_{50} , la valeur du PIF a été estimée égale à 1. Les valeurs de MPE étaient nulles.

En résumé, aucun effet lié à l'irradiation des cultures n'a été retrouvé dans cet essai quel que soit le produit d'essai et la dose. Bien que l'essai préliminaire ne soit théoriquement pas destiné à conclure sur le potentiel phototoxique d'un produit d'essai, ces résultats non ambigus avec des profils de cytotoxicité identiques dans les conditions irradiées et non irradiées sont favorables à l'absence de potentiel phototoxique des produits d'essai et la réalisation d'un essai définitif pour confirmer ces résultats n'a pas été jugée pertinente.

b) Mélange de co-formulants

En complément des essais menés sur chacun des co-formulants, un essai de phototoxicité a été réalisé sur les co-formulants en mélange (teneur de chaque MP proportionnelle à celle utilisée pour formuler un produit hydro-alcoolique type déjà commercialisé, avec une teneur cumulée totale de 10%).

Les données de viabilité cellulaire du témoin solvant et les résultats du témoin positif sont présentées dans le tableau 45 ci-dessous.

Tableau 45 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l'essai préliminaire de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 avec le mélange CoF₁₀

	Viabilité cellulaire relative ¹ (témoins solvants)	CI_{50} (Irr-) µg/mL	CI_{50} (Irr+) µg/mL	PIF ²	MPE ³
Témoin positif (chlorpromazine)	89	37,72	0,4103	102,487	0,485
CoF ₁₀	73	--			

¹ % moyen (± écart type) de viabilité cellulaire des cultures irradiées (Irr+) comparativement à la viabilité des cultures non irradiées (Irr-)

²PIF (facteur de photo-irritation) : CI_{50} (Irr-)/ CI_{50} (Irr+)

³MPE (photo-effet moyen) : comparaison point par point des courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation

Dans cet essai, les données du témoin positif étaient conformes, confirmant la sensibilité des cultures d'essai.

Concernant les contrôles négatifs (témoins solvants) de la plaque utilisée pour le mélange CoF₁₀, la viabilité cellulaire relative des cultures irradiées était de 73%, légèrement inférieure aux 80% requis pour valider l'essai. Cette valeur était associée à une valeur de DO corrigée légèrement inférieure à la valeur limite de 0,4 attendue en termes de critère de validité dans les cultures irradiées (0,360), *versus* une valeur de 0,493 dans les cultures non irradiées. Cependant, la valeur d'absorbance de 0,360 se situant dans l'intervalle des données historiques des témoins négatifs du laboratoire, et l'évaluation de la toxicité au microscope n'ayant identifié aucun dommage cellulaire, les écarts ont été considérés comme acceptables.

Les résultats de l'essai préliminaire pour le mélange de co-formulants CoF₁₀ sont présentés dans la figure 26 ci-après (courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation, valeurs de PIF et MPE et données de l'examen microscopique direct).

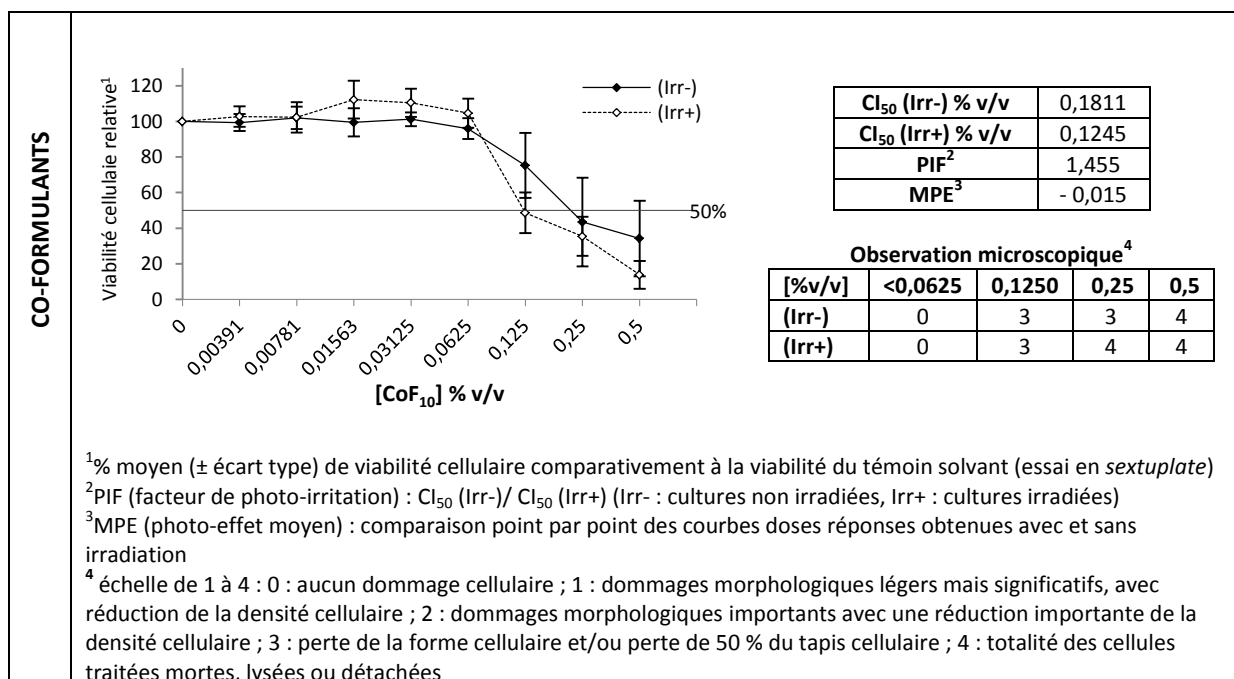


Figure 26 : Essai préliminaire de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 - traitement par le mélange CoF₁₀

Dans cet essai, les profils de toxicité étaient les mêmes pour les deux conditions d'essai ((Irr+) et (Irr-)). L'évaluation de la cytotoxicité par la méthode au rouge neutre a montré une relation dose-effet sur les 4 plus fortes concentrations, avec une cytotoxicité d'autant plus importante que la dose était élevée. Aux doses inférieures ou égales à 0,0625 % v/v, aucune cytotoxicité n'a été retrouvée. La valeur de Cl₅₀ résultante était un peu plus élevée pour les cultures non irradiées comparativement aux cultures irradiées (0,18 & 0,12 % v/v respectivement), donnant un facteur de photo-irritation légèrement supérieur à 1 (1,455)

mais inférieur au seuil de 2 correspondant à un effet probablement phototoxique. L'examen microscopique direct était bien corrélé aux mesures de viabilité par la méthode au rouge neutre, avec une forte toxicité du produit d'essai aux 3 plus fortes doses d'essai (scores de 3 ou 4), et l'absence de dommage cellulaire visible aux concentrations inférieures ou égales à 0,0625% v/v.

Bien que l'essai préliminaire ne soit pas spécifiquement destiné à évaluer le potentiel phototoxique, ces premiers résultats sont en faveur de l'absence de potentiel phototoxique du mélange de co-formulants.

Les résultats de cet essai ont par ailleurs été utilisés pour déterminer la gamme de dilutions du mélange CoF₁₀ pour l'essai définitif, reserrée autour des Cl₅₀ estimées.

Un pas de dilution plus petit (1,25) a été utilisé pour l'essai définitif, donnant des concentrations testées comprises entre 0,06554 et 0,3125 % v/v.

Les données de viabilité cellulaire du témoin solvant et les résultats du témoin positif pour les deux cultures d'essai, présentées dans le tableau 46, étaient conformes aux critères de validité.

Tableau 46 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l'essai définitif de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 avec le mélange CoF₁₀

		Viabilité cellulaire relative ¹ (témoins solvants)	Cl ₅₀ (Irr-) µg/ml	Cl ₅₀ (Irr+) µg/ml	PIF ²	MPE ³
TP ⁴	Culture 1	103	54,29	1,405	38,665	0,437
	Culture 2	86	49,97	1,5960	31,325	0,465
CoF ₁₀	Culture 1	93	--			
	Culture 2	96				

¹ % moyen (± écart type) de viabilité cellulaire des cultures irradiées (Irr+) comparativement à la viabilité des cultures non irradiées (Irr-)

² PIF (facteur de photo-irritation) : Cl₅₀ (Irr-)/ Cl₅₀ (Irr+)

³ MPE (photo-effet moyen) : comparaison point par point des courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation

⁴ TP : témoin positif - chlorpromazine

Les résultats de l'essai définitif (courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation, valeurs de PIF et MPE et données de l'examen microscopique direct) sont repris en figure 27.

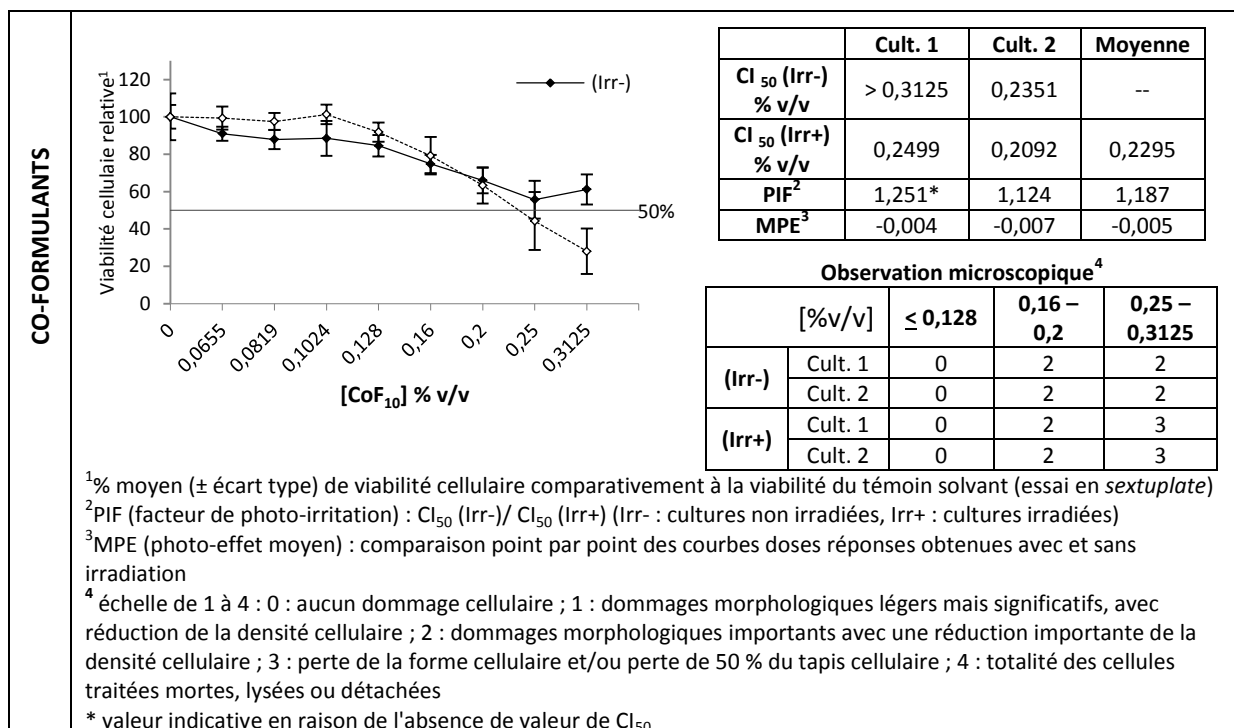


Figure 27 : Essai définitif de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 - traitement par le mélange CoF₁₀

Dans cet essai, en absence d'irradiation, une légère relation dose-effet a été observée, avec des viabilités cellulaires d'autant plus élevées que la concentration d'essai était faible. Les viabilités étaient toutes supérieures à 50% à l'exception d'une mesure à 47,62% à la dose de 0,25 % v/v dans une des deux cultures (donnée non présentée). Aux concentrations de 0,1 % v/v ou moins, les viabilités cellulaires étaient toutes supérieures à 80%.

Avec irradiation, une relation dose-effet a été observée pour les concentrations allant de 0,1 à 0,3125 % v/v, avec une viabilité cellulaire inversement proportionnelle à la concentration, et des valeurs moyennes de viabilité cellulaire inférieures à 50% aux deux plus fortes concentrations de 0,25 et 0,3125 % v/v (44,2 et 28% de viabilité respectivement). En dessous de 0,1 % v/v, les viabilités étaient toutes supérieures à 70%.

Les données de l'examen microscopique direct étaient cohérentes avec les mesures de viabilité, avec une toxicité visible du mélange CoF₁₀ observée aux concentrations de 0,16 % v/v ou plus, cotée à 2 pour les cultures non irradiées à partir de cette dose, et à 2 et 3 pour les cultures irradiées (2 aux doses de 0,16 et 0,2 puis 3 aux doses de 0,25 et 0,3125). Aucune toxicité n'était visible pour les 4 plus faibles concentrations.

La différence d'effet obtenue entre les deux conditions (Irr+) et (Irr-) était non biologiquement significative, telle qu'illustrée par les valeurs de PIF voisines de 1 (1,251 & 1,124) et de MPE quasiment nulles pour les deux cultures.

Les résultats de cet essai ont confirmé les résultats de l'essai préliminaire en faveur de l'absence de potentiel phototoxique du mélange de co-formulants testé.

Par ailleurs, ces résultats ont permis de fixer les teneurs de co-formulants à 2 % p/p dans les SHA pour les essais de phototoxicité avec ces produits, pour que la quantité de co-formulants à la dose d'essai des SHA (testés à 1%) soit de 0,2%, 1^{ère} dose de co-formulants entraînant une cytotoxicité inférieure à 50%. Des SHA avec 1% de co-formulants ont également été testés, pour disposer de SHA dont la teneur en co-formulants n'entraînait aucun effet observé sur la viabilité cellulaire des cultures d'essai.

c) Produits hydro-alcooliques

4 concentrations ont été testées (60, 70, 80 et 90% p/p) pour chaque alcool, formulé avec 1 ou 2 % p/p de co-formulants.

Les concentrations d'alcools dans les produits d'essai ont été vérifiées par analyse chromatographique en phase gazeuse et ont toutes été confirmées comme égales à la concentration théorique à moins de 5% près (données non présentées).

Les 24 produits hydro-alcooliques ont été testés à 1% v/v sans gamme de dilution, lors de 3 essais indépendants. Aucun essai préliminaire préalable n'a été réalisé.

Dans ces conditions d'essai, les doses d'alcool administrées étaient comprises entre 5300 et 7600 µg/mL, soit des doses supérieures aux 1000 µg/mL recommandés en dose maximale dans la ligne directrice de l'OCDE No 432 (tableau 47). Cependant, le dépassement de cette dose n'a pas été considéré préjudiciable pour l'exploitation des résultats, au regard des mesures de pH et osmolarités effectués sur les produits d'essais et des niveaux de cytotoxicité acceptables obtenus lors de la réalisation des essais.

Tableau 47 : Doses d'alcool (µg/mL) dans l'essai de phototoxicité *in vitro* (traitement à 1%)

	% p/p théorique alcool dans les SHA et teneur en co-formulants (1 ou 2% p/p)							
	60		70		80		90	
Teneur en co-formulants	1%	2%	1%	2%	1%	2%	1%	2%
Ethanol (µg/mL) ¹	5302	5275	6060	5975	6798	6804	7596	7608
Isopropanol (µg/mL) ¹	5385	5303	5917	6081	6755	6792	7571	7559
n-propanol (µg/mL) ¹	5269	5268	6087	6009	6806	6784	7530	7601

¹ doses calculées au plus juste à partir de la densité mesurée des produits d'essai et des teneurs en alcool dosées dans ces produits

Les données de viabilité cellulaire du témoin solvant et les résultats du témoin positif pour les deux cultures d'essai sont présentées dans le tableau 48.

Tableau 48 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l'essai définitif de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 avec les solutions hydro-alcooliques

			Viabilité cellulaire relative ¹	Cl ₅₀ (Irr-) µg/mL	Cl ₅₀ (Irr+) µg/mL	PIF ²	MPE ³	
SHA-sur base éthanol	TP ⁴	Culture 1	83	26,85	1,407	19,113	0,327	
		Culture 2	123	65,06	1,3270	49,049	0,600	
	Témoin solvant	Culture 1	83					
		Culture 2	133					
SHA-sur base isopropanol	TP ⁴	Culture 1	102	36,75	1,55	23,723	0,457	
		Culture 2	197	31,76	1,2890	24,656	0,604	
	Témoin solvant	Culture 1	78					
		Culture 2	98					
SHA-sur base n-propanol	TP ⁴	Culture 1	87	43,14	1,677	25,931	0,336	
		Culture 2	84	74,88	1,8930	39,63	0,366	
	Témoin solvant	Culture 1	87					
		Culture 2	77					

SHA : solution hydro-alcoolique

¹ % moyen (± écart type) de viabilité cellulaire des cultures irradiées (Irr+) comparativement à la viabilité des cultures non irradiées (Irr-)

² PIF (facteur de photo-irritation) : Cl₅₀ (Irr-)/ Cl₅₀ (Irr+)

³ MPE (photo-effet moyen) : comparaison point par point des courbes doses réponses obtenues avec et sans irradiation

⁴ TP : témoin positif - chlorpromazine

Dans ces 3 essais, la sensibilité des cultures cellulaires a été confirmée, avec des résultats des témoins positifs conformes.

Pour les plaques ayant reçu les SHA sur base isopropanol et n-propanol, une des deux cultures des témoins solvants a présenté un niveau de viabilité relative des cultures irradiées légèrement inférieur à 80% (78 et 77%). Cependant, ces % étaient proches des 80% requis, les données d'absorbance correspondantes avec et sans irradiation étaient cohérentes avec les données historiques des témoins négatifs du laboratoire, et l'évaluation de la toxicité au microscope n'a pas identifié de dommage cellulaire visible. Ces écarts ont donc été considérés comme acceptables.

Les résultats des essais, restitués en termes de viabilité moyenne relative des cultures irradiées (Irr+) comparativement à celle des cultures non irradiées à (Irr-) sont présentés dans le tableau 49.

Tableau 49 : Viabilité moyenne relative des cultures irradiées (Irr+) comparativement aux cultures non irradiées (Irr-) dans l'essai de phototoxicité *in vitro* sur cellules BALB/c 3T3 avec les solutions hydro-alcooliques

		Viabilité cellulaire relative ¹ des cultures irradiées					
Type de SHA	% p/p alcool	SHA CoF ₂			SHA CoF ₁		
		Culture 1	Culture 2	moyenne	Culture 1	Culture 2	moyenne
SHA-sur base éthanol	60	93,79	105,85	99,82 ± 8,53	102,56	99,05	100,81 ± 2,48
	70	94,92	102,89	98,90 ± 5,64	100,52	98,79	99,66 ± 1,22
	80	94,01	107,10	100,55 ± 9,26	95,92	109,22	102,57 ± 9,40
	90	97,55	109,06	103,30 ± 8,14	99,13	109,80	104,46 ± 7,54
SHA-sur base isopropanol	60	95,31	79,90	87,60 ± 10,90	100,96	86,60	93,78 ± 10,16
	70	99,42	81,31	90,37 ± 12,81	106,43	91,71	99,07 ± 10,41
	80	100,39	85,84	93,12 ± 10,29	100,00	94,29	97,14 ± 4,04
	90	96,50	78,96	87,73 ± 12,40	90,26	93,77	92,01 ± 2,48
SHA-sur base n-propanol	60	129,77	92,05	110,91 ± 26,67	102,50	89,06	95,78 ± 9,50
	70	116,01	91,87	103,94 ± 17,07	96,03	112,37	104,20 ± 11,56
	80	104,76	90,43	97,60 ± 10,13	96,44	111,46	103,95 ± 10,62
	90	102,88	109,91	106,40 ± 4,97	88,80	97,27	93,03 ± 5,99

¹ % moyen (± écart type) de viabilité cellulaire relative des cultures irradiées comparativement à la viabilité des cultures non irradiées (essais en *sexuplicate* – 2 cultures)

SHA : solution hydro-alcoolique

CoF₁ / CoF₂ : co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange, de teneur cumulée de 1 ou 2% p/p dans la formule des SHA testés

Pour les 3 essais, dans les deux conditions d'essai (avec et sans irradiation), aucun dommage cellulaire n'était visible à l'examen microscopique direct (données non présentées). L'évaluation de la cytotoxicité en utilisant la méthode au rouge neutre a confirmé les observations microscopiques, avec une viabilité cellulaire voisine de 100% quels que soient le produit d'essai et la condition d'essai, donnant des valeurs de viabilité moyenne relative des cultures (Irr+) comparativement à celle des cultures à (Irr-) voisines de 100 .

Dans les conditions d'essai, aucune phototoxicité n'a été révélée. Les données sont en faveur de l'absence de potentiel phototoxique des différentes solutions hydro-alcooliques, quel que soit le type d'alcool (éthanol, isopropanol, n-propanol), sa concentration (doses d'essai de l'ordre de 5300 µg/mL à 7600 µg/mL, soit 114 mM à 165 mM pour l'éthanol, et 88 à 126 mM pour l'isopropanol et le n-propanol) et la teneur en co-formulants (1 ou 2% p/p).

III.2.2. Génotoxicité

L'objectif des essais réalisés était de faire une évaluation comparative de la génotoxicité des 3 alcools couramment utilisés dans les produits d'hygiène des mains en utilisant des méthodes *in vitro*. Le test d'Ames et le test du micronoyau ont été réalisés selon les lignes directrices de l'OCDE No 471 "Essai de mutation réverse sur des bactéries» et No 487 « Test du micronoyau *in vitro* sur cellules de mammifères » pour évaluer les propriétés de mutation génique et chromosomique. Des essais complémentaires de dommage à l'ADN *in vitro* ont également été réalisés avec le test des comètes.

III.2.2.1. Test d’Ames

Le test d’Ames a été réalisé sur des souches de *S. typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100 et TA102, souches recommandées dans l’OCDE No 471).

Les 3 alcools (éthanol, isopropanol et n-propanol) en solution dans l’eau (alcools seuls) ou formulés en présence de co-formulants (SHA ou solutions hydro-alcooliques) ont été testés. 6 concentrations différentes de chaque alcool, visant à encadrer les concentrations usuellement rencontrées dans les produits d’hygiène des mains, ont été testées (60, 70, 75, 80, 85 et 90%). Les concentrations d’alcools dans les produits d’essai ont été vérifiées par analyse chromatographique en phase gazeuse et ont toutes été confirmées comme égales à la concentration théorique à moins de 5% près (données non présentées).

En raison du nombre important de produits d’essai, plusieurs essais indépendants ont été réalisés.

Pour chaque essai, les critères de validité rappelés ci-dessous étaient remplis :

- contrôles de stérilité conformes
- observation d’un taux correct de révertants spontanés pour les témoins négatifs,
- augmentation biologiquement significative du nombre de révertants en présence des témoins positifs,
- cohérence avec les données historiques du laboratoire.

Les doses d’alcool correspondant aux 100 µL de produit d’essai par boîte, étaient de l’ordre de 50 à 75 mg (tableau 50), soit 10 à 15 fois supérieures à la dose maximale de 5 mg/boîte préconisée dans la ligne directrice de l’OCDE No 471.

Tableau 50 : Doses d’alcool utilisées (mg/boîte) dans le test d’Ames

% p/p alcool théorique	EtOH	SHA_EtOH	IPA	SHA_IPA	n-pro	SHA_n-pro
60	54,31	55,87	53,33	53,96	54,08	54,32
90	73,87	74,93	74,26	73,23	75,42	75,51

Doses calculées au plus juste à partir de la densité mesurée des produits d’essai et des teneurs en alcool dosées dans ces produits

Cependant, les produits d’essai étaient bien solubilisés (absence de précipité) et aucune cytotoxicité significative n’a été observée, permettant l’exploitation des résultats.

Les résultats présentés sous forme de tableau reprennent, pour chaque souche bactérienne et chaque condition d’essai (avec et sans activation métabolique), les nombres moyens de révertants et rapports d’induction obtenus après traitement, avec la significativité statistique associée le cas échéant. Les données des témoins négatifs et témoins positifs sont également présentées. En revanche, les données relatives aux contrôles de stérilité, qui se sont révélées conformes comme attendu, ne sont pas présentées. L’appréciation de la cytotoxicité par examen de la pousse de fond et les données individuelles des boîtes ne sont pas non plus présentées mais mentionnées dans l’analyse des données chaque fois que nécessaire.

III.2.2.1.1. Alcools seuls

a) Ethanol

Les résultats du test d'Ames après traitement par l'éthanol à 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p, (doses d'alcool par boîte comprises entre 54,3 et 73,9 mg) sont présentés dans le tableau 51.

Tableau 51 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de *S. typhimurium* exposées à l'éthanol

<i>S. typhimurium</i>		TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	TP ³	165,7	19,5*	293,0	88,8*	188,7	12,0*	674,7	7,3*	808,0	5,3*	
	TN ⁴	8,5		3,3		15,7		92,5		151,7		
	% p/p éthanol	60	8,7	1,0	6,3	1,9	14,7	0,9	85,0	0,9	77,7	0,5
		70	6,0	0,7	6,0	1,8	14,3	0,9	74,7	0,8	41,0	0,3
		75	6,0	0,7	4,7	1,4	10,7	0,7	83,3	0,9	56,0	0,4*
		80	8,3	1,0	5,3	1,6	12,0	0,8	78,3	0,8	47,3	0,3*
		85	7,3	0,9	6,0	1,8	14,7	0,9	65,7	0,7*	89,3	0,6*
90	5,7	0,7	8,0	2,4	13,7	0,9	75,3	0,8	130,3	0,9		
Avec activation métabolique	TP ³	438	47,6*	186	27,4*	2106,7	84,3*	2197,3	21,1*	1258,7	5,0*	
	TN ⁴	9,2		6,8		25,0		104,3		249,3		
	% p/p éthanol	60	11,0	1,2	7,3	1,1	22,3	0,9	91,3	0,9	283,3	1,1
		70	9,3	1,0	10,0	1,5	28,7	1,1	99,0	0,9	294,0	1,2
		75	10,7	1,2	6,0	0,9	30,0	1,2	98,7	0,9	308,7	1,2
		80	9,7	1,1	8,0	1,2	25,3	1,0	105,7	1,0	286,7	1,2
		85	13,7	1,5	7,7	1,1	32,0	1,3	101,7	1,0	264,7	1,1
90	8,7	0,9	8,7	1,3	27,0	1,1	97,3	0,9	257,3	1,0		

¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 6 boîtes pour le témoin négatif, et 3 boîtes pour les autres conditions)
² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle

³ TP : témoin positif	Sans activation métabolique	Azide de sodium (1 µg/boîte)	9-amino-acridine (50 µg/boîte)	2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	Azide de sodium (1 µg/boîte)	Mitomycine C (0,125 µg/boîte)
	Avec activation métabolique	2-anthramine (2 µg/boîte)				Benzo[a]pyrène (2 µg/boîte)

⁴ TN: témoin négatif : eau distillée
* p<0,01 (Dunnets's t)

Quelles que soient la dose d'éthanol et les conditions d'essai (avec et sans activation métabolique), aucune augmentation biologiquement significative du nombre de révertants n'a été notée vis-à-vis des 5 souches de *Salmonella typhimurium*. Lorsque les rapports d'induction étaient supérieurs à 1, ils n'excédaient pas 2 pour les souches TA98, TA100 et TA102, ni 3 pour les souches TA1535 et TA1537, c'est-à-dire sans significativité biologique.

En absence d'activation métabolique, les 6 solutions d'éthanol ont toutes induit une diminution du nombre de révertants des souches TA98, TA100 et TA102, avec un effet plus marqué sur la souche TA102 et une significativité statistique (p<0,01) observée aux concentrations de 75 à 85 % p/p d'éthanol. Une diminution statistiquement significative a

également été observée après traitement par la solution d’éthanol à 85 % p/p pour la souche TA100. Ces effets, couplés à une légère cytotoxicité visualisée par une diminution de la pousse de fond, peuvent être attribués aux propriétés antimicrobiennes de l’éthanol.

En conclusion, l’éthanol aux doses testées de 54,3 à 73,9 mg/boîte (100 µL de solutions à 60, 70, 75, 80, 85 ou 90 % p/p) n’est pas mutagène dans le test d’Ames mené sur les souches de *S. typhimurium*. Ces résultats sont cohérents avec les données déjà publiées sur l’éthanol dans des essais de mutation génique sur bactéries avec et sans activation métabolique, où aucun signe de mutagenèse n’a été mis en évidence, à des doses d’essai équivalentes à celles mises en œuvre dans nos études ou même supérieures.

b) Isopropanol

Le tableau 52 présente les résultats du test d’Ames après traitement par l’isopropanol à 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p (doses d’alcool par boîte comprises entre 53,3 et 74,3 mg).

Tableau 52 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de *S. typhimurium* exposées à l’isopropanol

<i>S. typhimurium</i>		TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	TP ³	578,7	59,1*	281,3	44,7*	366,7	20,1*	732,0	6,1*	1356,0	7,4*	
	TN ⁴	9,8		6,3		18,2		120		184,3		
	% p/p isopropanol	60	5,0	0,5	14,7	2,3*	27,0	1,5	112,0	0,9	245,7	1,3*
		70	5,0	0,5	18,7	3,0*	31,3	1,7	120,3	1,0	244,0	1,3*
		75	4,7	0,5	13,0	2,1	25,0	1,4	105,0	0,9	247,0	1,3*
		80	5,7	0,6	16,3	2,6*	26,0	1,4	119,7	1,0	228,0	1,2
		85	6,3	0,6	13,0	2,1	25,7	1,4	126,3	1,1	240,7	1,3
		90	8,0	0,8	13,3	2,1	24,7	1,4	118,3	1,0	232,7	1,3
Avec activation métabolique	TP ³	690,7	86,3*	581,3	72,7*	2885,3	117,8*	3123,3	22,8*	1056,0	3,1*	
	TN ⁴	8,0		8,0		24,5		137,0		342,7		
	% p/p isopropanol	60	9,0	1,1	6,0	0,8	23,7	1,0	113,7	0,8	306,7	0,9
		70	7,0	0,9	7,3	0,9	20,7	0,8	115,0	0,8	325,7	1,0
		75	10,7	1,3	6,0	0,8	27,0	1,1	105,3	0,8*	288,0	0,8
		80	6,0	0,8	4,3	0,5	19,7	0,8	111,3	0,8	295,3	0,9
		85	8,3	1,0	4,7	0,6	22,7	0,9	118,7	0,9	312,0	0,9
		90	8,0	1,0	5,7	0,7	19,0	0,8	120,7	0,9	323,3	0,9

¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 6 boîtes pour le témoin négatif, et 3 boîtes pour les autres conditions)
² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle

³ TP : témoin positif		TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102
	Sans activation métabolique	Azide de sodium (1 µg/boîte)	9-amino-acridine (50 µg/boîte)	2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	Azide de sodium (1 µg/boîte)	Mitomycine C (0,125 µg/boîte)
	Avec activation métabolique	2-anthramine (2 µg/boîte)				Benzo[a]pyrène (2 µg/boîte)

⁴ TN: témoin négatif : eau distillée
* p<0,01 (Dunnett's t)

En présence d'activation métabolique, aucune augmentation significative du nombre de révertants n'a été notée, avec des rapports d'induction voisins ou égaux à 1.

En absence de système d'activation métabolique, une augmentation statistiquement significative ($p < 0,01$) du nombre moyen de révertants de la souche TA1537 a été observée suite au traitement par l'isopropanol à 70% p/p. Le taux d'induction obtenu était de 3, correspondant au seuil de significativité biologique, avec une moyenne de 18,7 révertants dénombrés sur les 3 boîtes traitées (données individuelles de 16, 15 et 25) *versus* 6,3 révertants en moyenne pour le témoin négatif. Aucun autre effet significatif n'a été observé.

En absence de relation dose-effet et afin de pouvoir conclure, un deuxième essai visant à confirmer le résultat obtenu avec l'isopropanol vis-à-vis de la souche TA1537 en absence d'activation métabolique a été effectué (tableau 53).

Tableau 53 : Essai complémentaire partiel de mutation réverse sur la souche TA1537 de *S. typhimurium* exposée à l'isopropanol

<i>S. typhimurium</i>		TA1537		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	Témoin Positif (9-amino-acridine - 50 µg/boîte)	219,7	39,9*	
	Témoin Négatif (eau distillée)	5,5		
	% p/p isopropanol	60	4,0	0,7
		70	6,3	1,1
		75	10,0	1,8
		80	7,3	1,3
		85	7,3	1,3
		90	5,3	1,0

¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 6 boîtes pour le témoin négatif, et 3 boîtes pour les autres conditions)
² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle
* $p < 0,01$ (Dunnett's t)

L'effet observé au cours du premier essai uniquement à la dose de 70% p/p n'a pas été reproduit dans un essai indépendant, où l'ensemble des rapports d'induction observés était nettement inférieur à 3.

En conclusion, l'isopropanol aux doses testées de 53,3 à 74,3 mg/boîte (100 µL de solutions à 60, 70, 75, 80, 85 ou 90 % p/p) n'est pas mutagène dans le test d'Ames mené sur les souches de *S. typhimurium*. Ces résultats complètent les données retrouvées dans la littérature avec l'isopropanol pour le test de mutation génique sur bactéries, dont les résultats négatifs étaient pour des doses d'alcool inférieures, n'excédant pas 5 mg/boîte.

c) n-propanol

Le tableau 54 présente les résultats du test d'Ames après traitement par le n-propanol à 60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p (doses d'alcool par boîte comprises entre 54,1 et 75,4 mg).

Tableau 54 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de *S. typhimurium* exposées au n-propanol

<i>S. typhimurium</i>		TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	TP ³	281,3	38,5*	157,7	33,6*	252,0	23,3*	508,7	5,6*	1173,3	7,7*	
	TN ⁴	7,3		4,7		10,8		90,5		153,3		
	% p/p n-propanol	60	6,7	0,9	4,7	1,0	17,0	1,6	83,7	0,9	150,7	1,0
		70	7,3	1,0	5,0	1,1	13,7	1,3	85,0	0,9	154,7	1,0
		75	8,0	1,1	5,3	1,1	15,0	1,4	78,0	0,9	157,7	1,0
		80	9,7	1,3	3,7	0,8	17,7	1,6	74,7	0,8	163,0	1,1
		85	8,0	1,1	6,0	1,3	13,3	1,2	79,0	0,9	160,3	1,0
90	7,3	1,0	4,7	1,0	16,3	1,5	86,0	1,0	144,7	0,9		
Avec activation métabolique	TP ³	470,7	65,4*	233,3	29,9*	2592,0	110,3*	2688,0	24,2*	938,7	3,8*	
	TN ⁴	7,2		7,8		23,5		111,0		245,5		
	% p/p n-propanol	60	7,3	1,0	5,7	0,7	33,3	1,4*	102,0	0,9	222,0	0,9
		70	6,0	0,8	7,3	0,9	30,7	1,3	98,0	0,9	209,3	0,9
		75	13,0	1,8	7,3	0,9	25,3	1,1	98,7	0,9	201,7	0,8
		80	11,0	1,5	9,3	1,2	32,3	1,4*	91,7	0,8	218,3	0,9
		85	9,3	1,3	8,0	1,0	29,0	1,2	93,0	0,8	218,7	0,9
90	11,0	1,5	7,7	1,0	28,0	1,2	98,7	0,9	213,0	0,9		

¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 3 boîtes à l'exception du témoin négatif (moyenne de 6 boîtes))
² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle

³ TP : témoin positif		TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102
	Sans activation métabolique	Azide de sodium (1 µg/boîte)	9-amino-acridine (50 µg/boîte)	2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	Azide de sodium (1 µg/boîte)	Mitomycine C (0,125 µg/boîte)
	Avec activation métabolique	2-anthramine (2 µg/boîte)				Benzo[a]pyrène (2 µg/boîte)

⁴ TN: témoin négatif : eau distillée
* p<0,01 (Dunnetts's t)

En absence d'activation métabolique, aucun effet significatif n'a été observé quelle que soit la souche bactérienne, avec des rapports d'induction tous inférieurs à 2, souvent proches ou égaux à 1.

En présence d'activation métabolique, aucun effet significatif n'a été observé. Les seuls rapports d'induction supérieurs à 1, parfois statistiquement significatifs (p<0,01 pour les solutions à 60 et 80% d'alcool pour la souche TA98), étaient tous inférieurs à 2, c'est-à-dire sans significativité biologique.

En conclusion, le n-propanol aux doses testées de 54,1 et 75,4 mg/boîte (100 µL de solutions à 60, 70, 75, 80, 85 ou 90 % p/p) n'est pas mutagène dans le test d'Ames mené sur les souches de *S. typhimurium*. Ces résultats complètent les données retrouvées dans la

littérature avec le n-propanol pour le test de mutation génique sur bactéries, dont les résultats négatifs étaient pour des doses d'alcool inférieures, n'excédant pas 5 mg/boîte.

d) Conclusion sur les alcools seuls

Les solutions aqueuses d'éthanol, isopropanol ou n-propanol, testées à des doses de l'ordre de 50 à 75 mg/boîte, n'ont pas entraîné d'augmentation significative du nombre de révertants vis-à-vis des souches bactériennes de *S. typhimurium* TA98, TA100 et TA102, TA1535 et TA1537, que ce soit en absence ou en présence de système d'activation métabolique. Les données de cytotoxicité associée permettent d'exploiter ces résultats indépendamment des doses d'essai 10 à 15 fois supérieures à la teneur maximale recommandée dans la ligne directrice de l'OCDE No 471. Les 3 alcools sont donc considérés non mutagènes dans le test d'Ames mis en œuvre. Les résultats obtenus sont cohérents avec les données retrouvées dans la littérature.

III.2.2.1.2. Solutions hydro-alcooliques (SHA) et mélange de co-formulants (CoF₁₀)

Pour déterminer la teneur en co-formulants à utiliser pour formuler les SHA à tester (dose n'entraînant pas de cytotoxicité), un essai préalable sur le mélange de co-formulants seuls (CoF₁₀ : teneur cumulée totale de 10% p/p en solution dans le DMSO) a été réalisé. Cet essai a également permis d'évaluer le potentiel mutagène du mélange de co-formulants.

a) Mélange CoF₁₀

a.1) Essai préliminaire

A des fins de détermination de la dose maximale de CoF₁₀ pour l'essai principal, une gamme de dilutions de 5 doses de CoF₁₀ de progression géométrique voisine de √10 a été préalablement testée en présence et en absence d'activation métabolique sur chaque souche bactérienne, à raison d'une boîte par dose. Le tableau 55 présente les résultats obtenus en termes de cytotoxicité (T), nombre de révertants (R) et présence de précipité (P).

Tableau 55 : Essai préliminaire de toxicité avec le mélange CoF₁₀ vis-à-vis des 5 souches de *S. typhimurium* pour l'essai de mutation reverse

100 µL/boîte		TA1535			TA1537			TA98			TA100			TA102			
		T ¹	R ²	P ³	T	R	P	T	R	P	T	R	P	T	R	P	
Sans activation métabolique	TN ⁴	-	4	-	-	6	-	-	19	-	-	96	-	-	181	-	
	CoF ₁₀ ⁵ Dose en % v/v	1	-	9	-	-	6	-	-	17	-	-	88	-	-	130	-
		3	+++	2	-	+++	1	-	+	9	-	++	53	-	+	68	-
		10	N	0*	-	N	0*	-	+++	0*	-	N	0*	-	+++	0*	-
		30	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	+++	0*	-
		100	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-
Avec activation métabolique	TN ⁴	-	11	-	-	10	-	-	18	-	-	107	-	-	296	-	
	CoF ₁₀ ⁵ Dose en % v/v	1	-	8	-	-	10	-	-	34	-	-	120	-	-	306	-
		3	++	3	-	+	8	-	+	19	-	+	82	-	-	245	-
		10	N	0*	-	N	0*	-	+++	0*	-	N	0*	-	++	140	-
		30	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	+++	0*	-
		100	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	N	0*	-	+++	0*	-

¹ T = Toxicité (- nulle ; + faible ; ++ moyenne ; +++ forte ; N pas de pousse bactérienne)
² R = Nombre de révertants par boîte * Présence de micro-colonies de toxicité
³ P = Précipité (- absence; + léger; ++ modéré; +++ important empêchant le comptage des colonies)
⁴ TN: témoin négatif : solvant DMSO
⁵ CoF₁₀ : co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

Quelles que soient les conditions d'essai et la dose de traitement, aucun précipité n'a été observé.

En termes de toxicité, en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée pour les doses supérieures ou égales à 3% v/v de CoF₁₀, avec une forte diminution du nombre de révertants par boîte ou une absence totale de pousse des 5 souches traitées. La même observation a été faite en présence d'activation métabolique, à l'exception de la souche TA102 où la cytotoxicité a été observée à partir de la dose de 10% v/v de CoF₁₀.

Au regard de ces résultats, la concentration de 3 % v/v de CoF₁₀ a été retenue comme dose maximale à tester pour l'essai principal en absence d'activation métabolique. En présence d'activation métabolique, la même dose maximale a été utilisée pour les souches TA1535, TA1538, TA98 et TA100, et a été portée à 10% v/v pour la souche TA102.

a.2) *Essai principal*

Les résultats du test d'Ames suite au traitement par le mélange de co-formulants CoF₁₀ (doses de 100 µL/boîte) sont présentés dans le tableau 56.

Tableau 56 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de *S. typhimurium* exposées à des solutions du mélange CoF₁₀

<i>S. typhimurium</i>		TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	TP ³	351,3	38,2*	157,3	27,1*	192,0	14,8*	466,7	4,2*	858,7	5,6*	
	TN ⁴	9,2		5,8		13,0		111,7		152,2		
	CoF ₁₀ ⁵ Dose en % v/v	0,01	10,0	1,1	8,7	1,5	21,0	1,6	110,3	1,0	166,3	1,1
		0,03	9,0	1,0	6,3	1,1	17,3	1,3	105,7	0,9	137,0	0,9
		0,1	12,3	1,3	6,0	1,0	14,7	1,1	113,0	1,0	177,7	1,2
		0,3	9,0	1,0	4,0	0,7	17,7	1,4	106,0	0,9	166,7	1,1
		1	8,0	0,9	4,3	0,7	14,3	1,1	90,0	0,8	118,3	0,8
		3	7,0	0,8	4,0	0,7	10,7	0,8	68,3	0,6*	93,7	0,6*
Avec activation métabolique	TP ³	511,3	39,9*	254,0	36,3*	2862,7	99,4*	2885,3	23,2*	741,3	3,3*	
	TN ⁴	12,8		7,0		28,8		124,3		226,5		
	CoF ₁₀ ⁵ Dose en % v/v	0,01	12,7	1,0	6,0	0,9	24,3	0,8	139,3	1,1		
		0,03	12,0	0,9	6,3	0,9	28,3	1,0	128,7	1,0	206,0	0,9
		0,1	12,7	1,0	7,7	1,1	28,7	1,0	136,3	1,1	241,0	1,1
		0,3	10,0	0,8	7,0	1,0	25,7	0,9	118,0	0,9	230,7	1,0
		1	11,7	0,9	5,7	0,8	31,7	1,1	121,7	1,0	190,0	0,8
		3	7,0	0,5	3,3	0,5	20,0	0,7	92,7	0,7*	182,7	0,8
10										--	T⁶	

¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 3 boîtes à l'exception du témoin négatif (moyenne de 6 boîtes))

² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle

	TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102
³ TP : témoin positif	Sans activation métabolique Azide de sodium (1 µg/boîte)	9-amino-acridine (50 µg/boîte)	2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	Azide de sodium (1 µg/boîte)	Mitomycine C (0,125 µg/boîte)
	Avec activation métabolique 2-anthramine (2 µg/boîte)				Benzo[a]pyrène (2 µg/boîte)

⁴ TN: témoin négatif : DMSO : dimethylsulfoxyde

⁵ CoF₁₀ : co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4 en mélange de teneur cumulée de 10% dans le DMSO

⁶ T : toxicité importante – pas de pousse de fond

* p<0,01 (Dunnett's t)

Quelles que soient la dilution et condition d'essai (absence et présence de système d'activation métabolique), aucune augmentation biologiquement significative du nombre de révertants n'a été observée.

Des diminutions du nombre de révertants aux plus fortes doses ont été observées, en cohérence avec les données de cytotoxicité de l'essai préliminaire.

Le mélange CoF₁₀ n'est donc pas mutagène dans ces conditions expérimentales.

Sur la base de ces résultats, la teneur de 1% v/v de co-formulants en mélange a été retenue pour formuler les SHA testés (teneur maximale n'entraînant pas de cytotoxicité du système d'essai).

b) Solutions hydro-alcooliques (SHA)

Les résultats du test d'Ames avec les SHA sont présentés ci-après par alcool. Pour chacun de ces essais, un essai préliminaire a été réalisé pour confirmer le niveau de cytotoxicité acceptable des produits d'essai (résultats non présentés).

b.1) SHA à base d'éthanol

Les résultats du test d'Ames réalisé avec les 6 SHA sur base éthanol (doses testées d'alcool comprises entre 55,9 et 74,9 mg/boîte) sont présentés dans le tableau 57.

Tableau 57 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de *S. typhimurium* exposées à des solutions hydro-alcooliques à base d'éthanol

<i>S. typhimurium</i>		TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	TP ³	490,7	46,7*	531,3	54,2*	245,3	12,8*	576	5,5*	1141,3	4,6*	
	TN ⁴	10,5		9,8		19,2		105,0		246,7		
	% p/p Ethanol dans le SHA ⁵	60	5,7	0,5	5,3	0,5	13,7	0,7	89,0	0,8	176,0	0,7
		70	7,3	0,7	4,3	0,4	24,0	1,3	78,7	0,7	196,7	0,8
		75	8,7	0,8	3,7	0,4	16,0	0,8	82,0	0,8	180,0	0,7
		80	6,7	0,6	5,3	0,5	18,3	1,0	77,7	0,7	205,3	0,8
		85	7,0	0,7	7,0	0,7	18,3	1,0	93,7	0,9	208,7	0,8
90	7,3	0,7	9,0	0,9	20,3	1,1	84,7	0,8	163,3	0,7		
Avec activation métabolique	TP ³	569,3	54,2*	234,0	24,1*	2400,0	72,3*	2520,0	23,4*	1165,3	3,4*	
	TN ⁴	10,5		9,7		33,2		107,7		226,5		
	% p/p Ethanol dans le SHA	60	8,3	0,8	7,3	0,8	28,7	0,9	98,7	0,9	267,0	0,8
		70	8,7	0,8	8,0	0,8	30,0	0,9	96,7	0,9	207,3	0,6
		75	9,3	0,9	12,7	1,3	30,0	0,9	84,7	0,8	283,0	0,8
		80	7,3	0,7	7,0	0,7	33,0	1,0	96,7	0,9	281,3	0,8
		85	12,3	1,2	9,0	0,9	38,0	1,1	98,7	0,9	299,0	0,9
90	11,7	1,1	7,3	0,8	30,3	0,9	87,7	0,8	365,3	1,1		
¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 3 boîtes à l'exception du témoin négatif (moyenne de 6 boîtes))												
² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle												
³ TP : témoin positif		TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102						
	Sans activation métabolique	Azide de sodium (1 µg/boîte)	9-amino-acridine (50 µg/boîte)	2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	Azide de sodium (1 µg/boîte)	Mitomycine C (0,125 µg/boîte)						
	Avec activation métabolique	2-anthramine (2 µg/boîte)				Benzo[a]pyrène (2 µg/boîte)						
⁴ TN: témoin négatif : eau distillée												
⁵ SHA : solution hydro-alcoolique à base d'éthanol avec 1% v/v de CoF ₁₀ (mélange de MP1, MP2, MP3 et MP4 à 10 % p/p dans le DMSO)												
* p<0,01 (Dunnett's t)												

Pour chaque SHA, en absence et en présence d'activation métabolique, aucun effet biologiquement significatif n'a été observé vis-à-vis des 5 souches bactériennes (rapports d'induction inférieurs aux seuils de significativité correspondants). Comme pour les solutions d'éthanol dans l'eau, les diminutions de nombre de révertants observées peuvent raisonnablement être imputées aux propriétés bactéricides de l'éthanol présent dans les SHA.

En conclusion, les 6 solutions hydro-alcooliques testées sur base éthanol (60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p, équivalent à des doses d'alcool comprises entre 55,9 et 74,9 mg/boîte) sont considérées non mutagènes dans les conditions expérimentales mises en œuvre du test d'Ames.

b.2) SHA à base d'isopropanol

Les résultats du test d'Ames avec les 6 SHA sur base isopropanol (doses testées d'alcool comprises entre 54 et 73,2 mg/boîte) sont présentés dans le tableau 58.

Tableau 58 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de *S. typhimurium* exposées à des solutions hydro-alcooliques à base d'isopropanol

<i>S. typhimurium</i>		TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	TP ³	549,3	29,4*	900,0	132,4*	346,7	19,0*	393,0	3,4*	416,0	2,9*	
	TN ⁴	18,7		6,8		18,2		115,5		143,3		
	% p/p Isopropanol dans le SHA ⁵	60	11,3	0,6	4,3	0,6	19,3	0,9	105	0,9	98	0,7*
		70	16,7	0,9	3,7	0,5	14,0	0,8	95,3	0,8	108,0	0,8
		75	10,3	0,6	6,0	0,9	15,3	0,8	78,3	0,7	94,7	0,7*
		80	16,3	0,9	3,3	0,5	12,7	0,7	81,3	0,7	87,7	0,6*
		85	11,7	0,6	5,0	0,7	17,3	1,0	84,0	0,7	98,7	0,7*
90	19,0	1,0	3,7	0,5	17,7	1,0	77,3	0,7*	103,0	0,7		
Avec activation métabolique	TP ³	544,0	32,4*	215,3	24,7*	2526,7	104,4*	2241,3	19,4*	413,0	2,4*	
	TN ⁴	16,8		8,7		24,2		115,5		171,7		
	% p/p Isopropanol dans le SHA ⁵	60	15,3	0,9	5,0	0,6	32,7	1,4	101,3	0,9	186,3	1,1
		70	14,0	0,8	7,0	0,8	20,7	0,9	72,0	0,6*	107,5	0,6
		75	10,0	0,6	5,7	0,7	16,0	0,7	80,7	0,7	166,0	1,0
		80	12,0	0,7	4,7	0,5	19,3	0,8	91,7	0,8	168,3	1,0
		85	11,3	0,7	6,3	0,7	21,7	0,9	84,3	0,7	153,3	0,9
90	11,3	0,7	6,0	0,7	17,3	0,7	89,7	0,8	155,0	0,9		

¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 3 boîtes à l'exception du témoin négatif (moyenne de 6 boîtes))
² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle

³ TP : témoin positif	Sans activation métabolique	TA1535 Azide de sodium (1 µg/boîte)	TA1537 9-amino-acridine (50 µg/boîte)	TA98 2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	TA100 Azide de sodium (1 µg/boîte)	TA102 Mitomycine C (0,125 µg/boîte)
	Avec activation métabolique	2-anthramine (2 µg/boîte)				Benzo[a]pyrène (2 µg/boîte)

⁴ TN: témoin négatif : eau distillée
⁵ SHA : solution hydro-alcoolique à base d'isopropanol avec 1% v/v de CoF₁₀ (mélange de MP1, MP2, MP3 et MP4 à 10 % p/p dans le DMSO)
* p<0,01 (Dunnett's t)

Pour chaque SHA, en absence d'activation métabolique, aucun effet biologiquement significatif en termes de propriétés mutagènes n'a été observé vis-à-vis des 5 souches bactériennes (rapports d'induction inférieurs aux seuils de significativité correspondants). Il en est de même en présence d'activation métabolique.

Les diminutions de nombre de révertants observées (rapports d'induction inférieurs à 1) sont raisonnablement à mettre en relation avec les propriétés bactéricides de l'isopropanol présent dans les SHA.

En conclusion, les 6 solutions hydro-alcooliques testées sur base isopropanol (60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p, équivalent à des doses d'alcool comprises entre 54 et 73,2 mg/boîte) sont considérées non mutagènes dans les conditions expérimentales mises en œuvre du test d'Ames.

b.3) SHA à base de n-propanol

Les résultats du test d'Ames avec les 6 SHA sur base n-propanol (doses testées d'alcool comprises entre 54,3 et 75,5 mg/boîte) sont présentés dans le tableau 59.

Tableau 59 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de *S. typhimurium* exposées à des solutions hydro-alcooliques à base de n-propanol

<i>S. typhimurium</i>		TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102		
100 µL/boîte		Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	Révertants ¹	Rapport d'induction ²	
Sans activation métabolique	TP ³	501,3	55,7*	628,7	96,7*	538,7	39,9*	334,7	3,2*	1282,0	10,8*	
	TN ⁴	9,0		6,5		13,5		103,8		119,2		
	% p/p n-propanol dans le SHA ⁵	60	9,0	1,0	3,3	0,5	18,0	1,3	81,7	0,8	81,3	0,7*
		70	5,7	0,6	4,7	0,7	19,3	1,4	72,0	0,7*	76,3	0,6*
		75	10,0	1,1	6,0	0,9	15,7	1,2	72,0	0,7*	72,0	0,6*
		80	5,7	0,6	3,0	0,5	13,7	1,0	74,0	0,7*	65,7	0,6*
		85	5,3	0,6	4,0	0,6	16,3	1,2	69,0	0,7*	59,7	0,5*
90	4,3	0,5	4,7	0,7	14,3	1,1	56,0	0,5*	49,3	0,4*		
Avec activation métabolique	TP ³	557,3	50,7*	302,7	46,6*	2904,0	110,8*	2674,7	24,2*	408,0	2,3*	
	TN ⁴	11,0		6,5		26,2		110,7		179,3		
	% p/p n-propanol dans le SHA ⁵	60	11,7	1,1	7,0	1,1	29,0	1,1	79,0	0,7*	136,7	0,8
		70	9,7	0,9	4,3	0,7	23,3	0,9	87,7	0,8	142,3	0,8
		75	13,3	1,2	7,3	1,1	19,3	0,7	69,7	0,6*	124,7	0,7
		80	7,7	0,7	4,7	0,7	26,7	1,0	67,7	0,6*	117,7	0,7
		85	7,7	0,7	4,3	0,7	21,0	0,8	81,7	0,7*	110,7	0,6
90	11,0	1,0	3,0	0,5	27,0	1,0	70,3	0,6*	79,0	0,4*		

¹ nombre moyen de révertants par boîte (moyenne de 3 boîtes à l'exception du témoin négatif (moyenne de 6 boîtes))
² nombre moyen de révertants par boîte traitée / nombre moyen de révertants par boîte contrôle

³ TP : témoin positif	Sans activation métabolique	TA1535 Azide de sodium (1 µg/boîte)	TA1537 9-amino-acridine (50 µg/boîte)	TA98 2-nitro fluorine (2 µg/boîte)	TA100 Azide de sodium (1 µg/boîte)	TA102 Mitomycine C (0,125 µg/boîte)
	Avec activation métabolique	2-anthramine (2 µg/boîte)				Benzo[a]pyrène (2 µg/boîte)

⁴ TN: témoin négatif : eau distillée
⁵ SHA : solution hydro-alcoolique à base de n-propanol avec 1% v/v de CoF₁₀ (mélange de MP1, MP2, MP3 et MP4 à 10 % p/p dans le DMSO)
* p<0,01 (Dunnett's t)

Pour chaque SHA, en absence et en présence d'activation métabolique, aucun effet biologiquement significatif en termes de propriétés mutagènes n'a été observé vis-à-vis des 5 souches bactériennes (rapports d'induction inférieurs aux seuils de significativité correspondants).

Les diminutions de nombre de révertants observées peuvent raisonnablement être attribuées aux propriétés bactéricides de l'alcool présent dans les SHA.

En conclusion, les 6 solutions hydro-alcooliques testées sur base n-propanol (60, 70, 75, 80, 85 et 90% p/p, équivalent à des doses d'alcool comprises entre 54,3 et 75,5 mg/boîte) sont considérées non mutagènes dans les conditions expérimentales mises en œuvre du test d'Ames.

c) Conclusion sur les SHA

Comme pour les solutions d'alcool seul, les SHA à 60, 70, 75, 80, 85 ou 90% d'éthanol, isopropanol ou n-propanol (doses en alcool comprises entre 54 et 75 mg/boîte) n'ont pas entraîné d'augmentation significative du nombre de révertants vis-à-vis des souches bactériennes de *S. typhimurium* TA98, TA100 et TA102, TA1535 et TA1537, que ce soit en absence ou en présence de système d'activation métabolique. Les données de cytotoxicité associée permettent d'exploiter ces résultats indépendamment des doses d'essai 10 à 15 fois supérieures à la teneur maximale recommandée dans la ligne directrice de l'OCDE No 471. Ces produits sont donc considérés non mutagènes dans le test d'Ames mis en œuvre.

III.2.2.2. Test du micronoyau

Deux modèles cellulaires différents ont été utilisés pour le test du micronoyau (MN) : TK6 (lignée lymphoblastoïde) et NCI H292 (lignée pulmonaire).

Les essais réalisés en première intention sur les cellules TK6 ont été effectués avec une administration des traitements à 1% v/v directement dans le milieu de culture.

Les 3 alcools (éthanol, isopropanol et n-propanol) formulés en solution dans l'eau (alcools seuls) ou en présence de co-formulants (SHA ou solutions hydro-alcooliques) ont été testés. Comme pour les autres essais, les concentrations d'alcools dans les produits d'essai ont été vérifiées par analyse chromatographique en phase gazeuse et ont toutes été confirmées comme égales à la concentration théorique à moins de 5% près (données non présentées). Le mélange de co-formulants seuls en solution dans le DMSO (CoF₁₀), a également été testé. Tous les essais ont été réalisés avec et sans activation métabolique avec deux temps différents de traitement (temps court et temps long).

Pour la lignée pulmonaire, les essais se sont limités aux alcools seuls, en relation avec l'exposition des voies respiratoires aux alcools lors de l'utilisation des produits hydro-alcooliques, seuls composés volatils. Deux modes d'administration différents des produits d'essai ont été utilisés :

- administration à 1% v/v directement dans le milieu de culture (immersion)
- administration sous forme de vapeurs sur des cultures cellulaires en interface air-liquide, pour une meilleure représentativité des conditions d'exposition des voies respiratoires aux alcools issus des produits hydro-alcooliques.

Les essais en immersion ont tous été réalisés avec et sans activation métabolique, avec deux temps différents de traitement (temps court et temps long).

Les doses d'alcool administrées (calculées au plus juste à partir de la densité mesurée des produits d'essai et des teneurs en alcool dosées dans ces produits), étaient de l'ordre de 6 à 9 µL/mL ou 5300 à 7500 µg/mL (soit 118 à 161 mM pour l'éthanol et 90 à 125 mM pour l'isopropanol et le n-propanol), soit des doses supérieures à la dose maximale recommandée dans la ligne directrice (la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/mL ou 2 µL/mL) (tableau 60). Cependant, les critères de validité permettant l'exploitation des résultats étaient remplis, avec des valeurs de pH et osmolarité pour les plus fortes doses et des niveaux de cytotoxicité acceptables.

Tableau 60 : Concentrations d'alcool (µL/mL, mg/mL ou mM) administrées dans le test du micronoyau

1%		% p/p alcool dans l'eau (alcool) ou en présence de co-formulants (SHA)											
		60		70		75		80		85		90	
		alcool	SHA	alcool	SHA	alcool	SHA	alcool	SHA	alcool	SHA	alcool	SHA
Ethanol	µL/mL	6,71	6,75	7,67	7,58	8,05	7,94	8,46	8,52	8,91	8,82	9,15	9,19
	µg/mL	5431	5460	6202	6129	6513	6421	6845	6896	7206	7132	7405	7434
	mM	118	118	135	133	141	139	148	150	156	155	161	161
Isopropanol	µL/mL	6,59	6,63	7,58	7,34	8,08	7,84	8,41	8,22	8,80	8,69	9,18	8,94
	µg/mL	5333	5365	6129	5941	6537	6340	6801	6647	7116	7028	7426	7233
	mM	89	89	102	99	109	105	113	111	118	117	124	120
n-propanol	µL/mL	6,69	6,71	7,61	7,68	7,96	8,04	8,43	8,54	8,92	8,94	9,32	9,33
	µg/mL	5408	5432	6154	6213	6438	6503	6818	6911	7215	7232	7542	7551
	mM	90	90	102	103	107	108	113	115	120	120	125	126

Pour le traitement par vapeurs, deux schémas de traitement, sans ajout de système d'activation métabolique, ont été appliqués : traitement continu de 30 minutes ou réitéré de 2 min toutes les 5 min pendant 1 heure, avec un débit de 5 mL/min. Les niveaux d'exposition moyens des cultures cellulaires sont présentés dans le graphe en figure 28.

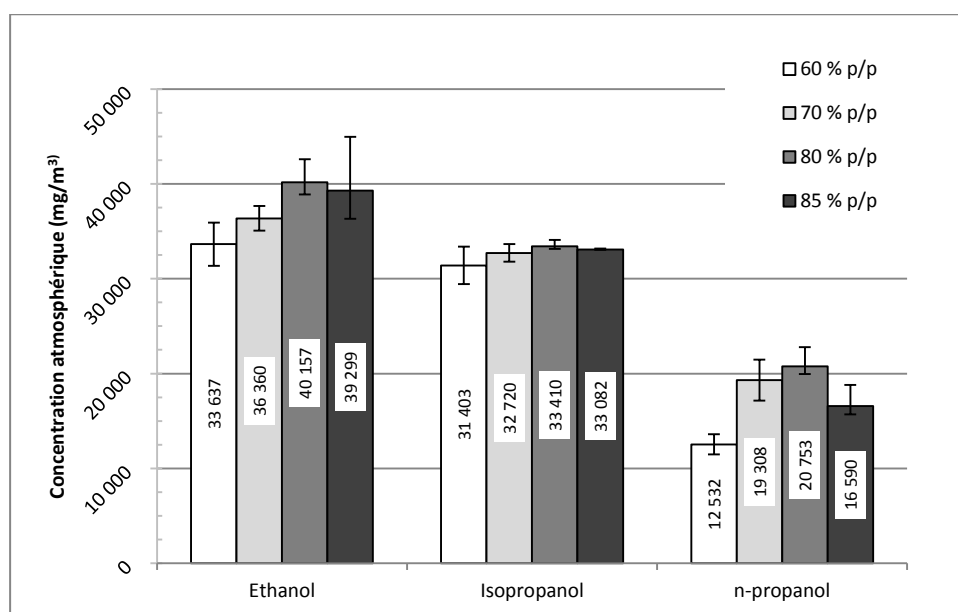


Figure 28 : Concentrations atmosphériques (moyennes et écart-type) en vapeurs d'alcool lors des essais dans le système VITROCELL

Pour un alcool donné, les concentrations atmosphériques en vapeurs d'alcool étaient plus ou moins les mêmes quelle que soit la teneur en alcool dans la solution de départ (60, 70, 80 ou 85%) suggérant une saturation des atmosphères d'essai dès la 1^{ère} concentration. Cependant, il est à noter un différentiel dans le taux d'exposition aux différents alcools, avec

un niveau d'exposition le plus élevé pour l'éthanol (valeur moyenne de $37\,363 \pm 2\,969$ mg/m³, soit $19\,562 \pm 1\,554$ ppm) puis l'isopropanol (valeur moyenne de $32\,654 \pm 880$ mg/m³, soit $13\,114 \pm 354$ ppm), et le n-propanol (valeur moyenne de $17\,296 \pm 3\,615$ mg/m³, soit $6\,946 \pm 1\,452$ ppm). Ces différences sont cohérentes avec les différences de volatilité des 3 alcools au regard de leur température d'ébullition et pression de vapeur.

Les résultats présentés reprennent, pour les différents produits d'essais et leurs témoins négatifs respectifs, le nombre moyen de cellules micronucléées parmi 2000 cellules mononucléées pour chaque condition d'essai. Les données relatives aux témoins positifs sont également présentées. Pour les données des témoins négatifs exposés à de l'air propre dans les essais effectués avec le dispositif Vitrocell, le nombre de MN pour 2000 cellules correspond à la moyenne des témoins négatifs des 4 essais par type d'alcool (10 cultures au total : 3 puits pour deux essais et 2 puits pour les deux autres, l'un des 3 puits ayant été remis à l'étuve à des fins de témoin négatif pour l'exploitation des résultats du témoin positif administré en étuve).

Les données de cytotoxicité associée sont également restituées avec la valeur de RPD (doublement relatif de la population).

III.2.2.2.1. Alcools seuls

a) Ethanol

a.1) Cellules TK6 avec traitement en immersion dans le milieu de culture

Les graphes repris en figure 29 présentent les résultats du test du MN sur cellules TK6 après traitement par de l'éthanol aux doses de 118 à 161 mM (5430 à 7400 µg/mL) administré en immersion dans le milieu de culture.

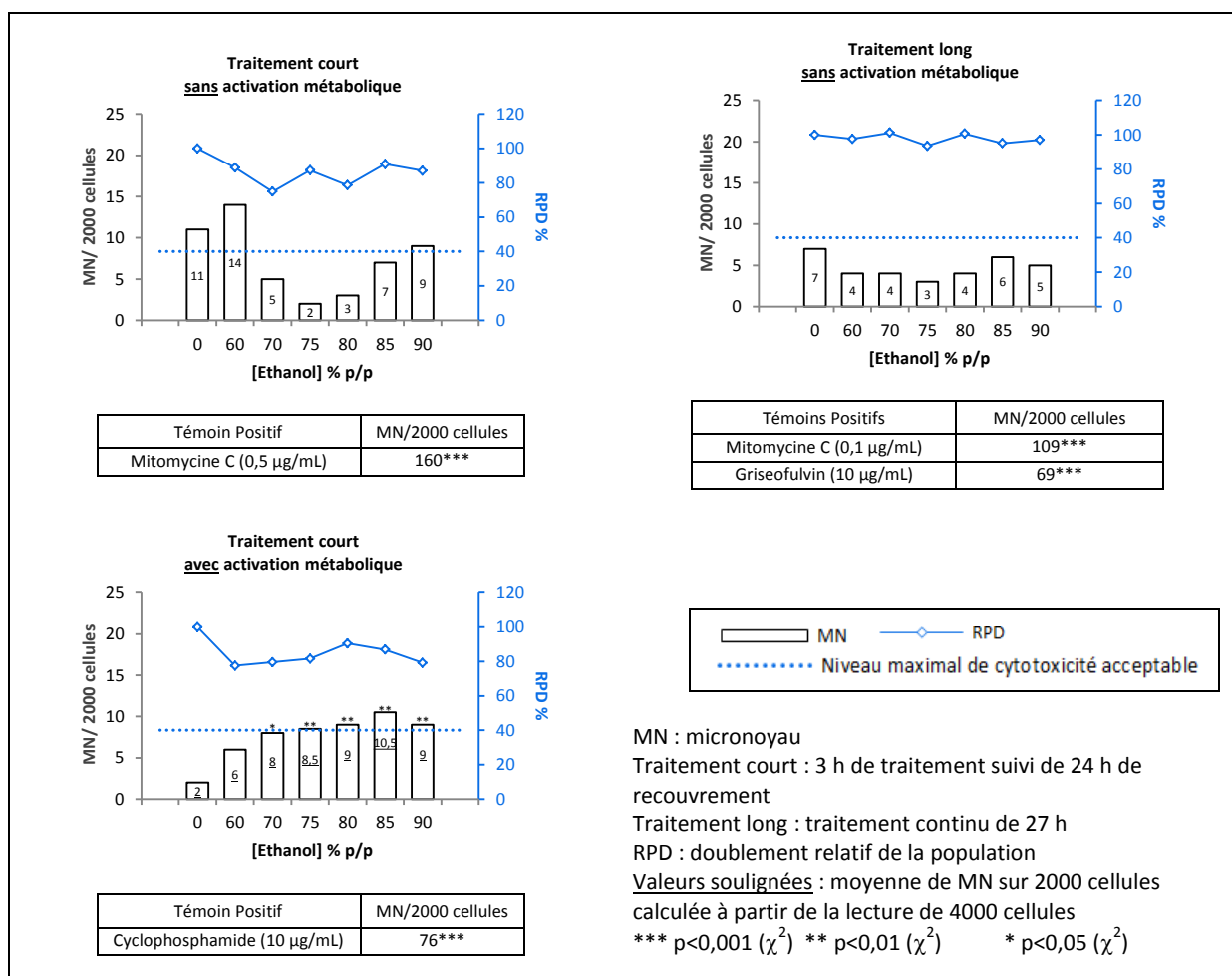


Figure 29 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées à l'éthanol

Lors des traitements sans système d'activation métabolique exogène ajouté, seule une augmentation du nombre de MN à la dose de 60% a été notée suite au temps court de traitement, avec 14 cellules micronucléées sur 2000 cellules, *versus* 11 dans le témoin négatif. Cependant, cet effet n'était ni statistiquement, ni biologiquement significatif (valeur

dans la gamme des témoins historiques négatifs, effet non dose relié et non observé après le temps long de traitement).

Lors du traitement en présence d'activation métabolique, les solutions d'éthanol dans l'eau à 70, 85, 80, 85 et 90% p/p d'alcool ont induit une augmentation statistiquement significative du nombre de cellules micronucléées comparativement au témoin. Dans cet essai, les dénombrements de cellules micronucléées parmi 1000 cellules sur les deux cultures d'essai ont donné un résultat particulièrement faible pour le témoin négatif (n=2) et non consistant pour les différents produits d'essai avec des écarts relativement importants entre les deux cultures. Une seconde lecture sur deux nouvelles séries de 1000 cellules a donc été réalisée. Le nombre de MN pour 2000 cellules dans cette condition d'essai est donc la moyenne calculée à partir de 4000 cellules. Le tableau 61 présente les données détaillées des différentes lectures.

Tableau 61 : Données compilées des deux lectures du test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées à l'éthanol en présence de système d'activation métabolique

Conditions d'essai		MN/2000 ¹ cellules (moyenne)	Lecture 1		Lecture 2	
			MN/2000 cellules	MN/1000 cellules Séries A+B ²	MN/2000 cellules	MN/1000 cellules Séries A+B ²
% p/p éthanol	0	2	2	(1+1)	2	(1+1)
	60	6	6	(5+1)	6	(4+2)
	70	8*	6	(4+2)	10*	(7+3)
	75	8,5**	14**	(10+4)	3	(0+3)
	80	9**	10*	(7+3)	8	(6+2)
	85	10,5**	11*	(7+4)	10*	(5+5)
	90	9**	13**	(9+4)	5	(3+2)

MN : micronoyau
¹ MN sur 2000 cellules : moyenne calculée à partir de 4000 cellules mononucléées
² Séries A+B : lecture de 1000 cellules sur chacune des deux cultures
** p<0,01 (χ^2) * p<0,05 (χ^2)

Parmi les réponses significatives, seule la solution d'éthanol à 85% p/p a présenté des résultats homogènes entre les deux lectures, avec un nombre de MN de 11 et 10 pour chacune des 2 séries de 2000 cellules mononucléées observées. Pour les concentrations d'alcools à 70, 75, 80 et 90 %, les moyennes de MN observées sont la résultante de données avec une forte dispersion en fonction des lectures réalisées. Plusieurs valeurs de MN observées, bien que statistiquement significatives, se situent dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (IC₉₅ [3,73 – 9,99]) ou en sont proches. De plus, le nombre de MN observés dans le groupe témoin était particulièrement faible et inférieur à la borne inférieure de l'IC₉₅ des données historiques des témoins négatifs du laboratoire.

Dans ces conditions, il a été décidé de réaliser un deuxième essai en présence d'activation métabolique, en utilisant les mêmes lots de cellules et fraction S9 du S9 mix pour l'activation métabolique, ainsi que les mêmes produits d'essai. Les résultats sont présentés en figure 30.

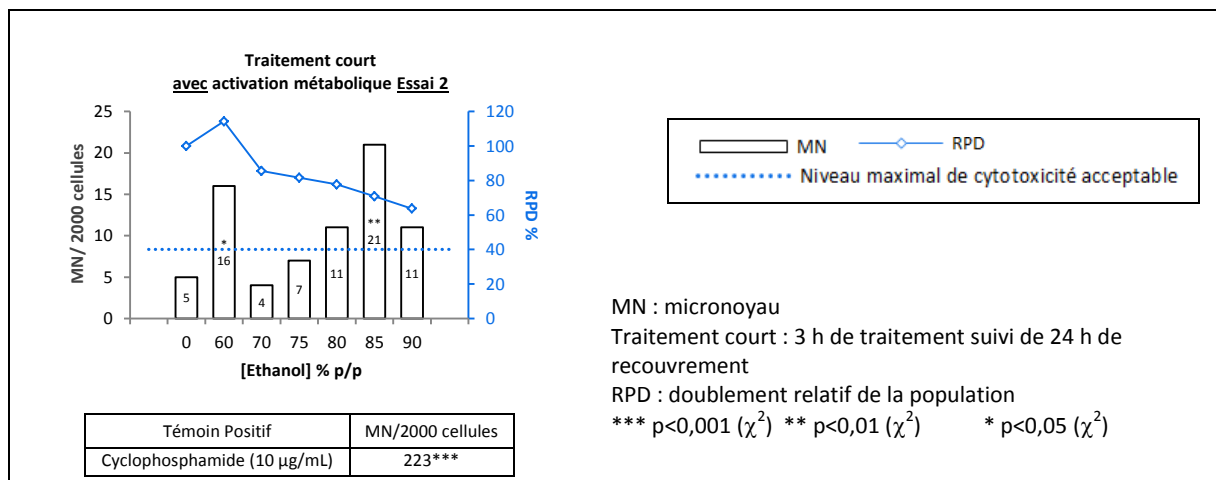


Figure 30 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées à l'éthanol en présence de système d'activation métabolique (2^{ème} essai indépendant)

Contrairement au premier essai, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée suite au traitement par des solutions d'éthanol à 70, 75, 80 et 90 % p/p, avec 4 à 11 MN observés parmi 2000 cellules contre 5 dans le témoin négatif. En revanche, les solutions à 60 et 85% p/p d'éthanol ont induit une augmentation statistiquement et biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées, avec 16 et 21 MN dénombrés parmi 2000 cellules contre 5 dans le témoin négatif. Ces valeurs sont supérieures à la valeur maximale de la plage de distribution des données historiques pour les témoins négatifs.

Les résultats obtenus divergeant d'un essai à l'autre pour 5 des 6 solutions d'éthanol testées, un troisième essai a été réalisé en présence d'activation métabolique, toujours en utilisant les mêmes lots de cellules et fraction S9 du S9 mix et les mêmes produits d'essai. En raison du résultat significatif obtenu à 60% dans l'essai précédent, deux concentrations supplémentaires de 55% et 65% p/p d'éthanol visant à encadrer cette dose ont été ajoutées. Les résultats sont présentés en figure 31.

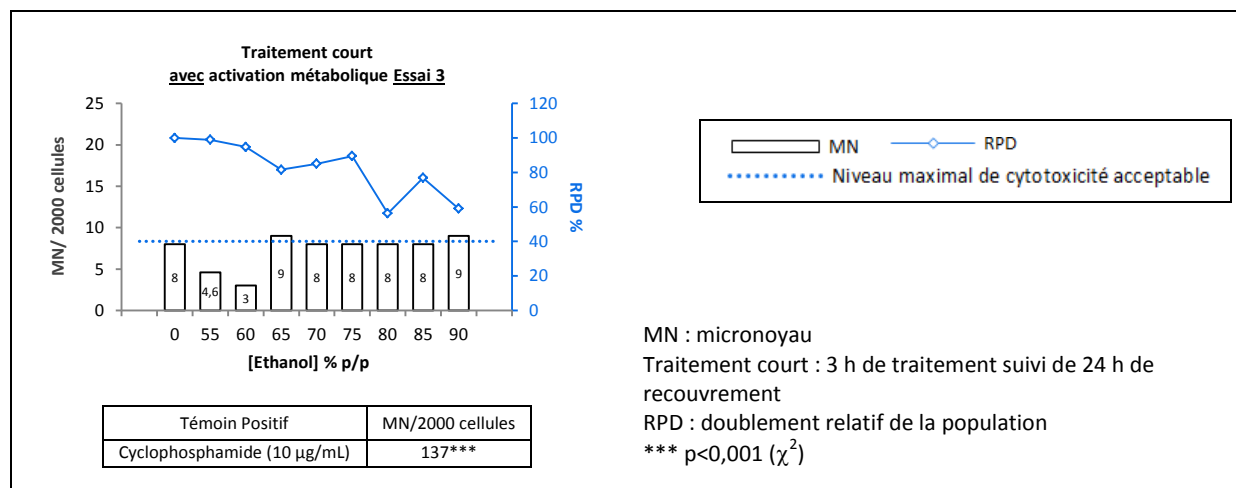


Figure 31 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées à l'éthanol en présence de système d'activation métabolique (3^{ème} essai indépendant)

Dans cet essai complémentaire, aucune augmentation statistiquement ni biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit la dose, avec 3 à 9 MN observés parmi 2000 cellules contre 8 dans le témoin négatif.

En résumé, l'éthanol à des concentrations comprises entre 118 et 161 mM (soit entre 5430 et 7400 µg/mL ou 6,7 et 9,2 µL/mL) n'a pas entraîné d'augmentation significative de la fréquence de cellules micronucléées dans le test du MN sur cellules TK6 en absence de système d'activation métabolique. En revanche, dans deux essais indépendants réalisés en présence d'activation métabolique, l'éthanol à 118, 135, 141, 148 et 156 mM a induit une augmentation statistiquement et biologiquement significative du nombre de MN comparativement au témoin négatif. Bien qu'administré à des concentrations supérieures aux recommandations de la ligne directrice OCDE No 487, les critères de validité des essais étaient remplis, permettant l'exploitation des résultats. Dans ces essais, l'effet n'était pas accentué avec l'augmentation de la dose, et à l'exception de l'éthanol à 156 mM (traitement par la solution à 85% p/p d'alcool), les réponses positives n'ont pas été retrouvées avec les mêmes doses d'alcool. Cependant, les quantités d'éthanol étaient très proches d'un produit d'essai à l'autre, les comparaisons de résultats en fonction de la dose restent délicates. Un troisième essai réalisé en présence d'activation métabolique n'a pas permis de reproduire des résultats positifs.

Le seul test du MN positif retrouvé dans la littérature avec l'éthanol a été réalisé sur des cellules MCL-5 métaboliquement compétentes, sans ajout de système d'activation métabolique exogène. Les résultats publiés étaient clairement positifs, avec une relation dose-effet sur des doses d'éthanol couvrant nos concentrations d'essai, comprises entre 4 et 20 µL/mL.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus sur cellules TK6 obtenus dans 3 essais indépendants, de l'absence de relation dose-effet et de l'absence de reproductibilité, le

potentiel d'induction de mutations chromosomiques *in vitro* sur cellules humaines TK6 traitées en immersion par l'éthanol est considéré comme étant équivoque dans ce système d'essai *in vitro*.

a.2) Cellules TK6 traitées de façon indirecte par application topique des produits d'essai sur épidermes humains reconstitués

En seconde intention, à des fins d'investigation complémentaire suite aux premiers résultats équivoques obtenus sur cellules TK6 traitées en immersion en présence d'activation métabolique, un essai complémentaire avec une approche expérimentale différente pour une meilleure représentativité des conditions d'exposition des produits hydro-alcooliques a été réalisé. Les solutions d'éthanol ont été administrées par voie topique sur des épidermes humains reconstitués mis en co-culture avec les cellules TK6.

Dans cet essai, les doses d'alcool administrées (20 µL/épiderme) étaient de l'ordre de 10,9 à 14,4 mg/épiderme, en fonction de la concentration en alcool dans le produit d'essai (tableau 62).

Tableau 62 : Doses d'alcool administrées dans le test du micronoyau sur cellules TK6 en co-culture avec EpiSkin™ SM

	% p/p éthanol dans l'eau				
	60	70	75	80	85
Dose d'alcool en mg par épiderme	10,86	12,40	13,07	13,69	14,41

Les résultats sont présentés dans la figure 32 ci-après.

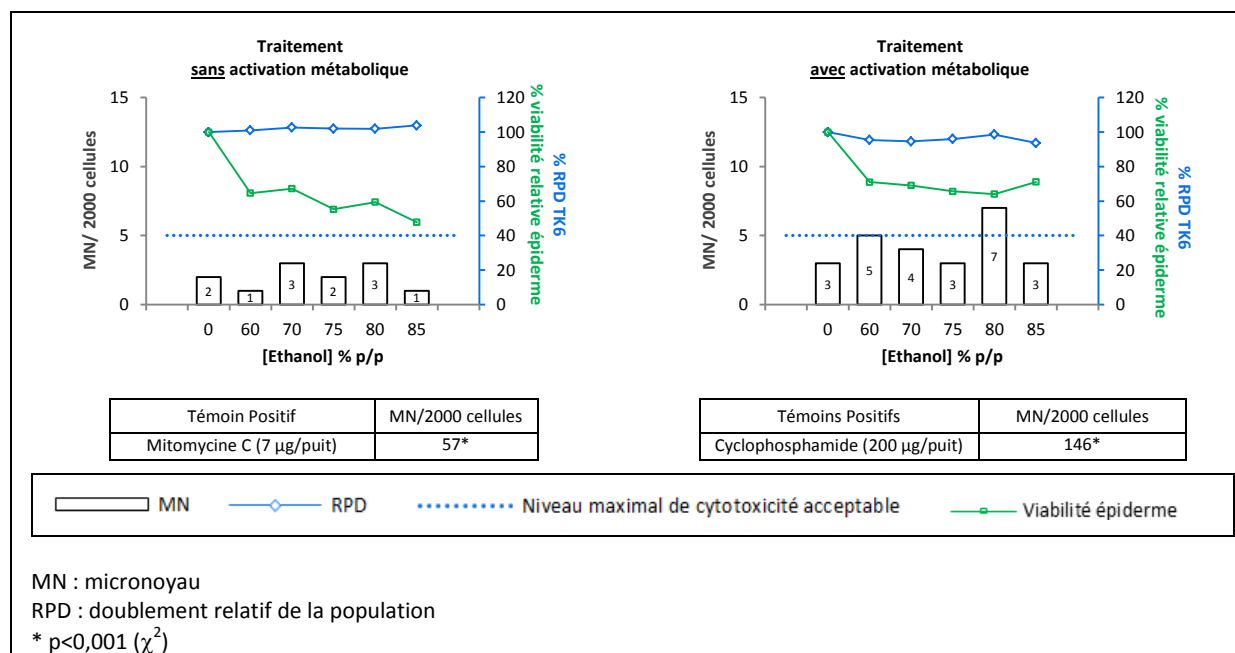


Figure 32 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 en co-culture avec des épidermes humains reconstitués traités par des solutions d'éthanol

Dans cet essai, en absence comme en présence d'activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit la dose d'éthanol administrée, comparativement au témoin négatif.

Dans ces conditions expérimentales de co-culture correspondant à un mode d'exposition plus représentatif des conditions réelles, aucun potentiel génotoxique de l'éthanol n'a été mis en évidence.

a.3) Cellules H292 avec traitement en immersion dans le milieu de culture

Les graphes repris en figure 33 présentent les résultats du test du micronoyau sur cellules NCI H292 après traitement par des solutions d'éthanol, administrées en immersion dans le milieu de culture aux doses d'alcool de 118 à 161 mM (5430 à 7400 µg/mL).

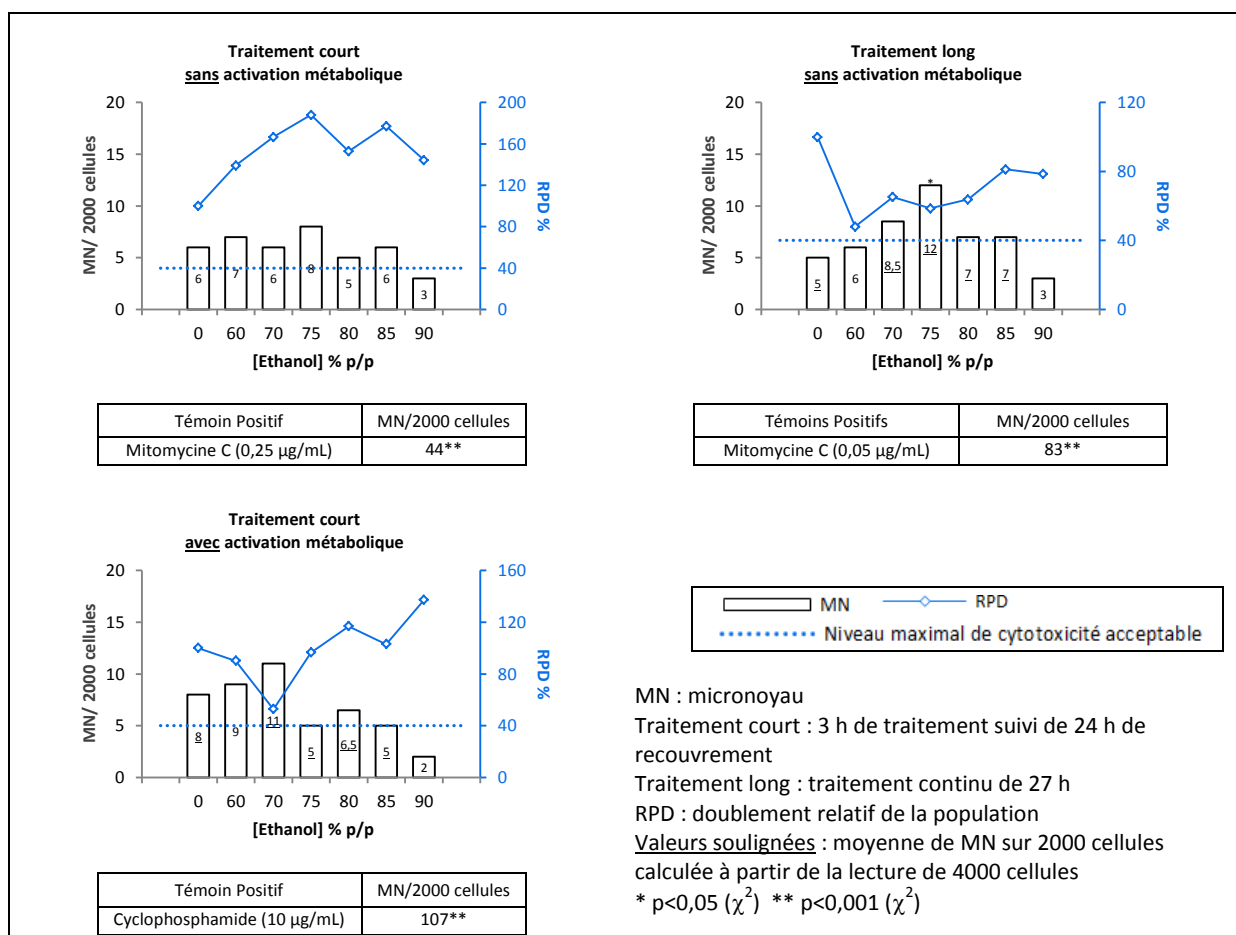


Figure 33 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 exposées à l'éthanol

Dans cet essai, un écart de dénombrement important entre les deux cultures sur la première série de lecture a été retrouvé pour les cultures traitées sur un temps de traitement long avec les solutions de 70 à 85% d'alcool, et pour les cultures en présence de système

d'activation métabolique traitées par l'éthanol à 70, 75, 80 et 85 %. Une deuxième lecture a donc été réalisée et les valeurs de MN restituées pour ces cultures sont une moyenne calculée sur 4000 cellules (tableau 63).

Tableau 63 : Données compilées des deux lectures du test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 exposées à l'éthanol

Conditions d'essai		MN/2000 cellules (moyenne)	Lecture 1		Lecture 2		
			MN/2000 cellules	MN/1000 cellules Séries A+B ¹	MN/2000 cellules	MN/1000 cellules Séries A+B ¹	
Sans activation métabolique - Temps long	TN	5	5	(1+4)	5	(0+5)	
	% p/p éthanol	60	6	6	(4+2)	--	--
		70	8,5	10	(6+4)	7	(4+3)
		75	12*	17*	(12+5)	7	(4+3)
		80	7	7	(6+1)	7	(5+2)
		85	7	8	(6+2)	6	(5+1)
	90	3	3	(1+2)	--	--	
Avec activation métabolique	TN	8	3	(1+2)	13	(6+7)	
	% p/p éthanol	60	9	9	(7+2)	--	--
		70	11	8	(7+1)	14	(5+9)
		75	5	3	(2+1)	7	(4+3)
		80	6,5	8	(6+2)	5	(2+3)
		85	5	7	(3+4)	3*	(2+1)
	90	2	2	(1+1)	--	--	

MN : micronoyau
¹Séries A+B : lecture de 1000 cellules sur chacune des deux cultures
 * p<0,05 (χ^2)

En absence d'activation métabolique, une augmentation statistiquement significative du nombre de MN à la dose de 75% a été notée suite au temps long de traitement, avec 12 cellules micronucléées sur 2000 cellules (moyenne calculée sur 4000 cellules), *versus* 5 dans le témoin négatif. Aucun autre effet notable n'a été obtenu.

En présence d'activation métabolique, l'ensemble des résultats était négatif, avec aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de MN quelle que soit la concentration d'éthanol, comparativement au témoin négatif.

Au regard du résultat significatif obtenu avec l'éthanol à 75 % p/p administré en traitement long sans système d'activation métabolique, un deuxième essai dans les mêmes conditions a été effectué, en utilisant les mêmes lots de cellules et produits d'essai (Fig. 34).

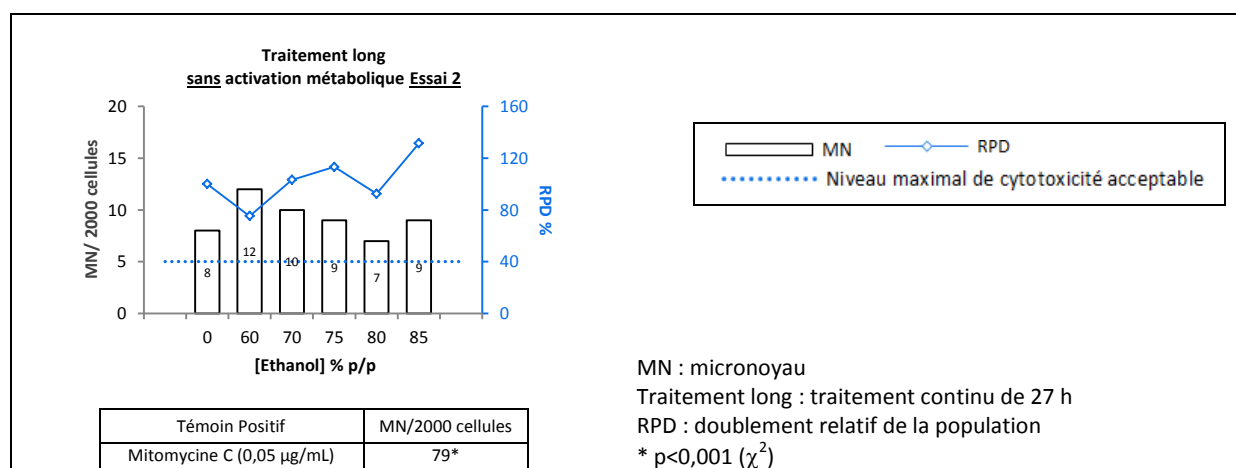


Figure 34 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 exposées à l'éthanol (traitement long sans activation métabolique)

Contrairement à l'essai précédent, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit la teneur en éthanol dans le produit d'essai.

Dans ces conditions d'essai, au regard des résultats obtenus dans 2 essais indépendants, de l'absence de relation dose-effet et de l'absence de reproductibilité du résultat observé sans activation métabolique avec un temps de traitement long, les résultats d'essai sont considérés négatifs, avec l'absence de potentiel génotoxique de l'éthanol sur cellules NCI H292.

a.4) Cellules H292 cultivées en interface air-liquide (IAL) avec traitement par vapeurs d'alcool

Les graphes ci-après (Fig. 35) présentent les résultats du test du MN sur cellules NCI H292 cultivées en IAL après exposition aux vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'éthanol à 60, 70, 80 et 85% p/p, selon les deux schémas de traitement retenus (traitement continu de 30 minutes ou exposition de 2 minutes réitérée toutes les 5 minutes pendant 1 heure). Le niveau moyen de vapeurs d'éthanol généré dans l'atmosphère des puits contenant les cultures était de l'ordre de 37400 mg/m³ ($\pm 19\ 600$ ppm) d'éthanol, sans différence significative en fonction de la concentration d'alcool dans la solution utilisée.

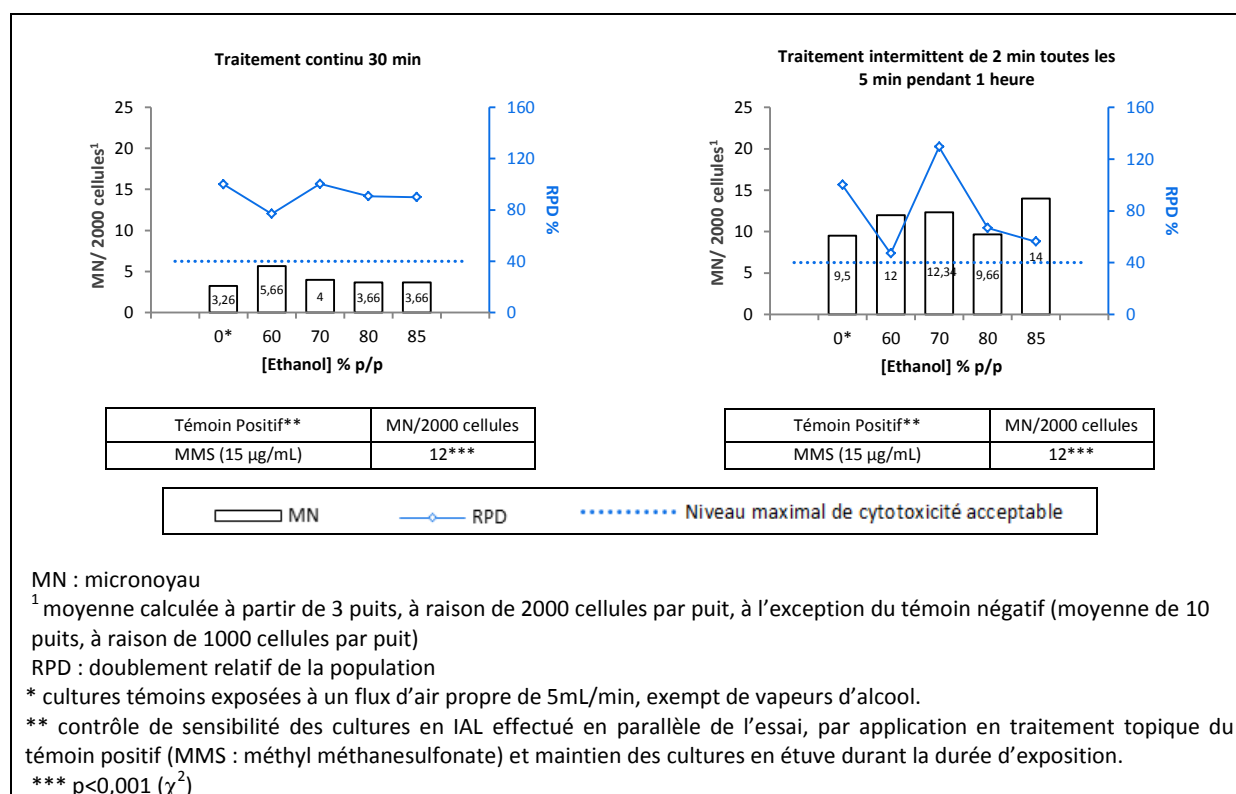


Figure 35 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'éthanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p

Dans ces deux essais, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée comparativement aux témoins. Pour des raisons pratiques, aucun système d'activation métabolique exogène n'a été ajouté dans cet essai. Cependant, une métabolisation de l'éthanol ne peut être exclue, le modèle cellulaire utilisé disposant des gènes codant les enzymes du métabolisme des alcools.

Les données de cet essai sont donc en faveur d'absence de potentiel génotoxique des vapeurs d'éthanol, lorsqu'elles sont testées sur une culture en interface air-liquide de cellules pulmonaires humaines NCI H292.

a.5) Conclusion sur les essais du MN avec l'éthanol

Les essais mis en œuvre sur les cellules TK6 confirment de façon plutôt équivoque les propriétés pro-mutagènes connues de l'éthanol à forte concentration (résultat positif dans un test *in vitro* du MN à des doses de 4 à 20 µL/mL – Kayani & Parry 2010). Cependant, dans nos essais, l'effet n'était pas accentué avec l'augmentation de la dose, et à l'exception de l'éthanol à 156 mM (traitement par la solution à 85% p/p d'alcool), les réponses positives n'ont pas été reproduites avec les mêmes doses d'alcool au cours d'un essai indépendant. Par ailleurs, un troisième essai réalisé en présence d'activation métabolique n'a pas permis de reproduire des résultats positifs.

Aucun résultat positif n'a été retrouvé au cours d'un essai sur modèle de co-culture, avec administration de l'alcool au niveau d'un épiderme humain reconstitué, mimant ainsi la barrière cutanée telle qu'elle existe en situation réelle d'exposition. Il aurait été intéressant de déterminer les concentrations d'éthanol présentes dans les milieux de culture des cellules TK6 dans ce modèle expérimental, pour confirmer et apprécier le niveau d'exposition des cellules à l'alcool. Cependant, les résultats obtenus dans ce modèle restent intéressants pour l'évaluation des risques liés à l'exposition des utilisateurs résultante de l'application cutanée d'éthanol. En effet, dans ce modèle, la dose d'alcool administrée était de 20 $\mu\text{L}/\text{épiderme}$ (52 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$), soit une quantité supérieure aux 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ repris dans la ligne directrice de l'OCDE traitant de l'absorption cutanée *in vitro* pour être représentatif des conditions normales de l'exposition humaine cutanée aux produits chimiques (OECD 2004c) et la pénétration cutanée résultante est supérieure dans les épidermes humains reconstitués comparativement à celle réellement existante sur peau humaine, en relation avec une fonction barrière insuffisante (Netzlaff *et al.* 2005, Netzlaff *et al.* 2007, Ponc 1992, Perkins *et al.* 1999, Schmook *et al.* 2001).

Les résultats obtenus sur cellules TK6 par traitement en immersion avec les solutions d'éthanol n'ont pas non plus été reproduits dans le même test du MN réalisé sur un modèle de cellule pulmonaire humaine (NCI H292) avec et sans système d'activation métabolique ajouté. Il en est de même pour les essais réalisés avec une exposition aux vapeurs d'alcool à des doses relativement élevées (de l'ordre de 37400 mg/m^3 ($\pm 19\ 600$ ppm) sur des durées d'expositions de 30 minutes en continu ou de 24 minutes sur une heure (12 fois 2 minutes toutes les 5 minutes). Ces derniers ont été réalisés sans ajout de système d'activation métabolique exogène. Cependant, une métabolisation de l'éthanol ne peut être exclue, le modèle cellulaire utilisé disposant des gènes codant les enzymes du métabolisme des alcools. Il est prévisible en revanche que le niveau d'expression protéique des enzymes du métabolisme était bien plus faible que celui obtenu avec l'ajout d'un système d'activation métabolique exogène. Cependant, ces conditions expérimentales augmentent le degré de représentativité des conditions réelles d'exposition, et sont intéressantes pour l'évaluation des risques en termes de génotoxicité au niveau des voies respiratoires.

En conclusion, les résultats d'essais obtenus sont négatifs lorsque l'éthanol a été testé en conditions expérimentales représentatives de l'exposition en situation d'utilisation des produits hydro-alcooliques. Ceci est en faveur d'une absence de génotoxicité systémique consécutive à une possible pénétration cutanée de l'alcool, et en faveur de l'absence de génotoxicité locale au niveau pulmonaire en relation avec l'exposition aux vapeurs d'alcool.

Aucun essai de génotoxicité sur un système d'essai représentatif de la peau n'a été réalisé avec les solutions d'éthanol.

b) Isopropanol

b.1) Cellules TK6 avec traitement en immersion dans le milieu de culture

Les graphes repris en figure 36 présentent les résultats du test du MN sur cellules TK6 après traitement par l’isopropanol administré en immersion dans le milieu de culture aux doses d’alcool de 89 à 124 mM (5330 à 7430 µg/mL).

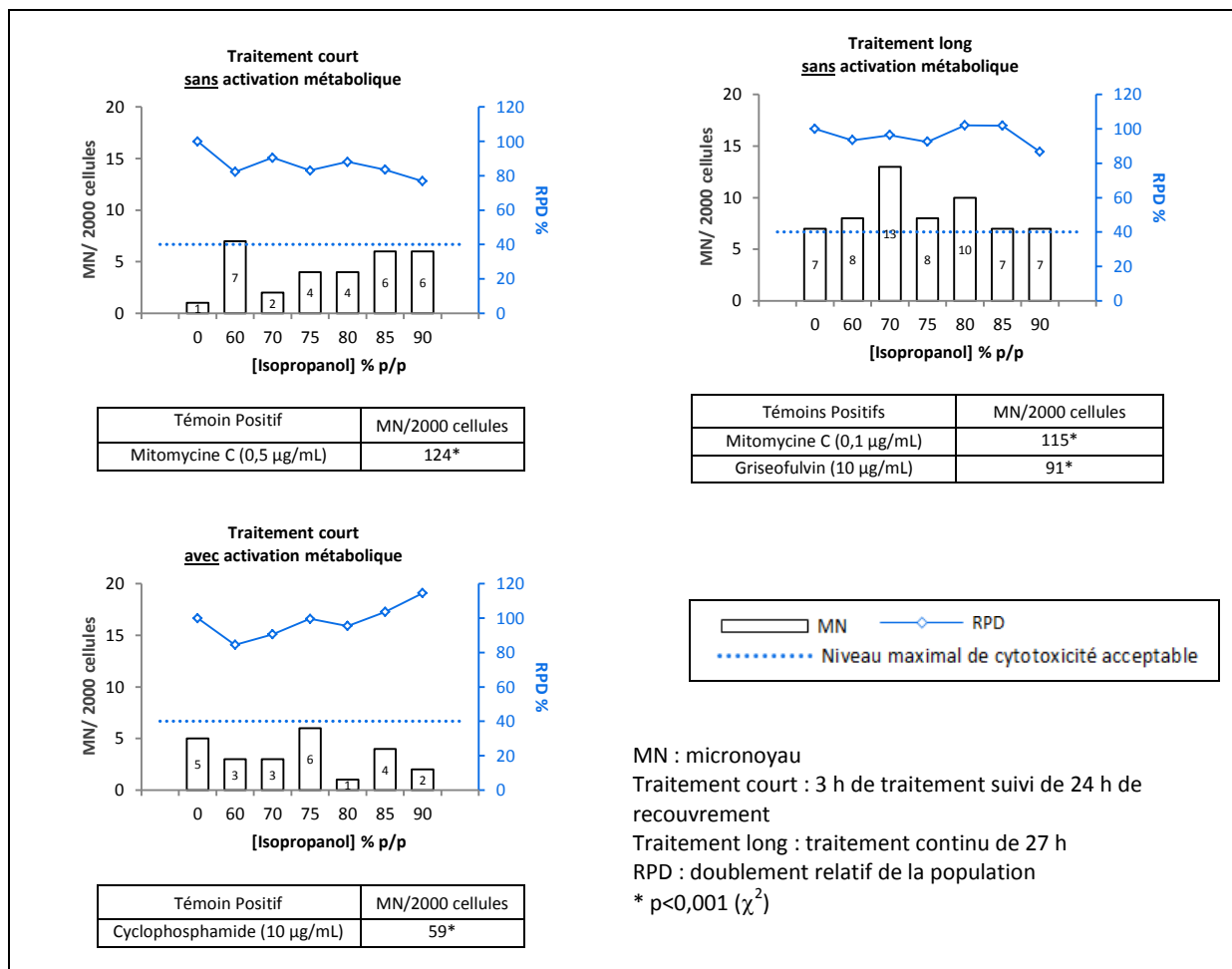


Figure 36 : Test du micronoyau in vitro sur cellules TK6 exposées à l’isopropanol

En absence comme en présence d’activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n’a été observée quelle que soit la solution d’isopropanol, comparativement au témoin négatif. Les résultats obtenus sont cohérents avec les données de la littérature disponibles et sont en faveur de l’absence de propriétés génotoxiques de l’isopropanol.

b.2) Cellules H292 avec traitement en immersion dans le milieu de culture

Les résultats du test du MN sur cellules NCI H292 après traitement par l’isopropanol, administré en immersion dans le milieu de culture aux doses d’alcool de 89 à 124 mM (5330 à 7430 µg/mL) sont présentés en figure 37.

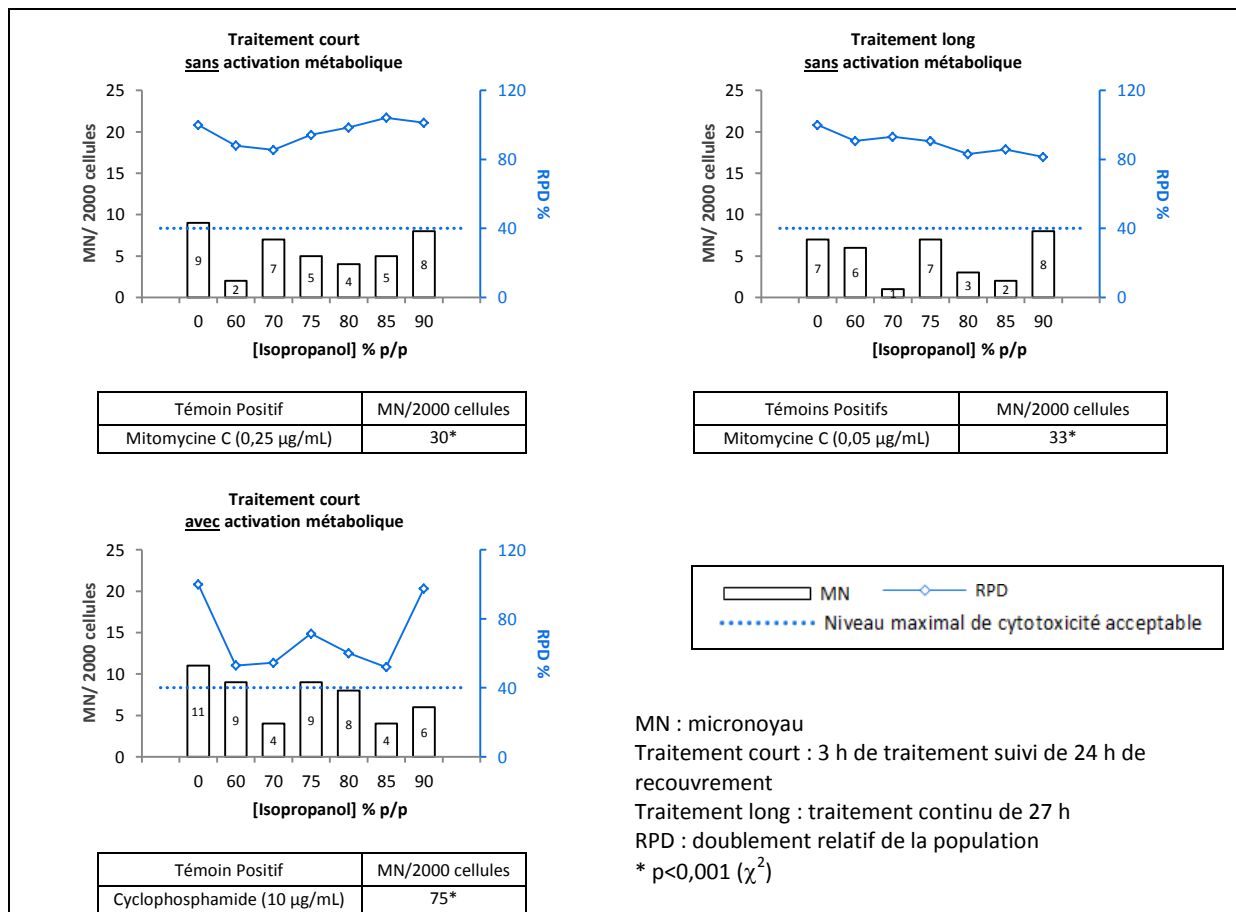


Figure 37 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 exposées à l’isopropanol

En absence comme en présence d’activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n’a été observée quelle que soit la solution d’isopropanol, comparativement au témoin négatif. Les résultats obtenus sont en faveur de l’absence de propriétés génotoxiques de l’isopropanol.

b.3) Cellules H292 cultivées en interface air-liquide (IAL) avec traitement par vapeurs d'alcool

Les graphes en figure 38 présentent les résultats du test du MN sur cellules NCI H292 cultivées en IAL après exposition aux vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'isopropanol à 60, 70, 80 et 85% p/p, selon les deux schémas de traitement retenus (traitement continu de 30 minutes ou exposition de 2 minutes répétée toutes les 5 minutes pendant 1 heure). Le niveau moyen de vapeurs d'isopropanol généré dans l'atmosphère des puits contenant les cultures était de l'ordre de 32700 mg/m³ (±13 100 ppm) d'isopropanol, sans différence significative en fonction de la concentration d'alcool dans la solution utilisée.

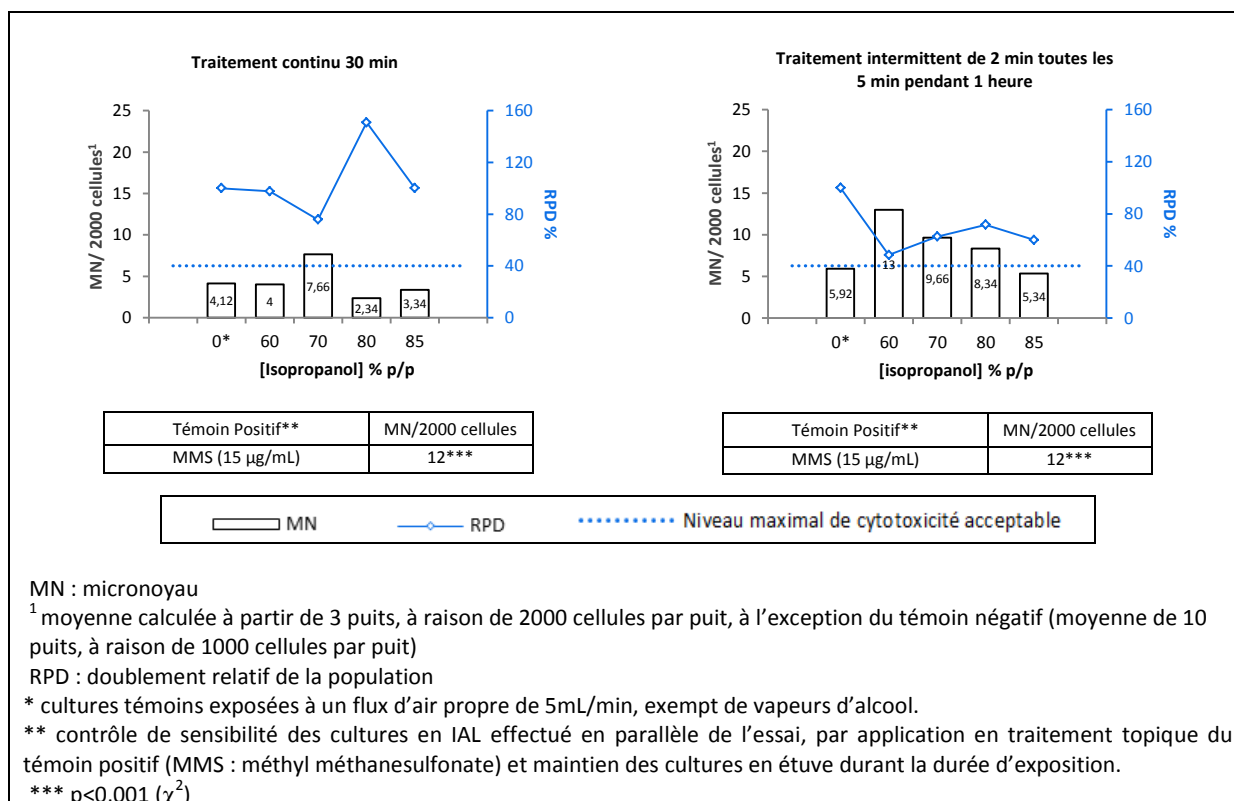


Figure 38 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'isopropanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p

Dans ces deux essais, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée. Pour des raisons pratiques, aucun système d'activation métabolique exogène n'a été ajouté dans cet essai. Cependant, une métabolisation de l'isopropanol ne peut être exclue, le modèle cellulaire utilisé disposant des gènes codant les enzymes du métabolisme des alcools. Les données de cet essai sont donc en faveur d'absence de potentiel génotoxique des vapeurs d'isopropanol, lorsqu'elles sont testées sur une culture en IAL de cellules pulmonaires humaines NCI H292.

b.4) Conclusion sur les essais du MN avec l'isopropanol

L'ensemble des essais mis en œuvre (traitement en immersion sur cultures cellulaires TK6 et NCI H292 aux doses comprises entre 89 et 124 mM d'isopropanol (5330 et 7430 µg/mL), et traitement par vapeurs sur cultures en IAL de cellules NCI H292 – niveau d'exposition moyen de 32700 mg/m³ (±13 100 ppm)) n'a mis en évidence aucun potentiel génotoxique de l'isopropanol.

Aucun test du MN *in vitro* n'a été retrouvé dans la littérature avec l'isopropanol. Cependant, il existe pour cet alcool des données portant sur les différents aspects à prendre en considération pour l'évaluation de la génotoxicité (essais *in vitro* de mutations géniques sur bactéries et sur cellules de mammifères, en absence et en présence d'activation métabolique, et test du MN *in vivo*).

Les données obtenues sont cohérentes avec les données de la littérature disponibles pour cet alcool, et constituent un élément de preuve supplémentaire en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques de l'isopropanol. Elles apportent également des données utiles pour l'évaluation des risques en termes de génotoxicité de l'isopropanol au niveau des voies respiratoires, avec des résultats négatifs obtenus dans des conditions expérimentales augmentant le degré de représentativité des conditions réelles d'exposition en situation d'utilisation des produits hydro-alcooliques.

Aucun essai de génotoxicité sur un système d'essai représentatif de la peau n'a été réalisé avec les solutions d'isopropanol.

c) n-propanol

c.1) Cellules TK6 avec traitement en immersion dans le milieu de culture

Les résultats du test du MN sur cellules TK6 après traitement par du n-propanol administré en immersion dans le milieu de culture aux doses d'alcool de 90 à 125 mM (5400 à 7500 µg/mL) sont présentés dans la figure 39 ci-après.

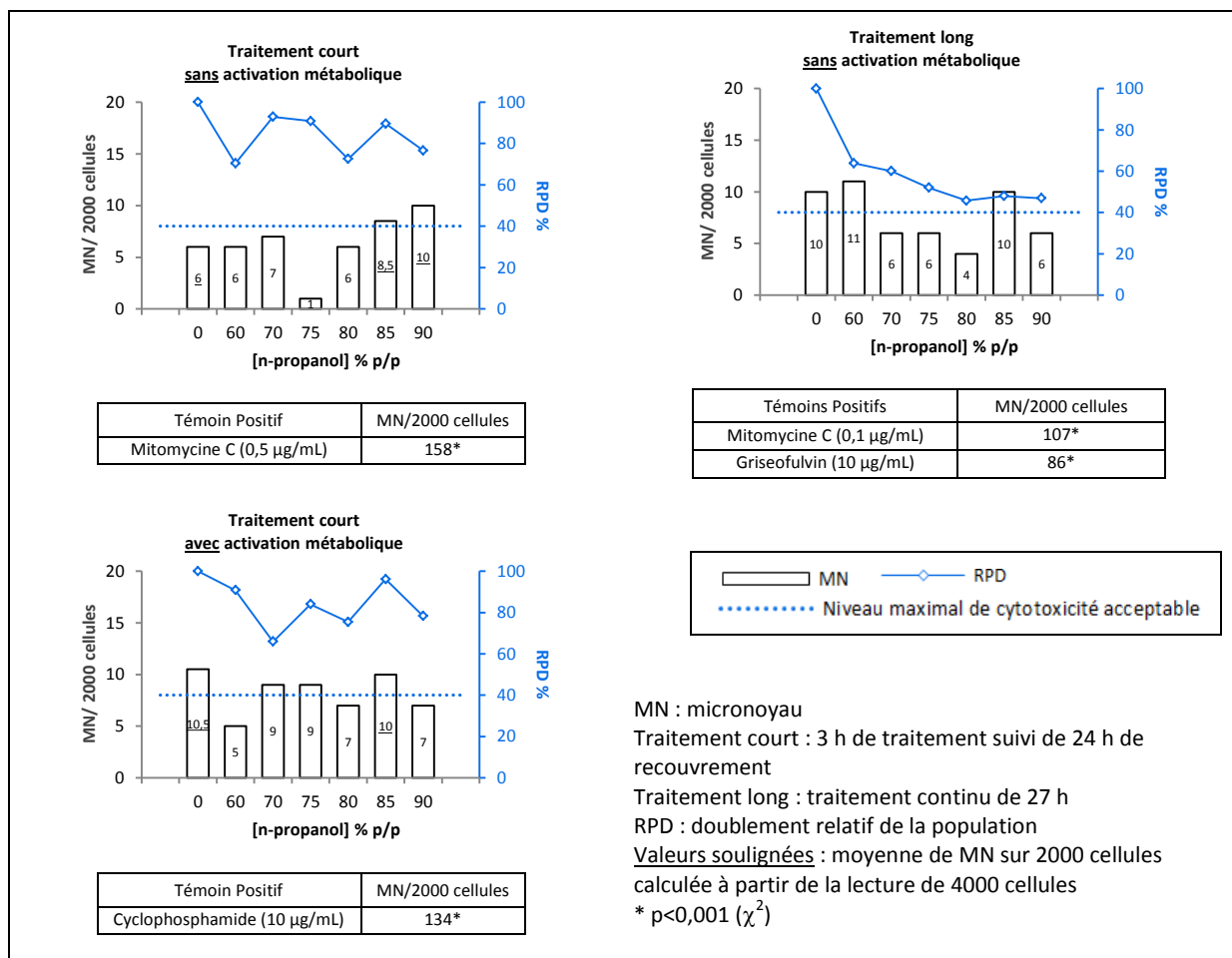


Figure 39 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées au n-propanol

En absence d'activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit la solution de n-propanol, comparativement au témoin négatif. Les valeurs de MN pour les cultures traitées à 85 et 90 % sont une moyenne calculée sur 4000 cellules, en raison d'écart de dénombrement important entre les deux cultures sur la première série de lecture (3 et 10 MN à 85% et 2 et 7 MN à 90%). Les données de la deuxième lecture étaient de 3 et 1 MN à 85 % et 5 et 6 MN à 90 %.

En présence d'activation métabolique, les résultats sont également négatifs, avec l'absence d'augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de MN quelle que soit la solution de n-propanol, comparativement au témoin négatif. Pour les mêmes raisons que précédemment, la valeur restituée pour le traitement par le n-propanol à 85 % est une valeur calculée sur 4000 cellules (dénombrement de 10 et 2 MN sur les premières lectures de 1000 cellules de chaque culture, puis de 4 et 4 MN sur la deuxième lecture).

Les conclusions obtenues sont en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol et sont cohérents avec les données de la littérature disponibles sur cet alcool.

Cependant, les seuls essais retrouvés dans la littérature investiguant la génotoxicité du n-propanol sont des études *in vitro* de mutation génique sur bactéries et des essais de mutations chromosomiques, avec, pour seul essai réalisé en présence d'activation métabolique, un test d'échanges de chromatides sœurs, dont la ligne directrice de l'OCDE est aujourd'hui abrogée en raison de résultats non prédictifs de génotoxicité. Les résultats obtenus constituent donc un élément de preuve supplémentaire en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol.

c.2) Cellules H292 avec traitement en immersion dans le milieu de culture

Les résultats du test du MN sur cellules NCI après traitement par du n-propanol administré en immersion dans le milieu de culture aux doses d'alcool de 90 à 125 mM (5400 à 7500 µg/mL) sont présentés dans la figure 40 ci-dessous.

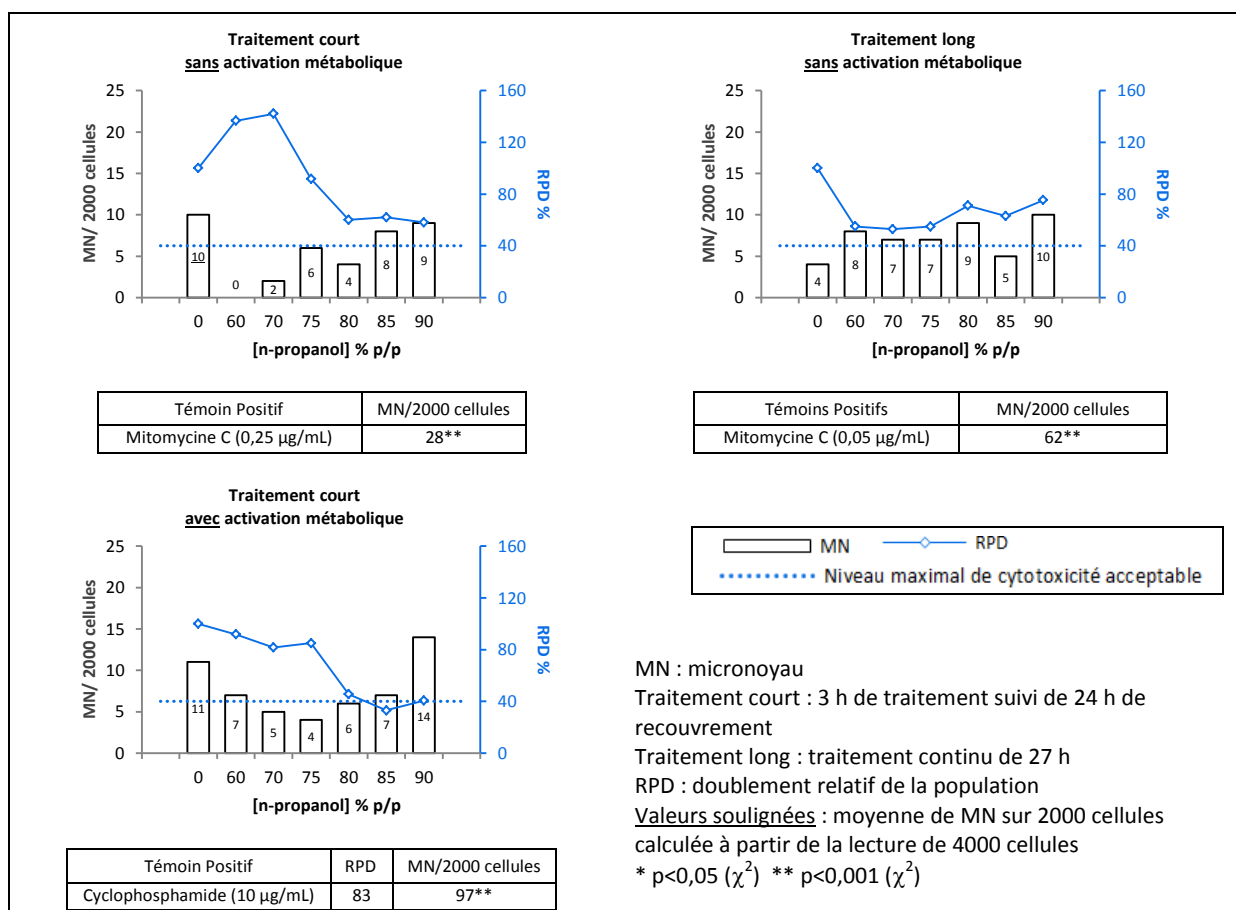


Figure 40 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 exposées au n-propanol

En absence comme en présence d'activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit la solution de n-propanol, comparativement au témoin négatif.

En raison d'un écart important de dénombrement de MN sur 1000 cellules entre les deux cultures sur la première série de lames du témoin négatif des deux cultures pour la condition d'essai traitement court sans activation métabolique (11 et 3 MN dénombrés sur 1000 cellules), une deuxième lecture a été effectuée avec dénombrement de 5 et 1 MN. La valeur de 10 MN pour 2000 cellules correspond donc à la moyenne calculée à partir de 4000 cellules.

Les résultats obtenus sont en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol.

c.3) Cellules H292 cultivées en interface air-liquide (IAL) avec traitement par vapeurs d'alcool

Les graphes repris en figure 41 présentent les résultats du test du MN sur cellules NCI H292 cultivées en IAL après exposition aux vapeurs d'alcool générées à partir de solutions de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p, selon les deux schémas de traitement retenus (traitement continu de 30 minutes ou exposition de 2 minutes répétée toutes les 5 minutes pendant 1 heure). Le niveau moyen de vapeurs de n-propanol généré dans l'atmosphère des puits contenant les cultures était de l'ordre de 17300 mg/m³ (±7000 ppm) de n-propanol, sans différence significative en fonction de la concentration d'alcool dans la solution utilisée.

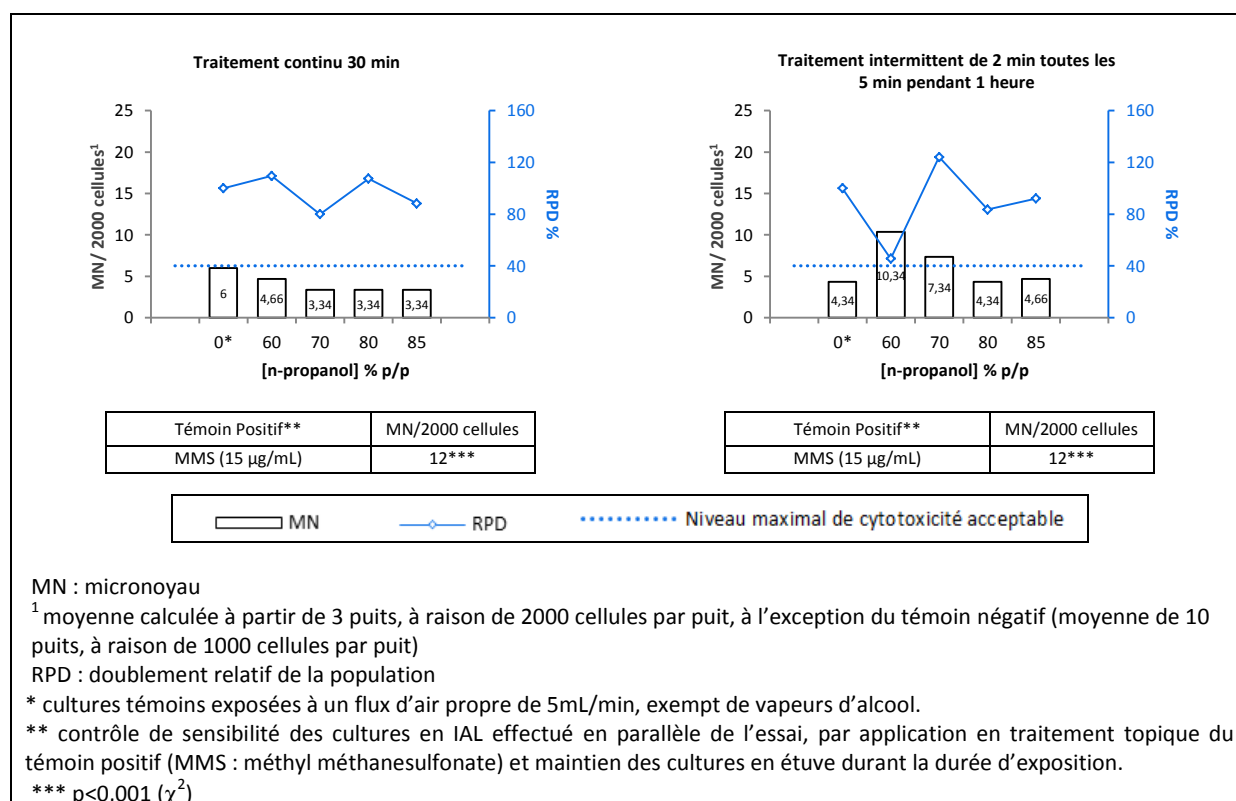


Figure 41 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'alcool générées à partir de solutions de n-propanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p

Dans ces deux essais, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée. Pour des raisons pratiques, aucun système d'activation métabolique exogène n'a été ajouté dans cet essai. Cependant, une métabolisation du n-propanol ne peut être exclue, le modèle cellulaire utilisé disposant des gènes codant les enzymes du métabolisme des alcools. Les données de cet essai sont donc en faveur d'absence de potentiel génotoxique des vapeurs de n-propanol, lorsqu'elles sont testées sur une culture en IAL de cellules pulmonaires humaines NCI H292.

c.4) **Conclusion sur les essais du MN avec le n-propanol**

L'ensemble des essais mis en œuvre (traitement en immersion sur cultures cellulaires TK6 et NCI H292 aux doses comprises entre 90 et 125 mM de n-propanol (5400 et 7500 µg/mL), et traitement par vapeurs sur cultures en IAL de cellules NCI H292 – niveau d'exposition moyen de 17300 mg/m³ (±7000 ppm)) n'a mis en évidence aucun potentiel génotoxique du n-propanol.

Aucun test du MN *in vitro* n'a été retrouvé dans la littérature avec le n-propanol. Les seuls essais retrouvés investiguant la génotoxicité du n-propanol sont des études *in vitro* de mutation génique sur bactéries et des essais de mutations chromosomiques, avec, pour seul essai réalisé en présence d'activation métabolique, un test d'échanges de chromatides sœurs, dont la ligne directrice de l'OCDE est aujourd'hui abrogée en raison de résultats non prédictifs de génotoxicité. Les résultats obtenus constituent donc un élément de preuve intéressant pour étayer l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol, au regard du peu de données disponibles dans la littérature en termes de propriétés génotoxiques pour cet alcool.

Par ailleurs, les résultats d'essai obtenus suite à l'exposition de cultures cellulaires pulmonaires à des vapeurs de n-propanol apportent des données intéressantes pour l'évaluation des risques en termes de génotoxicité du n-propanol au niveau des voies respiratoires. En effet, nos résultats négatifs ont été obtenus dans des conditions expérimentales augmentant le degré de représentativité des conditions réelles d'exposition en situation d'utilisation des produits hydro-alcooliques.

Aucun essai de génotoxicité sur un système d'essai représentatif de la peau n'a été réalisé avec les solutions de n-propanol.

d) Conclusion sur les alcools seuls

L'isopropanol et le n-propanol testés aux doses respectives de 89 à 124 mM (5 330 à 7 430 µg/mL) et de 90 à 125 mM (5 400 à 7 500 µg/mL) n'ont pas induit d'augmentation significative de la fréquence de micronoyaux dans le test du MN *in vitro* sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6, que ce soit en présence ou en absence de système d'activation métabolique. Il en est de même pour les essais réalisés sur les cellules NCI H292 (modèle cellulaire pulmonaire humain), y compris lorsque les alcools ont été administrés sous forme de vapeurs (valeurs moyennes de $\pm 32\,700\text{ mg/m}^3$ ($\pm 13\,100\text{ ppm}$) pour l'isopropanol et $17\,300\text{ mg/m}^3$ ($\pm 7\,000\text{ ppm}$) pour le n-propanol).

Seuls des résultats équivoques ont été retrouvés sur cellules TK6 traitées par immersion avec des teneurs en éthanol de 117 à 156 mM (5 430 à 7 400 µg/mL) en présence d'activation métabolique, avec une augmentation statistiquement et biologiquement significative du nombre de MN comparativement au témoin négatif retrouvée dans deux essais indépendants. Dans ces essais, l'effet n'était pas accentué avec l'augmentation de la dose. Ces propriétés n'ont pas été retrouvées lorsque l'exposition à l'éthanol était indirecte, avec administration de l'alcool au niveau d'un épiderme humain reconstitué, mimant ainsi la barrière cutanée telle qu'elle existe en situation réelle d'exposition. Il en est de même lorsque l'essai a été réalisé sur un modèle de cellules pulmonaires (NCI H292), y compris lorsque l'éthanol a été administré sous forme de vapeurs (niveaux d'exposition moyen de $\pm 37\,400\text{ mg/m}^3$ ($\pm 19\,600\text{ ppm}$)).

Les données issues de modèles expérimentaux plus représentatifs des conditions réelles d'exposition aux alcools en situation professionnelle lors de l'utilisation des produits hydro-alcooliques apportent des informations en faveur de l'absence de risque génotoxique systémique ou des voies respiratoires liés à l'exposition à ces alcools.

Aucun essai de génotoxicité sur un système d'essai représentatif de la peau n'a été réalisé avec les différents alcools.

III.2.2.2.2. Solutions hydro-alcooliques (SHA) et mélange de co-formulants (CoF₁₀)

Pour déterminer la teneur en co-formulants à utiliser pour formuler les SHA à tester (dose n'entraînant pas de cytotoxicité), un essai préalable sur le mélange de co-formulants seuls (CoF₁₀ : teneur cumulée totale de 10% p/p en solution dans le DMSO) a été réalisé sur une gamme de dilutions.

Cet essai a également permis d'évaluer le potentiel génotoxique du mélange de co-formulants.

a) Mélange CoF₁₀

a.1) Essai préliminaire

A des fins de détermination de la dose maximale de CoF₁₀ pour l'essai principal, une gamme de dilutions de 11 doses de CoF₁₀ de progression géométrique au demi a été préalablement testée en présence et en absence d'activation métabolique.

Les graphes en figure 42 présentent les données de toxicité restituées en termes de doublements de population relatifs observés pour cette gamme de dilutions.

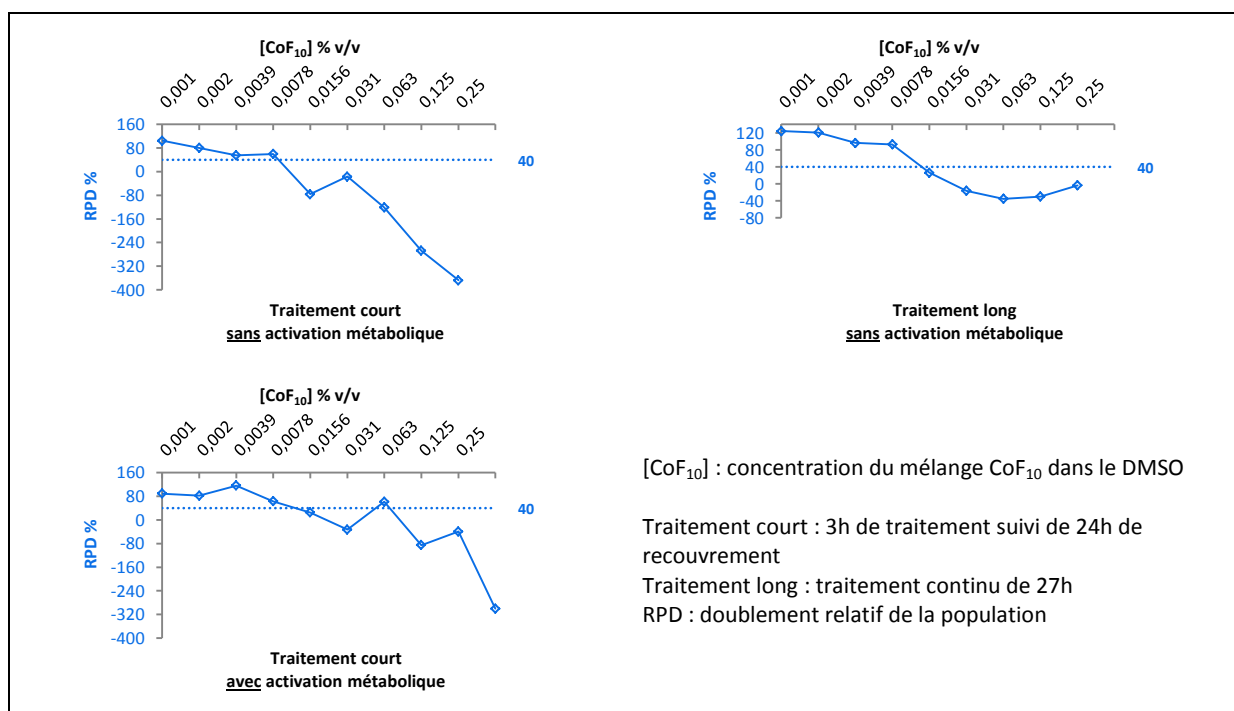


Figure 42 : Essai préliminaire de cytotoxicité sur cellules TK6 après traitement par le mélange CoF₁₀

Dans les 3 conditions d'essai, la première dose testée générant plus de 60% de cytotoxicité (RPD < 40%) était de 0,0156%, et la première dose testée générant moins de 60% de

cytotoxicité était de 0,0078%. La concentration de 0,015% a donc été choisie comme la plus forte concentration pour les essais principaux de génotoxicité.

Un pas de dilution plus petit a été utilisé pour l’essai avec traitement long comparativement au traitement court (pas de dilution de 1,2 *versus* 1,5). En effet, lors du traitement long, le niveau de cytotoxicité observé à 0,0078% était plus faible que pour les essais avec un traitement court, avec un taux de cytotoxicité de 7,3%. Cette approche a permis d’obtenir une gamme de dilutions sur des teneurs les plus élevées possibles sans pour autant atteindre un niveau de cytotoxicité qui rendrait l’essai inexploitable.

a.2) Essai définitif

Les résultats du test définitif du MN sur cellules TK6 après traitement par le mélange de co-formulants administré en immersion dans le milieu de culture sont présentés en figure 43.

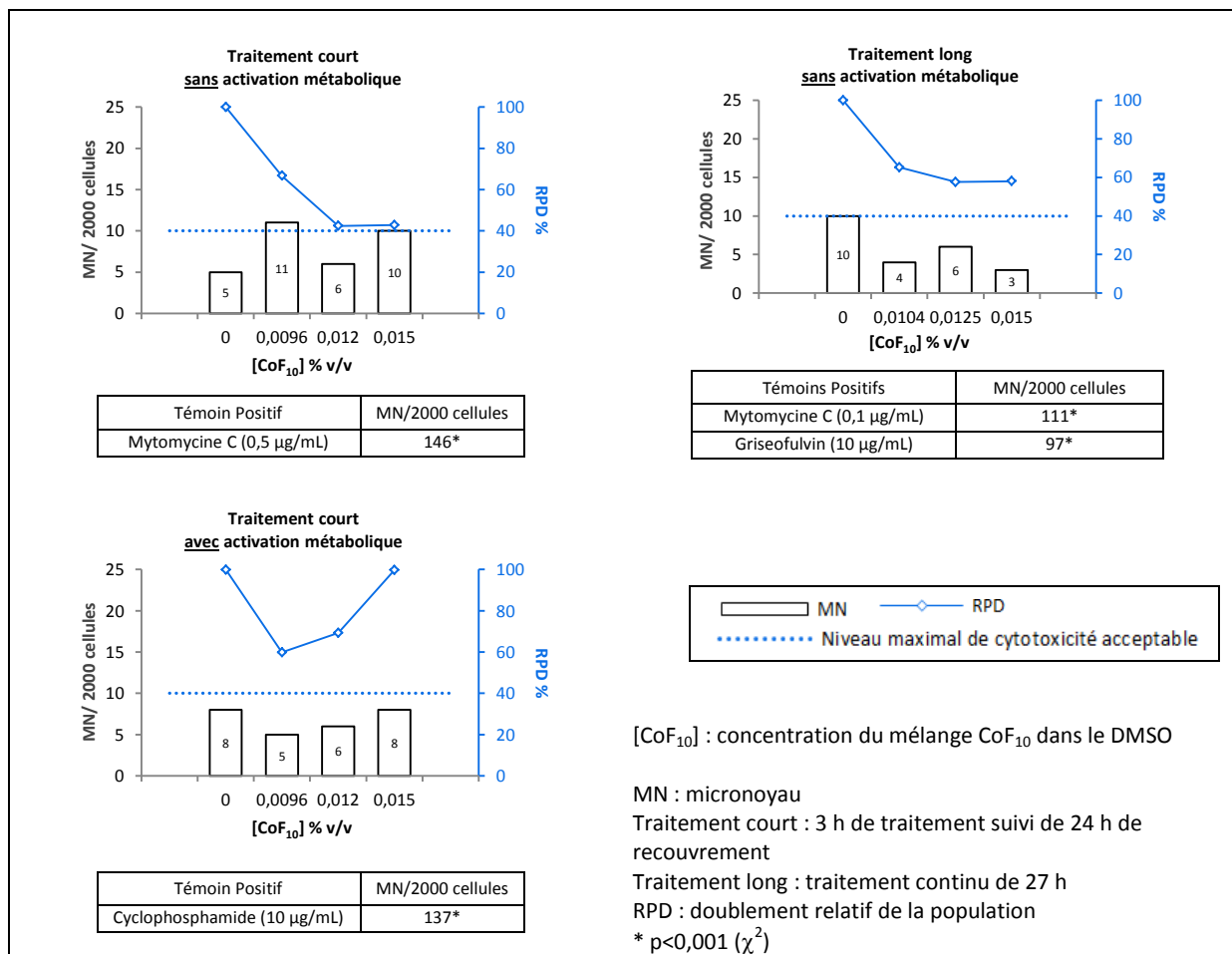


Figure 43 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées au mélange CoF₁₀

En absence comme en présence d’activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n’a été observée quelle que soit la concentration testée du mélange de co-formulants,

comparativement au témoin négatif. Ces données sont en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques du mélange de co-formulants CoF₁₀.

Sur la base de ces résultats, la teneur initiale de 1% v/v de co-formulants (pour une teneur finale de 0,001 % lors de la réalisation de l'essai) a été retenue pour formuler les SHA testés (teneur maximale n'entraînant pas de cytotoxicité du système d'essai).

b) Solutions hydro-alcooliques (SHA)

Pour chaque type d'alcool, un essai préliminaire a été réalisé pour confirmer le niveau de cytotoxicité acceptable des produits d'essai (résultats non présentés). Les résultats définitifs de génotoxicité sont présentés ci-après, par type d'alcool.

b.1) SHA sur base éthanol

Les graphes en figure 44 présentent les résultats du test du MN sur cellules TK6 après traitement par des solutions hydro-alcooliques sur base éthanol, administrées en immersion dans le milieu de culture aux doses d'alcool de 118 à 161 mM (5460 à 7430 µg/mL).

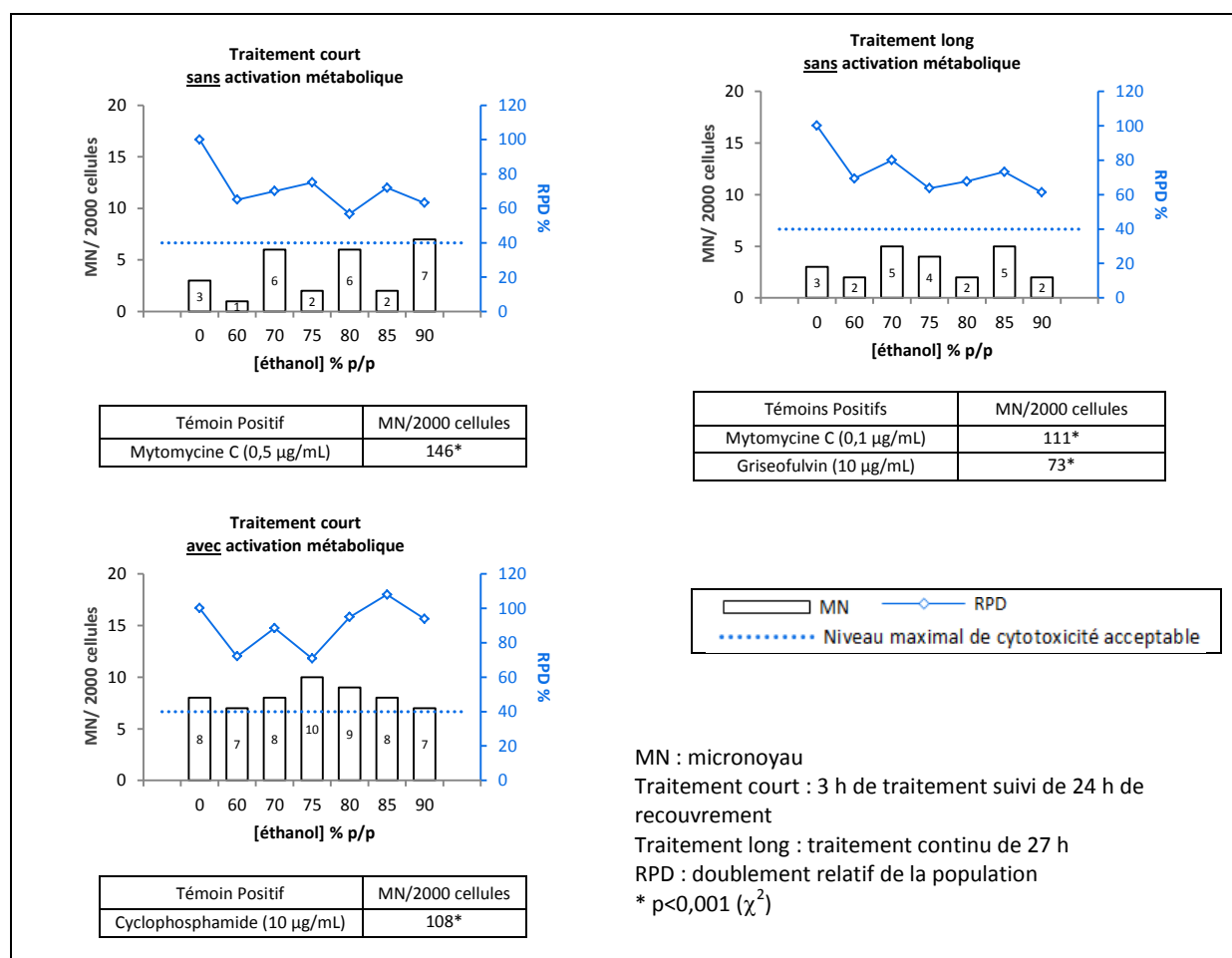


Figure 44 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées à des solutions hydro-alcooliques sur base éthanol

En absence comme en présence d'activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit le produit d'essai, comparativement au témoin négatif. Dans ces conditions d'essai, aucun potentiel génotoxique des solutions hydro-alcooliques sur base éthanol n'a été mis en évidence.

b.2) *SHA sur base isopropanol*

Les graphes en figure 45 présentent les résultats du test du MN sur cellules TK6 après traitement par des solutions hydro-alcooliques sur base isopropanol administrées en immersion dans le milieu de culture aux doses d'alcool de 89 à 120 mM (5370 à 7230 µg/mL).

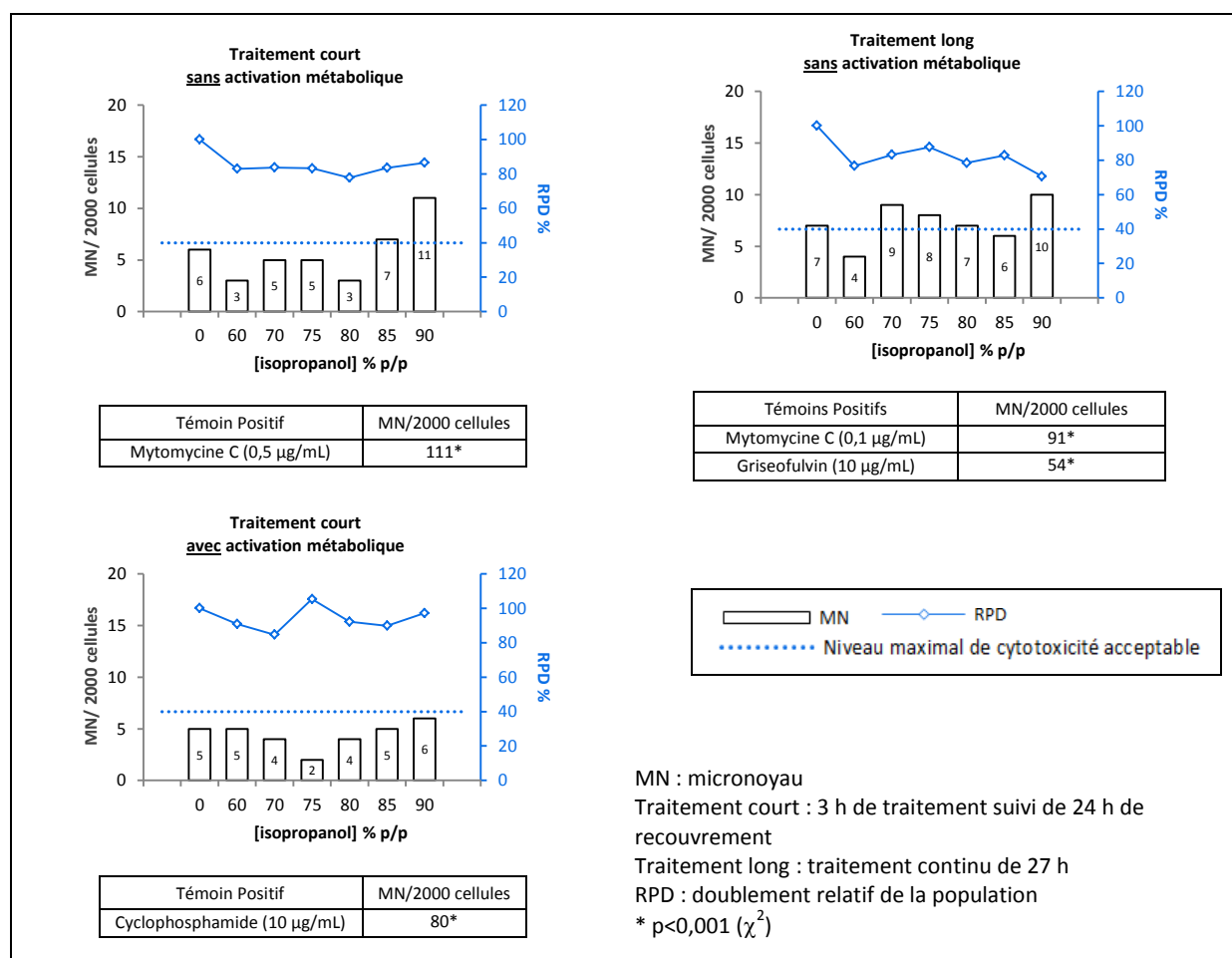


Figure 45 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées à des solutions hydro-alcooliques sur base isopropanol

En absence comme en présence d'activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit le produit d'essai, comparativement au témoin négatif. Dans ces conditions d'essai, aucun potentiel génotoxique des solutions hydro-alcooliques sur base isopropanol n'a été mis en évidence.

b.3) *SHA sur base n-propanol*

Les graphes en figure 46 présentent les résultats du test du MN sur cellules TK6 après traitement par des solutions hydro-alcooliques sur base n-propanol administrées en immersion dans le milieu de culture aux doses d'alcool de 90 à 126 mM (5430 à 7550 µg/mL).

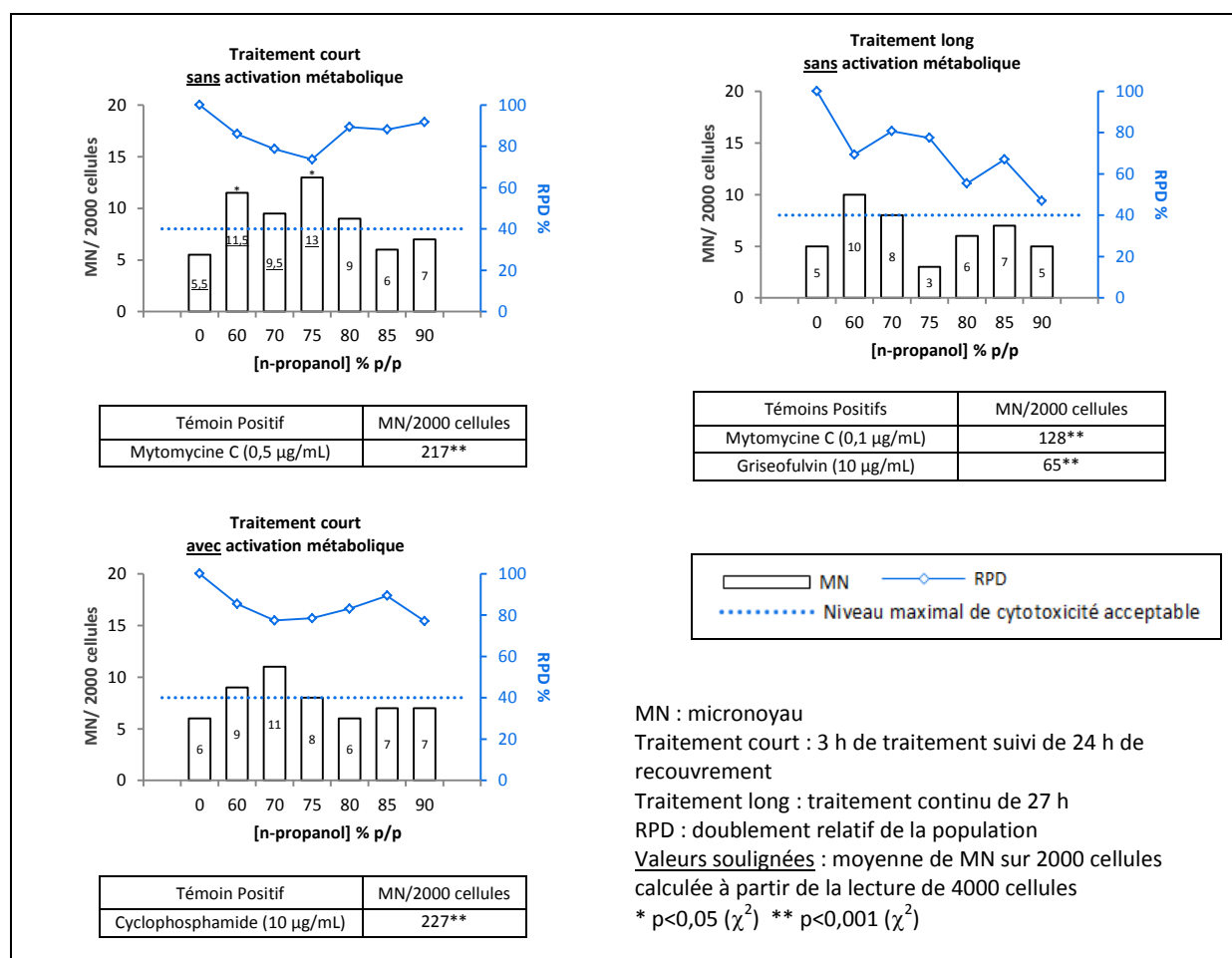


Figure 46 : Test du micronoyau *in vitro* sur cellules TK6 exposées à des solutions hydro-alcooliques sur base n-propanol

Lors du traitement court en absence d'activation métabolique, les solutions hydro-alcooliques sur base n-propanol à 60 et 75 % p/p ont induit une augmentation statistiquement significative du nombre de cellules micronucléées, comparativement au témoin négatif. Les valeurs de MN pour ces doses sont une moyenne calculée sur 4000 cellules, en raison d'écart de dénombrement important sur 1000 cellules entre les deux cultures sur la première série de lames (3 et 10 MN à 85% et 2 et 7 MN à 90%). Les lectures effectuées sur la deuxième série de lames des deux cultures ont respectivement dénombré 7 et 5 MN à 60% et 3 et 5 MN à 75%, donnant des valeurs moyennes de 11,5 et 13 MN pour 2000 cellules, comparativement à 5,5 MN pour 2000 cellules pour le témoin négatif.

Le même traitement administré sur une durée plus longue (27 heures) n'a entraîné aucune augmentation significative du nombre de MN quelle que soit la teneur en alcool, comparativement au témoin négatif.

Lors du traitement en présence d'activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées n'a été observée quelle que soit le produit d'essai, comparativement au témoin négatif.

Les résultats de cet essai sont divergents en absence d'activation métabolique. Cependant, en raison de l'hétérogénéité de lecture du nombre de MN entre lecteurs et cultures, et des résultats clairement négatifs pour les mêmes produits d'essai administrés sur une durée de traitement plus longue, les valeurs moyennes de 11,5 et 13 MN pour 2000 cellules n'ont pas été considérées comme étant biologiquement significatives. En présence d'activation métabolique, les résultats étaient clairement négatifs. En cohérence avec les données déjà publiées sur le n-propanol, et les résultats obtenus avec le n-propanol seul sur cellules TK6, les résultats de cet essai sont faveur de l'absence de potentiel génotoxique des solutions hydro-alcooliques sur base n-propanol.

c) Conclusion sur les solutions hydro-alcooliques

Les solutions hydro-alcooliques (SHA) sur base éthanol, isopropanol ou n-propanol testées respectivement aux doses d'alcool de 118 à 161 mM (5460 à 7430 µg/mL), 89 à 120 mM (5370 à 7230 µg/mL) et 90 à 126 mM (5430 à 7550 µg/mL) n'ont pas entraîné d'augmentation du nombre de cellules micronucléées comparativement aux témoins dans le test du MN sur cellules TK6, que ce soit en présence ou en absence de système d'activation métabolique. Il en est de même pour les essais réalisés sur le mélange de co-formulants présents dans les SHA lorsqu'ils ont été testés seuls, sur une gamme de 3 concentrations.

Aucun essai de génotoxicité sur un système d'essai représentatif de la peau n'a été réalisé avec les SHA.

III.2.2.3. Test des comètes

Le test des comètes a été réalisé en vue de compléter les résultats d'essais obtenus avec l'éthanol sur les cellules TK6 dans le test du MN. Dans le cadre de l'approche comparative entre alcools, l'isopropanol et le n-propanol ont également été testés. Pour cet essai, les 3 alcools en solution dans l'eau à 60, 70, 75, 80 et 85% ont été administrés dans le milieu de culture des cellules TK6 à la dose de 1% v/v.

Le test des comètes a également été réalisé sur la lignée cellulaire pulmonaire NCI H292, après exposition des cultures en interface air-liquide (IAL) aux vapeurs d'alcool avec le dispositif Vitrocell, en relation avec l'exposition des voies respiratoires aux alcools lors de l'utilisation des produits hydro-alcooliques. Les doses d'alcool administrées dans ces essais étaient les mêmes que celles utilisées lors du test du MN, les essais ayant été réalisés avec les mêmes produits d'essai.

Les doses d'essai sont résumées dans le tableau 64 ci-dessous

Tableau 64 : Doses d'alcool administrées dans le test des comètes

TK6	Ethanol	de 6,71 à 8,91 µL/mL (5430 à 7210 µg/mL ou 118 à 156 mM)
	Isopropanol	de 6,59 à 8,80 µL/mL (5330 à 7120 µg/mL ou 89 à 118 mM)
	n-propanol	de 6,69 à 8,92 µL/mL (5400 à 7220 µg/mL ou 90 à 120 mM)
NCI H292	Ethanol	19 562 ppm ± 1 554
	Isopropanol	13 114 ppm ± 354
	n-propanol	6 946 ppm ± 1 452

Pour chaque essai, les critères d'acceptabilité rappelés ci-dessous permettant l'exploitation des résultats étaient remplis :

- cytotoxicité à chaque concentration testée inférieure à 70% par rapport au contrôle négatif,
- pourcentages d'ADN dans la queue du témoin positif statistiquement supérieurs à ceux du témoin négatif,
- pourcentages d'ADN dans la queue des groupes témoins positifs et négatifs cohérents avec les données historiques.

Les résultats présentés reprennent, pour chaque condition d'essai ou schéma de traitement, la moyenne des médianes des TI (tail intensity / pourcentage d'ADN dans la queue) pour 100 cellules. Le calcul a été fait à partir des résultats des différentes cultures (2 à 3 cultures en fonction des essais, correspondant à 400 ou 600 cellules). Les résultats sont restitués pour chaque produit d'essai ainsi que pour les témoins négatifs et positifs.

Pour les données des témoins négatifs exposés à de l'air propre dans les essais effectués avec le dispositif Vitrocell, la médiane des TI correspond à la moyenne des témoins négatifs des 4 essais par type d'alcool (10 cultures au total : 3 puits pour deux essais et 2 puits pour les deux autres, l'un des 3 puits ayant été remis à l'étuve à des fins de témoin négatif pour l'exploitation des résultats du témoin positif administré en étuve).

Les données de cytotoxicité associée sont également restituées en termes de viabilité relative comparativement au témoin négatif.

III.2.2.3.1. Alcools seuls sur cellules TK6

Le tableau 65 ci-dessous présente les résultats du test des comètes sur cellules TK6 après traitement en immersion dans le milieu de culture par des solutions d'éthanol, isopropanol ou n-propanol dans l'eau. Les doses d'essais étaient comprises entre 5430 et 7210 µg/mL (118 - 156 mM) pour l'éthanol, entre 5330 et 7120 µg/mL (89 - 118 mM) pour l'isopropanol et entre 5400 et 7220 µg/mL (90 - 120 mM) pour le n-propanol.

Tableau 65 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules TK6 exposées à des solutions d'éthanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p

Conditions d'essai		% ADN dans la queue ¹	Viabilité cellulaire relative	
Sans activation métabolique	Témoin positif (MMS 20 µg/mL)	42,74* ± 0,89	90,9	
	Témoin négatif	1,20 ± 0,37	100,0	
	% p/p éthanol	60	0,68 ± 0,23	121,2
		70	0,90 ± 0,04	112,1
		75	0,61 ± 0,15	112,1
		80	0,40 ± 0,03	109,1
		85	0,64 ± 0,13	103,0
	% p/p isopropanol	60	0,62 ± 0,05	103,0
		70	0,56 ± 0,12	100,0
		75	0,78 ± 0,06	87,9
		80	0,68 ± 0,36	124,2
		85	0,53 ± 0,28	115,2
	% p/p n-propanol	60	0,57 ± 0,06	84,8
		70	0,68 ± 0,24	87,9
		75	0,71 ± 0,15	87,9
80		0,55 ± 0,26	81,8	
85		0,85 ± 0,19	69,7	
Avec activation métabolique	Témoin positif (MMS 20 µg/mL) ²	3,02** ± 0,42	125,0	
	Témoin négatif	0,17 ± 0,08	100,0	
	% p/p éthanol	60	1,24** ± 1,36	95,8
		70	1,59** ± 0,58	106,2
		75	0,84** ± 0,24	118,7
		80	1,18** ± 0,30	175,0
		85	0,74** ± 0,16	85,4
	% p/p isopropanol	60	0,80** ± 0,43	127,1
		70	0,34** ± 0,07	143,7
		75	0,46** ± 0,25	120,8
		80	0,55** ± 0,12	143,7
		85	0,78** ± 0,41	104,2
	% p/p n-propanol	60	0,55* ± 0,04	104,2
		70	0,55* ± 0,12	129,2
		75	0,56* ± 0,13	110,4
80		0,89* ± 0,18	93,7	
85		0,91* ± 0,05	125,0	

¹ moyenne des médianes et écart-type pour 100 cellules (données issues de 2 cultures – lecture de 400 cellules au total)
² témoin positif testé sans système d'activation métabolique
MMS : méthyl méthanesulfonate
* p<0,05 Mann-Whitney (différence par rapport au contrôle)
** p<0,05 Mann-Whitney et Kruskal-Wallis (différence d'effet entre les concentrations)

Dans cet essai, le témoin positif utilisé en parallèle des deux conditions d'essai pour confirmer la sensibilité des cellules était le MMS, testé sans système d'activation métabolique. En effet, il n'existait pas, au moment de la réalisation du test, de témoin positif valide en présence de système d'activation métabolique pour le test des comètes. La réponse induite par le MMS dans les deux conditions d'essai était biologiquement significative, bien que relativement faible en présence d'activation métabolique, mais dans la gamme des témoins historiques du laboratoire. L'essai a donc été considéré valide.

En absence d'activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ni biologiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue n'a été observée comparativement au témoin négatif, quelle que soit l'alcool testé, et quelle que soit la dose administrée.

En présence d'activation métabolique, une augmentation du pourcentage d'ADN dans la queue suite au traitement par les différents alcools a été observée, comparativement au témoin négatif. Cette augmentation était statistiquement significative pour toutes les doses d'essai. Il est cependant difficile d'interpréter ces résultats. En effet, dans cette condition d'essai, le résultat du témoin négatif était faible, nettement inférieur à celui observé en absence d'activation métabolique (0,17% *versus* 1,20%) et n'a pu être comparé à des données historiques, le laboratoire ne disposant pas de données sur ce test pour ce modèle cellulaire et cette condition d'essai.

Prenant également en considération la faible amplitude de réponse (inférieure à 2% pour l'éthanol et inférieure à 1% pour l'isopropanol et le n-propanol), l'absence de relation dose-effet pour l'éthanol et l'isopropanol, et la faible amplitude d'augmentation de réponse avec la dose pour le n-propanol, il est probable que les réponses observées suite au traitement par ces 3 alcools soient sans significativité biologique.

III.2.2.3.2. Vapeurs d'alcools sur cellules H292 cultivées en interface air-liquide (IAL)

a) Ethanol

Le tableau 66 présente les résultats du test des comètes sur cellules NCI H292 cultivées en IAL après exposition aux vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'éthanol à 60, 70, 80 et 85% p/p, selon les deux schémas de traitement retenus (traitement continu de 30 minutes ou exposition de 2 minutes répétée toutes les 5 minutes pendant 1 heure). Le niveau moyen de vapeurs d'éthanol généré dans l'atmosphère des puits contenant les cultures était de 19 562 ppm \pm 1 554, sans différence significative en fonction de la concentration d'alcool dans la solution utilisée.

Tableau 66 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'éthanol - essai en absence d'activation métabolique

Conditions d'essai		% ADN dans la queue ¹	Viabilité cellulaire relative ²	
Traitement de 30 minutes	Témoin positif ³ MMS (15 µg/mL)	27,44* ± 2,40	104,2 ± 8,8	
	% p/p éthanol	0 ⁴	3,09 ± 1,04	100,0
		60	3,39 ± 1,12	104,1 ± 6,2
		70	4,03 ± 0,87	102,3 ± 0,9
		80	1,8 ± 0,31	100,5 ± 2,1
		85	3,09 ± 1,06	102,6 ± 1,4
Traitement réitéré de 2 minutes toutes les 5 minutes pendant 1 heure	Témoin positif ³ MMS (15 µg/mL)	28,79* ± 10,85	103 ± 8,7	
	% p/p éthanol	0 ⁴	1,95 ± 0,69	100,0
		60	2,97 ± 0,47	89,0 ± 16,6
		70	2,82* ± 0,33	93,9 ± 7,9
		80	2,7 ± 1,11	90,2 ± 6,4
		85	1,36 ± 0,13	95,1 ± 2,0

¹ moyenne des médianes et écart-type pour 100 cellules (données issues de 3 puits à raison de 200 cellules par puit, à l'exception du témoin négatif (moyenne de 10 puits : données compilées des essais avec les 4 solutions d'alcool))
² moyenne et écart-type des 3 cultures traitées en comparaison aux viabilités cellulaires des 2 ou 3 cultures non traitées
³ contrôle de sensibilité des cultures en IAL effectué en parallèle de l'essai, par application en traitement topique du témoin positif (MMS : méthyl méthanesulfonate) et maintien des cultures en étuve durant la durée d'exposition.
⁴ cultures témoins exposées à un flux d'air propre de 5mL/min, exempt de vapeurs d'alcool.
* p<0,05 Mann-Whitney

Dans cet essai, suite à 30 minutes d'exposition continue aux vapeurs d'alcool, aucune augmentation statistiquement ni biologiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue n'a été observée suite au traitement par vapeurs d'alcool générées à partir des 4 solutions d'éthanol à 60, 70, 80 et 85% p/p, comparativement au témoin négatif.

Dans le cas de l'exposition réitérée de 2 minutes toutes les 5 minutes pendant 1 heure, une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue suite au traitement par vapeurs d'alcool générées à partir d'éthanol à 70% a été observée, comparativement au témoin négatif. Cependant, ce résultat était inférieur à celui obtenu dans le témoin négatif lors du traitement continu de 30 minutes ainsi que pour 3 des 4 doses d'essai. Prenant également en considération l'absence de réponse positive observée avec les trois autres solutions d'éthanol utilisées pour générer les vapeurs, en rappelant que les 4 solutions ont entraîné des concentrations atmosphériques en vapeurs similaires, cette réponse est considérée comme étant non biologiquement significative.

b) Isopropanol

Le tableau 67 ci-dessous présente les résultats du test des comètes sur cellules NCI H292 cultivées en IAL après exposition aux vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'isopropanol à 60, 70, 80 et 85% p/p, selon les deux schémas de traitement retenus

(traitement continu de 30 minutes ou exposition de 2 minutes réitérée toutes les 5 minutes pendant 1 heure). Le niveau moyen de vapeurs d’isopropanol généré dans l’atmosphère des puits contenant les cultures était de 13 114 ppm \pm 354, sans différence significative en fonction de la concentration d’alcool dans la solution utilisée.

Tableau 67 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d’isopropanol – essai en absence d’activation métabolique

Conditions d’essai		% ADN dans la queue ¹	Viabilité cellulaire relative ²	
Traitement de 30 minutes	Témoin positif ³ MMS (15 µg/mL)	16,66* \pm 5,35	104,7 \pm 0,3	
	% p/p isopropanol	0 ⁴	2,8 \pm 0,34	100,0
		60	3,68 \pm 0,63	103,4 \pm 2,4
		70	4,23* \pm 0,60	91,9 \pm 10,3
		80	4,97** \pm 1,43	100,5 \pm 1,5
		85	3,82 \pm 1,26	101,5 \pm 1,4
Traitement réitéré de 2 minutes toutes les 5 minutes pendant 1 heure	Témoin positif ³ MMS (15 µg/mL)	28,79* \pm 10,85	103 \pm 8,7	
	% p/p isopropanol	0 ⁴	2,56 \pm 0,93	100,0
		60	3,04 \pm 1,61	77,8 \pm 34,6
		70	2,27 \pm 0,97	64,7 \pm 24,6
		80	1,27 \pm 0,32	65,0 \pm 3,2
		85	1,52 \pm 0,33	88,7 \pm 9,3

¹ moyenne des médianes et écart-type pour 100 cellules (données issues de 3 puits à raison de 200 cellules par puit, à l’exception du témoin négatif (moyenne de 10 puits : données compilées des essais avec les 4 solutions d’alcool)
² moyenne et écart-type des 3 cultures traitées en comparaison aux viabilités cellulaires des 2 ou 3 cultures non traitées
³ contrôle de sensibilité des cultures en IAL effectué en parallèle de l’essai, par application en traitement topique du témoin positif (MMS : méthyl méthanesulfonate) et maintien des cultures en étuve durant la durée d’exposition.
⁴ cultures témoins exposées à un flux d’air propre de 5mL/min, exempt de vapeurs d’alcool.
* p<0,05 Mann-Whitney ** p<0,01

Dans cet essai, suite à 30 minutes d’exposition continue aux vapeurs d’alcool, une augmentation statistiquement significative du pourcentage d’ADN dans la queue suite au traitement par vapeurs d’alcool générées à partir d’isopropanol à 70 et 80% a été observée, comparativement au témoin négatif. Cependant, ce résultat était de faible amplitude (moins du double de la réponse du témoin négatif). Prenant également en considération l’absence de réponse positive observée avec les deux autres solutions d’isopropanol utilisées pour générer les vapeurs, en rappelant que les 4 solutions ont entraîné des concentrations atmosphériques en vapeurs similaires, cette réponse est considérée comme étant non biologiquement significative.

Dans le cas de l’exposition réitérée de 2 minutes toutes les 5 minutes pendant 1 heure, aucune augmentation statistiquement ni biologiquement significative du pourcentage d’ADN dans la queue n’a été observée quelle que soit la dose d’éthanol administrée, comparativement au témoin négatif.

c) n-propanol

Le tableau 68 ci-dessous présente les résultats du test des comètes sur cellules NCI H292 cultivées en IAL après exposition aux vapeurs d'alcool générées à partir de solutions de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p, selon les deux schémas de traitement retenus (traitement continu de 30 minutes ou exposition de 2 minutes réitérée toutes les 5 minutes pendant 1 heure). Le niveau moyen de vapeurs de n-propanol généré dans l'atmosphère des puits contenant les cultures était de 6 946 ppm \pm 1 452, sans différence significative en fonction de la concentration d'alcool dans la solution utilisée.

Tableau 68 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs de n-propanol - essai en absence d'activation métabolique

Conditions d'essai		% ADN dans la queue ¹	Viabilité cellulaire relative ²	
Traitement de 30 minutes	Témoin positif ³ MMS (15 µg/mL)	9,63* \pm 2,62	99,8 \pm 1,1	
	% p/p n-propanol	0 ⁴	1,65 \pm 0,47	100,0
		60	1,66 \pm 0,39	97,5 \pm 5,1
		70	2,27 \pm 0,40	106,1 \pm 1,7
		80	2,05 \pm 1,59	94,6 \pm 4,6
85	3,81 \pm 0,99	93,6 \pm 1,1		
Traitement réitéré de 2 minutes toutes les 5 minutes pendant 1 heure	Témoin positif ³ MMS (15 µg/mL)	28,79* \pm 10,85	103 \pm 8,7	
	% p/p n-propanol	0 ⁴	1,78 \pm 0,89	100,0
		60	1,98 \pm 0,43	70,6 \pm 32,7
		70	2,85 \pm 0,91	89,0 \pm 10,2
		80	1,49 \pm 0,87	85,9 \pm 13,9
85	1,35 \pm 0,66	86,2 \pm 6,8		

¹ moyenne des médianes et écart-type pour 100 cellules (données issues de 3 puits à raison de 200 cellules par puit, à l'exception du témoin négatif (moyenne de 10 puits : données compilées des essais avec les 4 solutions d'alcool)
² moyenne et écart-type des 3 cultures traitées en comparaison aux viabilités cellulaires des 2 ou 3 cultures non traitées
³ contrôle de sensibilité des cultures en IAL effectué en parallèle de l'essai, par application en traitement topique du témoin positif (MMS : méthyl méthanesulfonate) et maintien des cultures en étuve durant la durée d'exposition.
⁴ cultures témoins exposées à un flux d'air propre de 5mL/min, exempt de vapeurs d'alcool.
* p<0,05 Mann-Whitney

Dans cet essai, quel que soit le schéma de traitement appliqué (continu ou réitéré), aucune augmentation statistiquement ni biologiquement significative du % d'ADN dans la queue n'a été observée, comparativement au témoin négatif.

III.2.2.3.3. Conclusion sur le test des comètes

Le test des comètes réalisé sur les cellules TK6 après exposition aux alcools (118 à 156 mM pour l'éthanol, 89 à 118 mM pour l'isopropanol et 90 à 120 mM pour le n-propanol) n'a pas mis en évidence d'augmentations biologiquement significatives de la fragmentation d'ADN. En absence d'activation métabolique, aucune augmentation du pourcentage d'ADN dans la queue n'a été retrouvée. En présence d'activation métabolique, une augmentation statistiquement significative a été observée avec les 3 alcools, mais sans pertinence biologique au regard de la faible amplitude de réponse du témoin négatif, de la faible

amplitude de réponse des cultures traitées (inférieure à 2 % d'ADN dans la queue pour l'éthanol et à 1% d'ADN dans la queue pour l'isopropanol et le n-propanol) et de l'absence de relation dose-effet établie. Sur cellules pulmonaires NCI H292 cultivées en IAL, aucune augmentation biologiquement significative de la fragmentation d'ADN consécutive à l'exposition des cultures cellulaires aux vapeurs d'alcool (valeurs moyennes de 37400 mg/m³ (19 600 ppm) pour l'éthanol, 32700 mg/m³ (13 100 ppm) pour l'isopropanol et 17300 mg/m³ (7000 ppm) pour le n-propanol) n'a été mise en évidence. Pour l'éthanol et l'isopropanol, quelques réponses étaient supérieures aux contrôles de façon statistiquement significative, mais sans significativité biologique.

Nos résultats avec l'éthanol diffèrent des deux essais de dommages primaires à l'ADN *in vitro* identifiés avec cet alcool (Blasiak *et al.* 2000, Lamarche *et al.* 2003). Dans ces essais réalisés sans système d'activation métabolique, des résultats « positifs » ont été rapportés. Cependant, pour l'un des deux, les résultats n'étaient pas exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue, mais en OTM, paramètre de quantification pouvant surestimer la réponse observée en relation avec un facteur multiplicatif de la quantité d'ADN par la longueur de la queue. Selon la ligne directrice N° 489 de l'OCDE (2014), le pourcentage d'ADN dans la queue est considéré comme le paramètre de quantification des dommages à l'ADN le plus pertinent, corrélé linéairement aux dommages d'ADN sur une large gamme de dommages et qui est fonction de la fréquence de cassure de l'ADN (Hartmann *et al.* 2003, Burlinson *et al.* 2007).

En théorie, sur la base des connaissances acquises en termes de mécanismes d'action génotoxique probables de l'éthanol, et comme pour les deux essais publiés cités ci-dessus, une réponse « positive » était possible suite au traitement sans système d'activation métabolique, en relation avec les dommages primaires à l'ADN consécutifs à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (IARC 2012). En présence d'activation métabolique, une réponse négative ou une diminution statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue comparativement aux contrôles était possiblement attendue, liée à l'effet pontant connu de l'acétaldéhyde issu du métabolisme de l'éthanol.

Le test des comètes est un test indicateur d'exposition, qui en cas de réponse positive couplée à un test du MN positif, suggère l'implication de mécanismes clastogènes dans la formation des MN observés, tandis qu'à l'inverse, un résultat négatif serait plutôt indicateur de mécanismes aneugènes (qui nécessiterait une confirmation en utilisant un système d'essai spécifiquement dédié à la mise en évidence de tels mécanismes, *e.g.* méthode du FISH). Les résultats négatifs obtenus en présence d'activation métabolique dans le test des comètes avec l'éthanol donnent donc peu de poids à l'hypothèse d'effets clastogènes impliqués dans les réponses équivoques observées dans le test du MN sur cellules TK6 en présence d'activation métabolique, suggérant en conséquence un possible effet aneugène. Cette hypothèse nécessiterait donc une investigation spécifique du mécanisme d'action en réalisant le test du MN couplée à la méthode FISH.

IV. Discussion

L'hygiène des mains (HDM) contribue de façon significative à la prévention des infections nosocomiales et a été identifiée comme la première mesure de prévention du risque infectieux associé aux soins (WHO 2009). Les pratiques actuelles privilégient l'utilisation de produits hydro-alcooliques (PHA) lorsque les mains sont visiblement propres, en raison de leur praticité d'emploi par comparaison aux savons désinfectants : pas besoin de point d'eau et temps d'action plus court. La teneur en alcool dans ces produits est élevée pour disposer d'une efficacité antimicrobienne rapide. La dernière révision de la norme d'efficacité virucide EN 14476 a introduit des contraintes méthodologiques supplémentaires nécessitant d'augmenter les quantités d'alcool pour maintenir le niveau d'efficacité exigé sur une durée inchangée, pouvant porter la teneur en alcool à plus de 80% p/p dans ces produits. Les alcools principalement utilisés pour formuler ces produits sont l'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol, seuls ou en association. La quantité de produit généralement utilisée pour un traitement hygiénique des mains est de l'ordre de 3 mL. La fréquence d'utilisation varie en fonction des situations et peut dépasser les 100 frictions par jour dans certains services tels qu'en réanimation.

L'organe primo-exposé lors de l'utilisation de ces produits est bien sûr la peau. En relation avec les propriétés volatiles des alcools, en plus de la peau, l'exposition des personnes lors de l'utilisation de ces produits est également respiratoire. L'objectif de ce travail de recherche était d'effectuer une évaluation comparative de ces 3 alcools en termes de toxicité cutanée et respiratoire avec mise en évidence, le cas échéant, de l'impact de concentrations croissantes, et prise en compte de la présence de co-formulants.

En raison de leurs propriétés volatiles, les taux de pénétration cutanée des 3 alcools sont faibles. Pour l'éthanol, le taux d'absorption a été évalué à 1 % environ dans les études de pénétration cutanée *in vitro* sur peau de cobaye et de porc en conditions non occlusives (Gummer & Maibach 1986, Pendlington *et al.* 2001) et a été estimé entre 0,5 et 2,3% en fonction des scénarios d'exposition dans un essai sur volontaires utilisant des PHA formulés à base d'éthanol (Kramer *et al.* 2007). Pour l'isopropanol, le taux de pénétration cutanée évalué dans un essai *in vitro* sur peau humaine en conditions non occlusives était de 0,6% (Morris *et al.* 1995), et a été estimé entre 0,4 et 1,1% en fonction des scénarios d'exposition dans un essai sur volontaires utilisant des PHA formulés à base d'isopropanol (Below *et al.* 2012). On ne retrouve pas de données expérimentales de test de pénétration cutanée *in vitro* pour le n-propanol, mais son taux de pénétration cutanée estimé dans un essai sur volontaires utilisant des PHA à base de n-propanol était compris entre 0,5 et 2,9 % selon les situations d'exposition (Below *et al.* 2012).

Les 3 alcools peuvent pénétrer l'organisme par les voies respiratoires (Lester & Greenberg 1951, Nadeau *et al.* 2003, Tardif, 2004, Laham *et al.* 1980, Brugnone *et al.* 1983, Nelson *et al.* 1989, INRS 2016c). Les études disponibles pour l'éthanol estiment le taux d'absorption pulmonaire entre 70 et 80% (Lester & Greenberg 1951, Nadeau *et al.* 2003, Tardif, 2004).

En situation d'utilisation des PHA chez les professionnels de santé, les données publiées confirment la présence d'éthanol atmosphérique au niveau des voies respiratoires. Les teneurs moyennes mesurées ou estimées étaient généralement de l'ordre de 100 à 2500 mg/m³ d'alcool lors de l'utilisation de 3 mL de PHA à base d'éthanol (AFSSET 2010, Hautemanière *et al.* 2013b, Dumas Campagna *et al.* 2014b). Une étude a également rapporté des teneurs atmosphériques au niveau des voies respiratoires nettement supérieures, mesurées entre 14 000 et 20 200 mg/m³ d'éthanol (Bessoneau & Thomas 2012). Lorsque les mesures ont été réalisées sur des durées plus longues, dans des situations représentatives de différentes pratiques d'HDM associées aux soins, les taux mesurés ou estimés sont plus faibles, de 40 à 250 mg/m³ d'éthanol (Hautemanière *et al.* 2013b, AFSSET 2010). La grande dispersion des mesures obtenues est vraisemblablement à attribuer aux différents protocoles mis en œuvre, se différenciant notamment par les produits d'essai utilisés, le volume et taux de ventilation des locaux d'essai, les méthodes de prélèvement et les méthodes d'analyse utilisées.

Des dosages d'éthanol dans l'air expiré de personnes utilisant les PHA à base d'éthanol ont confirmé une exposition pulmonaire (Brown *et al.* 2007, Ahmed-Lecheheb *et al.* 2012, Hautemanière *et al.* 2013a).

On ne retrouve pas de données similaires publiées pour l'isopropanol et le n-propanol. Cependant, s'agissant également de deux composés volatils, des mesures atmosphériques au niveau des voies respiratoires et/ou de dosages d'alcool dans l'air expiré de personnes utilisant des produits à base de ces alcools confirmeraient probablement une exposition par les voies respiratoires même si ces deux alcools ont des profils de volatilité un peu inférieurs à celui de l'éthanol (pressions de vapeur de 4,2 et 1,94 kPa à 20°C respectivement, *versus* 5,9 kPa pour l'éthanol).

Lors de l'utilisation de PHA, les expositions systémiques induites restent faibles. Les nombreuses études évaluant les éthanolémies consécutives à l'utilisation de PHA (AFSSET 2010, Dumas-Campagna *et al.* 2014b, Huynh-Delerme *et al.* 2012, Miller *et al.* 2006, Brown *et al.* 2007, Kramer *et al.* 2007, Ahmed-Lecheheb *et al.* 2012, Hautemanière *et al.* 2013a) concluent toutes à des valeurs indissociables des valeurs endogènes naturelles de concentration sanguine en éthanol (0 – 35 mg/L) (Al-Awadhi *et al.* 2004) pour des quantités d'éthanol appliquées allant jusque 60 g en 30 minutes ou 150 g en 80 minutes. Ces résultats sont cohérents avec les études disponibles chez l'homme où des volontaires exposés pendant 3 à 6 heures à des vapeurs d'éthanol présentaient une éthanolémie n'excédant pas 5,6 mg/L pour une exposition allant jusqu'à 1900 mg/m³ (1 000 ppm) (Campbell & Wilson, 1986, Seeber *et al.* 1994, Nadeau *et al.* 2003).

Les données disponibles pour l'isopropanol, bien que moins nombreuses, rapportent également un faible niveau d'exposition systémique en relation avec l'utilisation des PHA, avec des niveaux sanguins moyens d'isopropanol inférieurs à 2 mg/L suite à une exposition à 24 g d'alcool en 1 heure ou 30 g en 4 heures (Brown *et al.* 2007, Turner *et al.* 2004), et des pics sanguins n'excédant pas 10 mg/L dans un protocole d'usage intensif (jusqu'à 110 g en 80 min), ramené à moins de 3 mg/L dans un test d'usage plus représentatif des expositions réelles (18 g en 4 heures) (Below *et al.* 2012). Comme pour l'éthanol, les élévations de taux sanguins possiblement induites par l'utilisation de PHA semblent donc indissociables des teneurs sanguines endogènes naturelles rapportées pour cette substance (0,01 mg/L à 10 mg/L) (Below *et al.* 2012).

Une seule étude rapportant des mesures de n-propanol sanguin suivant l'utilisation de PHA a été retrouvée dans la littérature. Le pic sanguin moyen associé à l'application de 51 g de n-propanol en 30 minutes sur une période de 80 minutes était de 18 mg/L. Cette valeur était ramenée à moins de 5 mg/L dans un test d'usage plus représentatif des expositions réelles (utilisation de 18,25 g sur 4 heures) (Below *et al.* 2012). Le suivi des teneurs en propionaldéhyde dans cette étude n'a montré aucune accumulation de la dose absorbée. Cependant, contrairement à l'éthanol et à l'isopropanol, le n-propanol ne se retrouve à l'état physiologique naturel qu'en quantité très faible (0 à 48 µg/L) (Liebich *et al.* 1982).

En termes de métabolisme, les 3 alcools subissent principalement un métabolisme oxydatif sous l'action consécutive de l'ADH (alcool-déshydrogénase) puis de l'ALDH (aldéhyde-déshydrogénase) (Gouille & Guerbet 2015, WHO 1990b, INRS 2016a, 2016b, 2016c). L'éthanol et le n-propanol disposent également d'une voie d'oxydation accessoire commune sous l'action du CYP2E1. En raison d'une affinité enzymatique différente de l'ADH et de l'ALDH vis-à-vis des 3 alcools, le métabolisme de l'éthanol est retardé en présence de n-propanol (INRS 2016c). Il en est de même pour le métabolisme de l'isopropanol en présence d'éthanol (WHO 1990a) ou de n-propanol (INRS 2016c). Pour l'éthanol, il existe, chez l'homme, une variabilité inter-individuelle du métabolisme en relation avec un polymorphisme des deux enzymes majoritairement impliquées, l'ADH et l'ALDH (Gouille & Guerbet 2015). Bien que non décrit dans la littérature, on ne peut exclure un impact du polymorphisme existant de ces enzymes sur le métabolisme de l'isopropanol et du n-propanol. Ces 3 alcools sont également éliminés en faible quantité *via* un métabolisme non oxydatif, notamment, en dénominateur commun à ces 3 alcools, sous forme de glucurono-conjugué, ou sous forme inchangée par l'air expiré (Gouille & Guerbet 2015, Arndt *et al.* 2016, WHO 1990a, INRS 2016a, 2016b, 2016c). Une excrétion sous forme inchangée existe également par voie urinaire pour l'isopropanol et par voie urinaire et la sueur pour l'éthanol (WHO 1990a, INRS 2016a, 2016b).

En termes de toxicité (hors reprotoxicité non appréhendée dans la revue bibliographique effectuée), les 3 alcools se distinguent principalement par les propriétés cancérigènes avérées de l'éthanol en relation avec la consommation excessive de boissons alcoolisées (IARC 2012). Des mécanismes génotoxiques contribuent au risque accru de cancérogénèse lié

à la consommation d'alcool (IARC 2012). Les propriétés mutagènes de l'acétaldéhyde issu du métabolisme oxydatif de l'éthanol sont mises en cause, ainsi qu'un mécanisme oxydatif secondaire suite à l'exposition à l'éthanol lié à l'induction enzymatique du CYP2E1 à l'origine de stress oxydant (IARC 2012). En revanche, les propriétés cancérogènes de l'éthanol dans le cadre des expositions professionnelles à des vapeurs d'éthanol ne sont pas établies. Aucune des données disponibles n'identifie de risque supplémentaire cancérogène par voie cutanée ou par inhalation en relation avec l'utilisation des PHA (Lachenmeier 2008, Bevan *et al.* 2009, Afssaps, 2011, INRS 2016a).

En termes de toxicité aiguë, les données disponibles chez l'animal concluent à un niveau relativement faible de toxicité aiguë des 3 alcools quelle que soit la voie d'exposition (Lehman & Chase 1944, Smyth & Carpenter 1948, Smyth *et al.* 1954, Taylor *et al.* 1964, Kimura *et al.* 1971, Laham *et al.* 1980, Youssef *et al.* 1992, Bartsch *et al.* 1976, Moser & Balster 1984, INRS 2016a, 2016b, 2016c). A fortes concentrations, les 3 alcools agissent essentiellement sur le système nerveux central, induisant une dépression et une narcose, précédées d'une phase d'excitation uniquement pour l'éthanol (Lachenmeier 2008, INRS 2016a, 2016b, 2016c). Dans le cas de l'utilisation des PHA pour l'HDM, au regard des faibles taux d'exposition systémique induite par l'utilisation des PHA, aucun signe de toxicité aiguë associé à l'utilisation de ces produits n'est attendu.

Les données de toxicité chronique par voie orale identifient le foie comme organe cible pour l'éthanol et le n-propanol (Holmberg *et al.* 1986, INRS 2016a, Hillbom *et al.* 1974, Wakabayashi *et al.* 1991, ECB 2008). Cependant, les données disponibles chez le rat concluent à des valeurs relativement élevées de NOAEL par voie orale de 3 g/kg/j ou plus pour ces deux alcools (études de 13 et 17 semaines) (Holmberg *et al.* 1986, Hillbom *et al.* 1974). Par inhalation, la toxicité hépatique chez le rat n'a pas été retrouvée jusqu'à la dose de 20 000 mg/m³ d'éthanol durant 26 jours (Di Luzio & Stege 1979). La NOAEL par inhalation a été estimée comme étant supérieure à 11 750 mg/m³/6h dans une étude chez le rat de 28 jours (Chu *et al.* 2005). Les données pour l'isopropanol sont un peu plus sévères, avec une valeur de LOAEL par voie orale chez le rat mâle de 870 mg/kg (étude de 12 semaines) (Pilegaard & Ladefoged 1993). Cependant, dans cette étude, la toxicité observée était rénale et on ne peut exclure qu'il s'agisse de néphropathie induite par l' α 2-microglobuline, exclusive au rat mâle et sans transposition à l'homme. La NOAEL par inhalation pour l'isopropanol est similaire à celle de l'éthanol, avec une valeur de 12 470 mg/m³/6h établie dans une étude chez le rat et la souris durant 13 semaines (Kapp *et al.* 1996). Pour les mêmes raisons que celles formulées pour la toxicité aiguë, aucun signe de toxicité chronique associé à l'utilisation des PHA n'est attendu.

Les 3 alcools sont des substances irritantes pour les yeux, chez l'animal comme chez l'homme, avec une sévérité de réponse chez l'animal plus importante pour le n-propanol (Smyth *et al.* 1954, Marzulli & Ruggles 1973, Griffith *et al.* 1980, Guillot *et al.* 1982, Morgan *et al.* 1987, ECETOC 1998). Les 3 alcools présentent également des propriétés d'irritation

respiratoire (AFSSET 2010, INRS 2016a, 2016b, 2016c). Il n'existe pas suffisamment de données pour effectuer une comparaison précise des 3 alcools sur cette toxicité. Cependant, les données disponibles chez l'homme suggèrent une concentration seuil d'irritation respiratoire plus faible pour l'isopropanol et le n-propanol, par comparaison à l'éthanol.

Aucune différence notable entre les 3 alcools étudiés n'a été retrouvée en termes d'irritation et de sensibilisation cutanée. Les essais d'irritation cutanée chez l'animal concluent à l'absence de propriétés irritantes de ces alcools (Smyth *et al.* 1954, Phillips *et al.* 1972, Nixon *et al.* 1975, Jacobs & Martens 1992, Bagley *et al.* 1996, ECB 2008). Il en est de même des données chez l'homme (Phillips *et al.* 1972, Nixon *et al.* 1975, Haddock & Wilkin 1982, Basketter *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2010, Löffler *et al.* 2007). L'état d'hydratation de la peau semble influencer la réponse d'irritation cutanée aux alcools, au regard d'érythèmes cutanés rapportés sur peau préalablement hydratée et absents dans le cas contraire (Haddock & Wilkin 1982, Wilkin & Fortner 1985, Wilkin & Stewart 1987). Les essais de sensibilisation cutanée concluent à l'absence de propriétés sensibilisantes (Jensen 1981, Gad *et al.* 1986, Descotes *et al.* 1988, ECETOC 1999, OECD 2004b, Lalko *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2010).

Aucune donnée de phototoxicité n'a été retrouvée dans la littérature.

Concernant spécifiquement les PHA utilisés pour l'HDM, plusieurs études investiguant leur acceptabilité cutanée ont conclu à une bonne tolérance cutanée de ces produits (Kampf *et al.* 2002, Kampf & Muscatiello 2003, Houben *et al.* 2006). Cependant, des réactions cutanées sur les mains des soignants peuvent se produire en relation avec la pratique quotidienne et répétée dans une même journée des frictions hydro-alcooliques, le plus fréquemment sous la forme de dermatites de contact irritatives (WHO 2009).

Au regard de ces données, nous avons engagé des études expérimentales *in vitro* d'évaluation comparative de la tolérance cutanée des 3 alcools par la réalisation d'essais d'irritation cutanée et de phototoxicité. La génotoxicité de ces 3 alcools a également été investiguée par des essais *in vitro*, en incluant un modèle de cellules pulmonaires humaines (NCI H292) en plus d'un modèle « plus classique » de cellules lymphoblastoïdes humaines TK6.

Certaines réponses biologiques spécifiques d'une substance peuvent être impactées par la présence d'autres molécules. A titre d'exemple,

- une réponse de sensibilisation plus importante a été observée chez l'animal suite à l'exposition à du p-t-butyl- α -methylhydrocinnamic aldéhyde ou au géraniol (substances parfumantes) lorsque ces substances étaient en présence d'éthanol par comparaison au diéthylphthalate (Lalko *et al.* 2004) ;
- dans leurs travaux sur l'exposition systémique à l'isopropanol et n-propanol, Below *et al.* (2012) ont obtenu des données suggérant une absorption du n-propanol différente selon qu'il est ou non en association avec l'isopropanol ;

- le métabolisme de l'isopropanol est retardé en présence d'éthanol ou n-propanol.

Certains essais ont donc également été réalisés sur des solutions hydro-alcooliques incluant des co-formulants, en raison de leur présence dans les PHA utilisés pour l'HDM.

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont exclusivement et volontairement recouru aux méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Ceci se justifie par l'objectif initial d'évaluation comparative des 3 alcools, et le recul significatif existant en termes d'acceptabilité de ces alcools en relation avec une utilisation significative des PHA depuis de nombreuses années. Par ailleurs, le contexte réglementaire actuel ne peut pas être écarté, et les réglementations applicables aux PHA (CLP, REACH, Biocides) privilégient toutes le recours aux méthodes alternatives, la mise en œuvre d'expérimentation animale se devant d'être scientifiquement justifiée avant d'être engagée. Egalement, sous l'impulsion de la réglementation cosmétique européenne ayant progressivement interdit l'expérimentation animale (EU. 2003), des méthodologies alternatives à l'expérimentation animale ont été validées et sont aujourd'hui disponibles pour appréhender plusieurs aspects toxicologiques, au moins en première étape avant décision d'engager des essais complémentaires sur animaux lorsque cela est possible et justifié.

Evaluation de la tolérance locale cutanée

Le test *in vitro* d'irritation cutanée selon l'OCDE No 439 est une méthode validée n'utilisant pas d'animaux, alternative au test d'irritation cutanée de Draize sur le lapin, pour la détermination du potentiel irritant cutané des produits chimiques (OECD 2015b, publication initiale en 2010). Dans nos expériences, 3 alcools aliphatiques à chaîne courte, l'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol, à quatre concentrations différentes dans l'eau (60, 70, 80 ou 85% p/p) ont été testés à l'aide d'EpiSkinTM SM, un des modèles d'épiderme humain reconstitué (RhE) validé dans la ligne directrice OCDE No 439. Des solutions hydro-alcooliques (SHA) déclinées avec les mêmes types d'alcools et les mêmes 4 concentrations et comprenant des co-formulants (association d'agents hydratants, émoullissants et protecteur) ont également été testées. Le critère de jugement était la viabilité moyenne relative des RhE évaluée par l'intermédiaire de la réduction du MTT.

Suite à l'exposition des RhE (EpiSkinTM SM) aux alcools dans l'eau, les solutions d'éthanol et d'isopropanol (60 à 85% p/p) n'ont pas montré d'activité cytotoxique significative (viabilité des épidermes supérieure au seuil de significativité biologique de 50% défini dans la ligne directrice), tandis que les solutions de n-propanol ont dans une certaine mesure (60, 70 et 80% p/p, mais pas à 85% p/p) induit une cytotoxicité significative, avec des viabilités des RhE inférieures à 50%. Néanmoins, ces résultats n'apparaissent pas en accord avec les données expérimentales *in vivo* publiées sur les propriétés irritantes du n-propanol chez l'animal comme chez l'homme. En effet, les données disponibles sur cet alcool sont en

faveur de propriétés non irritantes pour la peau, comme pour l'éthanol et l'isopropanol, et aucune différence n'a pu être identifiée entre le n-propanol et les 2 autres alcools (Haddock & Wilkin 1982, Löffler *et al.* 2007). En fait, des réactions cutanées n'ont été signalées que dans les études étudiant l'impact de l'état d'hydratation préalable de la peau sur la tolérance cutanée aux alcools. Des érythèmes locaux ont été rapportés après l'application topique par patchs de solutions d'éthanol, d'isopropanol ou de n-propanol (100%) pendant 10 minutes sur une peau préalablement hydratée chez 19 volontaires sur 22, tandis qu'aucune réaction cutanée n'a été observée chez les 22 mêmes volontaires suite au traitement identique sur une peau non hydratée (Haddock & Wilkin 1982). Des érythèmes cutanés ont également été signalés après une exposition de 5 minutes à des patchs contenant une solution à 75% d'éthanol ou à 75% de n-propanol sur peau préalablement hydratée (Haddock & Wilkin 1982, Wilkin & Stewart 1987), avec une incidence légèrement supérieure pour le n-propanol (9 volontaires avec une réaction positive pour le n-propanol contre 5 pour l'éthanol, pour un total de 12 participants). Un léger effet de solutions de n-propanol sur la perte insensible en eau (TEWL - transepidermal water loss) a également été décrit sur une peau pré-irritée par des détergents (Lubbe *et al.* 2001). La TEWL reflète l'état de la barrière cutanée, la perte naturelle d'eau liée à la diffusion passive et la respiration insensible de la peau étant accrues quand la barrière cutanée est affectée (Fluhr *et al.* 2006). Cependant, dans cette étude, les modifications de la TEWL n'étaient pas différentes de celles de l'eau, excluant l'implication du n-propanol dans les effets observés.

Toutes les autres données convergent vers des propriétés non irritantes. L'éthanol testé chez l'animal pour l'irritation cutanée s'est révélé non irritant pour la peau (Jacobs & Martens 1992, Phillips *et al.* 1972), il en est de même pour l'isopropanol (Nixon *et al.* 1975, Bagley *et al.* 1996) ainsi que pour le n-propanol (Smyth *et al.* 1954, ECB 2008). Exception faite des études mentionnées précédemment étudiant l'impact de l'hydratation de la peau, les études chez l'homme sont en faveur d'un potentiel non irritant ou faiblement irritant pour ces 3 alcools. Dans une étude conduite chez 15 volontaires visant à étudier les réactions cutanées possibles provoquées par ces 3 alcools à différentes concentrations, aucune irritation de la peau (évaluée par la présence d'érythème et la TEWL après exposition répétée par patchs occlusifs de 24 heures sur 2 jours avec des solutions de 60 à 99% d'alcool) n'a été observée, seul un léger effet déshydratant a été retrouvé (Löffler *et al.* 2007). Plusieurs autres études menées avec l'éthanol (concentrations de 9,5% à 100%) appliqué par voie cutanée par patchs sur des périodes allant de plusieurs heures à plusieurs jours ont confirmé que l'éthanol présente une bonne compatibilité cutanée (Phillips *et al.* 1972, Haddock & Wilkin 1982, Basketter *et al.* 2004). Le même profil est retrouvé pour l'isopropanol dans des études chez l'homme testant des solutions d'alcool à 100% appliquées par patch pendant des périodes de 10 min à 4 heures (Nixon *et al.* 1975, Haddock & Wilkin 1982, Basketter *et al.* 2004).

Ces données de la littérature suggèrent que les résultats obtenus avec le test *in vitro* d'irritation cutanée selon la ligne directrice de l'OCDE No 439 pour le n-propanol avec EpiSkin™ SM ne sont pas « prédictifs » d'un effet irritant réel de cet alcool.

Plusieurs hypothèses ont donc été formulées avec investigation de certaines d'entre elles par la réalisation d'études complémentaires.

Les premières hypothèses émises étaient en relation avec un biais possible dû aux limites du modèle 3D *in vitro*.

Contrairement aux études *in vivo*, l'utilisation de RhE ne permet pas l'évaluation de l'irritation cutanée au travers de signes cliniques tels que l'œdème ou l'érythème qui impliquent une chaîne complexe de réponses biochimiques, neurales et cellulaires pour lesquelles les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de surface sont mobilisées (Van de Sandt *et al.* 1999). On peut également raisonnablement supposer que les mécanismes de défense *in vivo* pouvant être en mesure d'inhiber un processus irritant ne peuvent pas se produire dans les RhE, pouvant générer une cytotoxicité des RhE alors qu'aucun signe clinique d'irritation n'aurait été visible sur la peau *in vivo*.

Au niveau des RhE, la spécificité de réponse pourra être impactée par une moins bonne fonction barrière du modèle par comparaison à celle de la peau complète, seules les couches épidermiques étant présentes dans les RhE. Cette fonction barrière insuffisante a été décrite pour plusieurs modèles de RhE disponibles : EpiSkin™, SkinEthic™, et EpiDerm™ (Netzlaff *et al.* 2005, Netzlaff *et al.* 2007). Il est important de mentionner que la ligne directrice OCDE No 428 relative à l'absorption cutanée (OECD 2004c) ainsi que les opinions plus récentes adoptées par le Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS 2010) et le Groupe des produits phytopharmaceutique de l'EFSA (European Food Safety Authority) (EFSA 2012) sur l'absorption cutanée ne recommandent pas l'utilisation de RhE, étant donné des taux d'absorption plus élevés que ceux mesurés sur peau complète excisée (Ponec 1992, Perkins *et al.* 1999, Schmook *et al.* 2001, Netzlaff *et al.* 2007). Dans le test d'irritation, le taux de pénétration plus élevé pourrait entraîner une surestimation des propriétés irritantes réelles. Au regard de nos résultats, s'il peut exister une relation causale entre l'effet observé et la fonction barrière, d'autres facteurs spécifiques aux solutions de n-propanol pour certaines dilutions interviennent également, puisque la viabilité des RhE n'a pas été impactée par les 2 autres alcools quelle que soit leur concentration, ni par le n-propanol à 85% dans l'eau.

Un autre aspect important à considérer est le métabolisme cutané. De nombreuses enzymes du métabolisme ont été identifiées dans la peau (Kao 1988, Kao & Carver 1991, Ahmad & Mukhtar 2004, Oesch *et al.* 2007, Wiegand *et al.* 2014). Les substances chimiques peuvent donc y subir une métabolisation. En ce qui concerne les alcools, le métabolisme implique essentiellement l'ADH et l'ALDH, et certaines de ces oxydoréductases ont été identifiées dans la peau vivante : ADH1B, ADH4, ADH class-3, ALDH1A1, ALDH1L1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH9A1, ALDH1B1 et ALDH1A3 (Hu *et al.* 2010; Van Eijl 2012). Une autre voie métabolique impliquant les enzymes de la famille du cytochrome P450 peut également être impliquée dans le métabolisme de l'alcool, en particulier le CYP2E1 pour l'éthanol et le n-

propanol, qui a pu être identifié dans de la peau humaine fraîchement excisée (Hu *et al.* 2010). Plusieurs études ont démontré que le modèle EpiSkin™ reproduit partiellement les capacités métaboliques de la peau humaine (Luu-The *et al.* 2009, Van Eijl *et al.* 2012, Hewitt *et al.* 2013). Ont notamment été identifiés certains types d'ADH et d'ALDH : ADH3, ALDH2, ALDH3A2 et ALDH9A1 (Van Eijl *et al.* 2012). Le CYP2E1 a également été identifié, mais en teneur très faible.

Une hypothèse pour expliquer la différence de viabilités des RhE observée après traitement par les 3 alcools pourrait être dans la différence de capacités métaboliques des RhE vis-à-vis de ces alcools, avec un métabolisme du n-propanol possiblement altéré comparativement à celui de la peau *in vivo*. Une telle hypothèse peut être étayée par l'étude clinique menée par Wilkin & Fortner (1985) au cours de laquelle des réactions cutanées ont été observées suite au traitement par du n-propanol sur peau « normale », alors qu'aucune réaction n'a été constatée lorsque la peau avait préalablement été traitée avec un inhibiteur de l'ADH (4-méthylpyrazole à 40%). Cependant, si cette hypothèse apparaît plausible, les résultats observés suggèrent que cet aspect métabolique serait dépendant d'autres paramètres tels que la concentration en alcool ou en eau, car aucun résultat similaire n'a été observé pour la concentration la plus élevée testée de 85% p/p de n-propanol.

Il est également intéressant de mentionner l'étude de Jirova *et al.* (2010) qui a évalué la robustesse de la méthode de test *in vitro* en comparant avec les résultats *in vivo* disponibles chez l'homme par patch-test de 4 heures. Un taux de concordance de 70% a été rapporté pour EpiSkin™ (sensibilité de 100% : 3 des 3 substances irritantes testées correctement classées, mais spécificité de 65% seulement : 13 des 20 substances non irritantes chez l'homme correctement identifiées) et de 76% avec EpiDerm™ (sensibilité de 80% : 4 des 5 substances irritantes correctement classées, et spécificité de 75% : 15 des 20 substances non irritantes correctement identifiées).

Afin de comprendre si nos résultats pouvaient être liés à un possible défaut de spécificité d'EpiSkin™ SM vis-à-vis du n-propanol, nous avons effectué des essais avec un autre modèle de RhE, en recourant au modèle VitroDerm développé par Thor Personal Care. Dans cet essai, aucune cytotoxicité n'a été observée sur les épidermes avec l'ensemble des produits d'essai à base de n-propanol, en faveur d'un manque de spécificité du modèle EpiSkin™ SM pour cet alcool. Une explication possible de la différence observée réside dans la nature de la membrane basale utilisée pour la production du RhE, l'une étant inerte en polycarbonate pour VitroDerm, l'autre étant biochimique avec une matrice en collagène pour EpiSkin™ SM. Dans ce modèle, il y a vraisemblablement un taux de rétention plus élevé du produit d'essai, qui de fait n'est peut-être pas complètement éliminé au cours du rinçage effectué pour stopper le traitement, entraînant indirectement un temps de contact plus long des épidermes avec le produit d'essai, comparativement au modèle VitroDerm. Une autre explication peut également être liée au type de cellules utilisées pour générer les RhE (kératinocytes humains adultes d'origine mammaire pour EpiSkin™ SM et jeunes cellules primaires humaines de prépuce pour VitroDerm).

Étant donné que les viabilités des épidermes EpiSkin™ n'ont été significativement impactées que par un des trois alcools testés, la seconde série d'hypothèses formulées pour expliquer la différence de résultats était en relation avec les produits d'essai eux-mêmes. Deux hypothèses ont été étudiées, la première en lien avec les propriétés physicochimiques des 3 alcools, la seconde en relation avec la présence possible d'impuretés dans le n-propanol.

Si l'on s'intéresse aux valeurs de point d'ébullition et de pression de vapeur (P) pour évaluer la volatilité chimique, le n-propanol se distingue des deux autres alcools par une volatilité un peu plus faible. Nous avons par conséquent réalisé une étude en conditions occlusives pour évaluer l'impact de la volatilité sur nos résultats. Dans cet essai, des résultats similaires ont été obtenus, avec la même différence entre le n-propanol par opposition à l'éthanol et l'isopropanol, rejetant ainsi l'hypothèse de résultats liés à la différence de profil de volatilité des 3 alcools.

La seconde hypothèse étudiée était l'implication possible d'impuretés présentes dans les produits d'essai. Une analyse par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier plusieurs impuretés dans la qualité de n-propanol utilisée pour la préparation des produits. Cependant, le même profil de réponse a été obtenu dans l'essai complémentaire utilisant une qualité de n-propanol exempte de ces impuretés en complément de la qualité « standard », ce qui amène à rejeter l'hypothèse de résultats liés aux impuretés.

D'autres hypothèses peuvent découler des événements initiateurs de l'irritation au niveau épidermique. [Welss et al. \(2004\)](#) ont publié un article intéressant résumant les présomptions actuelles concernant les étapes d'initiation de l'irritation cutanée. Au niveau de l'épiderme, il est admis que les substances chimiques irritantes peuvent agir selon au moins deux voies différentes, la première par altération de la fonction barrière du *stratum corneum* (SC) et la seconde par effets directs sur les cellules de la peau. Le SC est la couche la plus externe de l'épiderme. Il est constitué de cornéocytes morts solidement reliés entre eux par des desmosomes, et solidaires de la matrice lipidique inter-cellulaire (appelée « ciment lipidique ») constituée essentiellement de céramides et de lipides neutres tels que du cholestérol libre, des esters de cholestérol et des acides gras libres. Les substances irritantes qui pénètrent dans le SC peuvent altérer le ciment lipidique et entraîner une dénaturation des protéines, résultant en une perte de la fonction barrière avec une perte insensible en eau accrue, favorisant l'accès des substances irritantes au niveau des kératinocytes de l'épiderme. Au niveau de ces couches cellulaires vivantes, différents mécanismes ont été identifiés, incluant la rupture membranaire à l'origine de la libération de cytokines IL-1 α aux propriétés pro-inflammatoires. L'altération de la physiologie des kératinocytes, avec une possible réponse aux irritants par stress oxydatif peut également se produire. Un autre mécanisme possible implique la modulation de la bicouche lipidique des membranes cellulaires, entraînant une altération de la fluidité membranaire pouvant impacter la transduction de signaux médiés par les récepteurs membranaires impliqués dans le

processus d'irritation. Des interactions avec les protéines intracellulaires ou membranaires semblent également possibles, à l'origine d'altérations des kératinocytes, directement ou indirectement par modification de l'environnement épidermique telle que la valeur de pH. La modification des récepteurs transmembranaires peut également être à l'origine d'un signal de transduction altéré entraînant des réponses aux irritants.

Si l'on s'intéresse aux coefficients de partage octanol/eau ($\text{Log } P_{ow}$), le n-propanol présente la valeur la plus élevée de $\text{Log } P_{ow}$ comparativement à l'isopropanol et l'éthanol (valeurs respectives de 0,25 à 0,34, 0,05 et -0,31). Cela laisse supposer une capacité de pénétration du n-propanol à travers le SC plus élevée comparativement aux deux autres alcools, ce qui lui confère plus de possibilités d'initier un ou plusieurs des événements impliqués dans les processus d'irritation mentionnés ci-dessus. Parmi ceux-ci, l'altération du ciment lipidique est une hypothèse plausible. Les alcools sont connus pour leurs propriétés de solvant, et lorsqu'ils sont appliqués sur la peau, cela peut perturber l'équilibre entre les différents lipides du SC, entraînant une altération de la matrice lipidique intercellulaire ([Van de Sandt et al. 1999](#), [Welss et al. 2004](#)). Il est possible que l'effet solubilisant des lipides par les alcools soit réduit par une dilution dans l'eau ([Kownatzki 2003](#)). Ceci est cohérent avec les résultats obtenus avec l'éthanol testé sur un modèle de membrane artificielle composé des trois classes de lipides retrouvés dans le SC (mélange équimolaire de céramides, d'acide palmitique et de cholestérol). En recourant aux techniques de spectroscopie RMN et de calorimétrie, il a été montré que l'éthanol est un fluidifiant des lipides du SC et pourrait même entraîner l'extraction des lipides pour des concentrations $\geq 30\%$ ([Kwak et al. 2012](#)). Cependant, à nouveau, cela n'est pas entièrement cohérent avec nos résultats ; en effet, même si les viabilités des RhE observées ont été impactées par l'alcool ayant le coefficient de partage octanol/eau le plus élevé, cela ne s'est produit que pour les 3 doses d'essai les plus basses.

Comme mentionné auparavant, en se basant sur les données publiées par [Haddock & Wilkin \(1982\)](#) et par [Wilkin & Stewart \(1987\)](#), l'état d'hydratation de la peau peut impacter la réponse cutanée aux alcools, avec une réaction cutanée observée sur une peau préalablement hydratée alors qu'aucune réaction n'a pu être observée sur une peau « normale » non hydratée. Cela peut être rapproché des études de [Warner et al. \(2003\)](#) sur l'ultrastructure du SC, ayant conclu qu'une exposition prolongée à l'eau induit une rupture des lamelles intercellulaires lipidiques du SC, avec la formation de poches d'eau dans l'espace intercellulaire et la séparation des cornéocytes.

Il ne fait aucun doute que l'irritation peut être la résultante de plusieurs événements. Le fait que la différence de réponse selon la concentration n'ait pas été observée avec les 2 autres alcools ni dans l'autre modèle de RhE utilisé suggère que les résultats observés sont la résultante d'événements multiples. Cela inclut la combinaison possible d'aspects métaboliques, de caractéristiques physico-chimiques et d'un effet seuil pour la survenue de certains événements biologiques en relation avec la teneur en eau, en plus de l'effet barrière

insuffisant des modèles de RhE comparativement à celui de la peau *in vivo*. Lorsque l'on effectue un test *in vitro* d'irritation cutanée, il est important de garder à l'esprit les limites possibles de la prédictibilité du test, tel qu'observé dans nos essais avec le n-propanol, et envisager la réalisation d'un essai complémentaire avec un autre modèle de RhE validé avant de conclure sur la classification et/ou d'engager d'autres essais telle que l'expérimentation animale lorsque cela est autorisé.

Les solutions hydro-alcooliques (SHA) proposées aux utilisateurs sont formulées avec des agents hydratants, émollients et protecteurs de la peau, en cohérence avec les données de nombreuses études ayant montré que l'ajout de ces co-formulants réduit significativement, voire élimine, l'effet desséchant des alcools (Boyce & Pittet 2002, Yamamoto *et al.* 2010). Pour une meilleure représentativité de l'exposition, nous avons donc également testé des SHA. Dans un contexte d'évaluation toxicologique, les produits ont été formulés avec une quantité totale de co-formulants en excès pour chacun des ingrédients (facteur d'environ 3 pour les plus concentrés) comparativement aux produits finis réellement commercialisés. Un test préliminaire a été effectué afin de confirmer que cette concentration accrue de co-formulants n'avait pas d'effet significatif sur les viabilités des RhE. Pour les trois types d'alcool testés sur le modèle EpiSkin™ SM, les pourcentages de viabilité les plus bas ont été observés avec la plus faible teneur en alcool (60% p/p), avec un effet nettement plus prononcé pour les SHA à base de n-propanol comparativement aux deux autres alcools. Cependant, cet effet cytotoxique à 60% de n-propanol dans les SHA n'a pas été reproduit avec le modèle de RhE VitroDerm. Les raisons expliquant ces résultats ne sont pas identifiées et les mêmes hypothèses que celles exprimées précédemment pour le n-propanol seul sur EpiSkin™ SM peuvent être formulées. Pour les 3 autres concentrations testées, l'exposition des RhE aux SHA n'a pas entraîné de modifications significatives de viabilité des épidermes.

Concernant la phototoxicité, celle-ci se définit comme une atteinte cellulaire induite par la lumière déclenchée ou exacerbée après l'exposition de la peau à la lumière, suite à une application topique de substance chimique ou à son exposition systémique (Kim *et al.* 2015). L'utilisation des PHA ne pouvant être dissociée de l'exposition à la lumière, il était intéressant d'appréhender tout possible potentiel de phototoxicité.

Dans nos travaux, les alcools seuls n'ont pas été testés, compte tenu de leur utilisation fréquente en tant que solvants de substance d'essai, sans qu'aucune phototoxicité associée n'ait été rapportée dans les publications, et leur absence d'absorption dans l'UV/VIS. Nous avons testé les 4 co-formulants utilisés pour formuler les SHA, isolément (MP1 à MP4) et en mélange dans le DMSO, en plus des SHA. Aucun de ces produits d'essai n'a montré de potentiel phototoxique dans l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU. Ceci est cohérent avec les faibles niveaux d'absorbance observés dans l'UV/VIS pour chaque co-formulant. En effet, la phototoxicité est le résultat de l'absorption cutanée de photons (UVA principalement mais

aussi UVB) et de l'énergie absorbée par les produits chimiques et il est admis que si le coefficient d'extinction molaire d'un produit est inférieur à 10 L/mole/cm, ce qui était le cas pour les différents co-formulants, il est peu probable que ce produit soit photoréactif (OECD 2004a).

Dans une approche d'évaluation comparative des 3 alcools, avec l'étude d'une potentialisation possible liée à la présence de co-formulants pour lesquels aucune information concernant le potentiel de phototoxicité n'était disponible, il était néanmoins intéressant d'effectuer l'analyse sur les SHA et de confirmer l'absence de potentiel phototoxique de ces produits.

L'objectif de nos expérimentations était d'identifier les différences de tolérance locale possible entre les 3 alcools communément utilisés dans les PHA (éthanol, isopropanol et n-propanol) et/ou entre les différentes concentrations en alcool comprises entre 60 et 85% p/p, telles que fréquemment rencontrées dans ces produits. Les méthodes utilisées étaient volontairement des méthodes alternatives *in vitro* validées permettant l'évaluation de l'irritation aiguë et la phototoxicité. La seule différence que nous avons observée concerne les solutions d'alcool dans l'eau testées sur EpiSkinTM SM, sans effets significatifs sur la viabilité des épidermes pour les produits à base d'éthanol et d'isopropanol, tandis que le n-propanol à 60, 70 ou 80% p/p a entraîné des diminutions significatives de viabilités des épidermes, avec des valeurs moyennes proches de 40% (aucun effet significatif n'a été observé à 85% p/p). Cependant, ces résultats n'ayant pas été reproduits avec l'utilisation d'un autre modèle de RhE (VitroDerm) et les données bibliographiques sur le n-propanol n'étant pas en faveur de propriétés irritantes, il peut en être conclut que les résultats obtenus avec EpiSkinTM SM suite au traitement par certaines solutions de n-propanol sont le résultat d'un manque de spécificité de ce modèle d'épiderme pour cette molécule. Des investigations complémentaires seraient nécessaires pour expliquer ces observations, telles qu'un test de solubilisation des lipides dans les deux modèles de RhE utilisés, en raison des propriétés solvantes des alcools.

Par ailleurs, il est important de garder à l'esprit les limites possibles de la prédictibilité des tests d'irritation *in vitro* pour ne pas se priver inutilement de molécules ou produits dans un contexte où l'innovation en chimie souffre déjà de nombreuses limites. L'approche méthodologique proposée en figure 47 pourrait contribuer à limiter ce risque pour ce qui est de l'irritation cutanée.

La démarche consiste, en cas de résultats significatifs ou équivoques observés dans un modèle RhE spécifique, à effectuer une évaluation selon l'approche « Weight of Evidence » (WoE ou poids de la preuve) afin d'évaluer le niveau de fiabilité du résultat obtenu. Le rapprochement avec les données existantes de la littérature sur le même produit d'essai ou un produit similaire permettra une première appréciation de la plausibilité des résultats obtenus. Une évaluation QSAR pourra également être engagée si elle n'a pas déjà été faite,

permettant ainsi de disposer de données de prédictibilité de résultats au regard de la structure chimique du produit d'essai. Si l'item d'essai est un mélange de substances, l'analyse devrait être effectuée sur chaque ingrédient, même s'il semble peu réaliste d'envisager les interactions multiples possibles entre les différentes substances. Les conclusions de cette première évaluation visent à réorienter vers la reformulation en cas de plausibilité forte de résultat positif, ou dans le cas contraire, à convenir de la nécessité d'investigations complémentaires sur le produit d'essai.

Dans cette situation, la revue de la littérature devrait ainsi être complétée des données issues du métabolisme attendu pour identifier les possibles effets liés aux différents métabolites. La question de la présence possible d'impuretés devrait également être investiguée. A l'issue de cette analyse, l'identification d'alertes conduira

- soit à un programme de reformulation,
- soit à un programme d'investigations expérimentales *in vitro* complémentaires sur le produit, à titre d'exemple et de façon non exhaustive : essais complémentaires selon un plan expérimental incluant le produit avec et sans impuretés, des contrôles supplémentaires correspondants aux métabolites attendus, des essais en présence d'inhibiteurs des enzymes du métabolisme.... Dans l'hypothèse de mélange, un plan expérimental de déformulation pourra permettre éventuellement d'identifier l'implication spécifique d'un ou plusieurs composants du mélange,
- soit, en dernière intention et uniquement sur justification scientifique, à la réalisation d'expérimentation animale, sous réserve que cela soit permis par la réglementation applicable au produit,

à moins de la décision d'arrêter les évaluations en retenant par défaut la classification irritante.

En revanche, en cas d'absence d'alerte, l'hypothèse d'une réponse spécifique au modèle utilisé devrait être investiguée, en recourant à un autre modèle validé d'épiderme humain reconstitué.

Un résultat positif ou équivoque dans ce second modèle renvoie à la situation préalablement décrite, offrant différentes possibilités entre la reformulation, un plan expérimental d'investigations complémentaires, l'expérimentation animale ou la classification irritante du produit d'essai. En cas de résultats négatifs, il convient de poursuivre par une évaluation par jugement d'expert, pour préciser dans quelle mesure ce résultat négatif prévaut sur le premier résultat positif ou équivoque. L'ensemble des informations acquises dans les étapes précédemment décrites, complété de données spécifiques au second modèle de RhE pourra être utilisé pour cette évaluation. En cas d'impossibilité de conclure, la démarche s'arrête avec classification du produit d'essai comme irritant cutané, ou pourra être complétée d'une expérimentation animale, sous réserve des mêmes pré-requis que ceux précédemment formulés. En cas de jugement d'expert permettant de valider ces nouveaux résultats, l'évaluation est terminée et permet de conclure à l'absence d'irritation cutanée.

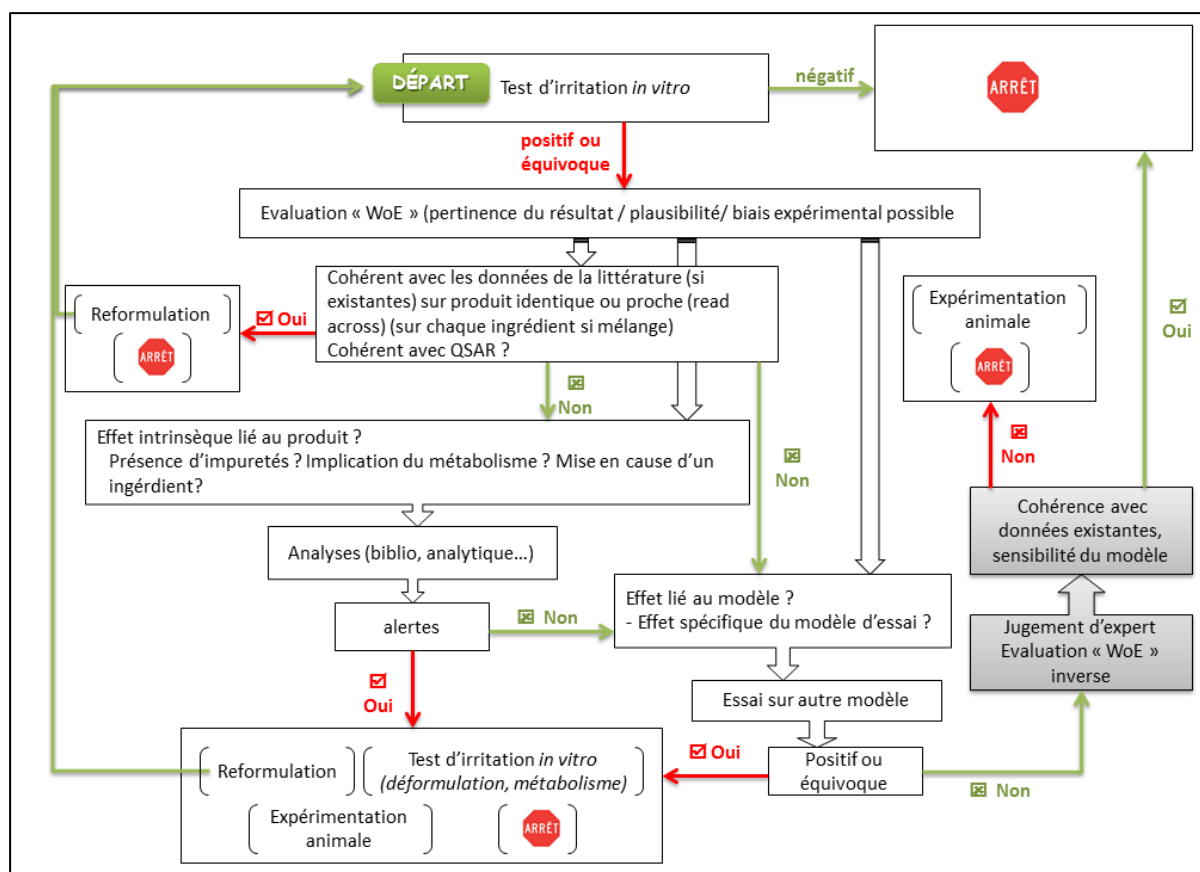


Figure 47 : Approche méthodologique proposée en cas de résultats positifs ou équivoques obtenus dans un premier essai d'irritation cutanée *in vitro* selon l'OCDE N° 439

Evaluation de la génotoxicité

Pour appréhender les différents mécanismes de génotoxicité, la mise en œuvre de plusieurs essais complémentaires est nécessaire. Les réglementations REACH (EC. 2006) et biocides (EU. 2012) applicables à nos produits d'essai mais aussi celles relatives à l'alimentation humaine et animale, aux médicaments humains, aux résidus de médicaments vétérinaires, aux dispositifs médicaux, aux ingrédients cosmétiques ou encore aux substances phytopharmaceutiques, prévoient la réalisation de deux tests *in vitro* comme première étape d'évaluation de la génotoxicité des substances : un test de mutation reverse sur bactéries (ligne directrice de l'OCDE No 471, OECD 1997) et un test de mutation chromosomique (soit le test du micronoyau (MN) *in vitro*, ligne directrice de l'OCDE No 487, OECD 2016g, soit le test d'aberrations chromosomiques ou analyse de métaphases, ligne directrice de l'OCDE No 473, OECD 2016b). Cette combinaison permet de couvrir les différents événements menant vers des mutations géniques et/ou chromosomiques (altérations structurelles et/ou numériques).

Dans notre étude, en cohérence avec ces préconisations d'essai, la génotoxicité des 3 alcools seuls ou en association avec des co-formulants a été étudiée avec la mise en œuvre du test d'Ames sur bactéries et du test du MN *in vitro*.

Pour tous les produits d'essai, différentes concentrations en alcool ont été testées, comprises entre 60 et 85 ou 90% p/p afin d'encadrer les concentrations usuellement utilisées pour les produits d'HDM sans rinçage, et étudier l'impact possible de concentrations croissantes en termes de génotoxicité. Les alcools utilisés pour l'HDM étant formulés en présence d'ingrédients cosmétiques tels que des agents émoullissants, hydratants et protecteurs pour une meilleure acceptabilité cutanée des produits, les alcools formulés avec des co-formulants (SHA : alcools formulés en présence d'un mélange de co-formulants représentatif de celui utilisé pour formuler les PHA utilisés pour l'HDM) ainsi que le mélange de co-formulants sans alcool ont également été testés dans le test d'Ames et certains tests du MN. Les résultats des essais sur le mélange de co-formulants ont également permis de déterminer la quantité maximale acceptable de ce mélange dans les produits alcooliques formulés, au regard de la cytotoxicité associée.

Dans le test d'Ames conduit dans notre cas sur *Salmonella typhimurium*, les composés mutagènes sont détectés par la mutation reverse induite au niveau d'un des gènes nécessaire à la synthèse d'histidine chez des bactéries rendues auxotrophes pour cet acide aminé. En milieu pauvre en histidine, et en présence de la substance d'essai, l'augmentation par rapport au taux spontané du nombre de révertants (bactéries prototrophes) donne une indication de l'activité mutagène du produit. L'essai est réalisé avec et sans activation métabolique afin de démontrer l'activité des promutagènes et des mutagènes directs, respectivement. Un résultat est considéré positif dans cet essai en cas de doublement ou triplement, selon la souche, du nombre de révertants par rapport au témoin négatif, avec reproductibilité du résultat dans un essai indépendant.

Dans nos essais, les souches de *Salmonella typhimurium* utilisées étaient celles recommandées dans la ligne directrice de l'OCDE No 471 (TA98, TA100, TA102, TA1535 et TA1537) ([OECD 1997](#)). Le système d'activation métabolique était du S9 de foie de rat induit par l'arochlor 1254.

Les résultats d'essai obtenus avec le mélange de co-formulants seuls concluent à l'absence de propriétés mutagènes/promutagènes de ce mélange dans le test d'Ames.

Les différents alcools testés (50 à 75 mg/boîte) ont donné des résultats négatifs en absence et en présence du système d'activation métabolique, y compris lorsqu'ils étaient formulés en présence de co-formulants.

Ces résultats sont cohérents avec les données publiées sur ces alcools :

- pour l'éthanol, des résultats négatifs sont publiés pour des essais *in vitro* de mutation génique sur bactéries avec et sans activation métabolique réalisés à des doses d'essai

équivalentes à celles mises en œuvre dans nos études ou même supérieures ([De Flora et al. 1984a & 1984b](#), [Zeiger et al. 1992](#), [Cotruvo et al. 1978](#), [Arimoto et al. 1982](#), [Blevins & Taylor 1982](#), [Blevins & Shelton 1983](#), [Hayes et al. 1984](#), [Hellmer & Bolcsfoldi 1992](#), [Bingham et al. 2001](#), [Phillips & Jenkinson 2001](#)),

- pour l'isopropanol, nos résultats complètent les données retrouvées dans la littérature avec des résultats négatifs pour des doses d'alcool inférieures, n'excédant pas 5 mg/boîte ([Florin et al. 1980](#), [Shimizu et al. 1985](#)),
- il en est de même pour le n-propanol, dont les résultats négatifs publiés pour le test de mutation génique sur bactéries sont pour des doses d'alcool n'excédant pas 5 mg/boîte ([ECHA, 2017](#), [ECB 2008](#)).

Par ailleurs, dans le cadre de l'évaluation de la génotoxicité associée à l'utilisation des PHA utilisés pour l'HDM, il était intéressant de confirmer l'absence de propriétés mutagènes/pro-mutagènes des alcools formulés dans le test d'Ames.

Dans le test du MN, après exposition des cellules au produit d'essai avec et sans activation métabolique, les cultures cellulaires sont cultivées pendant une période suffisante pour subir une division cellulaire et permettre la visualisation éventuelle d'une altération chromosomique de structure ou de nombre par la formation de micronoyaux en interphase. Les cellules récoltées et colorées sont ensuite analysées au microscope pour comptabiliser les cellules avec MN. Un composé est considéré génotoxique dans cet essai en cas d'augmentation statistiquement et biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées par rapport au témoin négatif et une relation dose-effet. La reproductibilité dans un essai indépendant a également été prise en considération.

Les essais ont été réalisés sur deux lignées de cellules humaines. La première est une lignée lymphoblastoïde, en relation avec une exposition systémique indirecte possible aux produits suite au possible passage transcutané ou *via* les voies respiratoires. Il s'agit des cellules TK6, p53 compétentes et reprises dans la ligne directrice de l'OCDE No 487 ([OECD 2016g](#)) parmi les modèles cellulaires de choix pour la réalisation du test du MN. La seconde est une lignée pulmonaire, les poumons constituant le deuxième organe primo-exposé après la peau lors de l'utilisation des PHA, en raison des propriétés volatiles des alcools. Il s'agit des cellules NCI H292, également p53 compétentes.

Pour les 3 types d'alcool, des essais sur TK6 et NCI H292 ont été effectués avec une administration de traitement directement dans le milieu de culture. Exclusivement pour l'éthanol, le test du MN a également été effectué dans un modèle de co-culture, avec administration du traitement sur un épiderme humain reconstitué, EpiskinTM SM. L'utilisation de ce modèle vise à reproduire la barrière cutanée et ainsi se rapprocher des conditions réelles d'exposition lors de l'utilisation des PHA.

L'ensemble de ces essais a été réalisé en présence et en absence de système d'activation métabolique (S9 de foie de rat induit par l'arochlor comme pour le test d'Ames). Pour les

cellules NCI H292, des essais ont été effectués en utilisant un second mode de traitement. Les cellules cultivées en interface air-liquide (IAL) ont été exposées au niveau de leur face apicale à des vapeurs d'alcools. L'équipement Vitrocell® équipé d'un générateur d'aérosol relié à un système de chauffage a été utilisé. Ce système permet la circulation en débit contrôlé d'une atmosphère chargée du produit d'essai dans des modules spécialement conçus pour un contact direct entre les cellules et l'atmosphère de test. Dans un contexte d'évaluation toxicologique en relation avec l'utilisation des PHA, deux schémas de traitement différents ont été utilisés : une exposition continue sur une durée de 30 minutes et une exposition de 2 minutes répétée toutes les 5 minutes sur une durée totale de 60 minutes. Le second schéma d'exposition a été choisi à partir des travaux publiés de [Hautemanière et al. \(2013b\)](#) utilisant cette séquence d'utilisation des PHA en unité de soins intensifs pour évaluer l'exposition du personnel de soins aux vapeurs d'alcool durant leur utilisation. Ces essais ont été réalisés sans ajout de système d'activation métabolique exogène. Cependant, une métabolisation des substances d'essai ne peut être exclue, le modèle cellulaire utilisé disposant des gènes codant les enzymes du métabolisme des alcools ([Courcot et al. 2012](#)). Il est prévisible en revanche que le niveau d'expression protéique des enzymes du métabolisme était bien plus faible que celui obtenu avec l'ajout d'un système d'activation métabolique exogène. Cependant, ces conditions expérimentales augmentent le degré de représentativité des conditions réelles d'exposition, et sont intéressantes pour l'évaluation des risques en termes de génotoxicité au niveau des voies respiratoires.

Les résultats du test du MN sur cellules TK6 avec traitement par l'éthanol (118 à 161 mM) dans le milieu de culture sans ajout de système d'activation métabolique étaient tous négatifs. En présence de système d'activation métabolique, les essais ont mis en évidence une activité génotoxique considérée comme étant équivoque. En effet, la réponse observée n'était pas accentuée avec l'augmentation de la dose, et à l'exception de l'éthanol à 156 mM (8,9 µL/mL), les réponses positives n'ont pas été retrouvées avec les mêmes doses d'alcool selon les essais, démontrant l'absence de reproductibilité, paramètre important dans l'évaluation de la génotoxicité. Ces résultats pourraient être liés à la formation de l'acétaldéhyde lors de la métabolisation de l'éthanol ([IARC 2012](#)). Ils peuvent également être rapprochés de l'étude de [Kayani & Parry \(2010\)](#), qui a mis en évidence une augmentation de faible intensité mais dose-reliée de l'incidence de MN dans des cellules lymphoblastoïdes MCL-5 métaboliquement compétentes, pour des doses d'éthanol relativement élevées, de 4 à 10 µL/mL.

En revanche, l'éthanol en présence de co-formulants, testé aux doses d'alcool comprises entre 118 et 161 mM, n'a induit aucune augmentation significative du nombre de MN sur cellules TK6, que ce soit en présence ou en absence de système d'activation métabolique. Par ailleurs, l'essai préalable réalisé pour tester le mélange de co-formulants seuls a conclu à l'absence de propriétés génotoxiques de ce mélange dans le test du MN *in vitro*.

Dans une approche d'évaluation des risques, le test du MN sur TK6 a également été réalisé sur un modèle de co-culture, avec administration de l'éthanol au niveau d'un épiderme humain reconstitué. Dans cet essai, aucun résultat positif n'a été retrouvé, en absence comme en présence d'activation métabolique. Les concentrations d'éthanol présentes dans les milieux de culture des cellules TK6 n'ont pas été déterminées. Cependant, les résultats obtenus dans ce modèle restent intéressants pour l'évaluation des risques liés à l'exposition des utilisateurs résultante de l'application cutanée d'éthanol. En effet, dans ce modèle, la dose d'alcool administrée était de $52 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, quantité supérieure aux $10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ repris dans la ligne directrice de l'OCDE traitant de l'absorption cutanée *in vitro* pour être représentatif des conditions normales de l'exposition humaine cutanée aux produits chimiques (OECD 2004c) et la pénétration cutanée dans les épidermes humains reconstitués est supérieure à celle réellement existante sur peau humaine, en raison d'une fonction barrière moindre (Netzlaff *et al.* 2005, Netzlaff *et al.* 2007, Ponec 1992, Perkins *et al.* 1999, Schmook *et al.* 2001). Il est intéressant par ailleurs de mentionner que les SHA sont généralement utilisées à raison de 3 mL par friction pour un traitement hygiénique des mains. Considérant la surface moyenne développée des mains estimée à 860 cm^2 , et en appliquant un facteur de sécurité en portant la quantité de SHA par friction à 10 mL, la quantité de produit par unité de surface ($11,6 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) est inférieure aux $52 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ utilisés dans le modèle de co-culture.

Sur cellules pulmonaires humaines NCI H292, l'éthanol administré directement dans le milieu de culture aux doses de 118 à 161 mM, en absence comme en présence de système d'activation métabolique, n'a entraîné aucune augmentation significative du nombre de MN par comparaison aux cultures contrôles.

Les résultats du test du MN étaient également négatifs dans les essais réalisés sur les cellules NCI H292 cultivées en IAL exposées à des vapeurs d'éthanol (dose moyenne de $37\,400 \text{ mg}/\text{m}^3$ ($\pm 19\,600 \text{ ppm}$)) en absence de système d'activation métabolique.

Avec l'isopropanol, aucun potentiel génotoxique de l'alcool à des doses relativement élevées comprises entre 89 et 124 mM n'a été mis en évidence dans le test du MN *in vitro* sur cellules TK6 et NCI H292, en absence comme en présence de système d'activation métabolique. Il en est de même dans les essais sur cellules TK6 traitées par des SHA à base d'isopropanol (doses d'alcool comprises entre 89 et 120 mM) en présence comme en absence de système d'activation métabolique. Des résultats négatifs ont également été obtenus dans les essais réalisés sur les cultures de cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'isopropanol (dose moyenne de $32\,700 \text{ mg}/\text{m}^3$ ($\pm 13\,100 \text{ ppm}$)) en absence de système d'activation métabolique.

Pour cet alcool, on retrouve dans la littérature un test du MN *in vivo* concluant à l'absence de propriétés génotoxiques de l'isopropanol par voie *i.p.* (Kapp *et al.* 2012). Nos résultats d'essai du MN *in vitro* en termes de poids de la preuve pour étayer l'absence de propriétés génotoxiques de l'isopropanol sont donc d'intérêt limité. Cependant, ces résultats

complètent les données de génotoxicité disponibles pour cet alcool en apportant des résultats d'essais de mutations chromosomiques *in vitro* plus robustes que ceux actuellement disponibles. En effet, le seul test de cette catégorie identifié dans la littérature concluant à des résultats négatifs est un test de SCE dont la ligne directrice de l'OCDE correspondante a été archivée en raison de résultats non prédictifs de mécanismes génotoxiques. Nos résultats sont également intéressants pour l'approche comparative entre alcools. Enfin, nos essais complètent les données de la littérature avec des résultats sur des produits représentatifs de ceux utilisés pour l'HDM, utiles pour une évaluation des risques associés à l'utilisation de tels produits.

Des résultats similaires à ceux de l'isopropanol ont été obtenus avec le n-propanol. L'ensemble des tests du MN *in vitro* sur cellules TK6 et NCI H292 traitées par du n-propanol aux doses comprises entre 90 et 125 mM était clairement négatif, en présence comme en absence de système d'activation métabolique. Il en est de même des essais sur cellules TK6 traitées par des SHA à base de n-propanol (doses d'alcool de 90 à 126 mM) en présence et en absence de système d'activation métabolique. Des résultats négatifs ont également été obtenus dans les essais réalisés sur les cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs de n-propanol (dose moyenne de 17 300 mg/m³ (\pm 7 000 ppm)) en absence de système d'activation métabolique.

Peu d'essais sont retrouvés dans la littérature pour étayer l'absence de potentiel génotoxique du n-propanol. On retrouve des résultats négatifs dans l'essai de mutation génique sur bactéries mené selon les recommandations de la ligne directrice de l'OCDE No 471 en absence et en présence d'activation métabolique (ECHA, 2017). En termes de données d'essais de mutations chromosomiques *in vitro*, les résultats sont également en faveur de l'absence de propriétés génotoxiques du n-propanol (ECB 2008, von der Hude *et al.* 1987). Cependant, le seul essai réalisé en présence d'activation métabolique (von der Hude *et al.* 1987) est un essai de SCE, limitant le poids de la preuve en termes d'absence de génotoxicité pour cet alcool. *In vivo*, aucune étude avec cet alcool n'a été jugée recevable faute de données suffisantes pour valider sa recevabilité (ECB 2008). Les résultats de nos essais viennent donc compléter et renforcer les données disponibles pour cet alcool en termes d'absence de propriétés génotoxiques.

Le test des comètes a également été réalisé pour les alcools seuls à des fins d'investigations complémentaires en termes de dommages primaires à l'ADN. Il s'agit d'un test indicateur d'exposition, qui en cas de réponse positive couplée à un test du MN positif, suggère l'implication de mécanismes clastogènes dans la formation des MN observés, tandis qu'à l'inverse, un résultat négatif sera plutôt indicateur de mécanismes aneugènes (cette hypothèse nécessiterait une investigation spécifique du mécanisme d'action en réalisant le test du MN couplé à la méthode FISH, Fluorescence *in situ* hybridation).

Dans le test des comètes *in vitro*, après traitement des cellules, celles-ci sont incluses dans un gel d'agarose puis soumises à des étapes de lyse membranaire, de déroulement de l'ADN et d'électrophorèse qui permettra de quantifier la migration des fragments d'ADN en

relation avec les lésions induites par des agents génotoxiques. Dans nos essais, les résultats ont été restitués en pourcentage d'ADN dans la queue. Contrairement au test d'Ames et du MN, il n'existe pas de ligne directrice validée pour cet essai *in vitro*. Les critères de positivité retenus, définis à partir de ceux repris dans la ligne directrice équivalente *in vivo* (OCDE No 489, [OECD 2016h](#)) étaient l'augmentation statistiquement et biologiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue, avec une relation dose-effet.

Les essais ont été réalisés sur les mêmes modèles cellulaires que ceux utilisés pour le test du MN.

Pour l'éthanol, sur la base des connaissances acquises en termes de mécanismes d'action génotoxique de cet alcool, une réponse positive pouvait être attendue suite au traitement sans système d'activation métabolique, en relation avec les dommages primaires à l'ADN consécutifs à la formation d'espèces réactives de l'oxygène ([IARC 2012](#)). En présence d'activation métabolique, une réponse négative ou même une diminution significative du pourcentage d'ADN dans la queue comparativement aux contrôles pouvait être attendue, liée à l'effet pontant connu de l'acétaldéhyde issu du métabolisme de l'éthanol. Dans nos essais sur cellules TK6, en absence comme en présence d'activation métabolique, les résultats obtenus suite au traitement par l'éthanol (118 à 156 mM) étaient négatifs. Une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue a été obtenue en présence d'activation métabolique, mais sans significativité biologique. Sur les cultures de cellules NCI H292 en IAL exposées aux vapeurs d'éthanol (dose moyenne de 37 400 mg/m³) en absence d'activation métabolique, les résultats étaient également négatifs. Nos résultats diffèrent des deux essais de dommages primaires à l'ADN *in vitro* identifiés lors de la revue bibliographique ([Blasiak et al. 2000](#), [Lamarche et al. 2003](#)). Dans ces essais réalisés sans système d'activation métabolique, des résultats positifs ont été rapportés. Cependant, pour l'un des deux, les résultats n'étaient pas exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue, mais en OTM, paramètre de quantification pouvant surestimer la réponse observée en relation avec un facteur multiplicatif de la quantité d'ADN par la longueur de la queue.

Suite au traitement de cellules TK6 par isopropanol (89 à 118 mM) et n-propanol (90 à 126 mM) en absence et en présence de système d'activation métabolique, les résultats du test des comètes étaient tous négatifs. Comme pour l'éthanol, une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue a été obtenue en présence d'activation métabolique, mais sans significativité biologique. Sur les cultures de cellules NCI H292 en IAL exposées aux vapeurs d'alcool (dose moyenne de 32 700 mg/m³ pour l'isopropanol et 17 300 mg/m³ pour le n-propanol) en absence d'activation métabolique, les résultats étaient également négatifs.

En résumé, pour l'éthanol,

- les données de la littérature concluant à des propriétés génotoxiques attribuées à l'acétaldéhyde issu du métabolisme oxydatif de l'éthanol, ainsi qu'à un mécanisme oxydatif secondaire consécutif à l'induction enzymatique du CYP2E1 en situation d'exposition chronique et/ou à dose élevée d'éthanol
- nos résultats d'essais dans le test d'Ames étant négatifs,
- nos résultats du test du MN *in vitro* sur cellules TK6 étant
 - équivoques en présence d'activation métabolique en conditions expérimentales classiques et à des doses relativement élevées,
 - négatifs y compris en présence d'activation métabolique dans le modèle de co-culture plus représentatif des conditions réelles d'exposition,
 - et également négatifs lorsque l'éthanol était formulé en présence de co-formulants,
- l'éthanolémie induite suite à l'utilisation des PHA en relation avec une exposition par inhalation et voie cutanée (éthanolémies atteintes généralement indissociables de l'éthanolémie naturelle endogène existante) étant quasiment nulle,

il est possible de conclure à l'absence de préoccupation toxicologique en termes de risque génotoxique associé à l'exposition systémique induite à l'éthanol lors de l'utilisation de PHA.

Pour l'isopropanol, sur la base des données de génotoxicité publiées toutes négatives, complétées de nos résultats d'essais également négatifs, considérant par ailleurs le faible niveau d'exposition systémique à l'isopropanol induit par l'utilisation des PHA, tel que déterminé dans des essais sur volontaires en situation d'utilisation de ces produits ([Brown *et al.* 2007](#), [Turner *et al.* 2004](#)), il est également possible de conclure à l'absence de préoccupation toxicologique en termes de risque génotoxique associé à l'exposition systémique induite à l'isopropanol lors de l'utilisation de PHA à base d'isopropanol.

Moins de données sont disponibles pour le n-propanol en termes d'exposition systémique induite par l'utilisation des PHA sur base de n-propanol. Il existe cependant une étude documentant des pics moyens de concentration sanguine relativement faibles, avec absence d'accumulation de la dose absorbée ([Below *et al.* 2012](#)). Sur la base de cette étude en plus des données de génotoxicité publiées toutes négatives, complétées de nos résultats d'essai également négatifs, la même conclusion d'absence de risque génotoxique associé à l'exposition systémique induite au n-propanol lors de l'utilisation de PHA à base de cet alcool peut être formulée.

Pour les 3 alcools, aucun essai de génotoxicité *in vivo* avec exposition par inhalation n'a été retrouvé dans la littérature.

Dans un contexte d'évaluation de la toxicité respiratoire liée à l'utilisation des PHA, il était intéressant de mettre en œuvre les essais *in vitro* sur un modèle de cellules pulmonaires

humaines. Les niveaux d'exposition lors du traitement par vapeurs étaient élevés. Pour l'éthanol, ceux-ci étaient nettement supérieurs à ceux associés à l'utilisation des SHA en situation d'exposition professionnelle, estimés lors de mesures ou de simulations en termes d'exposition court terme entre 100 et 2500 mg/m³ en général (une seule étude publiée communique des taux plus élevés de 14000 à 20200 mg/m³) (AFSSET 2010, AFSSAPS 2011, Dumas-Campagna *et al.* 2014b, Hautemanière *et al.* 2013b, Bessonneau & Thomas 2012) et en termes d'exposition long terme entre 40 et 250 mg/m³ (AFSSET 2010, Hautemanière *et al.* 2013a). Dans nos essais, les doses d'éthanol étaient proches de 38 000 mg/m³. La même comparaison ne peut pas être effectuée pour l'isopropanol et le n-propanol à défaut de données disponibles. Il est cependant raisonnable de considérer que nos niveaux d'expositions de l'ordre de 33 000 mg/m³ pour l'isopropanol et 17300 mg/m³ pour le n-propanol, étaient également en excès par rapport aux situations d'exposition réelles, ces niveaux de vapeurs ayant été obtenus par montée en température des alcools à 87°C, valeur nettement supérieure aux 37°C de température corporelle et aux 20°C de température ambiante usuellement rencontrée.

Par ailleurs, il est intéressant de rappeler que ces alcools disposent de valeurs limites d'exposition professionnelle (VME de 1 900 mg/m³ et VLCT de 9 500 mg/m³ pour l'éthanol, VLCT de 980 mg/m³ pour l'isopropanol et VME de 500 mg/m³ pour le n-propanol) contribuant à limiter l'exposition des salariés.

Bien que limités à un seul modèle cellulaire, les résultats négatifs dans ces expérimentations, associés aux considérations exposées ci-dessus, constituent des données intéressantes en faveur de l'absence de préoccupation toxicologique en termes de risque génotoxique associé à l'exposition des voies respiratoires lors de l'utilisation de PHA à base de l'un de ces 3 alcools, éthanol, isopropanol ou n-propanol.

Conclusion générale et perspectives

Un des objectifs de nos travaux était d'effectuer une évaluation comparative entre l'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol en termes de toxicité cutanée, avec détermination de l'impact éventuel de concentrations croissantes.

Sur la base de la revue bibliographique réalisée, aucune différence de toxicité cutanée en termes d'irritation n'était attendue entre ces 3 alcools. Dans nos travaux, la toxicité cutanée a été évaluée par la réalisation d'essais d'irritation cutanée *in vitro* (OCDE No 439) et de phototoxicité *in vitro* (OCDE No 432). Considérant que les résultats du test d'irritation avec le n-propanol sur EpiSkinTM SM (viabilités cellulaires des RhE significativement impactées pour les concentrations d'alcool de 60, 70 et 80% p/p) étaient liés à un manque de spécificité du modèle, et en analysant tous les autres résultats obtenus, aucune différence significative entre les 3 alcools ne ressort en termes de tolérance locale indépendamment des concentrations croissantes comprises entre 60 et 85% p/p. Nos essais confirment donc

l'évaluation basée sur la revue bibliographique concluant à l'absence d'effet irritant pour la peau de ces 3 alcools, et complètent les données existantes en confirmant l'absence d'effet lié à des teneurs croissantes en alcool, y compris lorsque les alcools sont formulés en présence de co-formulants, tels qu'ils le sont dans les PHA destinés à l'HDM. La phototoxicité a également été étudiée, et les études ont permis de conclure à l'absence de phototoxicité des PHA testés.

Au final, les données sont en faveur d'une bonne tolérance cutanée. Aucune irritation aiguë ou phototoxicité chez l'homme en relation avec l'exposition cutanée à ces 3 alcools tels que fournis aux professionnels de santé dans les PHA pour l'HDM n'est attendue.

En revanche, il est ressorti de nos essais le possible manque de spécificité, déjà décrit dans la littérature, des modèles d'épidermes humains reconstitués (RhE) vis-à-vis de certaines substances, qu'il convient de garder à l'esprit dans le cadre de l'évaluation de l'irritation cutanée *in vitro*. Des investigations complémentaires et une évaluation par l'approche Weight of Evidence peuvent être utiles avant de conclure aux propriétés irritantes d'un item d'essai.

En plus de la toxicité cutanée, le second objectif était d'effectuer une évaluation comparative de ces 3 alcools en termes de toxicité respiratoire. Ce volet a été appréhendé par l'évaluation de la génotoxicité sur un modèle de cellule pulmonaire humaine. L'éthanol étant classé agent cancérigène par le CIRC en relation avec la consommation de boissons alcoolisées, avec implication de mécanismes génotoxiques sous-jacents, l'évaluation de la génotoxicité des 3 alcools a été étendue à un modèle de cellules lymphoblastoïdes humaines.

En termes de génotoxicité, une différence entre les alcools est ressortie de la revue bibliographique, avec des propriétés génotoxiques décrites pour l'éthanol mais pas pour les deux autres alcools. Cependant pour le n-propanol, les données disponibles ne sont pas issues d'une batterie d'essais *in vitro* suffisants pour appréhender les différents mécanismes génotoxiques, limitant le poids de la preuve sur l'absence de génotoxicité de cet alcool (absence de résultats d'essai de mutation chromosomique *in vitro*).

Pour notre évaluation, le test d'Ames (OCDE No 471) et le test du MN *in vitro* (OCDE No 487) sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 ont été réalisés avec les 3 alcools et les SHA correspondants. Le test du MN a également été réalisé sur cellules humaines pulmonaires NCI H292. Sur ce modèle, en plus du traitement classique par immersion, un traitement par vapeurs sur des cellules cultivées en IAL a également été effectué pour disposer de données dans des conditions plus représentatives des conditions réelles d'exposition par la voie pulmonaire.

Les essais ont été réalisés avec et sans ajout de système d'activation métabolique issu de foie de rat induit par l'arochlor 1254, à l'exception des essais avec traitement par vapeurs, exclusivement réalisés sans système d'activation métabolique sur cellules NCI H292.

Cependant, ce modèle de cellules dispose des gènes codant pour les enzymes du métabolisme des alcools, laissant supposer une métabolisation possible des alcools.

En seconde intention, dans une démarche mécanistique, le test des comètes *in vitro* a également été effectué sur cellules TK6 et NCI H292 avec les alcools seuls pour évaluer les dommages primaires à l'ADN.

Le test d'Ames et du MN sur cellules TK6 ont également été réalisés avec les alcools formulés, pour étendre l'évaluation à des produits représentatifs des PHA utilisés pour l'HDM.

Dans une certaine mesure, nos essais ont confirmé une différence de profil en termes de génotoxicité entre ces 3 alcools.

L'ensemble des essais réalisés avec l'isopropanol et le n-propanol était négatif et vient compléter les données d'essai *in vitro* disponibles pour ces alcools, en faveur d'absence de propriétés génotoxiques, y compris lorsqu'ils sont formulés en présence de co-formulants (doses d'alcool testées comprises entre 53 et 75 mg/boîte pour le test d'Ames, entre 90 et 125 mM pour les traitements en immersion pour le test du MN sur TK6 et NCI H292, et de l'ordre de 33 000 mg/m³ pour l'isopropanol et 17 300 mg/m³ pour le n-propanol pour le test du MN et test des comètes sur NCI H292 avec traitement par vapeurs).

En revanche, pour l'éthanol, les essais du MN mis en œuvre sur les cellules TK6 (doses d'alcool comprises entre 118 et 161 mM) ont confirmé de façon plutôt équivoque les propriétés pro-mutagènes connues de l'éthanol à forte concentration. Cependant, dans nos essais, l'effet n'était pas accentué avec l'augmentation de la dose, et à l'exception de l'éthanol à 156 mM, les réponses positives n'ont pas été reproduites avec les mêmes doses d'alcool au cours d'un essai indépendant. Dans une démarche visant à appréhender les mécanismes d'actions sous-jacents aux effets observés, le test des comètes avec et sans système d'activation métabolique a été effectué. Celui-ci n'a pas mis en évidence d'augmentation biologiquement significative de la fragmentation d'ADN et n'a donc pas permis d'apporter une explication possible de l'implication de l'acétaldéhyde ou de mécanisme de stress oxydant dans l'effet observé lors du test du MN. La reproduction du test du MN couplé à de l'hybridation *in-situ* (FISH) pour distinguer les MN contenant un fragment de chromosome de ceux contenant un chromosome entier permettrait d'apporter des réponses. Pour l'éthanol, un essai sur cellules TK6 en co-culture avec application de l'alcool sur un épiderme humain reconstitué (RhE) a également été réalisé. Dans cet essai reproduisant la barrière cutanée présente en situation réelle d'exposition, les résultats étaient négatifs.

L'ensemble des autres essais effectués a donné des résultats négatifs (test d'Ames avec des doses d'éthanol comprises entre 54 et 75 mg/boîte avec et sans co-formulants, test du MN sur NCI H292 avec et sans système d'activation métabolique aux doses d'éthanol comprises entre 118 et 161 mM, test du MN sur cellules NCI H292 en IAL exposées aux vapeurs d'éthanol ($\pm 38\ 000$ mg/m³), test du MN sur TK6 avec et sans activation métabolique avec

l'éthanol formulé aux concentrations comprises entre 118 et 161 mM en présence de co-formulants).

Au final, l'éthanol se distingue des deux autres alcools par un potentiel génotoxique connu et impliqué dans l'augmentation du risque de cancer lié à la consommation de boissons alcoolisées. Les propriétés génotoxiques de l'éthanol sont à attribuer à l'acétaldéhyde issu de l'oxydation de l'éthanol par l'ADH, et à des mécanismes oxydatifs secondaires vraisemblablement associés à un niveau seuil d'éthanol possiblement couplé à une durée d'exposition chronique. Pour les deux autres alcools, aucun potentiel génotoxique n'est rapporté dans la littérature ni n'a été observé dans nos expérimentations réalisées selon une batterie d'essais permettant d'appréhender les différents mécanismes impliqués dans la génotoxicité.

Dans un contexte d'évaluation des risques associé à l'utilisation des PHA, prenant en compte

- d'une part les données existantes sur les 3 alcools documentant un faible niveau d'exposition systémique induit par l'utilisation des PHA, indiscernable des taux endogènes connus pour l'éthanol et l'isopropanol,
- et d'autre part l'ensemble de nos résultats d'essai,

aucun risque accru de génotoxicité systémique consécutive à une possible pénétration cutanée et respiratoire de l'alcool en situation d'utilisation des PHA n'est identifié. Les données disponibles sont également en faveur de l'absence de génotoxicité locale au niveau pulmonaire en relation avec l'exposition aux vapeurs d'alcools.

En conclusion, en situation d'exposition aux alcools liée à l'utilisation des PHA, aucun risque pour la santé humaine en termes de toxicité cutanée et respiratoire ne ressort de ce travail de recherche.

D'autres travaux pourraient bien sûr compléter cette évaluation.

Dans nos essais, pour l'irritation cutanée, seule l'irritation aiguë a été appréhendée. Les types de dermatites de contact irritatives qui peuvent également se rencontrer avec les alcools ([Phillips et al. 1972](#)), telle que l'irritation sensorielle (symptômes subjectifs, piqûre, brûlure, démangeaisons ou même sensations douloureuses, mais sans modifications morphologiques) et l'irritation cumulative gagneraient à être appréhendés.

Dans un contexte d'évaluation de la tolérance cutanée, il conviendrait d'investiguer également la sensibilisation cutanée, quelques cas de dermatites allergiques de contact au niveau des mains étant rapportés chez le personnel soignant ([WHO 2009](#)). La sensibilisation cutanée résulte d'un mécanisme complexe. Pour qu'une réaction de sensibilisation de contact soit induite, plusieurs étapes mécanistiques résumées ci-après interviennent : (1) l'absorption cutanée et l'hapténation (liaison de la substance sensibilisante avec des protéines cellulaires conditionnant l'acquisition du potentiel immunogène), (2) l'inflammation épidermique avec une expression génique au niveau des kératinocytes

contrôlée par le facteur d'activation de transcription Nrf2, (3) l'activation puis la migration des cellules dendritiques cutanées jusqu'aux ganglions lymphatiques, et enfin (4) la prolifération des lymphocytes T antigène-spécifiques, qui reconnaissent le produit chimique lorsque celui-ci est appliqué sur la peau, à l'origine de la réponse allergique.

Avec l'interdiction de l'expérimentation animale pour les cosmétiques tout en conservant la démarche d'évaluation de leur sécurité, des méthodes alternatives ont été développées visant à appréhender les différentes étapes significatives de la sensibilisation. Il existe depuis peu des méthodologies validées permettant d'appréhender les 3 premières étapes de ce processus :

- Essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA) (Direct Peptide Reactivity Assay) (OCDE 442C, [OECD 2015c](#)) : méthode *in chemico* portant sur le premier événement clé du processus de sensibilisation cutanée, par quantification de la capacité d'une substance chimique à réagir avec certains peptides,
- Méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase (OCDE 442D, [OECD 2015d](#)): méthode *in vitro* portant sur le deuxième événement clé du processus de sensibilisation cutanée au niveau des kératinocytes, en mesurant la réactivité directe d'une substance à des résidus cystéine de Keap1, une protéine rétrorégulatrice du facteur de transcription Nrf2, la voie de régulation Nrf2-Keap1-ARE étant considérée comme l'une des voies pour l'identification des sensibilisants de contact potentiels (la seule méthode validée à ce jour est la méthode KeratinoSensTM).
- Test d'activation de la lignée cellulaire humaine (h-CLAT – human cell line activation test) (OCDE No 442E, [OECD 2016a](#)) : méthode *in vitro* proposée pour l'étude du troisième événement clé de la sensibilisation cutanée. Elle permet de quantifier les variations d'expression des marqueurs de surface cellulaires associés au processus d'activation des monocytes et des cellules dendritiques (CD86 et CD54), à la suite de l'exposition à des sensibilisants.

Pour l'évaluation génotoxique des alcools, pour le volet respiratoire, des essais confirmant les capacités métaboliques du modèle cellulaire NCI H292 utilisé dans nos expérimentations, par détermination de l'expression protéique des enzymes par exemple, permettraient de donner plus de poids aux résultats négatifs obtenus. Il existe également des modèles 3D de tissu épithélial respiratoire humain reconstitué, permettant de générer des données sur un modèle *in vitro* avec un niveau supérieur de représentativité comparativement à la culture cellulaire.

Par ailleurs, aucun essai de génotoxicité sur un système d'essai représentatif de la peau n'a été retrouvé dans la littérature ni n'a été réalisé dans nos travaux. Il serait intéressant de disposer de résultats sur cellules cutanées humaines NHEK par exemple, ou sur épiderme humain reconstruit pour compléter l'évaluation des risques génotoxiques, la peau étant le premier organe exposé dans la pratique d'HDM. Il s'agit d'ailleurs des préconisations reprises dans le guide du SCCS pour l'évaluation de la sécurité des ingrédients cosmétiques

lorsque des premiers résultats de tests *in vitro* sont négatifs dans le test d'Ames et positifs dans le test du MN (SCCS 2016).

Egalement, un test du MN couplé à la technique FISH sur cellules TK6 suite au traitement par l'éthanol avec et sans système d'activation métabolique permettrait d'apporter une information mécanistique aux réponses positives observées.

L'évaluation de la réponse inflammatoire aux alcools sur des modèles représentatifs de l'exposition cutanée et respiratoire constituerait également un axe intéressant d'investigations complémentaire. Les effets de l'éthanol dans les réponses inflammatoires associées à diverses pathologies dont certaines infections pulmonaires sont décrits dans la littérature (Morris *et al.* 2015). L'inflammation est par ailleurs un processus impliqué dans les mécanismes d'irritation cutanée (Mathias & Maibach 1978, Berardesca & Distant 1994). Une première série d'expérimentations sur cellules NCI H292 (annexe 5) n'a pas mis en évidence de modulation marquée de l'expression des ARNm des gènes analysés (chimiokines pro-inflammatoires CCL5, CXCL1 et CCL20, cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL6, IL8 et TNF- α , cytokine anti-inflammatoire TGF β 1, mucine MUC5AC et marqueur de stress oxydatif COX2) suite à un traitement de 4 heures par éthanol (118 à 156 mM), isopropanol (89 à 118 mM) et n-propanol (90 à 120 mM). L'étude des niveaux de sécrétion des cytokines et chimiokines testées n'a pas non plus mis en évidence de modification significative. Cependant, ces premiers essais sont insuffisants pour effectuer une évaluation de la réponse inflammatoire. Différents schémas de traitement sur différents systèmes biologiques, incluant une variété plus importante de marqueurs de l'inflammation, gagneraient à être testés.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Essais de génotoxicité <i>in vitro</i> en fonction du système d'essai et du mécanisme étudié	6
Tableau 2 : Dénominations chimiques, N° CAS, formule chimique, masse molaire et classification harmonisée de l'éthanol, isopropanol et n-propanol	8
Tableau 3 : Principales caractéristiques physicochimiques de l'éthanol, isopropanol et n-propanol	9
Tableau 4 : Valeurs limites d'exposition professionnelle de l'éthanol, isopropanol et n-propanol en France	9
Tableau 5 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique à l'éthanol consécutifs à une exposition par inhalation ou par voie cutanée (revue bibliographique)	12
Tableau 6 : Evaluation des teneurs atmosphériques en éthanol au niveau des voies respiratoires lors de l'utilisation de produits hydro-alcooliques (revue bibliographique).....	15
Tableau 7 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique à l'éthanol consécutifs à l'utilisation de produits hydro-alcooliques (revue bibliographique)	16
Tableau 8 : Evaluation de la part de l'absorption cutanée dans l'exposition systémique à l'éthanol suite à une exposition par voie cutanée (revue bibliographique)	17
Tableau 9 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique à l'isopropanol suite à une exposition par voie cutanée (revue bibliographique)	27
Tableau 10 : Evaluation des niveaux d'exposition systémique au n-propanol suite à une exposition par voie cutanée (revue bibliographique).....	33
Tableau 11 : Données de toxicité aiguë de l'éthanol (revue bibliographique)	38
Tableau 12 : Données de toxicité aiguë de l'isopropanol (revue bibliographique)	40
Tableau 13 : Données de toxicité aiguë du n-propanol (revue bibliographique)	42
Tableau 14 : Valeurs de DL ₅₀ /CL ₅₀ de l'éthanol, isopropanol et n-propanol	44
Tableau 15 : Valeurs de NOAEL/LOAEL de l'éthanol, isopropanol et n-propanol.....	52
Tableau 16 : Etudes des dommages primaires à l'ADN induits par l'éthanol (revue bibliographique)	95
Tableau 17 : Essais de mutation génique <i>in vitro</i> sur cellules de mammifère avec l'éthanol (revue bibliographique)	97
Tableau 18 : Essais d'aberrations chromosomiques avec l'éthanol (revue bibliographique).....	97
Tableau 19 : Tests du MN avec l'éthanol (revue bibliographique)	99
Tableau 20 : Données sur les matières premières utilisées pour formuler les produits d'essai	112
Tableau 21 : Eléments de référence pour les analyses des alcools par CPG.....	114
Tableau 22 : Conditions chromatographiques utilisées pour le dosage des alcools.....	115
Tableau 23 : Produits d'essai testés en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué	120
Tableau 24 : Résumé des conditions expérimentales et données d'interprétation des essais d'irritation <i>in vitro</i>	124
Tableau 25 : Résumé des conditions expérimentales et données d'interprétation des essais de phototoxicité	134
Tableau 26 : Mutations présentées par les différentes souches de <i>S. typhimurium</i> utilisées pour le test d'Ames.....	136
Tableau 27 : Composition de 1 mL de S9 mix (test d'Ames)	137
Tableau 28 : Témoins négatifs et positifs pour les différentes souches de <i>S. typhimurium</i> dans le test d'Ames.....	139
Tableau 29 : Résumé des conditions expérimentales et données d'interprétation du test d'Ames..	142

Tableau 30 : Composition de 1 mL de S9 mix (test du micronoyau).....	147
Tableau 31 : Traitements et doses d’essai pour le test du micronoyau – administration en immersion	149
Tableau 32 : Traitements et doses d’essai pour le test du micronoyau sur TK6 en co-culture	151
Tableau 33 : Traitements par vapeurs d’alcool des cellules NCI H292 cultivées en IAL pour le test du micronoyau.....	157
Tableau 34 : Témoins négatifs et positifs utilisés pour les tests du micronoyau.....	158
Tableau 35 : Résumé des conditions expérimentales et données d’interprétation du test du micronoyau.....	164
Tableau 36 : Traitements et doses d’essai pour le test des comètes	167
Tableau 37 : Témoins négatifs et positifs utilisés pour les tests des comètes.....	168
Tableau 38 : Résumé des conditions expérimentales et données d’interprétation du test des comètes	172
Tableau 39 : Concentrations en alcool dans les produits d’essai pour le test d’irritation cutanée <i>in vitro</i> sur EpiSkin™ SM	175
Tableau 40 : Test d'irritation cutanée <i>in vitro</i> sur EpiSkin™ SM - traitement par deux qualités différentes de n-propanol	179
Tableau 41 : Profils de volatilité de l’éthanol, isopropanol et n-propanol	179
Tableau 42 : Test d’irritation cutanée <i>in vitro</i> sur EpiSkin™ SM – traitement en conditions occlusives par des solutions d’alcool à 60 ou 85% p/p.	180
Tableau 43 : Concentrations en alcool dans les SHA d’essai pour le test d’irritation cutanée <i>in vitro</i> sur EpiSkin™ SM.....	184
Tableau 44 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l’essai préliminaire de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 avec les 4 co-formulants	191
Tableau 45 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l’essai préliminaire de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 avec le mélange CoF ₁₀	193
Tableau 46 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l’essai définitif de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 avec le mélange CoF ₁₀	195
Tableau 47 : Doses d’alcool (µg/mL) dans l’essai de phototoxicité <i>in vitro</i> (traitement à 1%).....	198
Tableau 48 : Données des témoins solvants et du témoin positif de l’essai définitif de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 avec les solutions hydro-alcooliques	199
Tableau 49 : Viabilité moyenne relative des cultures irradiées (Irr+) comparativement aux cultures non irradiées (Irr-) dans l’essai de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 avec les solutions hydro-alcooliques.....	200
Tableau 50 : Doses d’alcool utilisées (mg/boîte) dans le test d’Ames.....	202
Tableau 51 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de <i>S. typhimurium</i> exposées à l’éthanol	203
Tableau 52 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de <i>S. typhimurium</i> exposées à l’isopropanol.....	204
Tableau 53 : Essai complémentaire partiel de mutation réverse sur la souche TA1537 de <i>S. typhimurium</i> exposée à l’isopropanol.....	205
Tableau 54 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de <i>S. typhimurium</i> exposées au n- propanol	206

Tableau 55 : Essai préliminaire de toxicité avec le mélange CoF ₁₀ vis-à-vis des 5 souches de <i>S. typhimurium</i> pour l'essai de mutation reverse	208
Tableau 56 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de <i>S. typhimurium</i> exposées à des solutions du mélange CoF ₁₀	209
Tableau 57 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de <i>S. typhimurium</i> exposées à des solutions hydro-alcooliques à base d'éthanol.....	211
Tableau 58 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de <i>S. typhimurium</i> exposées à des solutions hydro-alcooliques à base d'isopropanol.....	212
Tableau 59 : Essai de mutation réverse sur bactéries sur 5 souches de <i>S. typhimurium</i> exposées à des solutions hydro-alcooliques à base de n-propanol	213
Tableau 60 : Concentrations d'alcool (µL/mL, mg/mL ou mM) administrées dans le test du micronoyau.....	216
Tableau 61 : Données compilées des deux lectures du test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à l'éthanol en présence de système d'activation métabolique	219
Tableau 62 : Doses d'alcool administrées dans le test du micronoyau sur cellules TK6 en co-culture avec EpiSkin TM SM	222
Tableau 63 : Données compilées des deux lectures du test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 exposées à l'éthanol	224
Tableau 64 : Doses d'alcool administrées dans le test des comètes	244
Tableau 65 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules TK6 exposées à des solutions d'éthanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p	246
Tableau 66 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'éthanol - essai en absence d'activation métabolique.....	248
Tableau 67 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'isopropanol – essai en absence d'activation métabolique	249
Tableau 68 : Test des comètes en conditions alcalines (pH>13) sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs de n-propanol - essai en absence d'activation métabolique	250
Tableau 69 : Concentrations sanguines médianes maximales d'éthanol et d'acétaldéhyde après 20 traitements hygiéniques ou 10 désinfections chirurgicales des mains (Kramer <i>et al.</i> 2007)	309
Tableau 70 : Concentrations sanguines médianes maximales d'isopropanol et d'acétone dans différentes situations d'emploi de produits contenant de l'isopropanol (Below <i>et al.</i> 2012).....	315
Tableau 71 : Concentrations sanguines médianes maximales de n-propanol et propionaldéhyde dans différentes situations d'emploi de produits contenant du n-propanol (Below <i>et al.</i> 2012).....	319
Tableau 72 : Médiateurs de l'inflammation étudiés sur une culture cellulaire de NCI H292 après traitement par l'éthanol, l'isopropanol ou le n-propanol.....	354

Liste des figures

Figure 1 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol	21
Figure 2 : Métabolisme et élimination de l'isopropanol (INRS 2016b)	28
Figure 3 : Métabolisme oxydatif du n-propanol.....	35
Figure 4 : Histologie comparée des modèles d'épiderme humain reconstitué EpiSkin™ SM et VitroDerm, comparativement à l'épiderme humain <i>in vivo</i>	119
Figure 5 : Schéma récapitulatif du test d'irritation <i>in vitro</i> sur épiderme humain reconstitué	122
Figure 6 : Schéma récapitulatif du test de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3	132
Figure 7 : Schéma du test d'Ames en présence d'activation métabolique	140
Figure 8 : Représentation schématique de la formation d'un micronoyau	143
Figure 9 : Représentation schématique de la culture en interface air-liquide	146
Figure 10 : Schéma du modèle de co-culture utilisé pour le test du micronoyau sur cellules TK6	150
Figure 11 : Photos de l'équipement VITROCELL utilisé pour les traitements par vapeurs d'alcool....	152
Figure 12 : Equipement VITROCELL (A) Représentation schématique du module de traitement et circuits associés, (B) Représentation du flux de l'atmosphère d'essai au sein du module.....	153
Figure 13 : Séquences d'utilisation des PHA en situations de soins, d'après la publication d'Hautemanière <i>et al.</i> (2013)	156
Figure 14 : Schémas récapitulatifs du test du micronoyau : (A) traitement en immersion dans le milieu de culture, avec activation métabolique (B) essai en co-culture, avec activation métabolique	162
Figure 15 : Grandes catégories de cellules lors du test des comètes.....	165
Figure 16 : Schéma récapitulatif du test des comètes	171
Figure 17 : Test d'irritation cutanée <i>in vitro</i> sur EpiSkin™ SM - traitement par des solutions d'éthanol, d'isopropanol ou de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p	176
Figure 18 : Test d'irritation cutanée <i>in vitro</i> sur EpiSkin™ SM - traitement par des solutions d'éthanol, d'isopropanol ou de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p	177
Figure 19 : Chromatogrammes des différentes sources d'alcool utilisées, analysées par CPG.....	178
Figure 20 : Test d'irritation cutanée <i>in vitro</i> sur VitroDerm - traitement par du n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p	181
Figure 21 : Irritation cutanée <i>in vitro</i> sur Episkin™ SM - traitement par le mélange CoF ₁₀	183
Figure 22 : Irritation cutanée <i>in vitro</i> sur Episkin™ SM - traitement par des solutions hydro-alcooliques à base de 60, 70, 80 et 85 % p/p d'éthanol, isopropanol ou n-propanol	185
Figure 23 : Test d'irritation cutanée <i>in vitro</i> sur VitroDerm - traitement par des solutions hydro-alcooliques à base de n-propanol à 60, 70, 80 et 85% p/p	186
Figure 24 : Spectres d'absorption UV/VIS des alcools et matières premières (MP1, MP2, MP3 & MP4)	188
Figure 25 : Essai préliminaire de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 – traitement par les co-formulants MP1, MP2, MP3 et MP4	192
Figure 26 : Essai préliminaire de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 - traitement par le mélange CoF ₁₀	194
Figure 27 : Essai définitif de phototoxicité <i>in vitro</i> sur cellules BALB/c 3T3 - traitement par le mélange CoF ₁₀	196
Figure 28 : Concentrations atmosphériques (moyennes et écart-type) en vapeurs d'alcool lors des essais dans le système VITROCELL	216
Figure 29 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à l'éthanol.....	218

Figure 30 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à l'éthanol en présence de système d'activation métabolique (2 ^{ème} essai indépendant).....	220
Figure 31 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à l'éthanol en présence de système d'activation métabolique (3 ^{ème} essai indépendant).....	221
Figure 32 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 en co-culture avec des épidermes humains reconstitués traités par des solutions d'éthanol.....	222
Figure 33 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 exposées à l'éthanol.....	223
Figure 34 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 exposées à l'éthanol (traitement long sans activation métabolique)	225
Figure 35 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'éthanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p	226
Figure 36 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à l'isopropanol	228
Figure 37 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 exposées à l'isopropanol.....	229
Figure 38 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'alcool générées à partir de solutions d'isopropanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p	230
Figure 39 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées au n-propanol	232
Figure 40 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 exposées au n-propanol	233
Figure 41 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules NCI H292 en IAL exposées à des vapeurs d'alcool générées à partir de solutions de n-propanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p.....	234
Figure 42 : Essai préliminaire de cytotoxicité sur cellules TK6 après traitement par le mélange CoF ₁₀	237
Figure 43 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées au mélange CoF ₁₀	238
Figure 44 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à des solutions hydro-alcooliques sur base éthanol.....	240
Figure 45 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à des solutions hydro-alcooliques sur base isopropanol	241
Figure 46 : Test du micronoyau <i>in vitro</i> sur cellules TK6 exposées à des solutions hydro-alcooliques sur base n-propanol	242
Figure 47 : Approche méthodologique proposée en cas de résultats positifs ou équivoques obtenus dans un premier essai d'irritation cutanée <i>in vitro</i> selon l'OCDE N° 439.....	266
Figure 48 : Résultats d'enregistrement en continu de l'exposition à l'éthanol lors de frictions des mains avec deux produits hydro-alcooliques (AFSSET 2010).....	302
Figure 49 : Représentation schématisée du modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) pour l'éthanol inhalé proposé par Pastino <i>et al.</i> 1997.....	306
Figure 50 Chromatogramme (GC FID) du n-propanol additivé à 0,1% p/p des 5 impuretés de poids moléculaire supérieur décrites dans la monographie de la pharmacopée européenne.....	351
Figure 51 Modèle graphique de la PCR en temps réel (d'après Poitras & Houde 2002)	353
Figure 52 Principe de la technologie Taqman en qPCR : hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) d'après Poitras & Houde 2002	359
Figure 53 : Effet de l'éthanol, isopropanol et n-propanol sur la transcription de gènes de marqueurs de l'inflammation par les cellules H292	363
Figure 54 : Effet de l'éthanol, isopropanol et n-propanol sur la sécrétion de médiateurs de l'inflammation par les cellules H292	364

Références bibliographiques

- Adamski, H., P. Amblard, F. Aubin & J.-C. Beani (2008) Photodermatologie : Photobiologie cutanée, photoprotection, et photothérapie 2.
- AFSSAPS (2011) Rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé relatif à l'innocuité des produits hydro-alcooliques (PHA) à base d'éthanol utilisés pour la désinfection des mains à peau saine par le grand public dans le cadre de l'épidémie de la grippe A (H1N1) AFSSAPS - Mars 2011.
- AFSSET (2010) Avis de l'agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail relatif à «l'évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle ». Anses Éditions: octobre 2010.
- Ahmad, N. & H. Mukhtar (2004) Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases. *J Invest Dermatol*, 123, 417-25.
- Ahmed-Lecheheb, D., L. Cunat, P. Hartemann & A. Hautemaniere (2012) Dermal and pulmonary absorption of ethanol from alcohol-based hand rub. *J Hosp Infect*, 81, 31-5.
- Al-Awadhi, A., I. A. Wasfi, F. Al Reyami & Z. Al-Hatali (2004) Autobrewing revisited: endogenous concentrations of blood ethanol in residents of the United Arab Emirates. *Sci Justice*, 44, 149-52.
- Al-Otaibi, S. T. & H. A. M. Alqahtani (2015) Management of contact dermatitis. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, 19, 86-91.
- Amacher, D. E., S. C. Paillet, G. N. Turner, V. A. Ray & D. S. Salsburg (1980) Point mutations at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells. II. Test validation and interpretation. *Mutat Res*, 72, 447-74.
- Ames, B. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*, ed. A. Hollander, 267-282. New York: Plenum Press.
- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki & F. D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 2281-5.
- Ames, B. N., J. McCann & E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res*, 31, 347-64.
- Anderson, D., T. W. Yu & D. B. McGregor (1998) Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13, 539-55.
- Anon (1998) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxic potential). *ATLA* 26, 7-8.
- ANSES (2014) Proposition de valeurs guides de qualité d'air intérieur. L'acétaldéhyde. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Anses Éditions : mai 2014
- Arimoto, S., N. Nakano, Y. Ohara, K. Tanaka & H. Hayatsu (1982) A solvent effect on the mutagenicity of tryptophan-pyrollysate mutagens in the Salmonella/mammalian microsome assay. *Mutat Res*, 102, 105-12.
- Arndt, T., S. Schrofel, B. Gussregen & K. Stemmerich (2014) Inhalation but not transdermal resorption of hand sanitizer ethanol causes positive ethyl glucuronide findings in urine. *Forensic Sci Int*, 237, 126-30.
- Arndt, T., R. Beyreiss, W. Hartmann, S. Schrofel & K. Stemmerich (2016) Excessive urinary excretion of isopropyl glucuronide after isopropanol abuse. *Forensic Sci Int*, 266, 250-3.
- Badr, F. M. & R. S. Badr (1975) Induction of dominant lethal mutation in male mice by ethyl alcohol. *Nature*, 253, 134-6.
- Badr, F. M., R. S. Badr, R. L. Asker & F. H. Hussain (1977) Evaluation of the mutagenic effects of ethyl alcohol by different techniques. *Adv Exp Med Biol*, 85A, 25-46.
- Bagley, D. M., J. R. Gardner, G. Holland, R. W. Lewis, J. F. Regnier, D. A. Stringer & A. P. Walker (1996) Skin irritation: Reference chemicals data bank. *Toxicol In Vitro*, 10, 1-6.

- Balansky, R. M., P. M. Blagoeva, Z. I. Mircheva & S. de Flora (1993) Coclastogenicity of ethanol with cigarette smoke in rat erythroblasts and anticlastogenicity in alveolar macrophages. *Cancer Lett*, 72, 183-9.
- Baraona, E., M. Guerra & C. S. Lieber (1981) Cytogenetic damage of bone marrow cells produced by chronic alcohol consumption. *Life Sci*, 29, 1797-802.
- Bartsch, W., G. Spöner, K. Dietmann & G. Fuchs (1976) Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1,2-propanediol and Tween 20. *Arzneimittelforschung*, 26, 1581-3.
- Basketter, D. A., M. York, J. P. McFadden & M. K. Robinson (2004) Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis*, 51, 1-4.
- Bauer, E., R. D. Recknagel, U. Fiedler, L. Wollweber, C. Bock & K. O. Greulich (1998) The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutat Res*, 398, 101-10.
- Beauge, F., M. Clement, J. Nordmann & R. Nordmann (1979) Comparative effects of ethanol, n-propranol and isopropanol on lipid disposal by rat liver. *Chem Biol Interact*, 26, 155-66.
- Below, H., I. Partecke, N. O. Huebner, N. Bieber, T. Nicolai, A. Usche, O. Assadian, E. Below, G. Kampf, W. Parzefall, C. D. Heidecke, D. Zuba, V. Bessonneau, T. Kohlmann & A. Kramer (2012) Dermal and pulmonary absorption of propan-1-ol and propan-2-ol from hand rubs. *Am J Infect Control*, 40, 250-7.
- Berardesca, E. & F. Distanto (1994) The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis*, 31, 281-7.
- Berryman, S. H., R. A. Anderson, Jr., J. Weis & A. Bartke (1992) Evaluation of the co-mutagenicity of ethanol and delta 9-tetrahydrocannabinol with Trenimon. *Mutat Res*, 278, 47-60.
- Beskitt, J. L. & J. D. Sun (1997) *In Vitro* Skin Penetration Characteristics of Ethanol in the Rabbit, Mouse, Rat, and Human. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 16, 61-75.
- Bessonneau, V. & O. Thomas (2012) Assessment of exposure to alcohol vapor from alcohol-based hand rubs. *Int J Environ Res Public Health*, 9, 868-79.
- Bevan, R. J., R. J. Slack, P. Holmes & L. S. Levy (2009) An assessment of potential cancer risk following occupational exposure to ethanol. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 12, 188-205.
- Bingham, E., B. Cöhrssen & C. H. Powell. 2001. *Patty's toxicology*. New York: Wiley.
- Blasiak, J., A. Trzeciak, E. Malecka-Panas, J. Drzewoski & M. Wojewodzka (2000) *In vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol In Vitro*, 14, 287-95.
- Blevins, R. D. & M. S. Shelton (1983) Response of *Salmonella typhimurium* mutants to 3D9-THC and in conjunction with known mutagens. *J. Environ. Sci. Health*, A18, 413-443.
- Blevins, R. D. & D. E. Taylor (1982) Mutagenicity screening of 25 cosmetic ingredients with the salmonella/microsome test. *J. Environ. Sci. Health*, A17, 217-239.
- Boatman, R. J., L. G. Perry, L. A. Fiorica, J. C. English, R. W. Kapp, Jr., C. Bevan, T. R. Tyler, M. I. Banton & G. A. Wright (1998) Dermal absorption and pharmacokinetics of isopropanol in the male and female F-344 rat. *Drug Metab Dispos*, 26, 197-202.
- Boffetta, P. & M. Hashibe (2006) Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*, 7, 149-56.
- Borenfreund, E. & J. A. Puerner (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24, 119-24.
- Borish, L. C. & J. W. Steinke (2003) 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 111, S460-75.
- Bourrain, J. (2010) Phototoxicité, photoallergie : diagnostic et prise en charge. http://allergo.lyon.inserm.fr/MEDICAMENTS/7-6_photoallergies.pdf Consulté en ligne le 6 décembre 2015.
- Boyce, J. M. & D. Pittet (2002) Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Am J Infect Control*, 30, S1-46

- Brayer, C., P. Micheau, C. Bony, L. Tauzin, H. Pilorget, S. Samperiz & J. L. Alessandri (2004) [Neonatal accidental burn by isopropyl alcohol]. *Arch Pediatr*, 11, 932-5.
- Brown, N. M., Z. Trizna & S. Pathak (1992) Clastogenic interactions between lobeline sulfate and ethyl alcohol: a cytogenetic study. *Anticancer Res*, 12, 1467-9.
- Brown, T. L., S. Gamon, P. Tester, R. Martin, K. Hosking, G. C. Bowkett, D. Gerostamoulos & M. L. Grayson (2007) Can alcohol-based hand-rub solutions cause you to lose your driver's license? Comparative cutaneous absorption of various alcohols. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1107-8.
- Brugnone, F., L. Perbellini, P. Apostoli, M. Bellomi & D. Caretta (1983) Isopropanol exposure: environmental and biological monitoring in a printing works. *Br J Ind Med*, 40, 160-8.
- Brusick, D., M. Aardema, L. Kier, D. Kirkland & G. Williams (2016) Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid. *Crit Rev Toxicol*, 46, 56-74.
- Brydon, E. W., H. Smith & C. Sweet (2003) Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCI-H292) cells limits pro-inflammatory cytokine release. *J Gen Virol*, 84, 2389-400.
- Burim, R. V., R. Canalle, C. S. Takahashi, D. C. Tavares, L. Martinelli Ad Ade & E. T. Sakamoto-Hojo (2004) Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics. *Mutat Res*, 560, 187-98.
- Burleigh-Flayer, H., R. Garman, D. Neptun, C. Bevan, T. Gardiner, R. Kapp, T. Tyler & G. Wright (1997) Isopropanol vapor inhalation oncogenicity study in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 36, 95-111.
- Burleigh-Flayer, H. D., M. W. Gill, D. E. Strother, L. W. Masten, R. H. McKee, T. R. Tyler & T. Gardiner (1994) Isopropanol 13-week vapor inhalation study in rats and mice with neurotoxicity evaluation in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 23, 421-8.
- Burlinson, B., R. R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S. Y. Brendler-Schwaab, A. R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T. S. Kumaravel, M. Nakajima, Y. F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez & A. Hartmann (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res*, 627, 31-5.
- Campbell, L. & H. K. Wilson (1986) Blood alcohol concentrations following the inhalation of ethanol vapour under controlled conditions. *J Forensic Sci Soc*, 26, 129-35.
- Chaubey, R. C., B. R. Kavi, P. S. Chauhan & K. Sundaram (1977) Evaluation of the effect of ethanol on the frequency of micronuclei in the bone marrow of swiss mice. *Mutat Res*, 43, 441-4.
- Chauhan, P. S., M. Aravindakshan, N. S. Kumar & K. Sundaram (1980) Failure of ethanol to induce dominant lethal mutations in Wistar male rats. *Mutat Res*, 79, 263-75.
- Chu, I., R. Poon, V. Valli, A. Yagminas, W. J. Bowers, R. Seegal & R. Vincent (2005) Effects of an ethanol-gasoline mixture: results of a 4-week inhalation study in rats. *J Appl Toxicol*, 25, 193-9.
- Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26, 249-61.
- Collins, A. R. (2009) Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*, 681, 24-32.
- Cotruvo, J. A., V. F. Simmon & R. J. Spangord (1978) Investigation of mutagenic effects of products of ozonation reactions in water. *Ann N Y Acad Sci*, 298, 124-140.
- Courcot, E., J. Leclerc, J. J. Lafitte, E. Mensier, S. Jaillard, P. Gosset, P. Shirali, N. Pottier, F. Broly & J. M. Lo-Guidice (2012) Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with *in vivo* expression profiles. *Drug Metab Dispos*, 40, 1953-65.
- Cozens, A. L., M. J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W. E. Finkbeiner, J. H. Widdicombe & D. C. Gruenert (1994) CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10, 38-47.

- Crespi, C. L., F. J. Gonzalez, D. T. Steimel, T. R. Turner, H. V. Gelboin, B. W. Penman & R. Langenbach (1991) A metabolically competent human cell line expressing five cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes: application to mutagenicity testing. *Chem Res Toxicol*, 4, 566-72.
- da Costa, E. S. L. D., L. C. Rodrigues, V. R. Dos Santos, M. da Costa Allgayer, A. de Barros Falcao Ferraz, H. C. Rolla, P. Pereira & J. N. Picada (2014) Evaluation of mutagenic and genotoxic activities of lobeline and its modulation on genomic instability induced by ethanol. *Life Sci*, 103, 73-8.
- Darroudi, F. & A. T. Natarajan (1987) Induction of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in CHO cells by mutagenic metabolites activated by plant microsomal extracts. *Biol. Zent.bl*, 106, 169-174.
- De Flora, S., A. Camoirano, P. Zancchi & C. Bennicelli (1984b) Mutagenicity testing with TA97 and TA102 of 30 DNA-damaging compounds, negative with other Salmonella strains. *Mutat Res*, 134, 159-65.
- De Flora, S., P. Zancchi, A. Camoirano, C. Bennicelli & G. S. Badolati (1984a) Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat Res*, 133, 161-98.
- De Oliveira, N. C., M. S. Sarmiento, E. A. Nunes, C. M. Porto, D. P. Rosa, S. R. Bona, G. Rodrigues, N. P. Marroni, P. Pereira, J. N. Picada, A. B. Ferraz, F. V. Thiesen & J. Da Silva (2012) Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food Chem Toxicol*, 50, 1208-14.
- Deleo, V. A. (2004) Photocontact dermatitis. *Dermatol Ther*, 17, 279-88.
- Descotes, J. (1988) Identification of Contact Allergens: The Mouse Ear Sensitization Assay. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*, 7, 263-272.
- Di Luzio, N. R. & T. E. Stege (1979) Influence of chronic ethanol vapor inhalation on hepatic parenchymal and Kupffer cell function. *Alcohol Clin Exp Res*, 3, 240-7.
- Dumas-Campagna, J., S. Haddad & G. Charest-Tardif (2014b) Predictions of Blood Ethanol Levels Resulting From Occupational Use of Hydro Alcoholic Solutions and Ethanol-Based Varnishes. *J Environ Anal Toxicol* 5, 260.
- Dumas-Campagna, J., R. Tardif, G. Charest-Tardif & S. Haddad (2014) Ethanol toxicokinetics resulting from inhalation exposure in human volunteers and toxicokinetic modeling. *Inhal Toxicol*, 26, 59-69.
- Dutch Expert Committee on Occupational Standards (2006) Evaluation of the health effects from occupational exposure. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2006; publication no. 2006/06OSH. ISBN 90-5549-601-4
- EC. 2006. Regulation No 1907/2006 of the European Parliament and the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and Repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396 of 30122006, (2006), pp. 1-849
- ECB (2008) Propan-1-ol. European Union Risk Assessment Report - part II Human Health. *European Chemicals Bureau* 82, 104-226.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Healthcare-associated infections acquired in intensive care units - Annual Epidemiological Report 2016 [2014 data] <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-acquired-intensive-care-units-annual>
- ECETOC (1998) Technical Report N° 48 (2) Eye Irritation: Reference Chemicals Data Bank (Second Edition)
- ECETOC (1999) Technical Report N° 77 : Skin and Respiratory Sensitisers: Reference Chemicals Data Bank.
- ECHA (2017a) Reach registration dossier of Propan-1-ol. Helsinki, Finland: European Chemical Agency (ECHA). (first published 04/03/2011, last modified 23/04/2017) (web site consulted on 05/06/2017) Available from: <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/14586/7/7/2>
- ECHA (2017b) Reach registration dossier of Ethanol. Helsinki, Finland: European Chemical Agency (ECHA). (first published 08/12/2014, last modified 29/05/2017) (web site consulted on 17/09/2017) Available from: <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/6310/7/6/2>

- EFSA (2011) Scientific opinion of the scientific committee on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal* 2011;9 (9):2379
- EFSA (2012) EFSA Panel on Plant Protection Products (PPR), Guidance on Dermal Absorption. *EFSA Journal* 2012;10(4):2665.
- Ellahuene, M. F., L. P. Perez-Alzola & M. I. Olmedo (2012) Chronic ethanol consumption in mice does not induce DNA damage in somatic or germ cells, evaluated by the bone marrow micronucleous assay and the dominant lethal mutation assay. *Biol Res*, 45, 27-31.
- English, J. S. (2004) Current concepts of irritant contact dermatitis. *Occup Environ Med*, 61, 722-6, 674.
- Epstein, J. H. (1983) Phototoxicity and photoallergy in man. *J Am Acad Dermatol*, 8, 141-7.
- EU. (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (Text with EEA relevance), pp. 26-35 OJ L 066 of 11032003.
- EU. (2008) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 (Text with EEA relevance) pp. 1-1355 OJ L 353 of 31122008.
- EU. (2009) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance), pp. 59-209 OJ L 342 of 22122009.
- EU. (2012) Regulation No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 Concerning the Making Available on the Market and Use of Biocidal Products (Text with EEA Relevance), pp. 1-123 OJ L 167 of 22052012.
- EU. (2013) Commission Regulation No 283/2013 Setting Out the Data Requirements for Active Substances, in Accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market, pp. 1-84 OJ L 93 of 01032013.
- EU B.13/14 (2008) Mutagenicity: mutation reverse assay on bacteria. Council Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Official Journal of the European Union*, 51.
- EU. B.41. (2008) *IN VITRO* 3T3 NRU PHOTOTOXICITY TEST. Council Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Official Journal of the European Union*, 51.
- Fahelbum, I. M. & S. P. James (1979) Absorption, distribution and metabolism of propyl anthranilate. *Toxicology*, 12, 75-87.
- Faller, C., M. Bracher, N. Dami & R. Roguet (2002) Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol In Vitro*, 16, 557-72.
- Farooqi, Z., F. Darroudi & A. T. Natarajan (1993) The use of fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, 8, 329-34.
- Feghali, C. A. & T. M. Wright (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2, d12-26.
- Fenech, M. (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res*, 404, 155-65.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res*, 455, 81-95.
- Fenech, M., W. P. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi & E. Zeiger (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 534, 65-75.
- Fenech, M. & A. A. Morley (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*, 147, 29-36.

- Ferko, A. P. & E. Bobyock (1979) Rates of ethanol disappearance from blood and hypothermia following acute and prolonged ethanol inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 50, 417-27.
- Flamm, W. G. & L. D. Lehman-McKeeman (1991) The human relevance of the renal tumor-inducing potential of d-limonene in male rats: implications for risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*, 13, 70-86.
- Florin, I., L. Rutberg, M. Curvall & C. R. Enzell (1980) Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. *Toxicology*, 15, 219-232.
- Fluhr, J. W., K. R. Feingold & P. M. Elias (2006) Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent *in vivo* and *ex vivo* models. *Exp Dermatol*, 15, 483-92.
- Friedrich, U. & G. Nass (1983) Evaluation of a mutation test using S49 mouse lymphoma cells and monitoring simultaneously the induction of dexamethasone resistance, 6-thioguanine resistance and ouabain resistance. *Mutat Res*, 110, 147-62.
- Frohlich, E., G. Bonstingl, A. Hofler, C. Meindl, G. Leitinger, T. R. Pieber & E. Roblegg (2013) Comparison of two *in vitro* systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicol In Vitro*, 27, 409-17.
- Gad, S. C., B. J. Dunn, D. W. Dobbs, C. Reilly & R. D. Walsh (1986) Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol Appl Pharmacol*, 84, 93-114.
- Garcia-Gavin, J., R. Lissens, A. Timmermans & A. Goossens (2011) Allergic contact dermatitis caused by isopropyl alcohol: a missed allergen? *Contact Dermatitis*, 65, 101-6.
- Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt & et al. (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res*, 312, 217-33.
- Gonzalez, E. & S. Gonzalez (1996) Drug photosensitivity, idiopathic photodermatoses, and sunscreens. *J Am Acad Dermatol*, 35, 871-85; quiz 886-7.
- Gould, D. (2003) Occupational Irritant Contact Dermatitis in Healthcare Workers - Meeting the Challenge of Prevention. *Business briefing: european pharmacotherapy* 2003.
- Gould, J. W., M. G. Mercurio & C. A. Elmets (1995) Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *J Am Acad Dermatol*, 33, 551-73; quiz 574-6.
- Gouille, J. P. & M. Guerbet (2015) [Pharmacokinetics, metabolism, and analytical methods of ethanol]. *Ann Pharm Fr*, 73, 313-22.
- Greim, H. & U. Reuter (2001) Classification of carcinogenic chemicals in the work area by the German MAK Commission: current examples for the new categories. *Toxicology*, 166, 11-23.
- Griffith, J. F., G. A. Nixon, R. D. Bruce, P. J. Reer & E. A. Bannan (1980) Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. *Toxicol Appl Pharmacol*, 55, 501-13.
- Guillot, J. P., J. F. Gonnet, C. Clement, L. Caillard & R. Truhaut (1982) Evaluation of the ocular-irritation potential of 56 compounds. *Food Chem Toxicol*, 20, 573-82.
- Gummer, C. L. & H. I. Maibach (1986) The penetration of [14C]ethanol and [14C]methanol through excised guinea-pig skin *in vitro*. *Food Chem Toxicol*, 24, 305-9.
- Guo, L., J. Y. Yang & C. F. Wu (2008) Oxidative DNA damage induced by ethanol in mouse peripheral leucocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103, 222-7.
- Haddock, N. F. & J. K. Wilkin (1982) Cutaneous reactions to lower aliphatic alcohols before and during disulfiram therapy. *Arch Dermatol*, 118, 157-9.
- Halioua, B., L. Bensefa-Colas, B. Bouquiaux, M. N. Crepy, H. Assier, S. Billon & O. Chosidow (2012) Occupational contact dermatitis in 10,582 French patients reported between 2004 and 2007: a descriptive study. *Dermatology*, 225, 354-63.
- Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud & R. R. Tice (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18, 45-51.

- Hautemaniere, A., D. Ahmed-Lecheheb, L. Cunat & P. Hartemann (2013a) Assessment of transpulmonary absorption of ethanol from alcohol-based hand rub. *Am J Infect Control*, 41, e15-9.
- Hautemaniere, A., L. Cunat, D. Ahmed-Lecheheb, F. Hajjard, F. Gerardin, Y. Morele & P. Hartemann (2013b) Assessment of exposure to ethanol vapors released during use of Alcohol-Based Hand Rubs by healthcare workers. *J Infect Public Health*, 6, 16-26.
- Hayes, S., A. Gordon, I. Sadowski & C. Hayes (1984) RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay. *Mutat Res*, 130, 97-106.
- Hellmer, L. & G. Bolcsfoldi (1992) An evaluation of the E. coli K-12 uvrB/recA DNA repair host-mediated assay. I. *In vitro* sensitivity of the bacteria to 61 compounds. *Mutat Res*, 272, 145-60.
- Henrotin, Y., G. Deby-Dupont & J. Y. Reginster (2001) [Biochemical mediators of inflammation]. *Rev Med Liege*, 56, 433-42.
- Hewitt, N. J., R. J. Edwards, E. Fritsche, C. Goebel, P. Aeby, J. Scheel, K. Reisinger, G. Ouedraogo, D. Duche, J. Eilstein, A. Latil, J. Kenny, C. Moore, J. Kuehnl, J. Barroso, R. Fautz & S. Pfuhler (2013) Use of human *in vitro* skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Toxicol Sci*, 133, 209-17.
- Hillbom, M. E., K. Franssila & O. A. Forsander (1974) Effects of chronic ingestion of some lower aliphatic alcohols in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 9, 177-80.
- Holmberg, B., T. Kronevi, A. Ekner, Arbetarskyddsstyrelsen, S. Swedish National Board of Occupational & Health. 1986. Subchronic toxicity investigation of ethyl alcohol : a test for lowest effective dose (LED) to be used in long-term bioassay for carcinogenicity. Solna [Sweden]: *Arbetarskyddsstyrelsen*.
- Houben, E., K. De Paepe & V. Rogiers (2006) Skin condition associated with intensive use of alcoholic gels for hand disinfection: a combination of biophysical and sensorial data. *Contact Dermatitis*, 54, 261-7.
- Hsu, T. C., C. Furlong & M. R. Spitz (1991) Ethyl alcohol as a cocarcinogen with special reference to the aerodigestive tract: a cytogenetic study. *Anticancer Res*, 11, 1097-101.
- Hu, T., Z. S. Khambatta, P. J. Hayden, J. Bolmarcich, R. L. Binder, M. K. Robinson, G. J. Carr, J. P. Tiesman, B. B. Jarrold, R. Osborne, T. D. Reichling, S. T. Nemeth & M. J. Aardema (2010) Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDerm *in vitro* 3D human epidermis model compared to human skin. *Toxicol In Vitro*, 24, 1450-63.
- Huynh-Delerme, C., C. Artigou, L. Bodin, R. Tardif, G. Charest-Tardif, C. Verdier, N. Sater, M. Ould-Elhkim & C. Desmares (2012) Short Communication: Is Ethanol-Based Hand Sanitizer Involved in Acute Pancreatitis after Excessive Disinfection?-An Evaluation with the Use of PBPK Model. *J Toxicol*, 2012, 959070.
- IARC (1988) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 44 Alcohol Drinking. *World Health Organization: Lyon, France*.
- IARC (2007) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 96 Alcohol consumption and ethyl carbamate. *World Health Organization: Lyon, France*.
- IARC (2012) Personal Habits and Indoor Combustions. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Volume 100E, Consumption of alcoholic beverages (p 373-499). *World Health Organization: Lyon, France*.
- ICH (2012) International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH S2 R1: Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. . *ICH Geneva (Switzerland); 2012*.
- INRS (2012) Fiche toxicologique FT 0. *INRS Paris*, 29p.
- INRS (2016a) Fiche Toxicologique – Ethanol : FT 48. *INRS Paris*, 9p.
- INRS (2016b) Fiche Toxicologique – Propan-2-ol : FT 66. *INRS Paris*, 10p.
- INRS (2016c) Fiche Toxicologique – Propan-1-ol : FT 211. *INRS Paris*, 8p.
- INRS (2016d) ED 984 Aide-mémoire technique - Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France. *INRS Paris*, 32 p.

- INRS (2016e) Fiche Toxicologique – Aldéhyde Acétique : FT 120. *INRS* Paris, 8p.
- Irvine, L. F. (2003) Relevance of the developmental toxicity of ethanol in the occupational setting: a review. *J Appl Toxicol*, 23, 289-99.
- ISO/TC 194. 2014. ISO 10993-3:2014, Biological evaluation of medical devices -- Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity.
- Iwashita, J., T. Yamamoto, Y. Sasaki & T. Abe (2010) MUC5AC production is downregulated in NCI-H292 lung cancer cells cultured on type-IV collagen. *Mol Cell Biochem*, 337, 65-75.
- Izzotti, A., R. M. Balansky, P. M. Blagoeva, Z. I. Mircheva, L. Tulimiero, C. Cartiglia & S. De Flora (1998) DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *FASEB J*, 12, 753-8.
- Jacobs, G. A. & M. A. Martens (1992) OECD Skin Irritation Tests on Three Alcohols. *International Journal of Toxicology*, 11, 733.
- James, D. A. & D. M. Smith (1982) Analysis of results from a collaborative study of the dominant lethal assay. *Mutat Res*, 97, 303-14.
- Jensen, O. (1981) Contact allergy to propylene oxide and isopropyl alcohol in a skin disinfectant swab. *Contact Dermatitis*, 7, 148-50.
- Jirova, D., D. Basketter, M. Liebsch, H. Bendova, K. Kejlova, M. Marriott & H. Kandarova (2010) Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis*, 62, 109-16.
- Kampf, G. & M. Muscatiello (2003) Dermal tolerance of Sterillium, a propanol-based hand rub. *J Hosp Infect*, 55, 295-8.
- Kampf, G., M. Muscatiello, D. Hantschel & M. Rudolf (2002) Dermal tolerance and effect on skin hydration of a new ethanol-based hand gel. *J Hosp Infect*, 52, 297-301.
- Kao, J. (1988) Estimating the contribution by skin to systemic metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 548, 90-6.
- Kao, J. & M. P. Carver (1991) Skin metabolism. in *Dermatotoxicology*, Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. (eds), Hemisphere Publishing Corporation, New York, pp. 143-200
- Kapp, R. W., Jr., D. J. Marino, T. H. Gardiner, L. W. Masten, R. H. McKee, T. R. Tyler, J. L. Ivett & R. R. Young (1993) *In vitro* and *in vivo* assays of isopropanol for mutagenicity. *Environ Mol Mutagen*, 22, 93-100.
- Kapp, R. W., Jr., C. Bevan, T. H. Gardiner, M. I. Banton, T. R. Tyler & G. A. Wright (1996) Isopropanol: summary of TSCA test rule studies and relevance to hazard identification. *Regul Toxicol Pharmacol*, 23, 183-92.
- Kayani, M. A. & J. M. Parry (2010) The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol In Vitro*, 24, 56-60.
- Kido, R., I. Sato & S. Tsuda (2006) Detection of *in vivo* DNA damage induced by ethanol in multiple organs of pregnant mice using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *J Vet Med Sci*, 68, 41-7.
- Kilford, J., D. Thorne, R. Payne, A. Dalrymple, J. Clements, C. Meredith & D. Dillon (2014) A method for assessment of the genotoxicity of mainstream cigarette-smoke by use of the bacterial reverse-mutation assay and an aerosol-based exposure system. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 769, 20-8.
- Kim, K., H. Park & K. M. Lim (2015) Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicol Res*, 31, 97-104.
- Kim, S., C. Lewis & J. A. Nadel (2011) CCL20/CCR6 feedback exaggerates epidermal growth factor receptor-dependent MUC5AC mucin production in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *J Immunol*, 186, 3392-400.
- Kim, Y. D., E. J. Kwon, D. W. Park, S. Y. Song, S. K. Yoon & S. H. Baek (2002) Interleukin-1beta induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol Pharmacol*, 62, 1112-8.
- Kimura, E. T., D. M. Ebert & P. W. Dodge (1971) Acute toxicity and limits of solvent residue for sixteen organic solvents. *Toxicol Appl Pharmacol*, 19, 699-704.

- Kinnula, S., T. Tapiainen, M. Renko & M. Uhari (2009) Safety of alcohol hand gel use among children and personnel at a child day care center. *Am J Infect Control*, 37, 318-21.
- Kirkland, D. J., R. R. Marshall, S. McEnaney, J. Bidgood, A. Rutter & S. Mullineux (1989) Aroclor-1254-induced rat-liver S9 causes chromosomal aberrations in CHO cells but not human lymphocytes: a role for active oxygen? *Mutat Res*, 214, 115-22.
- Kirschner, M. H., R. A. Lang, B. Breuer, M. Breuer, C. S. Gronover, T. Zwingers, J. G. Bottrich, A. Arndt, U. Brauer, M. Hintzpetter, M. A. Burmeister & J. D. Fauteck (2009) Transdermal resorption of an ethanol- and 2-propanol-containing skin disinfectant. *Langenbecks Arch Surg*, 394, 151-7.
- Klassen, R. W. & T. V. Persaud (1976) Experimental studies on the influence of male alcoholism on pregnancy and progeny. *Exp Pathol (Jena)*, 12, 38-45.
- Klaude, M., S. Eriksson, J. Nygren & G. Ahnstrom (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*, 363, 89-96.
- Konigstein, M., M. Larisch & G. Obe (1984) Mutagenicity of antiepileptic drugs. I. Carbamazepine and some of its metabolites. *Mutat Res*, 139, 83-6.
- Korte, A., R. Slacik-Erben & G. Obe (1979) The influence of ethanol treatment of cytogenetic effects in bone marrow cells of Chinese hamsters by cyclophosphamide, aflatoxin B1 and patulin. *Toxicology*, 12, 53-61.
- Korte, A., H. M. Wagner & G. Obe (1981a) Simultaneous exposure of Chinese hamsters to ethanol and cigarette smoke: cytogenetic aspects. *Toxicology*, 20, 237-46.
- Korte, A., Obe, G., Ingwersen, I. and Ruckert, G. (1981b) Influence of chronic ethanol uptake and acute acetaldehyde treatment on the chromosomes of bone-marrow cells and peripheral lymphocytes of Chinese hamsters. *Mutat. Res.*, 88, 389-395.
- Kownatzki, E. (2003) Hand hygiene and skin health. *J Hosp Infect*, 55, 239-45.
- Kramer, A., H. Below, N. Bieber, G. Kampf, C. D. Toma, N. O. Huebner & O. Assadian (2007) Quantity of ethanol absorption after excessive hand disinfection using three commercially available hand rubs is minimal and below toxic levels for humans. *BMC Infect Dis*, 7, 117.
- Kramer, A., T. Bernig & G. Kampf (2002) Clinical double-blind trial on the dermal tolerance and user acceptability of six alcohol-based hand disinfectants for hygienic hand disinfection. *J Hosp Infect*, 51, 114-20.
- Kruhoffer, P. W. (1983) Handling of inspired vaporized ethanol in the airways and lungs (with comments on forensic aspects). *Forensic Sci Int*, 21, 1-17.
- Kwak, S., E. Brief, D. Langlais, N. Kitson, M. Lafleur & J. Thewalt (2012) Ethanol perturbs lipid organization in models of *stratum corneum* membranes: An investigation combining differential scanning calorimetry, infrared and (2)H NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1818, 1410-9.
- Lachenmeier, D. W. (2008) Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *J Occup Med Toxicol*, 3, 26.
- Laham, S., M. Potvin, K. Schrader & I. Marino (1980) Studies on inhalation toxicity of 2-propanol. *Drug Chem Toxicol*, 3, 343-60.
- Lalko, J., D. Isola & A. M. Api (2004) Ethanol and diethyl phthalate: vehicle effects in the local lymph node assay. *Int J Toxicol*, 23, 171-7.
- Lamarche, F., B. Gonthier, N. Signorini, H. Eysseric & L. Barret (2003) Acute exposure of cultured neurones to ethanol results in reversible DNA single-strand breaks; whereas chronic exposure causes loss of cell viability. *Alcohol Alcohol*, 38, 550-8.
- Lang, R. A., D. Egli-Gany, F. H. Brill, J. G. Bottrich, M. Breuer, B. Breuer & M. H. Kirschner (2011) Transdermal absorption of ethanol- and 1-propanol-containing hand disinfectants. *Langenbecks Arch Surg*, 396, 1055-60.
- Larson, E., R. Girard, C. L. Pessoa-Silva, J. Boyce, L. Donaldson & D. Pittet (2006) Skin reactions related to hand hygiene and selection of hand hygiene products. *Am J Infect Control*, 34, 627-35.

- Lau, C. F., R. Vogel, G. Obe & H. Spielmann (1991) Embryologic and cytogenetic effects of ethanol on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Reprod Toxicol*, 5, 405-10.
- Lee, Y., S. E. Dizzell, V. Leung, A. Nazli, M. A. Zahoor, R. N. Fichorova & C. Kaushic (2016) Effects of Female Sex Hormones on Susceptibility to HSV-2 in Vaginal Cells Grown in Air-Liquid Interface. *Viruses*, 8.
- Lehman, A. J. & H. F. Chase (1944) The acute and chronic toxicity of isopropyl alcohol. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 29 (6), 561-567.
- Lester, D. & L. A. Greenberg (1951) The inhalation of ethyl alcohol by man. I. Industrial hygiene and medicolegal aspects. II. Individuals treated with tetraethylthiuram disulfide. *Q J Stud Alcohol*, 12, 168-78.
- Levin, D. E., M. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers & B. N. Ames (1982) A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 7445-9.
- Lewin, G. A., P. R. Oppenheimer & W. A. Wingert Coma from alcohol sponging. *Journal of the American College of Emergency Physicians*, 6, 165-167.
- Lieber, C. S., E. Baraona, M. A. Leo & A. Garro (1987) International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper No. 15/2. Metabolism and metabolic effects of ethanol, including interaction with drugs, carcinogens and nutrition. *Mutat Res*, 186, 201-33.
- Liebich, H. M., H. J. Buelow & R. Kallmayer (1982) Quantification of endogenous aliphatic alcohols in serum and urine. *J Chromatogr*, 239, 343-9.
- Lin, Y. C., I. C. Ho & T. C. Lee (1989) Ethanol and acetaldehyde potentiate the clastogenicity of ultraviolet light, methyl methanesulfonate, mitomycin C and bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*, 216, 93-9.
- Löffler, H., G. Kampf, D. Schmermund & H. I. Maibach (2007) How irritant is alcohol? *British Journal of Dermatology*, 157, 74-81.
- Lubbe, J., C. Ruffieux, G. van Melle & D. Perrenoud (2001) Irritancy of the skin disinfectant n-propanol. *Contact Dermatitis*, 45, 226-31.
- Ludwig, E. & B. M. Hausen (1977) Sensitivity to isopropyl alcohol. *Contact Dermatitis*, 3, 240-4.
- Luu-The, V., D. Duche, C. Ferraris, J. R. Meunier, J. Leclaire & F. Labrie (2009) Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models Episkin and full thickness model from Episkin. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 116, 178-86.
- Machemer, L. & D. Lorke (1975) Experiences with the dominant lethal test in female mice: effects of alkylating agents and artificial sweeteners on pre-ovulatory oocyte stages. *Mutat Res*, 29, 209-14.
- Maffei, F., C. Fimognari, E. Castelli, G. F. Stefanini, G. C. Forti & P. Hrelia (2000) Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis*, 15, 517-23.
- Maffei, F., G. C. Forti, E. Castelli, G. F. Stefanini, S. Mattioli & P. Hrelia (2002) Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res*, 514, 49-58.
- Mahon, G. A. T., B. Middleton, W. D. Robinson, M. H. L. Green, I. d. G. Mitchell & D. J. Tweats (1989) Analysis of data from microbial colony assays. In Kirkland, D. J. (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Cambridge University Press, Cambridge, Part III*, 26-65.
- Maickel, R. P. & J. F. Nash, Jr. (1985) Differing effects of short-chain alcohols on body temperature and coordinated muscular activity in mice. *Neuropharmacology*, 24, 83-9.
- Manche, M., B. Foligne, M. Sauty, A. Platel, E. Vercauteren, G. Rauwel, S. Catoire, H. Ficheux, J. Criquelion & F. Nessler (2017) Comparative assessment of local tolerance of alcohols commonly used in alcohol-based hand rubs for hand hygiene. *Toxicol In Vitro*, 44, 142-153.
- Mankes, R. F., R. LeFevre, K. F. Benitz, I. Rosenblum, H. Bates, A. I. Walker, R. Abraham & W. Rockwood (1982) Paternal effects of ethanol in the long-evans rat. *J Toxicol Environ Health*, 10, 871-8.

- Maron, D. M. & B. N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 113, 173-215.
- Martinez, T. T., R. W. Jaeger, F. J. deCastro, M. W. Thompson & M. F. Hamilton (1986) A comparison of the absorption and metabolism of isopropyl alcohol by oral, dermal and inhalation routes. *Vet Hum Toxicol*, 28, 233-6.
- Marzulli, F. N., D. W. Brown & H. I. Maibach (1969) Techniques for studying skin penetration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 14, 76-83.
- Marzulli, F. N. & D. I. Ruggles (1973) Rabbit eye irritation test: collaborative study. *Journal of the AOAC*, 56, 905-914.
- Mathias, C. G. & H. I. Maibach (1978) Dermatotoxicology monographs I. Cutaneous irritation: factors influencing the response to irritants. *Clin Toxicol*, 13, 333-46.
- Mayol, K, C. F., Davoust-Nataf, N., 2013. Les médiateurs de l'inflammation. ed. w. a. f. <http://accres.ens-lyon.fr/accres/ressources/immunité-et-vaccination/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire/les-médiateurs-de-l2019inflammation>.
- Merhi, M., C. Y. Dombu, A. Brient, J. Chang, A. Platel, F. Le Curieux, D. Marzin, F. Nesslany & D. Betbeder (2012) Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for *in vitro* endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *Int J Pharm*, 423, 37-44.
- Meyer, B., W. Matthies, J. E. Nicholson & M. V. Shelanski (2010) Skin compatibility of two ethanol based virucidal hand disinfectants. *International Journal of Infection Control*, 6.
- Miller, B. M., H. F. Zitzelsberger, H. U. Weier & I. D. Adler (1991) Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- Miller, M. A., A. Rosin, M. E. Levsky, M. M. Patel, T. J. Gregory & C. S. Crystal (2006) Does the clinical use of ethanol-based hand sanitizer elevate blood alcohol levels? A prospective study. *Am J Emerg Med*, 24, 815-7.
- Morgan, R. L., S. S. Sorenson & T. R. Castles (1987) Prediction of ocular irritation by corneal pachymetry. *Food Chem Toxicol*, 25, 609-13.
- Morris, E. M., J. D. Sun, S. W. Frantz, J. L. Beskitt, C. Bevan, T. Gardiner, R. Kapp, T. R. Tyler & G. Wright. 1995. *In vitro* penetration of isopropanol (IPA) through rat, mouse and human skin. In *Society of Toxicology - 34th Annual Meeting*. The toxicologist.
- Morris, N. L., J. A. Ippolito, B. J. Curtis, M. M. Chen, S. L. Friedman, I. N. Hines, G. E. Haddad, S. L. Chang, L. A. Brown, T. J. Waldschmidt, P. Mandrekar, E. J. Kovacs & M. A. Choudhry (2015) Alcohol and inflammatory responses: summary of the 2013 Alcohol and Immunology Research Interest Group (AIRIG) meeting. *Alcohol*, 49, 1-6.
- Moser, V. C. & R. L. Balster (1985) Acute motor and lethal effects of inhaled toluene, 1,1,1-trichloroethane, halothane, and ethanol in mice: effects of exposure duration. *Toxicol Appl Pharmacol*, 77, 285-91.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Nadeau, V., D. Lamoureux, A. Beuter, M. Charbonneau & R. Tardif (2003) Neuromotor effects of acute ethanol inhalation exposure in humans: a preliminary study. *J Occup Health*, 45, 215-22.
- Natowicz, M., J. Donahue, L. Gorman, M. Kane, J. McKissick & L. Shaw (1985) Pharmacokinetic analysis of a case of isopropanol intoxication. *Clin Chem*, 31, 326-8.
- Nelson, B. K., W. S. Brightwell, B. J. Taylor, A. Khan, J. R. Burg, E. F. Krieg, Jr. & V. J. Massari (1989) Behavioral teratology investigation of 1-propanol administered by inhalation to rats. *Neurotoxicol Teratol*, 11, 153-9.
- Nelson, K. W., J. F. Ege, Jr., M. Ross, L. E. Woodman & L. Silverman (1943) Sensory response to certain industrial solvent vapors. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*, 25, 282-285.
- Nesslany, F. (2017) The current limitations of *in vitro* genotoxicity testing and their relevance to the *in vivo* situation. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 609-615.

- Netzlaff, F., C. M. Lehr, P. W. Wertz & U. F. Schaefer (2005) The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*, 60, 167-78.
- Netzlaff, F., M. Kaca, U. Bock, E. Haltner-Ukomadu, P. Meiers, C. M. Lehr & U. F. Schaefer (2007) Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations. *Eur J Pharm Biopharm*, 66, 127-34.
- Newland, N. & A. Richter (2008) Agents associated with lung inflammation induce similar responses in NCI-H292 lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro*, 22, 1782-8.
- Nixon, G. A., C. A. Tyson & W. C. Wertz (1975) Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicol Appl Pharmacol*, 31, 481-90.
- Obe, G. & D. Anderson (1987) International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper No. 15/1. Genetic effects of ethanol. *Mutat Res*, 186, 177-200.
- OECD (1981) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 101: UV-VIS Absorption Spectra. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, adopted 12 May 1981.
- OECD (1994) SIDS 2-PROPANOL. *UNEP PUBLICATIONS*.
- OECD (1997) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, adopted 21 July 1997
- OECD (2004a) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, adopted 13 April 2004
- OECD (2004b) SIDS Initial Assessment Report for SIAM 19. Ethanol. *UNEP PUBLICATIONS*.
- OECD (2004c) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 428: Skin absorption: *In vitro* method. . *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, adopted 13 April 2004.
- OECD (2015a) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 28 July 2015.
- OECD (2015b) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 28 July 2015.
- OECD (2015c) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 5 February 2015.
- OECD (2015d) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 442D: *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 5 February 2015.
- OECD (2016a). OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- OECD (2016b) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 473: *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- OECD (2016c) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- OECD (2016d) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- OECD (2016e) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 476: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpvt genes. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.

- OECD (2016f) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 478: Rodent Dominant Lethal Test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- OECD (2016g) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- OECD (2016h) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- OECD (2016i) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 490: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris*, Adopted 29 July 2016.
- Oesch, F., E. Fabian, B. Oesch-Bartlomowicz, C. Werner & R. Landsiedel (2007) Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab Rev*, 39, 659-98.
- Olive, P. L., J. P. Banath & R. E. Durand (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*, 122, 86-94.
- Ophaswongse, S. & H. I. Maibach. (1995) Alcohol dermatitis: Allergic contact dermatitis and contact urticaria syndrome Contact Dermatitis, 30(1), 1-6. *Journal of Safety Research*, 26, 61.
- Ostling, O. & K. J. Johanson (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123, 291-8.
- Ouédraogo, G., F. Nesslany, S. Simar, S. Talahari, D. Lagache, E. Vercauteren, L. Nakab, A. Mayoux, B. Faquet & N. Flamand. 2014. Predictive Method Development: Challenges for Cosmetics and Genotoxicity as a Case Study. *In Predictive Toxicology*, 241-278. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Oyanagi, T., T. Takizawa, A. Aizawa, O. Solongo, H. Yagi, Y. Nishida, H. Koyama, A. Saitoh & H. Arakawa (2017) Suppression of MUC5AC expression in human bronchial epithelial cells by interferon-gamma. *Allergol Int*, 66, 75-82.
- Pastino, G. M., B. Asgharian, K. Roberts, M. A. Medinsky & J. A. Bond (1997) A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 145, 147-57.
- Pendlington, R. U., E. Whittle, J. A. Robinson & D. Howes (2001) Fate of ethanol topically applied to skin. *Food Chem Toxicol*, 39, 169-74.
- Perkins, M. A., R. Osborne, F. R. Rana, A. Ghassemi & M. K. Robinson (1999) Comparison of *in vitro* and *in vivo* human skin responses to consumer products and ingredients with a range of irritancy potential. *Toxicol Sci*, 48, 218-29.
- Persoz, C., S. Achard, C. Leleu, I. Momas & N. Seta (2010) An *in vitro* model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol Lett*, 195, 99-105.
- Petkovits, T., G. Bohn & B. Brinkmann (1989) [Forensic medicine and toxicologic aspects of 2-propanol poisoning]. *Z Rechtsmed*, 102, 69-75.
- Phillips, B. J. & P. Jenkinson (2001) Is ethanol genotoxic? A review of the published data. *Mutagenesis*, 16, 91-101.
- Phillips, L., 2nd, M. Steinberg, H. I. Maibach & W. A. Akers (1972) A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicol Appl Pharmacol*, 21, 369-82.
- Pilegaard, K. & O. Ladefoged (1993) Toxic effects in rats of twelve weeks' dosing of 2-propanol, and neurotoxicity measured by densitometric measurements of glial fibrillary acidic protein in the dorsal hippocampus. *In Vivo*, 7, 325-30.
- Ponec, M. (1992) *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int J Cosmet Sci*, 14, 245-64.
- Pool-Zobel, B. L., I. Dornacher, R. Lambertz, M. Knoll & H. K. Seitz (2004) Genetic damage and repair in human rectal cells for biomonitoring: sex differences, effects of alcohol exposure, and susceptibilities in comparison to peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res*, 551, 127-34.

- Prin, L. H., E. Hennache, B. Bonnotte, B. Dubucquoi, S. Abbal, M. Faure, G. (2012) Réaction inflammatoire : aspects biologiques et cliniques, conduite à tenir. ed. a. f. <http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/page22/page22.html>.
- Poitras, E. & A. Houde (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotech.*, Vol.2, No 2, , pp.2-11.
- Poumay, Y., F. Dupont, S. Marcoux, M. Leclercq-Smekens, M. Herin & A. Coquette (2004) A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies. *Arch Dermatol Res*, 296, 203-11.
- Puschel, K. (1981) Percutaneous alcohol intoxication. *Eur J Pediatr*, 136, 317-8.
- Puschel, K. & T. Matzsch (1981) [Alcohol intoxication of children (author's transl)]. *Z Rechtsmed*, 86, 269-76.
- Randall, C. L., T. A. Burling, E. A. Lochry & P. B. Sutker (1982) The effect of paternal alcohol consumption on fetal development in mice. *Drug Alcohol Depend*, 9, 89-95.
- Scarino, A., R. Tardif & M. Charbonneau (2009) Influence of ALDH2 polymorphism on ethanol kinetics and pulmonary effects in male and female rats exposed to ethanol vapors. *Inhal Toxicol*, 21, 193-9.
- SCCS. (2010) Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. *In SCCS/1358/10 adopted 22 June 2010*.
- SCCS. 2016. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 9th revision, 29 September 2015, . In *SCCS/1564/15, revision of 25 April 2016*.
- Scheuplein, R. J. & I. H. Blank (1973) Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids. *J Invest Dermatol*, 60, 286-96.
- Schlouch, E. & R. Tardif (1999) Modélisation toxicocinétique de l'exposition à l'éthanol. *Université de Montréal. Présenté à Santé Canada*, 1-35.
- Schmook, F. P., J. G. Meingassner & A. Billich (2001) Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm*, 215, 51-6.
- Schuler, M., D. S. Rupa & D. A. Eastmond (1997) A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage *in vitro*. *Mutat Res*, 392, 81-95.
- Scott, R. C., M. A. Corrigan, F. Smith & H. Mason (1991) The Influence of Skin Structure on Permeability: An Intersite and Interspecies Comparison with Hydrophilic Penetrants. *J Investig Dermatol*, 96, 921-925.
- Seeber, A., M. Blaszkewicz, E. Kiesswetter, T. Bandel, K. Golka, P. Heitmann, R. R. Vangala & H. M. Bolt (1994) Biomonitoring, Leistung und Befinden bei inhalativer Ethanolexposition *Transactions of the German Soc, for Occ. & Env. Med. 34th annual meeting in Weisbaden, May 1994*.
- Senz, E. H. & D. L. Goldfarb (1958) Coma in a child following use of isopropyl alcohol in sponging. *J Pediatr*, 53, 322-3.
- Shimizu, H., Y. Suzuki, N. Takemura, S. Goto & H. Matsushita (1985) The results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Sangyo Igaku*, 27, 400-19.
- Singh, N. P., H. Lai & A. Khan (1995) Ethanol-induced single-strand DNA breaks in rat brain cells. *Mutat Res*, 345, 191-6.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice & E. L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175, 184-91.
- Smyth, H. F., Jr. & C. P. Carpenter (1948) Further experience with the range finding test in the industrial toxicology laboratory. *J Ind Hyg Toxicol*, 30, 63-8.
- Smyth, H. F., Jr., C. P. Carpenter, C. S. Weil & U. C. Pozzani (1954) Range-finding toxicity data: list V. *AMA Arch Ind Hyg Occup Med*, 10, 61-8.

- Spielmann, H., M. Balls, J. Dupuis, W. J. Pape, G. Pechovitch, O. de Silva, H. G. Holzhutter, R. Clothier, P. Desolle, F. Gerberick, M. Liebsch, W. W. Lovell, T. Maurer, U. Pfannenbecker, J. M. Potthast, M. Csato, D. Sladowski, W. Steiling & P. Brantom (1998) The International EU/COLIPA *In Vitro* Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Toxicol In Vitro*, 12, 305-27.
- Spielmann, H., W. W. Lovell, E. Hölzle, B. E. Johnson, T. Maurer, M. A. Miranda, W. J. W. Pape, O. H. Sapora & D. Sladowski (1994) *In vitro* phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA* 22, , 314-348.
- Spielmann, H., M. Liebsch, W. J. Pape, M. Balls, J. Dupuis, G. Klecak, W. W. Lovell, T. Maurer, O. De Silva & W. Steiling (1995) EEC/COLIPA in vitro photoirritancy program: results of the first stage of validation. *Curr Probl Dermatol*, 23, 256-64.
- Stotts, J. & W. J. Ely (1977) Induction of human skin sensitization to ethanol. *J Invest Dermatol*, 69, 219-22.
- SUETENS C., 2011. Surveillance et prévention des infections nosocomiales, 10 ans du Raisin, *Actes du colloque Raisin*, InVS, 27 avril 2011, page 6
- Tang, T., R. Gminski, M. Konczol, C. Modest, B. Armbruster & V. Mersch-Sundermann (2012) Investigations on cytotoxic and genotoxic effects of laser printer emissions in human epithelial A549 lung cells using an air/liquid exposure system. *Environ Mol Mutagen*, 53, 125-35.
- Tardif, R., L. Liu & M. Raizenne (2004) Exhaled ethanol and acetaldehyde in human subjects exposed to low levels of ethanol. *Inhal Toxicol*, 16, 203-7.
- Tates, A. D., N. de Vogel & I. Neuteboom (1980) Cytogenetic effects in hepatocytes, bone-marrow cells and blood lymphocytes of rats exposed to ethanol in the drinking water. *Mutat Res*, 79, 285-8.
- Tavares, D. C., A. O. Cecchi, A. A. Jordao, Jr., H. Vannucchi & C. S. Takahashi (2001) Cytogenetic study of chronic ethanol consumption in rats. *Teratog Carcinog Mutagen*, 21, 361-8.
- Teramoto, K., S. Horiguchi, M. Adachi, F. Wakitani & M. Fukui (1987) 2-propanol and acetone elimination via exhaled air after 2-propanol administration to rats. *Osaka City Med J*, 33, 153-60.
- Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu & Y. F. Sasaki (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-21.
- Turner, P., B. Saeed & M. C. Kelsey (2004) Dermal absorption of isopropyl alcohol from a commercial hand rub: implications for its use in hand decontamination. *J Hosp Infect*, 56, 287-90.
- UN (2013) United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) *Fourth revised edition*, UN New York and Geneva.
- Van de Sandt, J., R. Roguet, C. Cohen, D. Esdaile, M. Ponc, E. Corsini, C. Barker, N. Fusenig, M. Liebsch, D. Benford, B. de Fraissinette Ade & M. Fartasch (1999) The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *Altern Lab Anim*, 27, 723-43.
- Van Eijl, S., Z. Zhu, J. Cupitt, M. Gierula, C. Gotz, E. Fritsche & R. J. Edwards (2012) Elucidation of xenobiotic metabolism pathways in human skin and human skin models by proteomic profiling. *PLoS One*, 7, e41721.
- Vasdev, S. C., R. N. Chakravarti, D. Subrahmanyam, A. C. Jain & P. L. Wahi (1975) Myocardial lesions induced by prolonged alcohol feeding in rhesus monkeys. *Cardiovasc Res*, 9, 134-40.
- VICH (2002) International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Approval of Veterinary Medicinal Products (VICH); final guidance for industry on "studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: genotoxicity testing" (VICH GL23); availability. Notice. *Fed Regist*, 67, 602-3.
- von der Hude, W., M. Scheutwinkel, U. Gramlich, B. Fissler & A. Basler (1987) Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. *Environ Mutagen*, 9, 401-10.
- Vujevich, J. & M. Zirwas (2007) Delayed hypersensitivity to isopropyl alcohol. *Contact Dermatitis*, 56, 287.
- Vujasinović, M., M. Kočar, K. Kramer, M. Bunc & M. Brvar (2007) Poisoning with 1-propanol and 2-propanol. *Human & Experimental Toxicology*, 26, 975-978.

Références bibliographiques

- Wakabayashi, T., K. Adachi & J. Popinigis (1991) Effects of alkyl alcohols and related chemicals on rat liver structure and function. I. Induction of two distinct types of megamitochondria. *Acta Pathol Jpn*, 41, 405-13.
- Wangenheim, J. & G. Bolcsfoldi (1988) Mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds. *Mutagenesis*, 3, 193-205.
- Warner, R. R., K. J. Stone & Y. L. Boissy (2003) Hydration disrupts human *stratum corneum* ultrastructure. *J Invest Dermatol*, 120, 275-84.
- Welss, T., D. A. Basketter & K. R. Schroder (2004) *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro*, 18, 231-43.
- Wiegand, C., N. J. Hewitt, H. F. Merk & K. Reisinger (2014) Dermal xenobiotic metabolism: a comparison between native human skin, four *in vitro* skin test systems and a liver system. *Skin Pharmacol Physiol*, 27, 263-75.
- WHO (1990a) International Programme on Chemical Safety - Environmental Health Criteria N°103. 2-Propanol ISBN 92 4 157103 9. *World Health Organisation, Geneva, Switzerland*
- WHO (1990b) International Programme on Chemical Safety - Environmental Health Criteria N°102. 1-Propanol ISBN 92 4 157102 0. *World Health Organisation, Geneva, Switzerland*
- WHO (2009) WHO guidelines on hand hygiene in health care - First global patient safety challenge Clean care is safer care. ISBN 978 92 4 159790 6. *World Health Organisation, Geneva, Switzerland.*
- Wilkin, J. K. & G. Fortner (1985) Cutaneous vascular sensitivity to lower aliphatic alcohols and aldehydes in Orientals. *Alcohol Clin Exp Res*, 9, 522-5.
- Wilkin, J. K. & J. H. Stewart (1987) Substrate specificity of human cutaneous alcohol dehydrogenase and erythema provoked by lower aliphatic alcohols. *J Invest Dermatol*, 88, 452-4.
- Yamamoto, N., K. Miyamoto & M. Katoh (2010) [Development of alternative to animal experiment in evaluation of skin irritation caused by alcohol-based hand rubs]. *Yakugaku Zasshi*, 130, 1069-73.
- Youssef, A., K. Madkour, C. Cox & B. Weiss (1992) Comparative lethality of methanol, ethanol and mixtures in female rats. *J Appl Toxicol*, 12, 193-7.
- Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor & K. Mortelmans (1992) Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, 19 Suppl 21, 2-141.

Annexes

Annexe 1 : Etudes évaluant l'exposition aux alcools liée à l'utilisation des produits hydro-alcooliques par les professionnels de santé

1. ETHANOL

Plusieurs études ont déterminé les taux d'éthanol atmosphérique liés à l'utilisation des produits hydro-alcooliques et/ou les expositions systémiques, par dosages sanguins et/ou urinaires ou encore par mesure des concentrations d'éthanol dans l'air expiré.

1.1. Evaluation des niveaux d'exposition des voies respiratoires lors de l'utilisation des produits hydro-alcooliques

Dans le cadre de l'évaluation des risques liés à l'utilisation des produits hydro-alcooliques (PHA) par les professionnels de santé (AFSSET 2010, AFSSAPS 2011), une mesure d'exposition aux COV a été réalisée à proximité des voies respiratoires d'une infirmière effectuant 2 frictions hygiéniques d'une durée de 1 à 1,5 min dans un local peu ventilé (Fig. 48). Les mesures ont été faites à l'aide d'un PID (détecteur par photo-ionisation). La première friction a été réalisée avec 3 mL d'un PHA contenant 80% v/v d'éthanol (Manugel 85 – Laboratoires ANIOS). La seconde friction a été réalisée dans les mêmes conditions avec 3 mL d'alcool modifié à 60°.

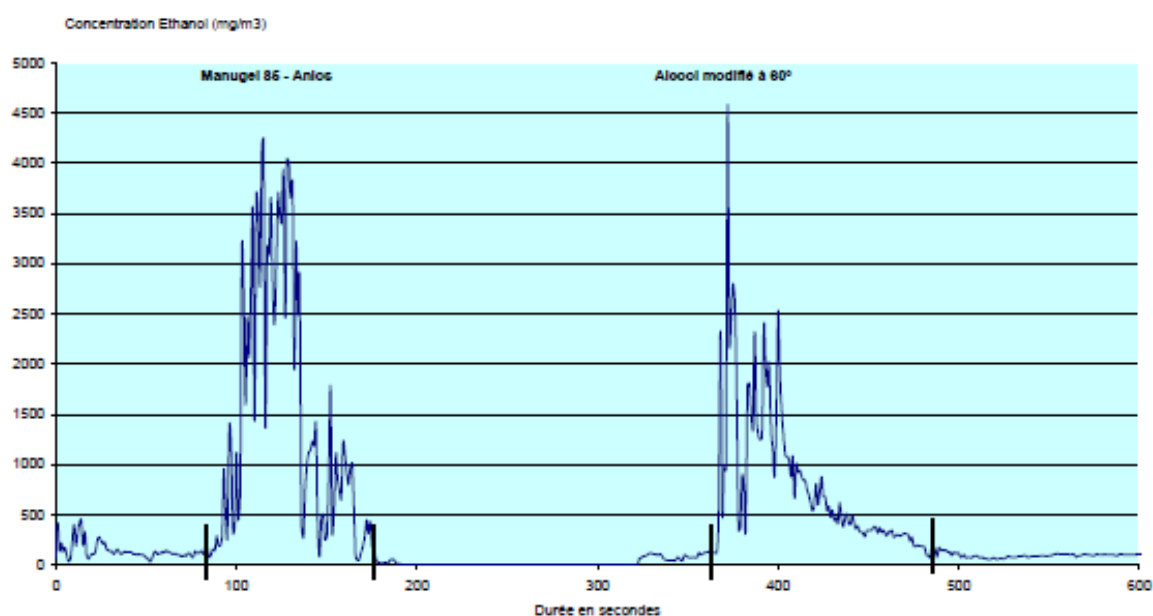


Figure 48 : Résultats d'enregistrement en continu de l'exposition à l'éthanol lors de frictions des mains avec deux produits hydro-alcooliques (AFSSET 2010)

Dans les deux cas, la teneur maximale en éthanol atmosphérique a atteint 4000 mg/m³ avec une exposition moyenne pondérée sur la durée de l'exposition correspondant à 1350 mg/m³ dans le cas du gel hydroalcoolique (durée de 100 secondes) et à 805 mg/m³ pour la friction

avec l'alcool modifié à 60° (durée de 120 secondes). Cinq minutes après l'arrêt de la friction, la teneur en éthanol dans l'atmosphère de la salle était en moyenne de 30 mg/m³. Cette valeur pourrait représenter la pollution ambiante résultant d'une utilisation régulière de PHA. (AFSSET 2010, AFSSAPS 2011).

Bessonneau & Thomas (2012) ont évalué la dose inhalée d'alcool durant la pratique de traitement hygiénique (3 mL - 30 secondes) et désinfection chirurgicale des mains (2x3mL – 2x45 secondes) chez un groupe de 5 volontaires. Deux produits différents ont été utilisés (ANIOGEL 85 NPC – Laboratoires ANIOS - à base de 70 % p/p d'éthanol – ci-après PHA1 et Germflash® à base de 56 % p/p d'éthanol et 9 % p/p d'isopropanol – ci-après PHA2) dans un local avec un taux de 12 renouvellements d'air par heure. Des prélèvements d'air ont été effectués au niveau des voies respiratoires toutes les 10 secondes durant 50 secondes pour le traitement hygiénique et 110 secondes pour la désinfection chirurgicale. Les kits de prélèvement contenaient un mélange de dichromate de potassium (K₂Cr₂O₇) et d'acide sulfurique (H₂SO₄), permettant le dosage indirect de l'éthanol par lecture UV-vis spectrophotométrique de la réduction des ions dichromate en présence d'alcool.

Durant le traitement hygiénique des mains, les concentrations moyennes équivalent éthanol ont atteint leur maximum 20 à 30 secondes après le début de la friction, avec des valeurs moyennes maximales comparables, de 14,3 ± 1,4 mg/L pour le PHA1 et 13,2 ± 0,7 mg/L pour le PHA2. 20 secondes après la fin de la procédure de désinfection, les concentrations étaient redevenues nulles.

Durant la friction chirurgicale des mains, deux pics ont été retrouvés à 40 et 80 secondes pour les deux produits d'essai. Les concentrations moyennes les plus élevées étaient de 20,2 ± 0,9 mg/L équivalent éthanol pour le PHA1 et 18,1 ± 0,9 mg/L pour le PHA2. 10 secondes après la fin de la procédure, les concentrations étaient quasiment redevenues nulles.

Hautemanière *et al.* (2013b) ont également déterminé le taux d'éthanol atmosphérique à hauteur des voies respiratoires chez 12 volontaires (6 hommes et 6 femmes) lors de 4 situations différentes d'hygiène des mains. Le produit d'essai était à base de 70 % p/p d'éthanol (ANIOGEL 85 NPC – Laboratoires ANIOS). La durée d'une friction était de ± 30 secondes dans les protocoles 1 à 3 (représentatives du traitement hygiénique), et de ± 60 secondes dans le protocole 4 (représentatif de la désinfection chirurgicale).

Annexe 1 : Etudes évaluant l'exposition aux alcools liée à l'utilisation des produits hydro-alcooliques par les professionnels de santé

1)	<u>Désinfection hygiénique des mains pour un soin de type consultation</u> [Exposition à 6 mL en 1 minute sur une période de 11 minutes] x10	2 frictions (F) de 3 mL espacées de 10 min (une friction à l'entrée et une friction en sortie de chambre) F1 – 10 min – F2
2)	<u>Désinfection hygiénique pour un soin de type pose d'une perfusion ou prélèvement sanguin</u> [Exposition à 9 mL en 1,5 minutes sur une période de 9,5 minutes] x 10	1 ^{ère} friction de 3 mL (entrée dans la chambre), 2 ^{ème} friction de 3 mL 5 min plus tard (après préparation du matériel pour le soin), puis 3 ^{ème} friction de 3 mL 3 min après (après le soin) F1 – 5 min – F2 – 3 min – F3
3)	<u>Prise en charge du soin en réanimation</u> [Exposition à 27 mL en 4,5 minutes sur une période de 44,5 minutes] x 10	séquence de 9 frictions de 3 mL espacées de 5 min. F1 – 5 min – F2 – 5 min – F3 – 5 min .../... F9
4)	<u>Désinfection chirurgicale des mains</u> [Exposition à 12 mL en 1 minute] x 10	total de 12 mL (2 x 6 mL) de produit jusqu'à séchage complet F1 – F2

Les mesures ont été effectuées selon deux approches :

- par PID (détecteur par photo-ionisation) pour mesurer les COV photo-ionisables (dont l'éthanol) et disposer d'un profil d'exposition en temps réel,
- par CPG après prélèvement actif d'air sur charbon actif sur la durée d'exposition (limite de détection de l'éthanol de 0,1 mg/L).

Les résultats sont présentés ci-dessous :

	Protocole	CPG	PID
Traitement hygiénique	1)	137 ± 10,9 mg/m ³	241 ± 59,2 mg/m ³
	2)	263 ± 7,0 mg/m ³	339 ± 67,4 mg/m ³
	3)	346 ± 43,8 mg/m ³	429 ± 41,1 mg/m ³
Désinfection chirurgicale	4)	617 ± 40,6 mg/m ³	655 ± 20,5 mg/m ³

CPG : Chromatographie en phase gazeuse PID : détecteur par photoionisation

Dans les protocoles de traitement hygiénique, les taux moyens d'éthanol atmosphérique étaient d'autant plus importants que le nombre de frictions hydro-alcooliques était important, avec des valeurs moyennes mesurées de 137 ± 10,9, 263 ± 7,0 et 346 ± 43,8 mg/m³ pour les protocoles 1), 2) et 3) respectivement. Les niveaux d'exposition étaient les plus élevés dans la situation de désinfection chirurgicale (scénario 4)), avec une valeur moyenne de 617 ± 40,6 mg/m³. Les données obtenues avec le PID, non spécifiques de l'éthanol, étaient toujours plus importantes.

L'analyse des profils d'exposition a montré des pics d'exposition corrélés aux frictions hydro-alcooliques, avec une exposition plus forte (continue dans la durée) dans le cas de la désinfection chirurgicale.

Dumas-Campagna et al. (2014b) ont effectué des mesures d'exposition à l'éthanol lors d'utilisation de solution hydro-alcoolique (SHA). Le produit d'essai était à base de 70 % v/v d'éthanol (Purell). Les concentrations d'éthanol dans l'air inhalé ont été mesurées en continu par spectrophotométrie infrarouge chez 5 volontaires (3 hommes et 2 femmes) suite

à 5 frictions de 3 minutes espacées de 15 minutes chacune avec 1,5 ou 3 g de produit (soit une exposition à 7,5 g ou 15 g de produit au total sur une période d'une heure), dans deux environnements différents :

- une pièce ventilée avec 18 renouvellements d'air par heure
- une pièce fermée peu ou pas ventilée.

Une variabilité inter et intra-individuelle importante a été retrouvée, de moindre importance en espace ventilé. Les valeurs d'exposition moyenne mesurées étaient les suivantes :

Quantité par friction		Pièce ventilée	Pièce peu ou pas ventilée
1,5 g	ppm	858 ± 258	1467 ± 883
	mg/m ³ *	1630 ± 490	2787 ± 1678
3 g	ppm	1134 ± 122	1243 ± 594
	mg/m ³ *	2155 ± 232	2362 ± 1129

* les résultats dans la publication sont communiqués en ppm – la conversion en mg/m³ est effectuée avec l'hypothèse de conditions expérimentales de 25°C, 1013 hPa, où 1 ppm = 1,9 mg/m³

Les niveaux d'exposition moyens associés à l'utilisation de 1,5 g de produit par friction étaient de l'ordre de 1600 mg/m³ en local ventilé et 2800 mg/m³ en local peu ou pas ventilé. Avec l'utilisation de 3 g de produit, les taux atmosphériques étaient de l'ordre de 2150 mg/m³ et 2300 mg/m³ respectivement. Le pic d'exposition à l'éthanol était d'environ 4470 mg/m³ en local peu ou pas ventilé, *versus* 2375 mg/m³ en local ventilé.

Hautemanière *et al.* (2013a) ont évalué le niveau d'exposition en situation d'activité professionnelle. 26 professionnels de santé (3 hommes et 23 femmes) ont été monitorés durant 4 heures d'activité avec utilisation de produit hydro-alcoolique à 70% p/p d'éthanol (ANIOGEL 85 NPC – Laboratoires ANIOS). La quantité totale moyenne de produit utilisée était de 33 g (34,5 mL), correspondant à 11,5 traitements hygiéniques de 3 mL chacun. Les taux d'éthanol atmosphérique à hauteur des voies respiratoires ont été déterminés par prélèvement actif d'air sur charbon actif sur toute la durée d'exposition (analyses par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme - limite de détection = 0,1 mg/L). Le taux moyen d'éthanol inhalé était de 46,2 ± 34,8 mg/m³. L'analyse des données individuelles a montré une corrélation positive entre la quantité de produit utilisée et la quantité d'éthanol inhalée (p=0,05).

1.2. Evaluation des niveaux d'exposition systémiques à l'éthanol consécutifs à l'utilisation des produits hydro-alcooliques

Le rapport de l'AFSSET relatif à l'évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle (AFSSET 2010) rapporte une étude de simulation des niveaux d'exposition à l'éthanol et d'éthanolémie consécutive, associés à l'utilisation des produits hydro-alcooliques.

Les simulations d'éthanolémie ont été faites en recourant à un modèle pharmacocinétique à base physiologique (modèle PBPK : physiologically based pharmacokinetic model) permettant de simuler l'exposition par inhalation à différentes concentrations atmosphériques d'éthanol et de prédire ainsi le comportement toxicocinétique de l'éthanol. Le modèle utilisé est adapté de celui publié par *Pastino et al. (1997)* (Fig. 49). Ce modèle comporte 5 compartiments : cerveau, foie, tissus gras, tissus richement perfusés (reins, coeur) et tissus pauvrement perfusés (muscles au repos et peau), représentant 91% de la masse totale de l'organisme. Les 9 % restants (constitués notamment des os, ongles, cheveux, cartilage et dents) ne sont pas pris en compte en raison de leur faible influence sur la cinétique de l'éthanol (*Schlouch & Tardif 1999*). Les paramètres pris en compte sont les concentrations en éthanol et le débit sanguin dans les différents compartiments, les caractéristiques des activités physiques sur les paramètres circulatoires et respiratoires ainsi que les coefficients de partage sang/air et tissus/sang.

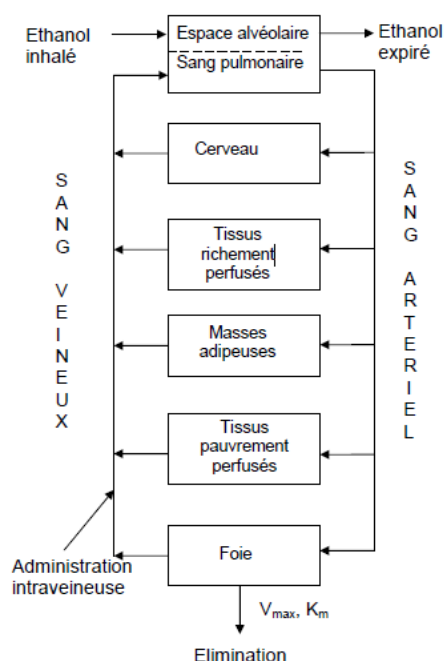


Figure 49 : Représentation schématique du modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) pour l'éthanol inhalé proposé par *Pastino et al. 1997*

Dans un scénario réaliste d'utilisation des PHA au cours de la journée (20 frictions chirurgicales ou 50 frictions simples par jour), les niveaux d'exposition sur une journée de travail de 8 heures sont de l'ordre de 200 à 250 mg/m³. L'éthanolémie a été estimée sur une journée de travail de 8 heures avec 42 frictions de 94 secondes avec un gel hydro-alcoolique à 80% v/v d'éthanol. Dans cette simulation, l'éthanolémie maximale cumulée était de l'ordre de 1,28 mg/L.

Le même modèle pharmacocinétique à base physiologique a été utilisé par [Huynh-Delerme et al. \(2012\)](#) pour estimer l'éthanolémie d'une personne possiblement exposée durant 2 jours à 378 mL d'éthanol par les voies respiratoires. Le scénario correspond à un total de 180 frictions hydro-alcooliques réalisées par 30 personnes dans une même pièce faiblement ventilée (0,08 m³/min), à raison de 3 frictions de 3 mL par jour par personne avec un produit à 70% p/p d'éthanol. Dans ces conditions maximalisantes d'exposition, la concentration atmosphérique moyenne d'éthanol estimée était de 1518 mg/m³ en fin d'exposition. La concentration maximale d'éthanolémie correspondante a été estimée à 5,9 mg/L.

Dans leur étude évaluant les niveaux d'exposition des voies respiratoires de 5 volontaires lors de l'utilisation de PHA (5 frictions de 3 minutes espacées de 15 minutes chacune avec 1,5 ou 3 g de produit à base de 70 % v/v d'éthanol (Purell)) dans deux environnements différents en termes de ventilation, [Dumas-Campagna et al. \(2014b\)](#) ont utilisé leurs résultats pour estimer les niveaux d'éthanolémie consécutive. Le même scénario que celui retenu par l'Afsset pour l'évaluation des risques liée à l'utilisation des PHA en milieu de santé a été utilisé (42 frictions de 3 minutes sur une journée de 8 heures). Le modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) utilisé était celui retravaillé par [Dumas-Campagna et al. \(2014\)](#), ajoutant à la clairance métabolique hépatique de l'éthanol une biotransformation extra-hépatique de haute affinité et de faible capacité associée aux tissus richement perfusés. Dans tous les cas, les éthanolémies estimées suites aux différentes simulations étaient inférieures à 1 mg/L (valeurs maximales de 0,42 mg/L chez la femme et 0,40 mg/L chez l'homme).

Dans une étude prospective de [Miller et al. \(2006\)](#) conduite en ouvert, 5 volontaires se sont frictionnés les mains avec 5 mL de produit (62 % d'éthanol dénaturé - % p/p, p/v ou v/v non précisé) à 50 reprises sur une période de 4 heures. Aucune différence dans les mesures d'éthanolémie n'a été observée avant et après les frictions hydro-alcooliques, avec des valeurs toutes inférieures au seuil de détection de 5 mg/L (méthode d'analyse non communiquée).

Brown et al. (2007) ont étudié le potentiel d'absorption cutanée d'éthanol après utilisation intensive d'une solution hydro-alcoolique (SHA) à 70% d'éthanol (Avagard, 3M Healthcare) en milieu hospitalier. Les volontaires (n=20) devaient se frictionner les mains 30 fois en une heure, soit une application toutes les 2 minutes, à raison de 1,2 à 1,5 mL à chaque friction. 1 à 2 minutes, puis 10 à 13 minutes après la fin de l'épreuve, la teneur d'éthanol dans l'haleine a été mesurée par alcootest (limite de détection de 0,001 %). L'éthanolémie a également été mesurée par chromatographie en phase gazeuse sur prélèvement sanguin effectuée 5 à 7 minutes après la fin de l'épreuve (limite de détection = 1 mg/L et limite de quantification = 20 mg/L).

De l'éthanol a été détecté dans l'haleine de 6 volontaires 1 à 2 minutes après la dernière application (0,001 à 0,0025 %). L'éthanol n'était plus détectable dans l'air exhalé après 10 à 13 minutes. Une éthanolémie détectable mais non quantifiable (inférieure à 20 mg/L) a été retrouvée pour 2 sujets uniquement. Ces données concluent à un très faible passage dans le sang de l'éthanol utilisé dans ces conditions, sans qu'il soit possible de faire la part de l'éthanol inhalé.

Kramer et al. (2007) ont également étudié le niveau d'exposition systémique à l'éthanol sur 12 volontaires des deux sexes (6+6), suite à l'utilisation de solutions hydro-alcooliques (ci-après A, B et C) contenant différentes concentrations d'éthanol (95, 85 et 55% respectivement). Le produit C contenait également 10% de n-propanol.

Deux schémas d'exposition mimant le traitement hygiénique et la désinfection chirurgicale des mains ont été testés, selon un protocole randomisé en double aveugle,

- 4 mL de produit par friction des mains durant 30 secondes, à 20 reprises, espacées d'une minute chacune (traitement hygiénique), soit une exposition à 60,0 g, 56,2 g et 39,6 g d'éthanol pour les désinfectants A, B et C, sur un temps d'exposition total de 10 min sur une période de 30 minutes
- 5*4mL de produit sur les mains et avant-bras durant 3 minutes à 10 reprises, espacées de 5 minutes chacune (désinfection chirurgicale), soit une exposition à 149,9 g, 140,0 g et 99,0 g d'éthanol pour les désinfectants A, B et C, sur un temps d'exposition total de 30 min sur une période de 80 minutes

Les taux sanguins initiaux d'éthanol et d'acétaldéhyde ont été déterminés chaque jour avant le début des applications, puis sur une cinétique de 90 minutes suivant la dernière application, par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (limites de détection : éthanol = 0,14 mg/L, acétaldéhyde = 0,07 mg/L ; limites de quantification : éthanol = 0,28 mg/L, acétaldéhyde = 0,15 mg/L). Pour les mesures en dessous des seuils de détection, la valeur par défaut de 50% de la limite de détection a été retenue (soit 0,07 mg/L pour l'éthanol et 0,035 mg/L pour l'acétaldéhyde).

Avant mise en œuvre des protocoles d'application, les valeurs médianes étaient en-dessous des niveaux maximums physiologiques (0,32 mg/L pour l'éthanol et 0,31 mg/L pour l'acétaldéhyde) et confirment l'abstinence en éthanol des volontaires avant le début de l'étude. La valeur médiane de l'éthanolémie de base était de 0,07 mg/L (0,06-0,08). Pour près de 80% des contrôles (57 sur 72), les valeurs étaient en dessous de la limite de détection. La valeur la plus élevée était de 1,7 mg/L. Pour l'acétaldéhyde, la valeur médiane de base était de 0,20 mg/L (0,18–0,22 mg/L). 5,5% des valeurs de base (4 sur 72) étaient en dessous des seuils de détection. La valeur la plus élevée était de 1,95 mg/L.

Suite à l'administration répétée selon le protocole de traitement hygiénique, la valeur d'éthanolémie médiane était croissante dans les 30 minutes suivant la fin des administrations, pour ensuite diminuer progressivement. Il en a été de même dans les essais de désinfection chirurgicale, avec une cinétique un peu plus rapide observée avec le produit C (55% p/p d'éthanol et 10 % p/p de n-propanol) (pic obtenu en 20 minutes).

Les résultats obtenus en termes de concentrations médianes maximales d'éthanol et d'acétaldéhyde, quantité médiane d'éthanol absorbé et taux d'absorption correspondant sont présentés dans le tableau 69 ci-après.

Tableau 69 : Concentrations sanguines médianes maximales d'éthanol et d'acétaldéhyde après 20 traitements hygiéniques ou 10 désinfections chirurgicales des mains (Kramer *et al.* 2007)

	[EtOH] _{produit} % p/p	Quantité totale d'éthanol appliqué (g)	C _{max} EtOH (mg/L)	C _{max} Acetald. (mg/L)	Quantité d'EtOH absorbé ¹ Valeur médiane	Taux d'absorption %
			Valeur médiane	Valeur médiane		
Traitement hygiénique (20*4mL *30sec)	95	60,0	20,95	0,50	1365 mg	2,3
	85	56,2	11,45	0,50	630 mg	1,1
	55	39,6	6,90	0,60	358 mg	0,9
Désinfection chirurgicale (10*(5*4mL) *3min)	95	149,9	17,50	4,00	1067 mg	0,7
	85	140,0	30,10	3,30	1542 mg	1,1
	55	99,0	8,80	1,70	477 mg	0,5

¹quantité d'éthanol absorbé : poids corporel (kg) x r x taux sérique maximum (mg/l) avec r=0,7 (hommes) ou 0,6 (femmes)

Dans le protocole de traitement hygiénique, les éthanolémies médianes maximales étaient d'autant plus importantes que la teneur en éthanol dans le produit était importante, avec des valeurs de 20,95, 11,45 et 6,90 mg/L pour les désinfectants A, B et C respectivement. Les taux d'absorption calculés à partir des quantités totales d'éthanol appliquées étaient compris entre 0,9 % et 2,3 %.

Dans le protocole de désinfection chirurgicale, les valeurs médianes d'éthanolémie maximale étaient de 17,5, 30,1 et 8,8 mg/L pour les désinfectants A, B et C respectivement, correspondant à des taux d'absorption compris entre 0,5 et 1,1 %.

Dans ce scénario d'usage intensif des PHA, les taux d'absorption restent faibles (0,5 à 2,3% de la dose appliquée) et les valeurs d'éthanolémie mesurées sont nettement inférieures à celles à partir desquelles on observe une influence sur le comportement, et qui se situe aux environs de 100 mg/L (AFSSET 2010).

Sur la base de ces résultats, les auteurs ont calculé que dans un scénario de 3 frictions chirurgicales des mains espacées de deux heures chacune avec un produit contenant 95% d'éthanol, l'éthanolémie moyenne estimée d'un chirurgien serait de 2,61 mg/L chez l'homme et 3,68 mg/L chez la femme.

Kinnula *et al.* (2009) ont quant à eux étudié l'absorption cutanée de l'éthanol chez l'enfant par mesure du taux d'éthanol dans l'air expiré. 82 enfants (45 filles et 37 garçons) âgés de 3,5 à 7,2 ans, répartis sur deux garderies, se sont frictionnés les mains avec des solutions hydro-alcooliques (SHA) à 70% d'éthanol (% p/p ou p/v ou v/v non précisé). La dose de SHA utilisée était de 1,5 mL chez les 47 enfants de la première garderie, et 3 mL chez les 35 enfants de la seconde. Une surveillance d'une durée de 15 min a été mise en place afin de noter tous les contacts avec les muqueuses (yeux, bouche, narines). La concentration en éthanol dans l'air expiré a été mesurée avec un alcoomètre (seuil de détection de 0,01‰) avant désinfection puis 15 à 60 minutes après le début de l'étude.

Quelle que soit la dose, aucune détection d'alcool n'a été faite, malgré des contacts mains-bouche comptabilisés jusqu'au nombre de 30 dans les 15 premières minutes pour certains enfants.

Ahmed-Lecheheb *et al.* (2012) ont étudié l'absorption de l'éthanol chez 86 agents hospitaliers (10 hommes et 76 femmes) durant 4 heures d'activité professionnelle avec utilisation de produit hydro-alcoolique à 70% p/p d'éthanol (ANIOSGEL 85 NPC – Laboratoires ANIOS). Les quantités de produit utilisé ont été comptabilisées. Le niveau d'exposition a été évalué par des mesures avant et après 4 heures de travail :

- par dosage d'éthanol dans l'air expiré par éthylotest (bande de détection = 0,00 – 2 mg/L ; précision $\pm 0,01$ mg/L)
- par prélèvements sanguins et urinaires pour déterminer les concentrations d'éthanol et ses métabolites (acétaldéhyde et acétate) par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (limite de détection de l'éthanol = 0,1 mg/L)

La quantité de produit utilisée sur 4 heures était très variable, de 1,23 à 59,84 g, avec une valeur moyenne de $27,5 \pm 14,9$ g (soit 9 frictions hydro-alcooliques ± 5). L'éthanol a été détecté en faible concentration ($0,076 \pm 0,05$ mg/L) dans l'air expiré de 28 personnes 1 à 2 minutes après l'exposition. Les dosages sanguins et urinaires de l'éthanol et ses métabolites (acétaldéhyde et acétate) après les 4 heures d'exposition étaient négatifs (limite de détection de l'éthanol de 0,1 mg/L).

Des résultats similaires ont été obtenus par [Hautemanière et al. \(2013a\)](#) dans leur étude citée précédemment, menée sur 26 professionnels de santé (3 hommes et 23 femmes) monitorés durant 4 heures d'activité avec utilisation de produit hydro-alcoolique à 70% p/p d'éthanol (ANIOGEL 85 NPC – Laboratoires ANIOS). Des mesures au niveau des voies respiratoires ont été effectuées par utilisation d'éthylotest pour déterminer les concentrations d'éthanol expiré, avec des mesures juste avant et 1 à 2 minutes après l'essai (bande de détection = 0,00 – 2 mg/L ; précision \pm 0,01 mg/L). En complément, des prélèvements sanguins et urinaires avant et après la période d'activité ont été effectués pour doser l'éthanol et ses métabolites (acétaldéhyde et acétate) par chromatographie liquide en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (limite de détection = 0,1 mg/L).

La quantité totale moyenne de produit utilisée était de 33 g (34,5 mL), correspondant à 11,5 traitements hygiéniques de 3 mL chacun. Le taux d'éthanol moyen mesuré dans l'air expiré 1 à 2 minutes après les 4 heures d'activité était faible, avec une moyenne de $0,03 \pm 0,06$ mg/L. Les dosages sanguins et urinaires de l'éthanol et ses métabolites (acétaldéhyde et acétate) après les 4 heures d'exposition étaient négatifs. Dans cette étude, les taux d'éthanol atmosphérique à hauteur des voies respiratoires ont également été déterminés.

1.3. Evaluation de la part d'absorption cutanée *versus* la part d'absorption par les voies respiratoires

L'un des obstacles rencontré lors de l'évaluation du passage transcutané des alcools lors des frictions hydro-alcooliques des mains est de faire la différence entre le passage transcutané et l'absorption par les voies respiratoires. Pour lever cette interrogation, [Kirschner et al. \(2009\)](#) ont étudié l'absorption cutanée d'éthanol suite à l'administration cutanée sous compresse de solutions hydro-alcooliques (74,1% d'éthanol dans l'eau et produit formulé à base 74,1 % d'éthanol et 10% d'isopropanol : Softasept®N, B-Braun). Selon un protocole d'essai croisé, randomisé, en double aveugle, 20 mL de produit ont été déposés sous compresse de 200 cm² fixée sur le dos de 14 volontaires pendant 10 minutes. Une période de repos de 48 heures a été respectée entre l'application des deux produits. Des prélèvements sanguins ont été effectués avant puis 15 et 60 minutes après le début de l'essai, et analysés par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme pour identifier la présence d'éthanol (limite de détection = 0,5 mg/L, limite de quantification = 1 mg/L).

Les éthanolémies mesurées étaient constantes, de l'ordre de 1,25 mg/L quel que soit le temps de mesure, qu'il s'agisse de l'éthanol seul ou en association avec l'isopropanol.

Dans une autre étude conduite sur les 14 mêmes volontaires, [Lang et al. \(2011\)](#) ont comparé l'absorption cutanée d'une solution aqueuse d'éthanol à 45 % p/v et de n-propanol à 18 %

p/v à celle d'une solution formulée à base de 45% p/v d'éthanol, 18 % p/v de n-propanol et d'agents protecteurs (PEG-6 caprilic/capric glycerides, diisopropyl adipate, panthenol, bisabolol et allantoiné – Softa-Man® - B-Braun). Selon un protocole d'essai croisé, randomisé, en double aveugle, 20 mL de produit ont été appliqués de façon topique durant 10 min sous compresse de 200 cm² fixée sur le dos. Les éthanolémies ont été mesurées 5 minutes avant l'administration du traitement puis 15, 30 et 60 minutes après le début de l'essai, par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (limite de détection annoncée de 0,5 mg/mL, avec des réserves puisque les résultats publiés communiquent des valeurs inférieures).

Quel que soit le produit et le temps de mesure, les éthanolémies moyennes étaient comprises entre 0,25 et 0,3 mg/L.

Les données toxicocinétiques en termes de C_{max}, t_{max} et ASC étaient équivalentes pour les 2 produits :

	Ethanol à 45 % p/v et n-propanol à 18 % p/v dans l'eau	Softa-Man®
C _{max} mg/L	0,35 ± 0,14	0,28 ± 0,08
t _{max} min	54,55 ± 12,4	53,18 ± 15,54
ASC mg/L.min	14,83 ± 2,58	13,98 ± 2,07

Une étude d'[Arndt et al. \(2014\)](#) a évalué la part de l'exposition à l'éthanol par les voies respiratoires *versus* voie cutanée durant l'utilisation de PHA. Le produit d'essai était à base de 78,2% p/p d'éthanol et environ 10% d'isopropanol (DESDERMAN® PURE – Schülke & Mayr GmbH). 5 volontaires ont effectué un total de 32 traitements hygiéniques (3 mL – 40/45 sec – 4 fois par heure) sur une durée de 8 heures tandis que deux autres volontaires étaient présents dans la même pièce sans utiliser de produit pour n'être exposés qu'aux vapeurs d'alcool. L'exposition à l'éthanol a été appréciée par dosage d'éthylglucuronide (EG) (métabolite de l'éthanol par voie non oxydative) dans les urines par chromatographie liquide couplée à une double spectrométrie de masse (LC/MS-MS). De l'EG a été retrouvé dans les urines de 4 des 5 volontaires, avec une valeur maximale de 1,7 mg/g de créatinine. Ce métabolite a également été retrouvé dans les urines des deux sujets contrôles, mais en teneur inférieure (valeur max de 0,8 mg/g).

Les 5 volontaires ont effectué la même expérience en appliquant le produit après avoir placé les mains sous enceinte pour prévenir de l'exposition par inhalation durant la friction. Dans ce cas, les taux d'EG urinaire étaient significativement réduits avec une valeur maximale de 0,09 mg/g.

Ces travaux suggèrent que l'éthanol absorbé lors de l'utilisation des PHA provient principalement des voies respiratoires, plutôt que de la peau.

2. ISOPROPANOL

Pour l'isopropanol, on ne retrouve pas d'études mesurant les concentrations atmosphériques en alcool liées à l'utilisation des PHA. Plusieurs études ont par contre porté sur les niveaux d'exposition systémique par analyses sanguines.

[Turner *et al.* \(2004\)](#) ont étudié chez l'homme l'absorption cutanée possible de l'isopropanol en relation avec l'utilisation d'un produit hydro-alcoolique pour la désinfection des mains. 10 volontaires (4 hommes et 6 femmes) se sont frictionnés les mains avec le produit d'essai formulé à 52,6 % p/p d'isopropanol (Sterisol hand désinfectant, Sterisol AB), à raison de 3 mL toutes les 10 minutes durant 4 heures (exposition à 72 mL au total). Les taux sanguins d'alcool ont été déterminés avant et 5 minutes après la dernière application par chromatographie en phase gazeuse (limite de détection : 0,5 mg/L).

Tandis qu'aucun sujet ne présentait de teneur d'isopropanol sanguine détectable en début d'essai, 9 volontaires ont présenté des taux sanguins compris entre 0,5 et 1,8 mg/L en fin d'essai.

[Brown *et al.* \(2007\)](#) ont également étudié le potentiel d'absorption cutanée d'alcool contenu dans une solution hydro-alcoolique (SHA) contenant 70% d'isopropanol (DeBug, Orion Laboratories Pty Ltd.). Les volontaires au nombre de 20 devaient se frictionner les mains 30 fois en une heure, soit une application toutes les 2 minutes, à raison de 1,2 à 1,5 mL à chaque friction. Le taux sérique d'isopropanol a été mesuré par chromatographie en phase gazeuse sur prélèvement sanguin effectué 5 à 7 minutes après la fin de l'épreuve (limite de détection = 1 mg/L et limite de quantification = 20 mg/L). Dans ce scénario représentatif d'une utilisation intensive, aucune des analyses sanguines n'a permis de mettre en évidence la présence d'isopropanol.

L'étude de [Kirschner *et al.* \(2009\)](#) préalablement décrite pour l'évaluation du passage transcutané de l'éthanol lors de frictions hydro-alcooliques des mains a également étudié l'absorption cutanée de l'isopropanol à 10%. Pour écarter la part de l'absorption par les voies respiratoires, les produits d'essai ont été administrés sous compresse (10 % d'isopropanol dans l'eau et produit formulé à base 74,1 % d'éthanol et 10% d'isopropanol : Softasept®N, B-Braun). Selon un protocole d'essai croisé, randomisé en double aveugle, 20 mL de produit ont été appliqués sur le dos de 14 volontaires pendant 10 minutes. Une période de repos de 48 heures a été respectée entre l'application des deux produits. Des prélèvements sanguins ont été effectués avant puis 15 et 60 minutes après le début de l'essai, et analysés par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme pour identifier la présence d'isopropanol ou d'acétone (limite de détection = 0,5 mg/L).

Aucune présence d'isopropanol ou d'acétone n'a été détectée dans les différents échantillons dosés (mesures avant puis 15 et 60 minutes après le début de l'essai).

Below et al. (2012) ont étudié chez l'homme le niveau d'exposition systémique à l'isopropanol en relation avec l'utilisation de solutions hydro-alcooliques contenant 63,14 % p/p d'isopropanol (Manorapid –Antiseptica – ci-après produit A) ou 45 % p/p d'isopropanol, 30 % p/p de n-propanol et 0,2 % p/p d'éthylsulfate de mecetronium (Sterilium Classic Pure - Bode Chemie – ci-après produit B). 3 protocoles d'essai contrôlés et en aveugle ont été mis en œuvre avec une pesée individuelle des flacons avant et après l'essai pour déterminer les quantités précises de produit utilisées.

1)	Désinfection hygiénique des mains [Exposition à 44,25 g (A) ou 30,64 g (B) d'isopropanol en 10 min. sur une période de 30 min.]		20 frictions de 30 sec. avec 4 mL de produit chacune espacées d'1 min.
	Désinfection chirurgicales des mains [Exposition à 110,62 g (A) ou 76,60 g (B) d'isopropanol en 30 min. sur une période de 80 min.]		10 frictions de 3 min. avec 5x4 mL de produit chacune, espacées de 5 min.
2)	Pas de port de masque	Test d'usage d'une ½ journée	3 interventions chirurgicales de 90 min. chacune
3)	Port de masque durant les frictions	[Exposition à 18,25 g (A) ou 12,64 g (B) d'isopropanol en 5 min. sur une période de 4 h.]	1 friction hygiénique de 30 sec. 10 min. avant la 1 ^{ère} intervention, 1 friction chirurgicale d'1 min. ½ avant chaque intervention

Le protocole 3 était identique au protocole 2, à l'exception d'un port de masque durant les frictions hydro-alcooliques pour prévenir de l'exposition par les voies respiratoires.

Les taux sanguins d'isopropanol et d'acétone ont été déterminés chaque jour avant le début des applications (t_0), puis

- pour le protocole 1, sur une cinétique de 90 minutes suivant la dernière application pour le traitement hygiénique et 120 minutes pour le traitement
- pour les protocoles 2 et 3, à la fin de chaque intervention chirurgicale, et 60 et 90 minutes après la fin de l'expérimentation.

Les analyses ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (limites de détection : isopropanol = 0,03 mg/L, acétone : 0,01 mg/L). Pour les mesures en dessous des seuils de détection, la valeur de 0 a été retenue par défaut. 12 volontaires (6 hommes et 6 femmes) ont participé au protocole 1, et 10 chirurgiens (6 hommes et 4 femmes) aux protocoles 2 et 3. Avant mise en œuvre des protocoles, la valeur médiane de base d'isopropanol était inférieure à 0,03 mg/L. L'acétone a été retrouvée dans tous les prélèvements, avec une valeur médiane de 2,10 mg/L.

Dans les 3 protocoles, une exposition systémique à l'isopropanol a été retrouvée.

Les résultats obtenus dans chaque protocole en termes de taux sanguins maximum en isopropanol et acétone (valeurs médianes), quantité d'isopropanol absorbée et taux d'absorption sont présentés dans le tableau 70 ci-dessous.

Tableau 70 : Concentrations sanguines médianes maximales d'isopropanol et d'acétone dans différentes situations d'emploi de produits contenant de l'isopropanol (Below *et al.* 2012)

	Protocole	Produit d'essai ¹	Quantité totale d'IPA appliqué (g)	C _{max} (médiane) mg/L		Quantité IPA absorbé ³ (médiane) mg	Taux d'absorption %
				IPA	acétone		
1 (30 min)	Traitement hygiénique (20*4mL*30sec)	A	44,25	5,3	6,2	310	0,7
		B	30,64	4,9	4,5	310	1,0
1 (30 min)	Désinfection chirurgicale (10*(5*4mL)*3min)	A	110,62	5,8	5,4	472	0,4
		B	76,60	10	4,95	569	0,7
2 (4 h)	Exposition dermique et respiratoire	A	18,25	1,70	9,02	92,7	0,5
		B	12,64	2,56	10,22	137	1,1
3 (4 h)	Exposition dermique	A	18,25	1,74	4,43	151	0,8
		B	12,64	1,24	4,45	129	1,0

¹ A : produit à base de 63,14 % p/p d'isopropanol / B : produit à base de 45% p/p d'isopropanol, 30 % p/p de n-propanol et 0,2 % p/p d'éthylsulfate de mecetronium

³ quantité d'IPA absorbé : poids corporel (kg) x r x taux sérique maximum (mg/L) avec r=0,7 pour les hommes et 0,6 pour les femmes

Suite aux 20 traitements hygiéniques, les taux d'isopropanol sanguins étaient croissants dans les 60 minutes suivant la fin des administrations, avec une valeur médiane maximale de l'ordre de 5 mg/L. Il en a été de même suite aux 10 désinfections chirurgicales, avec une cinétique plus rapide observée avec le produit B (pic obtenu en 30 minutes), et des valeurs moyennes maximales un peu plus élevées.

Les taux d'absorption correspondant étaient faibles, compris entre 0,4 et 1%, avec des taux légèrement plus importants suite à l'utilisation du produit B contenant les deux alcools (1 *versus* 0,7 dans la situation de traitement hygiénique, et 0,7 *versus* 0,4 pour la désinfection chirurgicale).

Dans les protocoles 2 et 3 (conditions d'utilisation chirurgicale réelle), les concentrations sanguines maximales en isopropanol obtenues étaient moindres, en relation avec une quantité d'alcool appliquée moins importante et sur une durée plus longue. Le port de masque a réduit le taux sanguin d'isopropanol obtenu pour le produit B mais pas pour le produit A.

Les concentrations sanguines en acétone étaient plus importantes de façon statistiquement significative que les valeurs de base dans le protocole 2, avec une valeur maximale obtenue de 10,22 mg/L. Les auteurs expliquent la différence de résultat avec le protocole 3 par le fait que les participants n'étaient pas autorisés à manger pendant l'essai dans le protocole 2 tandis qu'il était possible de manger entre les interventions chirurgicales dans le protocole 3.

Exprimés en taux d'absorption, les résultats concluent, comme dans le protocole 1, à de faibles taux compris entre 0,5 et 1,1%, avec des valeurs légèrement plus importantes suite à l'utilisation du produit B (1,1 *versus* 0,5 sans protection respiratoire, et 1 *versus* 0,8 avec protection respiratoire).

La même étude incluait un produit à base de n-propanol seul (70% p/p) (voir section suivante relative au n-propanol). En empêchant l'exposition par les voies respiratoires (protocole 3), la quantité absorbée de n-propanol était significativement inférieure à celle résultant de l'exposition par les voies cutanées et respiratoires (protocole 2) (109 mg vs 271 mg, $p < 0,05$). Cette diminution n'ayant pas été observée avec le produit à base d'isopropanol seul (63,14% p/p), ces résultats suggèrent que l'isopropanol est absorbé par la peau en plus grande proportion que le n-propanol, possiblement en relation avec le plus grand coefficient de perméabilité cutanée de l'isopropanol, et inversement, une plus grande proportion de n-propanol absorbé par les poumons.

Dans les 3 protocoles, les quantités absorbées ont été rapidement éliminées après la fin de l'exposition, et ne se sont pas accumulés (diminution rapide à des valeurs physiologiques naturelles), tel que démontré également par la non accumulation d'acétone dans les protocoles 2 et 3.

3. N-PROPANOL

On retrouve deux études portant sur l'évaluation de l'exposition systémique au n-propanol en relation avec l'utilisation des PHA.

Dans l'étude de [Lang et al. \(2011\)](#) précédemment décrite investiguant l'absorption cutanée des alcools en relation avec l'utilisation des PHA, les produits d'essais contenaient à la fois de l'éthanol et du n-propanol. Il s'agissait d'une solution aqueuse d'éthanol à 45 % p/v et de n-propanol à 18 % p/v et du même mélange d'alcools formulé en présence d'agents protecteurs (Softa-Man® - B-Braun). Pour écarter la part de l'exposition par les voies respiratoires, les volontaires (n=14) ont reçu un traitement topique de 20 mL de produit sous compresse de 200 cm² fixée sur le dos durant 10 min., selon un protocole d'essai croisé, randomisé, en double aveugle, avec des administrations espacées de 48 heures minimum. Les concentrations sériques en n-propanol ont été mesurées 5 minutes avant l'administration du traitement puis 15, 30 et 60 minutes après retrait du patch, par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (limites de détection : 0,5 mg/mL).

Quel que soit le produit et le temps de mesure (avant puis 15, 30 et 60 minutes après le début de l'essai), le n-propanol n'a pas été retrouvé.

Dans l'étude de [Below et al. \(2012\)](#) précédemment décrite étudiant le niveau d'exposition systémique à l'isopropanol en relation avec l'utilisation de solutions hydro-alcooliques, deux des 3 produits d'essai contenaient du n-propanol : à hauteur de 70% p/p pour l'un (Skinman Sensitive, Ecolab – ci-après produit A), et 30 % p/p pour l'autre, en association avec 45% p/p d'isopropanol et 0,2% p/p d'éthylsulfate de mecetronium (Sterilium Classic Pure, Bode Chemie– ci-après produit B).

Les 3 protocoles d'essai mis en œuvre (essais contrôlés et en aveugle) sont rappelés ci-dessous, avec documentation des quantités réelles de produit utilisées calculées à partir des pesées des flacons avant et après l'essai. Dans le protocole 1, le produit à base de 70 % p/p de n-propanol n'a pas été testé.

Annexe 1 : Etudes évaluant l'exposition aux alcools liée à l'utilisation des produits hydro-alcooliques par les professionnels de santé

1)	Désinfection hygiénique des mains [Exposition à 20,42 g (B) de n-propanol en 10 min. sur une période de 30 min.]		20 frictions de 30 sec. avec 4 mL de produit chacune espacées d'1 min.
	Désinfection chirurgicales des mains [Exposition à 51,05 g (B) de n-propanol en 30 min. sur une période de 80 min.]		10 frictions de 3 min. avec 5x4 mL de produit chacune, espacées de 5 min.
2)	Pas de port de masque	Test d'usage d'une ½ journée [Exposition à 20,1 (A) ou 8,43 (B) de n-propanol en 5 minutes sur une période de 4 h.]	3 interventions chirurgicales de 90 min. chacune 1 friction hygiénique de 30 sec. 10 min. avant la 1ère intervention,
3)	Port de masque durant les frictions		1 friction chirurgicale d'1 min. ½ avant chaque intervention

Le protocole 3 était identique au protocole 2, à l'exception d'un port de masque durant les frictions hydro-alcooliques pour prévenir de l'exposition par les voies respiratoires.

Les taux sanguins de n-propanol et de propionaldéhyde (principal métabolite du n-propanol) ont été déterminés chaque jour avant le début des applications, puis

- pour le protocole 1, sur une cinétique de 90 minutes suivant la dernière application pour le traitement hygiénique, et 120 minutes pour la désinfection chirurgicale
- pour les protocoles 2 et 3, à la fin de chaque intervention chirurgicale (t 90 minutes), et 60 et 90 minutes après la fin de l'expérimentation.

Les analyses ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (limites de détection : n-propanol: 0,13 mg/L, propionaldéhyde : 0,02 mg/L). Pour les mesures en dessous des seuils de détection, la valeur de 0 a été retenue par défaut.

12 volontaires (6 hommes et 6 femmes) ont participé au protocole 1, et 10 chirurgiens (6 hommes et 4 femmes) aux protocoles 2 et 3. Avant mise en œuvre des protocoles, la valeur médiane de base de n-propanol était inférieure à 0,13 mg/L (limite de détection). La valeur de propionaldéhyde était de 0,03 mg/L.

Les résultats obtenus dans chaque protocole en termes de taux sanguins maximum en n-propanol et propionaldéhyde (valeurs médianes), quantité de n-propanol absorbée et taux d'absorption sont présentés dans le tableau 71 ci-après.

Tableau 71 : Concentrations sanguines médianes maximales de n-propanol et propionaldéhyde dans différentes situations d'emploi de produits contenant du n-propanol (Below *et al.* 2012)

	Protocole	Produit d'essai ¹	Quantité totale de n-pro appliqué (g)	C _{max} (médiane) mg/L		Quantité n-pro absorbée ³ (médiane) mg	Taux d'absorption %
				n-pro	propionaldéhyde		
1 (30 min)	Traitement hygiénique (20*4mL*30sec)	B	20,42	9,15	0,15	600	2,9
1 (30 min)	Désinfection chirurgicale (10*(5*4mL)*3min)	B	51,05	18	0,2	918	1,8
2 (4 h)	Exposition dermique et respiratoire	A	20,1	4,08	--	271	1,3
		B	8,43	2,14	--	124	1,5
3 (4 h)	Exposition dermique	A	20,1	1,16	--	109	0,5
		B	8,43	0,68	--	97,6	1,2

¹ A : produit à base de 70 % p/p de n-propanol / B : produit à base de 45 % p/p d'isopropanol, 30 % p/p de n-propanol et 0,2 % p/p d'éthylsulfate de mecetronium

² n-pro : n-propanol

³ quantité de n-pro absorbé : poids corporel (kg) x r x taux sérique maximum (mg/l) avec r=0,7 pour les hommes et 0,6 pour les femmes

Dans les 3 protocoles, une exposition systémique au n-propanol a été retrouvée et était d'autant plus importante que la quantité de produit utilisée était élevée.

Suite aux 20 traitements hygiéniques, les taux de n-propanol sanguins étaient croissants dans les 30 minutes suivant la fin des administrations, avec une valeur médiane maximale de 9,15 mg/L. Dans le protocole de désinfection chirurgicale, le taux sanguin maximum a également été observé après 30 minutes, mais était plus important, avec une valeur moyenne maximale de 18 mg/L. Les taux d'absorption correspondant étaient faibles, estimés à 2,9% dans le protocole de traitement hygiénique et 1,8 % pour la désinfection chirurgicale. Aucune variation significative du taux de propionaldéhyde n'a été observée (taux médian maximum de 0,15 et 0,2 mg/L).

Dans les protocoles 2 et 3 (conditions d'utilisation chirurgicale réelle), les concentrations sanguines maximales en n-propanol obtenues étaient moindres, en relation avec une quantité d'alcool appliquée moins importante et sur une durée plus longue, et nettement diminuées dans le protocole 3 incluant le port de masque pour exclure l'exposition par inhalation, comparativement au protocole 2. Ces données suggèrent une part significative de l'absorption par les voies respiratoires.

Exprimés en taux d'absorption, les résultats concluent, comme dans le protocole 1, à de faibles taux compris entre 0,5 et 1,5 %, avec des valeurs légèrement plus importantes suite à l'utilisation du produit B contenant l'association des deux alcools (1,5 *versus* 1,3 sans protection respiratoire, et 1,2 *versus* 0,5 avec protection respiratoire). La présence

simultanée de n-propanol et d'IPA semble influencer l'absorption, avec des taux d'absorption plus élevés comparativement au produit à base de n-propanol seul.

Dans les 3 protocoles, les quantités absorbées ont été rapidement éliminées après la fin de l'exposition et ne se sont pas accumulés, tel que démontré également par la non-accumulation de propionaldéhyde dans les protocoles 2 et 3 (détail des données non communiqué dans la publication).

Annexe 2 – Protocole d'utilisation de l'équipement Vitrocell®

Allumage et réglage de l'appareil

- ½ heure environ avant les essais, allumer le bain-marie réglé à 37°C
- allumer les débitmètres et compter 5 minutes environ pour qu'ils soient stabilisés
- vérifier la pression de la bouteille d'air synthétique (5 Bars)
- déconnecter le module de traitement du générateur d'aérosol et vapeurs
- contrôler au débitmètre le flux de vide à 5mL/min en sortie des modules

Mise en place des cellules dans les modules d'exposition et de contrôle

- le chargement des modules se fait sous PSM pour limiter les risques de contamination microbologique,
- mettre 3,5 mL de milieu dans chaque puit des deux modules et placer les inserts avec les cultures
- refermer les modules et les connecter à l'installation à l'aide des tubulures en place, en démarrant par les tubulures de sortie (translucides) puis celle d'entrée (noires) ; les tubulures ne doivent pas être pliées pour ne pas interrompre le flux d'air ou d'atmosphère d'essai.

Administration du traitement

- connecter le générateur d'aérosol et de vapeurs au module
- remplir le réservoir du générateur d'aérosol au $\frac{3}{4}$ avec le produit d'essai
- démarrer la pompe à vide
- effectuer le traitement selon le protocole choisi

Fin du cycle d'exposition

Lorsque le cycle est terminé,

- éteindre la pompe à vide
- retirer le réservoir du générateur d'aérosol
- déconnecter les tubulures de connection aux modules, en démarrant par les tubulures d'entrée puis les tubulures de sortie
- arrêter le bain-marie pour pouvoir débrancher le circuit d'eau du module
- déplacer les modules d'exposition sous PSM puis les ouvrir pour récupérer les cultures cellulaires

- éliminer les milieux de culture des modules par aspiration puis rincer les puits à l'éthanol 70%.

Arrêt de l'appareil

- purger 3-4h à l'air seul
- éteindre l'air comprimé
- couper les débitmètres.

Annexe 3 – Publication relative à l'évaluation de la tolérance cutanée



Comparative assessment of local tolerance of alcohols commonly used in alcohol-based hand rubs for hand hygiene

Monique Manche^{a,b,c,*}, Benoît Foligné^{d,e}, Mathieu Sauty^a, Anne Platel^{b,c}, Eric Vercauteren^b, Gaétan Rauwel^a, Sophie Catoire^f, Hervé Ficheux^f, Jacques Criquelion^a, Fabrice Nesslany^{b,c}

a Laboratoires ANIOS, Lille, Hellemmes, France

b Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille, France

c EA 4483, Université de Lille 2, 59000 Lille, France

d Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204, CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

e Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 – LIRIC, Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

f Département de toxicologie, Thor Personal Care, 147, rue Irène-Joliot-Curie, 60208 Compiègne cedex, France

ABSTRACT

Hand hygiene plays a key role in nosocomial infection prevention. To achieve users' adherence, products' dermal tolerance is essential. We aimed at making a comparative assessment of skin irritation and phototoxicity of the 3 alcohols commonly used in alcohol-based hand rubs (Ethanol, Propan-2-ol, Propan-1-ol) at 60, 70, 80 or 85% w/w in water or with co-formulates (hydrating, emollient and skin protective agents). *In vitro* validated OECD methods 439 and 432 were used. For irritation, EpiSkin™ Small Model was the chosen Reconstructed Human Epidermis (RhE). For phototoxicity, co-formulates alone or in mixture with and without alcohol were tested using BALB/c 3T3 cell cultures. Whilst Ethanol and Propan-2-ol could not be differentiated and displayed good skin tolerance profiles, Propan-1-ol based products lead to significant viability impairments of RhE at 60, 70 or 80% and at 60% in the presence of co-formulates. However, these results could not be reproduced in another RhE model. Taking also into account bibliographic data on Propan-1-ol, this suggests that our results are probably related to a lack of specificity of the used RhE. Therefore, it can be relevant in case of significant results to use two different RhE models before performing any classification and/or performing any complementary tests.

Key words:

Alcohol-based hand rubs,

Hand hygiene

In vitro

Skin irritation

Reconstructed human epidermis

Phototoxicity

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; COLIPA, now Cosmetics Europe – The Personal Care Association; ECVAM, European Centre for the Validation of Alternative Methods; EFSA, European Food Safety Authority; ESAC, ECVAM Scientific Advisory Committee; GHS, Globally Harmonized System; OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development; SCCS, Scientific Committee on Consumer Safety; UN, United Nations; WHO, World Health Organization.

*Corresponding author at: Laboratoires ANIOS – Pavé du Moulin – 59260 Lille Hellemmes – France.

Tel. : +33 3 20 67 67 67

E-mail address: m.manche@anios.com

1 Introduction

In its recommendations for hand hygiene in health care, the World Health Organization (WHO) states that hand hygiene is the first infectious risk prevention measure associated with care. It helps prevent the risk of microbial transmission to patients, health-care workers (HCW) and health-care environment. Non-adherence to hand hygiene is considered the major cause of occurrence of healthcare-associated infections and spread of multi-resistant organisms; it is also recognized as a significant factor in the development of outbreaks (WHO 2009). The 5 indications for hand hygiene identified to effectively interrupt pathogen transmission during care are “Before patient contact”, “Before aseptic task”, “After body fluid exposure risk”, “After patient contact” and “After contact with patient surroundings”. This involves a high number of hand hygiene episodes during some care practices, which can reach up to 30 occurrences per hour (WHO 2009).

Ultimate use of hand hygiene products will depend on user’s acceptance and skin tolerability. Currently, products that best suit are Alcohol-based hand rubs (ABHR). Their high content of alcohol, mainly Ethanol, Propan-2-ol or Propan-1-ol, or a combination of two of them, gives them efficiency against a broad spectrum of pathogens (bacteria, yeast, fungi, virus, mycobacterium, *etc.*) in a rather short-time action. They are easy to set up because of their use without water point, as long as hands are visibly clean. However, alcohols are known for their dehydrating effect in relation with their lipid-dissolving effect, and can therefore be responsible of skin dryness, and in some extent, skin irritation. Poor acceptance of alcohol-based hand-rubs was described in some hospitals in relation with the drying effect of alcohols (Larson *et al.* 2006).

Throughout Europe and the United States, health professionals are among the occupational groups at greatest risk to present Irritant Contact Dermatitis (ICD) (English 2004, Halioua *et al.* 2012). It is a significant occupational health problem because ICD will dissuade from complying with hand-hygiene protocols, and consequently increase the possibility of cross-infection as well as HCW self-injuries with possible serious infections (Gould 2003, Larson *et al.* 2006, WHO 2009). ICD is the clinical response of the skin due to contact with chemical substances that induce a non-immunological cutaneous inflammatory reaction. Even if allergic contact dermatitis does exist as well, ICD is the most common form of occupational skin disease which accounts for nearly 80% of contact dermatitis (Al-Otaibi & Alqahtani 2015). It is caused and modulated by both exogenous and endogenous factors resulting in epidermal barrier damage, damage to keratinocytes and release of pro-inflammatory factors (Mathias & Maibach 1978, Berardesca & Distanto 1994). ICD types identified to date are numerous, including acute, chronic and cumulative irritant dermatitis, delayed acute irritant dermatitis, irritant reaction, pustular irritant dermatitis, suberythematous irritation, sensory irritation, friction dermatitis and airborne dermatitis (Chew & Maibach 2003). It can sometimes be a photo-irritation phenomenon, *i.e.* an acute-light induced irritation which occurs on skin exposed to sufficient concentrations of the so-called photo-irritant and doses of activating radiation (Gonzalez & Gonzalez 1996, Deleo 2004). Photo-irritation can occur after the first exposure and clinical signs are the same as the ones of irritation, erythema, edema and desquamation (Gould *et al.* 1995). It is first observed as an inflammatory reaction, and typically only light-exposed areas are affected (Epstein 1983). Whilst ICD can be prevented by recommending users to avoid skin contact with the products by wearing personal protective equipment (PPE), and exposure to light by wearing clothes or PPE or changing the time of use in the specific case of photo-irritation, this cannot be applied to hand hygiene products.

For all the above mentioned reasons, it is of importance to offer hand hygiene products without any identified irritating potential. For ABHR, the presence of co-formulates, among which humectants and hydrating agents, allow significantly countering the adverse side effects of alcohols. Several studies have been conducted in clinical settings using different commercially available products containing humectants to assess their acceptability. They all converged to the same conclusion that such products are better tolerated by HCW and are associated with a better skin condition (less skin irritation and dryness) when compared with either plain or antimicrobial soap (Boyce & Pittet 2002, Larson *et al.* 2006).

The prediction of any chemical-induced ICD is a matter of special concern. Whilst it can be partly achieved by a strict selection of ingredients with regard to their toxicological profile, it can also be assessed through experimental test. Since 2003, alternative methods have been developed, especially for cosmetic safety assessment, with the publication of the 7th amendment (EU 2003) of cosmetic directive (now replaced by regulation, EU 2009), introducing a progressive ban of animal testing for cosmetics. Out of validated alternative methods, skin irritation using RhE models is one of them. The EpiSkinTM test method was

recognized in 2007 as a stand-alone method scientifically validated to fully replace the Draize skin irritation test according to EU classification (ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Statement 2007, Spielmann *et al.* 2007). This method will only assess acute irritation. ICD types that can also occur with alcohols, notably sensory irritation (subjective symptoms including stinging, burning, tightness, itching or even painful sensations, but without morphological changes) and cumulative irritancy (Phillips *et al.* 1972) would require separate experiments.

Regarding the phototoxic potential, it can be properly studied *in vitro*, using the 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test (3T3 NRU-PT), OECD guideline No. 432 (OECD. 2004a, EU. B.41. 2008). This is a simple and predictive model for acute phototoxicity, as confirmed by comparative studies of the results of *in vitro* 3T3 NRU-PT versus *in vivo* acute phototoxicity tests in animals and humans (Spielmann *et al.* 1994, Spielmann *et al.* 1998, Anon 1998, OECD. 2004a). Despite human skin keratinocytes are the first target cells exposed to sunlight, mouse fibroblasts have been preferred in this *in vitro* test for sensitivity reasons, as shown in the ECVAM/COLIPA pre-validation study screening different photosensitizers, where primary human keratinocytes cultures were less sensitive in relation with their higher potential to absorb UV radiation (Spielmann *et al.* 1995).

The aim of our research was to make a comparative assessment of local tolerance of alcohols commonly used in hand hygiene alcohol-based products using *in vitro* validated alternative methods. Formulated products, hereafter called hydro-alcoholic solutions (HAS), were also part of the tests battery, in order to take into account the presence of co-formulates in the commercially available products. For the above mentioned reasons, skin irritation and phototoxicity were investigated. Comparative assessment was between the 3 commonly used alcohols in ABHR: Ethanol, Propan-2-ol and Propan-1-ol, and for each alcohol, between 4 different concentrations ranged from 60% w/w to 85 % w/w, this range covering the alcohol content encountered in commercialized ABHR.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals and reagents

2.1.1 Test items

Ethanol (purity 94.377 % w/w), Propan-2-ol (purity 99.974 % w/w) and Propan-1-ol (purity 99.961 % w/w) were purchased from BRABANT Global Solvant (Tressin – France). Propan-1-ol (purity \geq 99.8%) was also purchased from Merck (Darmstadt - Germany). Co-Formulates arbitrary named Raw-Materials 1, 2, 3 & 4 (RM1, RM2, RM3 and RM4 - hydrating, emollient and skin protective agents) were provided by Laboratoires ANIOS (Lille-Hellemmes, France). For confidentiality reason, RM names and suppliers' identity could not be provided.

Solutions of alcohol (Ethanol, Propan-2-ol and Propan-1-ol) at 60, 70, 80 and 85% w/w in water or in the presence of 2 or 2.5 % w/w of co-formulates (mixture of RM1, RM2, RM3 and

RM4) and mixture of co-formulates at 2.5 (CoF 2.5) or 10 % w/w (CoF₁₀) in Dimethyl sulfoxide (DMSO, purity > 99.9% - Sigma-Aldrich - Saint Quentin Fallavier, France) were provided ready to use by Laboratoires ANIOS. Tested HAS were voluntary different from real HAS marketed products, with co-formulates' concentration determined in preliminary experiments at 2.5% for irritation tests, and 2% for phototoxicity tests, in order to not introduce toxicity level that would have impaired the test conduct or its interpretation.

2.1.2 Other chemicals and reagents

For *in vitro* skin irritation, Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) without Calcium and Magnesium (GIBCO, Paisley, UK) was used as negative control and rinsing solution. Sodium dodecyl sulfate 5% (SDS, purity ≥ 99 % - Biorad, Japan or purity ≥ 98.5% Sigma, USA) was used as positive control. MTT (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide, purity ≥ 98% - Sigma, Saint Louis, US), Propan-2-ol (purity ≥ 99.5 % – Sigma, Steinheim, Germany) and Hydrochloric acid 32% (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the determination of the tissues viability.

For *in vitro* phototoxicity test, DMSO (purity ≥ 99.7% - Merck, US) was used for test items dilution and Calcium and Magnesium free HBSS (Hanks Balanced Salt Solution - GIBCO, Paisley, UK) was used for treatment administration in cells cultures (1/200) and cells washings. CPZ (Chlorpromazine hydrochloride, purity ≥ 98%, Sigma, China) was used as positive control. NR (Neutral red: 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, purity ≥ 90% - Sigma Aldrich, Switzerland), absolute ethanol (purity ≥ 99.8% - Merck, Darmstadt, Germany) and acetic acid (purity ≥ 99% - Chem-Lab, Zedelgem, Belgium) were used for the determination of cell viability.

For analytical analysis, absolute ethanol (purity ≥ 99.8%) and Propan-2-ol (purity ≥ 99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and Propan-1-ol (purity ≥ 99.8%) from Merck (Darmstadt - Germany). Impurities standards Pentanol -1, Isobutanol & Butanol-1 were purchased from Fisher Scientific (Illkirch – France) and Hexanol – 1 & Butanol-2 from Merck (Darmstadt - Germany).

2.2 Analytical methods

Verification of alcohol concentration in test items and control of possible impurities in alcohols was performed by Gas Chromatography (G.C.) equipped with flame ionization detector (FID), using external standard calibration.

2.2.1 Material

Analyses were performed with Agilent Technologies 6890N G.C. equipped with a column RTX 1301 (30m, internal diameter 0.53 mm, thickness 3 μ m) supplied by Restek (Lisses, France). G.C. conditions were: 1 μ l injected volume at 220°C, with a pressure of 3 psi and a split ratio of 1/15. Oven was set at 70°C and hold for 6 min, then increased to 150°C at a rate of 30°C/min and hold for 3 minutes. The FID temperature was 260°C, and the flame ratio Air/H₂: 450/45 mL/min. Helium was used as carrier gas.

2.2.2 Preparation of samples for analysis

Samples to check the alcohol concentrations were dilutions at 0.4% w/w of test items in (1) a mix water/Propan-2-ol (50:50;v/v) for Ethanol, (2) a mix water/Propan-1-ol (50:50;v/v) for Propan-2-ol, (3) Propan-2-ol alone for Propan-1-ol. Samples for control of possible impurities were injected without prior preparation/dilution. The resulting chromatogram was compared to a chromatogram obtained from injection of a mixture of Propan-1-ol complemented with Butan-2-ol, Isobutanol, Butan-1-ol, Pentanol and Hexanol (0.1 w/w each).

2.3 *In vitro* Skin irritation

2.3.1 Biological material

EpiSkin™ Small Model (Episkin SNC -Lyon, France) and VitroDerm, an in house model adapted from the method of Poumay *et al.* (2004) and developed by Thor Personal Care (Compiègne, France) were used. They are both RhE consisting of multilayered epithelium looking like *in vivo* epidermis.

The RhE from Episkin are derived from a 13-day culture period of adult human breast keratinocytes on a collagen matrix at the air-liquid interface. They were provided as kits of 12 RhE units (0.38 cm²) with both maintenance and assay media. All biological elements in the composition of the epidermis as well as the kit culture medium were tested before use for viral, bacterial, fungal and mycoplasmic sterility. Epidermises were produced according to ISO 9001 Standard, and each batch was delivered with a certificate of analysis issued by the manufacturer, including histology control and IC₅₀ determination for SDS. The inserts containing the RhE were shipped at room temperature in a 12-well plate filled with a semi-solid agarose-nutrient medium. Upon reception, they were transferred into 12-well plates containing a fresh culture medium and kept overnight at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified incubator, prior to exposure to test items.

The RhE provided by Thor Personal Care are derived from a 16-day culture period of young human foreskin primary cells (Lonza, Switzerland) and were cultured on specialized

culture inserts (polycarbonate membrane, Millipore, 0.6 cm²) with animal product-free culture conditions. Histology, Trans Epithelial Resistance (TEER) measurement and ET₅₀ determination with triton x100 were performed to characterize the batch of tissue. The batch of primary cells was tested before used for viral, bacterial, fungal and mycoplasmic sterility. The culture of the epidermises was performed without antibiotics to avoid hidden contaminations.

2.3.2 Protocol

Prior to treatment, coloring potential of chemicals and their ability to directly reduce MTT was assessed as described in OECD test guideline No. 439 (OECD, 2015). In our experiments, no coloring potential of test items was identified and no MTT solutions became blue. For the main treatment, 10 µL (for EpiSkin™ model) or 16 µL (for VitroDerm model) of each test item was applied in triplicate to the apical side of the tissues (EPISKIN Small: Ethanol-, Propan-2-ol- and Propan-1-ol- based products, at 60, 70, 80 or 85% w/w of alcohol, and CoF 2.5; VitroDerm: Propan-1-ol based products and CoF 2.5), using a nylon mesh to improve the treatment spreading. PBS as negative control was systematically used in each run to demonstrate the viability of the tissues and to provide the 100% viability baseline value. SDS 5% was tested as positive control to confirm the barrier function and resulting sensitivity of the tissues. After 15 minutes of exposure at room temperature, the tissues were rinsed twice using pre-warmed PBS, gently blotted on blotting paper and dried with sterile cotton swabs, and then transferred into wells containing maintenance medium and placed at 37°C for 42 hours into a 5 % CO₂ humidified incubator.

Due to alcohol volatility, an additional study in occlusive conditions was performed with the 3 alcohols, at 60 and 85 % w/w in water, by filming the plates (Parafilm “M” – Pechiney Plastic Packaging, Chicago, US) just after applying the test items. The parafilm was removed after the 15-minute treatment period, and RhE were rinsed and handled as described before. In addition, a control study was performed to compare the results issued from Propan-1-ol solutions at 60% w/w prepared from the 2 different sources (Brabant and Merck).

The tissues were evaluated for cell viability using the MTT assay. The inserts were transferred into wells containing MTT solution in assay medium (0.3 mg/mL for EpiSkin™ RhE and 0.5 mg/mL for VitroDerm) and kept for aprox. 3 hours in the 37°C, 5% CO₂ humidified incubator. Tissues were then placed in Eppendorf tubes containing 0.5 mL of acidified isopropanol for EpiSkin™ RhE or 1 mL of isopropanol for VitroDerm, and refrigerated at +5°C protected from light up to 72 hours in order to extract the resulting formazan. Tubes contents were then transferred after agitation into a 96-well plate (0.2 mL/well, in duplicate for each tube) for optical densities (OD) determination in a spectrophotometer, at 550 nm for EpiSkin™ RhE or 570 nm for VitroDerm, against a blank of acidic isopropanol or isopropanol, respectively.

2.3.3 Expression and interpretation of results

Relative cell viability was calculated for each treated tissue as percent of the mean of the negative control tissues. Criteria for assay acceptance were those defined in OECD guideline No. 439 and interpretation was done according to the guideline, with mean relative tissues viability above 50 % predicting a non-irritating potential of the test item and mean tissue viability less than or equal to 50% classifying the test item as irritant to skin Category 2 according to UN GHS (UN 2013).

Statistical analyses have been performed when data from repeated tests were available, with the SAS/STAT® 14.2 software using non-parametric tests. All comparisons between products or between percentages were performed using the Kruskal-Wallis Test (more than two classification levels). The exact tests were performed except in very few cases (non-convergence of the algorithm).

2.4 *In vitro* Phototoxicity Test

Prior to 3T3 NRU-PT, UV/VIS absorption spectra of the different test items (alcohols and RM1, RM2, RM3 & RM4) were determined, as phototoxicity test is theoretically conducted for the chemicals that show absorption spectra in UV/VIS region.

2.4.1 UV/VIS spectral analysis

UV/VIS absorption spectra (220–1000 nm) were measured according to OECD guideline No. 101 (OECD. 1981) using 10 mm path length quartz cuvettes in the Ultra-fast Absorbance Spectrometer SPECTROstar NANO (BMG LABTECH) interfaced to a PC for data processing (MARS Data Analysis Software). When possible, maximum molar extinction coefficients were calculated with the equation “absorbance = extinction coefficient x path length x molar concentration”.

2.4.2 *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test (3T3 NRU-PT)

2.4.2.1 Cells culture

The mouse fibroblast cell line, BALB/c 3T3, clone 31 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Each batch of cells was tested to confirm the absence of mycoplasma contamination and their UV sensitivity. The basic culture medium was MEM (Modified Eagle’s Medium - Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% new-born calf serum (ATCC), glutamine (Merck, Japan), penicillin (Sigma, Israël) and streptomycin (Sigma, China).

Cells from frozen stock cultures were seeded in culture medium and subcultured at least once before using them in the 3T3 NRU-PT.

2.4.2.2 Protocol

All test items handling was performed under light protection in order to avoid any photo-activation or degradation of the test item prior to irradiation. 3T3 NRU-PT was carried out as described in the OECD guideline No. 432 (OECD. 2004a) with minor modifications.

For CoF₁₀ mixture and RM1 to 4, a dose range finding (DRF) assay with 8 test item dilutions in DMSO (half dilution rate) was conducted to determine the maximal test concentration for the definitive assay. As for HAS, they were tested as such. Alcohols alone were not tested.

Due to solvent properties, treatments were administered to cells cultures at 0.5% v/v in HBSS. Osmolality and pH were checked (acceptable pH 6.5 - 7.8 and no more than 10 mOsmol variation of osmolality when compared with culture medium or solvent control) (data not shown). The stability of the different test items and the absence of precipitate or trouble during the test period (1 hour) were also checked. DMSO used as solvent for RMs and CoF₁₀ was also tested at 0.5% in HBSS (solvent control). Concurrently, CPZ was used as positive control. Both DRF and definitive assays followed the same protocol, except DRF was performed on a single culture while duplicate cultures were used in the definitive assay.

Two 96-well plates were prepared for each product, with 10⁴ cells/well (except peripheral wells which were used as blank with culture medium only), one for the determination of the cytotoxicity (absence of UV-radiations (-Irr)) and one for the phototoxicity (presence of UV-radiations (+Irr)). Cells were maintained in culture for 24 h for formation of monolayers and further incubated during 1 hour with the different treatments: 12 wells for the control solvent, and 6 wells per test-item (HAS) or test item dilution (RM1, RM2, RM3, RM4 and CoF₁₀). After 1-hour incubation period, the (+Irr) plates were irradiated at room temperature at 5 J/cm² with the BIOSUN solar irradiator (Vilbert Lourmat RMX3W) which includes a filter to remove potentially cytotoxic UVB wavelengths. Meanwhile, the (-Irr) plates were kept at room temperature in a dark box. The treatment medium was then replaced by culture medium and after 24 hours, a microscopic evaluation was performed using a 5-grade scale (data not shown). Cell viability was determined using the NRU technique: after culture medium removal, 100 µL of a 50 µg/mL NR in serum supplemented medium were added and the plates were incubated for approximately 3 hours. The NR medium was then removed, cells were washed twice with HBSS and lysed in NR desorb solution (ethanol:water:acetic acid / 50:49:1). The plates were gently shaken for 10 min until NR forms a homogeneous solution, and the NRU was measured as absorbance at 550 nm in a spectrophotometer, using blanks as reference.

2.4.2.3 Expression and interpretation of results

Relative cell viability obtained with and without irradiation for each test item was calculated as percent of the mean viability of the negative control cultures.

For test items tested at 8 different dilutions, the responses obtained in the presence and in the absence of UVA irradiation were compared at the IC₅₀ level (concentration inhibiting cell viability by 50% compared to solvent controls), by calculating the photo-irritation factor (PIF: IC₅₀ ratio (-Irr)/(+Irr)). When it was not possible to determine the IC₅₀, the mean photo effect (MPE) was determined (statistical comparison of the dose-response curves obtained with and without UV). The calculation of the IC₅₀, the PIF and MPE were done with software Phototox version 2.0 (OECD, 2004). For HAS tested without dilution, the viabilities with and without irradiation were compared by calculating the ratio (-Irr)/(+Irr).

Criteria for assay acceptance were defined based on OECD guideline No. 432 and historical data of the laboratory. Except for HAS, interpretation was also performed in accordance with the OECD guideline, with PIF > 5 or MPE > 0.15 predicting a potential phototoxic hazard; PIF < 2 or MPE < 0.1 in favor of no phototoxic hazard and in-between PIF & MPE values concluding to probably phototoxic hazard. For HAS, a ratio close to- or higher than- 1 was considered as a result in favor of no phototoxic potential.

3 Results

3.1 Analytical results

Alcohol-based test items used in the different experiments were checked to be all in a range of less than 5% of the theoretical alcohol concentration (data not shown). The presence of possible impurities in alcohols used for test items preparation was also checked. Similar chromatograms profiles were observed between reference and test items alcohol quality for both ethanol and propan-2-ol (Fig. 1 - A & A', B & B'). As for Propan-1-ol, the chromatogram analysis revealed the presence of several impurities in the sample used to prepare test items (Fig. 1 - C & C'), with molecular weight higher than the one of Propan-1-ol referring to the retention times (rT 7.176, 7.981, 9.270, 9.844 min). Injection of a mix of the known impurities with molecular weight higher than Propan-1-ol described in the monography 01/2008:2036 of European pharmacopeia showed that the impurities present in the Propan-1-ol test item were not Butan-2-ol, Isobutanol, Butan-1-ol, Pentanol nor Hexanol (respective rT 2.764, 3.205, 3.883, 6.831, 8.425) (Fig. 2).

3.2 *In vitro* Skin irritation in EpiSkin™ Small model

3.2.1 Water-based alcohols solutions

In non-occlusive conditions (Fig. 3), similar data profiles were obtained for both Ethanol and Propan-2-ol solutions, with no significant effect on relative RhE viabilities, and values higher than 80% whatever the concentration. In return, for Propan-1-ol, RhE viabilities were significantly and similarly impacted, with mean viabilities barely above 40%, except for the highest concentration (85 % w/w), at which no significant effect was observed, with a mean relative viability of $72.65 \pm 7\%$. Statistical analyses confirmed that at least one mean value among the 12 means was statistically different from the other ones ($p < 0.05$). However, the complementary analyses performed to make comparisons between the different alcohols at one concentration or between the different concentrations of one alcohol did not show any statistically significant differences, presumably in relation with a lack of power linked to too few data.

Treatment in occlusive conditions (Table 1) lead to lower RhE viabilities but did not significantly modify the response profiles. Indeed, at both 60 and 85%, RhE viabilities for Ethanol and Propan-2-ol were still notably higher than 50%, while treatment with 60% w/w of Propan-1-ol significantly reduced viabilities with values lower than 50%. At 85 % w/w of Propan-1-ol, viability was slightly higher than 50%.

Regarding the 2 sources of Propan-1-ol tested at 60% w/w, no biologically significant difference in RhE viabilities could be observed, with mean relative RhE viabilities following treatment with the quality used for test items preparation (including impurities) and laboratory reagent quality of $42.4 \pm 11.4\%$ and of $36.3 \pm 8.4\%$, respectively.

3.2.2 Hydro-alcoholic solutions (HAS)

The mean cell viabilities ($\% \pm SD$) issued from the different experiments are given in Fig. 4. In the presence of co-formulates, all RhE viabilities were higher than 50% for both Ethanol- and Propan-2-ol- based HAS, in favor of non-irritant properties, as Ethanol and Propan-2-ol in water. For Propan-1-ol- based HAS, except for the lowest concentration at which RhE viability was significantly impacted (mean value of $\pm 20\%$), the presence of co-formulates allowed higher RhE viabilities in comparison with Propan-1-ol alone, in favor of non-irritant properties of these HAS for the 3 concentrations of 70, 80 & 85%.

3.3 *In vitro* Skin irritation in VitroDerm model

In order to ensure that the cytotoxic effect observed with Propan-1-ol was not specifically linked to a type of RhE, independent experiments were carried out using VitroDerm model.

When using this RhE, Propan-1-ol, in the presence or absence of co-formulates, whatever the alcohol content, lead to mean viabilities close to 100% and was thus not considered as irritant (Fig. 5).

3.4 Phototoxicity

3.4.1 UV/VIS spectrum

As expected, the absorption spectra of the 3 alcohols Ethanol, Propan-2-ol and Propan-1-ol did not show any absorbance, with OD values more or less equal to 0 whatever the wave length (covered wave-lengths ranged from 220 to 1000 nm) (data not shown). As for RM1 to RM4, low absorbance was observed in UVB/UVC with maximum OD values of 3.5 at wave lengths ranged between 250 and 310 nm for RM1, between 220 and 290 nm for RM3 and at 240 nm for RM4. For RM2, absorbance was lower, with OD value less than 1.3 at 220 nm (Fig. 6).

Maximum molar extinction coefficients were estimated to 0.99 for RM1, 0.11 for RM2 and 0.22 for RM4. It could not be calculated for RM3 due to unknown molecular weight.

3.4.2 3T3 NRU-PT assay

3.4.2.1 Co-formulates alone and in mixture

In the DRF study, the toxicity profiles were the same for two RM (RM1 and RM3) in both irradiated (+Irr) and non-irradiated cultures (-Irr), as illustrated by the cell viability curves with similar IC₅₀ values (0.23 & 0.24 % v/v for RM1 and 0.23 & 0.21 for RM3) (Fig. 7 - A & C), and PIF values close to 1 (0.978 for RM1 and 1.07 for RM3). Microscopic observations were well correlated to viability measurements (data not shown). For the 2 other RM (RM2 and RM4), in both (-Irr) and (+Irr) culture conditions, microscopic examination did not show any cellular damage whatever the tested concentrations (data not shown), and this was confirmed with the viability values all equal or close to 100% and PIF values estimated to 1 in the absence of IC₅₀ values (Fig. 7 – B (RM2) – data not shown for RM4). Although DRF study is not dedicated to conclude on photo-toxicity results, these non-ambiguous results with identical toxicological profiles in both irradiated and non-irradiated conditions were in favor of the absence of photo-toxicity potential. It was not considered meaningful to perform a definitive assay to confirm these results.

For CoF₁₀, both DRF and definitive assay did not show any significant difference between cell viability curves with or without UV-irradiation, as illustrated by PIF values inferior to 2 (1.455 in the DRF assay and 1.251 & 1.124 in the definitive assay) and MPE close to 0. Cell

viabilities curves in the definitive assay, which was performed on a smaller concentration range according to DRF results, well illustrate the absence of photo-toxicity induced by this mixture (Fig. 7 - D).

3.4.2.2 Hydro-alcoholic solutions (HAS)

The direct microscopic examination revealed no cytotoxicity either with or without irradiation, whatever the alcohol type and concentration in HAS. These observations were confirmed by the cell viability determination. Results expressed as the mean irradiated cultures relative viability compared to non-irradiated cultures were around 100% (Table 2), meaning a lack of cytotoxicity, in favor of the absence of photo-toxic potential.

4 Discussion

In vitro Skin irritation results

The *in vitro* skin irritation test is a validated alternative, non-animal method to the Draize rabbit skin irritation test for determining the skin irritation potential of chemicals (OECD Technical Guidance No. 439 (OECD, 2015, first published in 2010)). In our experiments, 3 low aliphatic alcohols, namely Ethanol, Propan-2-ol and Propan-1-ol, at 4 different concentrations in water (60, 70, 80 or 85% w/w) were tested using EpiSkin™ Small Model as RhE, one of the validated model of the OECD guideline No. 439. Corresponding HAS declined with the same alcohol types and different concentrations in the presence of co-formulates were tested as well. Our endpoint was the RhE viabilities assessed through MTT reduction.

Following RhE exposure to alcohols in water, Ethanol and Propan-2-ol solutions (60 to 85% w/w) did not display cytotoxic properties, whereas Propan-1-ol solutions at some extent (60, 70 and 80% w/w in water on EpiSkin™ Small Model but not at 85% w/w) induced significant cytotoxicity, with RhE viabilities lower than 50% (Fig. 3). These results do not appear to be in accordance with *in vivo* published experimental data on irritating properties of Propan-1-ol either in animals or in humans. Indeed, available data on this alcohol are in majority in favor of non-irritating properties to skin as for Ethanol and Propan-2-ol and no difference in response profile could be identified between Propan-1-ol versus the 2 other alcohols (Haddock & Wilkin 1982, Löffler *et al.* 2007). In fact, cutaneous reactions were only reported in studies investigating the impact of skin moisturizing status on dermal tolerance to alcohols. Local erythema were observed after Ethanol, Propan-2-ol or Propan-1-ol solutions (100%) topically applied by patch during 10 minutes on previously hydrated skin (through a 10-minute immersion of fore-arm in a water bath at 33°C) in 19 out of 22 volunteers, whereas no skin response was exhibited by the same 22 volunteers following the same treatment on non-hydrated skin (Haddock & Wilkin 1982). Cutaneous erythema were also reported after 5-minute exposure to patches with 75% Ethanol or 75% Propan-1-ol

solutions on previously hydrated skin (Haddock & Wilkin 1982, Wilkin & Stewart 1987), with a slightly higher incidence with Propan-1-ol (9 volunteers with positive reactions for Propan-1-ol against 5 for Ethanol, out of 12 participants). Slight effects of Propan-1-ol solutions on Trans Epidermal Water Loss (TEWL) were also described on pre-irritated skin by detergent (Lubbe *et al.* 2001). TEWL reflects permeability barrier status, the natural skin water loss of the skin linked to passive diffusion and insensible perspiration being enhanced when skin barrier is impaired (Fluhr *et al.* 2006). However, in this study, the TEWL changes were not different than the one of water, excluding propan-1-ol related effect.

All the other data converge to non-irritant properties. Ethanol tested in animals for skin irritation was not irritant to skin (Jacobs & Martens 1992, Phillips *et al.* 1972), Propan-2-ol as well (Nixon *et al.* 1975, Bagley *et al.* 1996) and also Propan-1-ol (Smyth *et al.* 1954, ECB 2008). Except the previously mentioned studies investigating hydration impact, human studies are in favor of non-irritant or rather low irritant potential of these 3 alcohols. In a study conducted in 15 human volunteers in order to investigate possible skin reactions caused by these 3 different alcohols at different concentrations from 60 to 99%, no skin irritation (assessed by erythema and TEWL following repeated exposure by 24-hour occlusive patches over 2 days with 60, 70, 80, 90 and 99% alcohol solutions) but only a drying effect was observed (Löffler *et al.* 2007). Several other studies conducted with Ethanol (concentrations ranged from 9.5% to 100%) topically applied in volunteers by patch over periods of several hours to several days confirm that Ethanol displays a good skin compatibility (Phillips *et al.* 1972, Haddock & Wilkin 1982, Basketter *et al.* 2004). Same profile is applicable to Propan-2-ol according to results of human studies testing 100% alcohol solutions by patch over 10 min to 4 hours (Nixon *et al.* 1975, Haddock & Wilkin 1982, Basketter *et al.* 2004).

This literature review suggests that the results obtained with the *in vitro* OECD guideline No. 439 irritation test for Propan-1-ol with EpiSkin™ Small Model may not be actually predictive of a real irritating effect of this alcohol.

In the current study, we observed differences between alcohols and, for propan-1-ol, even between tested concentrations. We aimed at formulating several hypotheses and investigated some of them, as depicted hereafter.

First assumptions were made in relation with possible bias due to the limitations of the *in vitro* 3D model.

In contrast to *in vivo* experiments, RhE models do not allow the assessment of skin irritation through clinical signs such as edema and erythema, which involve a complex chain of biochemical, neural and cellular responses with an implication of the endothelial cells of the surface blood vessels (Van de Sandt *et al.* 1999). It is also assume that *in vivo* defense mechanisms which may be able to stop irritation initiating events taking place at epidermis level cannot occur in RhE, thus leading to irritating signs in this EpiSkin™ Small model whereas it should not have occurred at global skin organ level in living organism.

At epidermal level in relation with RhE model, specificity may be impacted by the barrier function of the model known to be less efficient than the real skin. This lower barrier function has been demonstrated in the commercially available models: EpiSkin™, SkinEthic™, and EpiDerm™ (Netzlaff *et al.* 2005, Netzlaff *et al.* 2007). It is noteworthy to mention that the OECD guideline No. 428 related to skin penetration (OECD. 2004b) as well as the more recent opinions adopted by SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) and EFSA Panel on Plant Protection Products (European Food Safety Authority) on cutaneous absorption (SCCS 2010, EFSA 2012) do not recommend the use of RhE, in relation with higher penetration rates than the ones measured with excised complete skin (Ponec 1992, Perkins *et al.* 1999, Schmook *et al.* 2001, Netzlaff *et al.* 2007). In irritation test, this higher penetration rate may lead to over-estimation of actual irritant properties. In our experiments, if there may be a causal relationship with barrier function, it cannot be dissociated to specific properties of Propan-1-ol at some dilutions, as RhE viability was not impacted by the different tested solutions of the 2 other alcohols nor by Propan-1-ol at 85% in water.

Another important aspect is the skin metabolism potency in general and for alcohols in particular. When in contact with skin, the chemical substances may be subject to metabolic degradation, since many enzymatic systems have been identified in the skin (Kao 1988, Kao & Carver 1991, Ahmad & Mukhtar 2004, Oesch *et al.* 2007, Wiegand *et al.* 2014).

As far as alcohols are concerned, metabolism involves mainly alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH), and some of these oxydo-reductases have been identified in living skin: ADH1B, ADH4, ADH class-3, ALDH1A1, ALDH1L1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH9A1, ALDH1B1, ALDH1A3 (Hu *et al.* 2010; Van Eijl 2012). Other metabolism pathway implying enzymes of the cytochrome P450 family can also take place in alcohol metabolism, notably CYP2E1 for Ethanol and Propan-1-ol, and the corresponding CYP2E1 protein could be identified in fresh human skin as well (Hu *et al.* 2010). EpiSkin™ model has shown to partly exhibit the metabolic capability of native human skin (Luu-The *et al.* 2009, Van Eijl *et al.* 2012, Hewitt *et al.* 2013). Among others, ADH and ALDH have been identified at protein level for some types: ADH3, ALDH2, ALDH3A2, ALDH9A1 (Van Eijl *et al.* 2012). CYP2E1 has been identified as well, but at very low level. One hypothesis in the difference of RhE viabilities observed after treatment with the 3 different alcohols would be in the difference of metabolic capabilities of the RhE towards these alcohols, with possible impaired metabolism of Propan-1-ol in comparison with living skin. Such hypothesis can be supported by the clinical study conducted by Wilkin & Fortner (1985), where skin reactions were observed following treatment with Propan-1-ol with 1-hour pretreatment with hydrophilic ointment whereas no skin reaction occurred when the 1-hour pretreatment was including an ADH inhibitor (4-methylpyrazole solution at 40%) hydrophilic ointment. However, if this assumption appears plausible, the observed results lead us to suppose that this metabolism aspect would be dependent of other parameter such as alcohol or water concentration, as similar results were not observed for the highest tested concentration of 85% w/w.

Also, it is of interest to mention the study of Jirova *et al.* (2010) assessing the accuracy of *in vitro* test method with human *in vivo* results (the 4-h human patch test). They concluded to a level of concordance of 70% with EpiSkin™ (100% sensitivity *i.e.* 3 out of 3 irritants in humans correctly classified but 65% specificity only: 13 of 20 non-irritants in humans correctly identified) and 76% with EpiDerm™ (80% sensitivity *i.e.* 4 out of 5 human irritants correctly classified and 75% specificity: 15 of 20 human non-irritants correctly identified).

To understand if our results could be related to a possible lack of specificity of the EpiSkin™ Small Model towards Propan-1-ol, we performed additional tests with another RhE model, namely VitroDerm from Thor Personal Care. In this experiment, no cytotoxicity at all to RhE could be observed with Propan-1-ol-based test items (Fig. 5). One possible explanation of the observed difference can be the nature of the basement membrane used for the RhE production, an inert one in polycarbonate for VitroDerm, against a biochemical one with collagen matrix for EpiSkin™ Small Model. In the latter one, there is probably a higher retention/absorption rate of test item, which is possibly not fully eliminated during the rinsing step, leading indirectly to a higher contact time of the EpiSkin™ RhE with test item in comparison with VitroDerm model. Another explanation can also be related to the type of cells that are used to generate the RhE (adult human breast keratinocytes for EpiSkin™ Small Model, and young human foreskin primary cells for VitroDerm).

As the EpiSkin™ RhE viabilities were significantly impacted with only one of the 3 tested alcohols, second series of hypothesis we expressed to explain our results are in relation with the test items themselves. Two hypothesis were investigated, one in relation with physicochemical properties of the 3 alcohols, the second one in relation with possible different impurities profiles of the 3 alcohols used to prepare the test items.

Looking at boiling point and vapor pressure (P) to appraise a chemical volatility, Propan-1-ol appears to be the less volatile alcohol among these 3 alcohols (Table 3). We therefore investigated the impact of the volatility on our results to understand if the difference in volatility profile could be one of the factors responsible for the difference of RhE viabilities obtained after exposure to the 3 alcohols. The additional experiment in occlusive conditions lead to similar results, with the same difference between alcohols: Propan-1-ol versus Ethanol/Propan-1-ol, thus rejected the hypothesis of volatility-related results.

The second investigated hypothesis was the possible presence of impurity(ies) in test items and, if any, their implication. Gas chromatography analysis identified the presence of several impurities in the first Propan-1-ol quality used for test items preparation. The complementary test using the two Propan-1-ol qualities lead to the same response profiles, allowing us to exclude the hypothesis of impurities-related results.

Other hypothesis can be derived from irritation initiating events at epidermal level. Welss *et al.* (2004) published an interesting paper summarizing current presumptions on the initiating steps of skin irritation. At the epidermis level, it is accepted that chemical irritants

can act by at least two distinct pathways, firstly via damage to the barrier function of the *stratum corneum* (SC) and secondly by direct effects on cells of the skin. The SC is the outermost layer of the epidermis, made of dead corneocytes tightly connected by desmosomes, and embedded in the inter-cellular lipid matrix (so-called “lipid cement”), consisting mainly of ceramides and neutral lipids such as free cholesterol, cholesterol esters and free fatty acids. Irritants entering the SC can lead to alteration of the lipid cement and protein denaturation, resulting in loss of the barrier function with enhanced TEWL and increased penetration of irritants in epidermis to living keratinocytes. At these layer levels, different mechanisms have been identified, among them disruption of cell membranes resulting in the release of cytoplasm including the pro-inflammatory cytokines IL-1 α . Alterations in the physiology of keratinocytes, with possible oxidative stress response to irritants can also occur. Another possible mechanism includes the modulation of the liposomal bilayer of cell membranes, leading to impairment of membrane fluidity which might impact receptor-mediated signal transduction supporting or initiating irritant responses. It seems also possible that interactions of chemicals with intracellular or membrane-bound proteins damage keratinocytes either directly or indirectly by alteration of the epidermal environment (*e.g.* pH-values). Modification to trans-membranous receptors may also result in an altered signal transduction leading to irritant responses.

Looking at Octanol/water partition coefficients (Log P_{ow}), Propan-1-ol displays the highest value of Log P_{ow} (0.25 to 0.34 for Propan-1-ol, 0.05 for Propan-2-ol and -0.31 for Ethanol), assuming Propan-1-ol has higher ability of penetration through SC in comparison with Ethanol or Propan-2-ol, giving more possibilities to initiate one or more of the above mentioned irritating events. Out of them, lipid cement alteration is a plausible one. Alcohols are known for their solvent properties, and, when applied on skin, this will disturb the balance of the different lipids in the SC, resulting in an altered inter-cellular lipid matrix (Van de Sandt *et al.* 1999, Welss *et al.* 2004). It is likely that the lipid-dissolving action of alcohols is reduced by dilution in water (Kownatzki 2003). This is coherent with the results obtained with Ethanol tested on a model membrane composed of lipids representing the three classes of SC lipids (equimolar mixture of ceramide, palmitic acid and cholesterol). Using infrared and deuterium NMR spectroscopy as well as calorimetry, ethanol was found to be a fluidizer of the SC lipids and could even achieve lipid extraction with increasing concentration ($\geq 30\%$) (Kwak *et al.* 2012). However, again, this is not fully coherent with our results; indeed, even if the observed RhE viabilities were impacted by the alcohol with the highest Log P_{ow} , it only occurred at the 3 lower doses.

As mentioned before with published data from Haddock & Wilkin (1982) and from Wilkin & Stewart (1987), skin hydration may impact skin response to alcohols, with skin reaction observed on previously hydrated skin whereas no skin reaction could be observed on “normal” non-hydrated skin. This can be put together with Warner *et al.* (2003) studies on SC ultrastructure, where they could conclude that extended water exposure induces

disruption of SC intercellular lipid lamellae, forms large pools of water in the intercellular space and creates corneocyte separations.

It makes no doubt that irritation can be the result of several events. The fact this difference in response depending on the concentration was not observed with the 2 other alcohols nor in another RhE model lead us to think that the observed results are the resultant of multiple events. This possibly combines metabolic aspects, chemical characteristics and threshold effect for biological events depending on water content, in addition to less efficient skin barrier in RhE models than in the real life skin. When performing *in vitro* irritation test, it should be kept in mind of possible limits of test's predictability, especially among others for organic low aliphatic carbon chain alcohols, with the interest to implement a concurrent assay on another validated model before concluding on classification and/or performing any complementary tests.

Marketed end products are commonly formulated with hydrating, emollient and skin protective agents in addition to alcohol(s), in coherence with many studies which demonstrated that the drying effect of alcohol can be reduced or eliminated by adding emollients, humectants, or other skin conditioning agents to the formulations (Boyce & Pittet 2002, Yamamoto *et al.* 2010). We therefore investigated experimental HAS as well, in order to be more representative of real life. HAS used as test items were all specifically prepared with the same mixture of co-formulates, typically ones commonly used in HAS (Boyce & Pittet 2002). In the context of toxicological assessment, HAS were formulated with an overall quantity of these co-formulates in excess (+/- 3-fold factor) in comparison with real marketed end-products. A preliminary test was performed in order to confirm that this concentration in excess was without any significant effect on RhE viabilities. For the 3 different alcohol types tested on EpiSkinTM Small Model, the worst results were observed with the lowest concentration of alcohol (60% w/w), with a much more significant effect with Propan-1-ol based HAS in comparison with the two other alcohols types (Fig. 4). However, this cytotoxic effect at 60% of Propan-1-ol in HAS was not reproduced with the VitroDerm RHE model (Fig. 5). Reasons for these results are not identified and same hypothesis as the ones expressed before could be given. For the 3 other tested concentrations, RhE exposure to HAS did not lead to significant RhE viability changes.

Phototoxicity results

Phototoxicity is defined as a light-induced damage to cells triggered or exacerbated after exposure of the skin to light, in relation with a topically applied substance or after systemic exposure (Kim *et al.* 2015). Despite there is no reported clinical photoirritation cases in the literature with alcohols or ABHR, any phototoxicity potential should be anticipated because it would be of concern as ABHR use cannot be dissociated from skin exposure to light.

In the current study, the alcohols alone were not tested, based on their frequent use as solvent with no reported phototoxicity concern in literature and their non-absorbance

property in UV/VIS. We tested RM1 to 4 alone and in mixture, in addition to HAS. None of these test items showed phototoxic potential, when tested according to 3T3 NRU assay. This is consistent with the UV/VIS spectra absorbance profiles obtained with the test items, which showed no or little absorbance, and the estimated molar extinction coefficients. Indeed, phototoxicity is the result of the absorption of photons (UVA mainly but also UVB) and absorbed energy by photoactive chemicals and it was suggested that if the molar extinction/absorption coefficient of a chemical is less than $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, it is unlikely to be photoreactive (Bauer *et al.* 2014).

Anyway, as the objectives of our study were to compare the 3 alcohols and to investigate the possible potentiation due to the presence of co-formulates for which no information regarding phototoxic potential was available, it was interesting to perform the assay and confirm that phototoxicity is not of concern with these products.

5 Conclusion

The aim of our experiments was to identify possible local tolerance differences between the 3 alcohols commonly used in the ABHR (Ethanol, Propan-2-ol & Propan-1-ol) and/or between different alcohol concentrations ranged between 60 and 85% w/w, as usually present in these products. Methods used in the current study were voluntarily *in vitro* validated alternative methods, allowing assessment of acute irritation (neither cumulative nor sensory irritation) and phototoxicity. The only difference we observed was with water-based alcohol products tested on EpiSkin™ Small Model, with no significant effect on RhE viability for both ethanol- and propan-2-ol- based products, whereas propan-1-ol at 60, 70 or 80% w/w in water lead to significant RhE viabilities impairment, with mean values close to 40% (no significant impact observed at 85% w/w). However, considering that this was not reproduced using another RhE model (VitroDerm) and that bibliographic data on Propan-1-ol are not in favor of irritant properties, we reasonably consider that Propan-1-ol cytotoxic results in EpiSkin™ are the result of a lack of specificity of this RhE model for this chemical class. Further investigations would be necessary to explain these observations, like lipid solubilizing test in the two used RhE, in relation with alcohol solvent properties, and it should be kept in mind of possible limits of the *in vitro* irritation test's predictability, especially among others for organic low aliphatic carbon chain alcohols. Anyway, it allows concluding that in case of significant result observed in a specific model, it may be of interest to implement a concurrent assay on another validated model before concluding on classification and/or performing any complementary tests.

Considering our results on Propan-1-ol as misleading results, and looking at all the other results, no significant difference in terms of local tolerance could be identified between the 3 alcohols in spite of increased concentrations, with data in favor of a good skin tolerance. No acute skin irritation nor phototoxicity are expected for human beings dermally exposed

to these 3 alcohols as supplied to health-care workers in alcohol-based hand rubs for hand hygiene.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests.

Acknowledgements

This research was supported by Laboratoires ANIOS, French company specialized in the disinfectant products. The authors thank Carole Mequinion and Killian Privat for their technical support, Jean Noel Bertho and Yann Rigaut from Laboratoires ANIOS for providing testing products and analytical controls.

References

- Ahmad, N. & H. Mukhtar (2004) Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases. *J Invest Dermatol*, 123, 417-25.
- Al-Otaibi, S. T. & H. A. M. Alqahtani (2015) Management of contact dermatitis. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, 19, 86-91.
- Anon (1998) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxic potential). *ATLA* 26, 7-8.
- Bagley, D. M., J. R. Gardner, G. Holland, R. W. Lewis, J. F. Regnier, D. A. Stringer & A. P. Walker (1996) Skin irritation: Reference chemicals data bank. *Toxicol In Vitro*, 10, 1-6.
- Basketter, D. A., M. York, J. P. McFadden & M. K. Robinson (2004) Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis*, 51, 1-4.
- Bauer, D., L. A. Averett, A. De Smedt, M. H. Kleinman, W. Muster, B. A. Pettersen & C. Robles (2014) Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 68, 70-5.
- Berardesca, E. & F. Distanto (1994) The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis*, 31, 281-7.
- Boyce, J. M. & D. Pittet (2002) Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Am J Infect Control*, 30, S1-46.
- Chew, A. L. & H. I. Maibach (2003) Occupational issues of irritant contact dermatitis. *Int Arch Occup Environ Health*, 76, 339-46.
- Deleo, V. A. (2004) Photocontact dermatitis. *Dermatol Ther*, 17, 279-88.
- ECB (2008) Propan-1-ol. European Union Risk Assessment Report - part II Human Health. European Chemicals Bureau 82, 104-226.
- ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Statement (2007) Statement on the Validity on In vitro Tests for Skin Irritation, ESAC 26th Meeting 26-27th April, 2007
- EFSA (2012) EFSA Panel on Plant Protection Products (PPR), Guidance on Dermal Absorption. *EFSA Journal*, 10.
- English, J. S. (2004) Current concepts of irritant contact dermatitis. *Occup Environ Med*, 61, 722-6, 674.
- Epstein, J. H. (1983) Phototoxicity and photoallergy in man. *J Am Acad Dermatol*, 8, 141-7.
- EU (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (Text with EEA relevance), pp. 26-35 OJ L 066 of 11032003.

- EU. B.41. (2008) IN VITRO 3T3 NRU PHOTOTOXICITY TEST. Council Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). Official Journal of the European Union, 51.
- EU (2009) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance), pp. 59-209 OJ L 342 of 22122009.
- Fluhr, J. W., K. R. Feingold & P. M. Elias (2006) Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol*, 15, 483-92.
- Gonzalez, E. & S. Gonzalez (1996) Drug photosensitivity, idiopathic photodermatoses, and sunscreens. *J Am Acad Dermatol*, 35, 871-85; quiz 886-7.
- Gould, D. (2003) Occupational Irritant Contact Dermatitis in Healthcare Workers - Meeting the Challenge of Prevention. Business briefing: european pharmacotherapy 2003.
- Gould, J. W., M. G. Mercurio & C. A. Elmets (1995) Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *J Am Acad Dermatol*, 33, 551-73; quiz 574-6.
- Haddock, N. F. & J. K. Wilkin (1982) Cutaneous reactions to lower aliphatic alcohols before and during disulfiram therapy. *Arch Dermatol*, 118, 157-9.
- Halioua, B., L. Bensefa-Colas, B. Bouquiaux, M. N. Crepy, H. Assier, S. Billon & O. Chosidow (2012) Occupational contact dermatitis in 10,582 French patients reported between 2004 and 2007: a descriptive study. *Dermatology*, 225, 354-63.
- Hewitt, N. J., R. J. Edwards, E. Fritsche, C. Goebel, P. Aeby, J. Scheel, K. Reisinger, G. Ouedraogo, D. Duche, J. Eilstein, A. Latil, J. Kenny, C. Moore, J. Kuehnl, J. Barroso, R. Fautz & S. Pfuhler (2013) Use of human in vitro skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Toxicol Sci*, 133, 209-17.
- Hu, T., Z. S. Khambatta, P. J. Hayden, J. Bolmarcich, R. L. Binder, M. K. Robinson, G. J. Carr, J. P. Tiesman, B. B. Jarrold, R. Osborne, T. D. Reichling, S. T. Nemeth & M. J. Aardema (2010) Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDermin vitro 3D human epidermis model compared to human skin. *Toxicol In Vitro*, 24, 1450-63.
- INRS (2012) Fiche toxicologique FT 0. INRS Paris, 29p.
- Jacobs, G. A. & M. A. Martens (1992) OECD Skin Irritation Tests on Three Alcohols. *International Journal of Toxicology*, 11, 733.
- Jirova, D., D. Basketter, M. Liebsch, H. Bendova, K. Kejlova, M. Marriott & H. Kandarova (2010) Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis*, 62, 109-16.
- Kao, J. (1988) Estimating the contribution by skin to systemic metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 548, 90-6.
- Kao, J. & M. P. Carver (1991) Skin metabolism. in *Dermatotoxicology*, Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. (eds), Hemisphere Publishing Corporation, New York, pp. 143-200
- Kim, K., H. Park & K. M. Lim (2015) Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicol Res*, 31, 97-104.
- Kownatzki, E. (2003) Hand hygiene and skin health. *J Hosp Infect*, 55, 239-45.
- Kwak, S., E. Brief, D. Langlais, N. Kitson, M. Lafleur & J. Thewalt (2012) Ethanol perturbs lipid organization in models of stratum corneum membranes: An investigation combining differential scanning calorimetry, infrared and (2)H NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1818, 1410-9.
- Larson, E., R. Girard, C. L. Pessoa-Silva, J. Boyce, L. Donaldson & D. Pittet (2006) Skin reactions related to hand hygiene and selection of hand hygiene products. *Am J Infect Control*, 34, 627-35.
- Löffler, H., G. Kampf, D. Schermund & H. I. Maibach (2007) How irritant is alcohol? *British Journal of Dermatology*, 157, 74-81.
- Lubbe, J., C. Ruffieux, G. van Melle & D. Perrenoud (2001) Irritancy of the skin disinfectant n-propanol. *Contact Dermatitis*, 45, 226-31.

- Luu-The, V., D. Duche, C. Ferraris, J. R. Meunier, J. Leclaire & F. Labrie (2009) Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models EpiSkin and full thickness model from EpiSkin. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 116, 178-86.
- Mathias, C. G. & H. I. Maibach (1978) *Dermatotoxicology monographs I. Cutaneous irritation: factors influencing the response to irritants.* *Clin Toxicol*, 13, 333-46.
- Netzlaff, F., C. M. Lehr, P. W. Wertz & U. F. Schaefer (2005) The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*, 60, 167-78.
- Netzlaff, F., M. Kaca, U. Bock, E. Haltner-Ukomadu, P. Meiers, C. M. Lehr & U. F. Schaefer (2007) Permeability of the reconstructed human epidermis model EpiSkin in comparison to various human skin preparations. *Eur J Pharm Biopharm*, 66, 127-34.
- Nixon, G. A., C. A. Tyson & W. C. Wertz (1975) Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicol Appl Pharmacol*, 31, 481-90.
- OECD. (1981) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 101: UV-VIS Absorption Spectra. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, adopted 12 May 1981.
- OECD. (2004a) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, adopted 13 April 2004
- OECD. (2004b) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 428: Skin absorption: in vitro method. . Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, adopted 13 April 2004.
- OECD. (2015) OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, adopted 28 July 2015.
- Oesch, F., E. Fabian, B. Oesch-Bartlomowicz, C. Werner & R. Landsiedel (2007) Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab Rev*, 39, 659-98.
- Perkins, M. A., R. Osborne, F. R. Rana, A. Ghassemi & M. K. Robinson (1999) Comparison of in vitro and in vivo human skin responses to consumer products and ingredients with a range of irritancy potential. *Toxicol Sci*, 48, 218-29.
- Phillips, L., 2nd, M. Steinberg, H. I. Maibach & W. A. Akers (1972) A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicol Appl Pharmacol*, 21, 369-82.
- Ponec, M. (1992) In vitro cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int J Cosmet Sci*, 14, 245-64.
- Poumay, Y., F. Dupont, S. Marcoux, M. Leclercq-Smekens, M. Herin & A. Coquette (2004) A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res*, 296, 203-11.
- SCCS. (2010) Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. In SCCS/1358/10 adopted 22 June 2010.
- Schmook, F. P., J. G. Meingassner & A. Billich (2001) Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm*, 215, 51-6.
- Smyth, H. F., Jr., C. P. Carpenter, C. S. Weil & U. C. Pozzani (1954) Range-finding toxicity data: list V. *AMA Arch Ind Hyg Occup Med*, 10, 61-8.
- Spielmann, H., M. Balls, M. Brand, B. Doring, H. G. Holzhutter, S. Kalweit, G. Klecak, H. L. Eplattenier, M. Liebsch, W. W. Lovell, T. Maurer, F. Moldenhauer, L. Moore, W. J. Pape, U. Pfanenbecker, J. Potthast, O. De Silva, W. Steiling & A. Willshaw (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol In Vitro*, 8, 793-6.
- Spielmann, H., M. Liebsch, W. J. Pape, M. Balls, J. Dupuis, G. Klecak, W. W. Lovell, T. Maurer, O. De Silva & W. Steiling (1995) EEC/COLIPA in vitro photoirritancy program: results of the first stage of validation. *Curr Probl Dermatol*, 23, 256-64.
- Spielmann, H., M. Balls, J. Dupuis, W. J. Pape, G. Pechovitch, O. de Silva, H. G. Holzhutter, R. Clothier, P. Desolle, F. Gerberick, M. Liebsch, W. W. Lovell, T. Maurer, U. Pfanenbecker, J. M. Potthast, M. Csato, D. Sladowski,

- W. Steiling & P. Brantom (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Toxicol In Vitro*, 12, 305-27.
- Spielmann, H., S. Hoffmann, M. Liebsch, P. Botham, J. H. Fentem, C. Eskes, R. Roguet, J. Cotovio, T. Cole, A. Worth, J. Heylings, P. Jones, C. Robles, H. Kandarova, A. Gamer, M. Remmele, R. Curren, H. Raabe, A. Cockshott, I. Gerner & V. Zuang (2007) The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. *Altern Lab Anim*, 35, 559-601.
- UN (2013) United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Fourth revised edition, UN New York and Geneva.
- Van de Sandt, J., R. Roguet, C. Cohen, D. Esdaile, M. Ponc, E. Corsini, C. Barker, N. Fusenig, M. Liebsch, D. Benford, B. de Fraissinette Ade & M. Fartasch (1999) The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *Altern Lab Anim*, 27, 723-43.
- Van Eijl, S., Z. Zhu, J. Cupitt, M. Gierula, C. Gotz, E. Fritsche & R. J. Edwards (2012) Elucidation of xenobiotic metabolism pathways in human skin and human skin models by proteomic profiling. *PLoS One*, 7, e41721.
- Warner, R. R., K. J. Stone & Y. L. Boissy (2003) Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure. *J Invest Dermatol*, 120, 275-84.
- Welss, T., D. A. Basketter & K. R. Schroder (2004) In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro*, 18, 231-43.
- WHO (2009) WHO guidelines on hand hygiene in health care - First global patient safety challenge Clean care is safer care. ISBN 978 92 4 159790 6. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
- Wiegand, C., N. J. Hewitt, H. F. Merk & K. Reisinger (2014) Dermal xenobiotic metabolism: a comparison between native human skin, four in vitro skin test systems and a liver system. *Skin Pharmacol Physiol*, 27, 263-75.
- Wilkin, J. K. & G. Fortner (1985) Cutaneous vascular sensitivity to lower aliphatic alcohols and aldehydes in Orientals. *Alcohol Clin Exp Res*, 9, 522-5.
- Wilkin, J. K. & J. H. Stewart (1987) Substrate specificity of human cutaneous alcohol dehydrogenase and erythema provoked by lower aliphatic alcohols. *J Invest Dermatol*, 88, 452-4.
- Yamamoto, N., K. Miyamoto & M. Katoh (2010) [Development of alternative to animal experiment in evaluation of skin irritation caused by alcohol-based hand rubs]. *Yakugaku Zasshi*, 130, 1069-73.

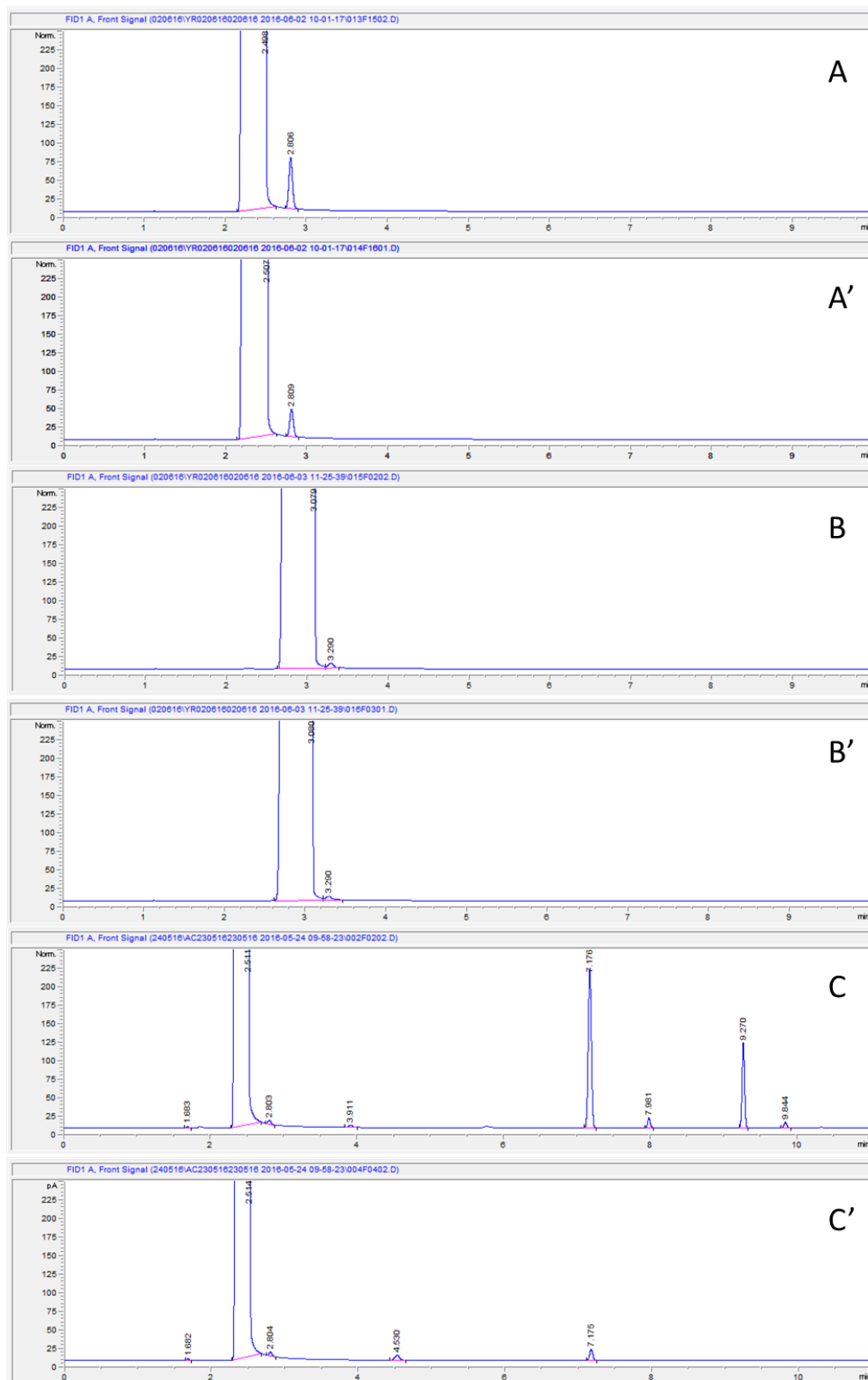


Fig. 1. G.C. chromatograms of different sources of alcohols: (A) & (A') Ethanol, (B) & (B'): Propan-2-ol, (C) & (C'): Propan-1-ol. Simple letter is for the quality used for test items preparation whereas letter with apostrophe is the laboratory reagent quality of alcohol.

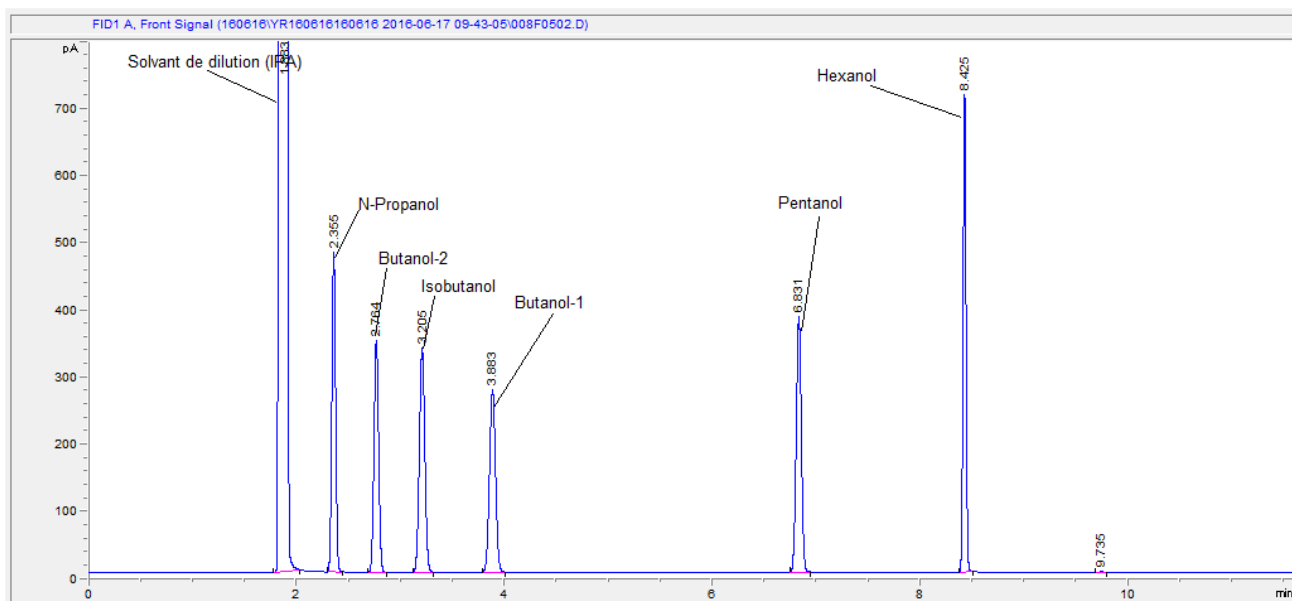


Fig. 2. G.C. chromatogram of Propan-1-ol complemented with a mix of the 5 impurities (0.1% w/w each) with molecular weight higher than Propan-1-ol described in the Propan-1-ol monography of European Pharmacopeia.

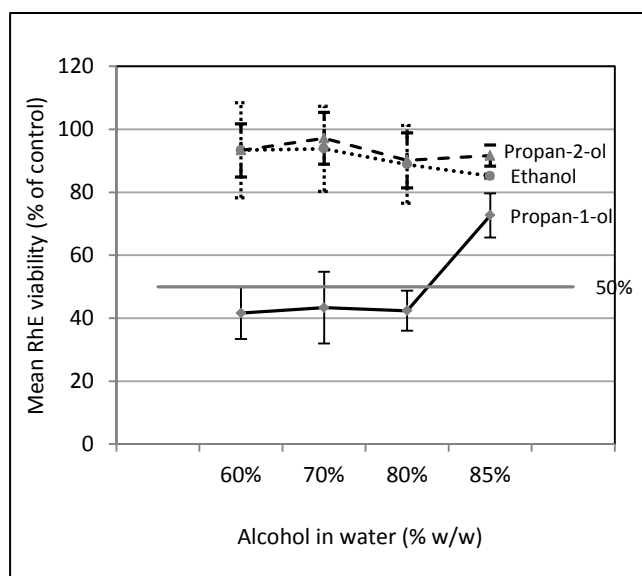


Fig. 3. Relative tissue viability obtained with EpiSkin™ small model following topical treatment of 15 minutes with alcohol solutions in water (Ethanol, Propan-2-ol or Propan-1-ol) at 4 different concentrations. Means are issued from 3 independent experiments at 60 and 80% w/w, and 2 at 70 & 85% w/w.

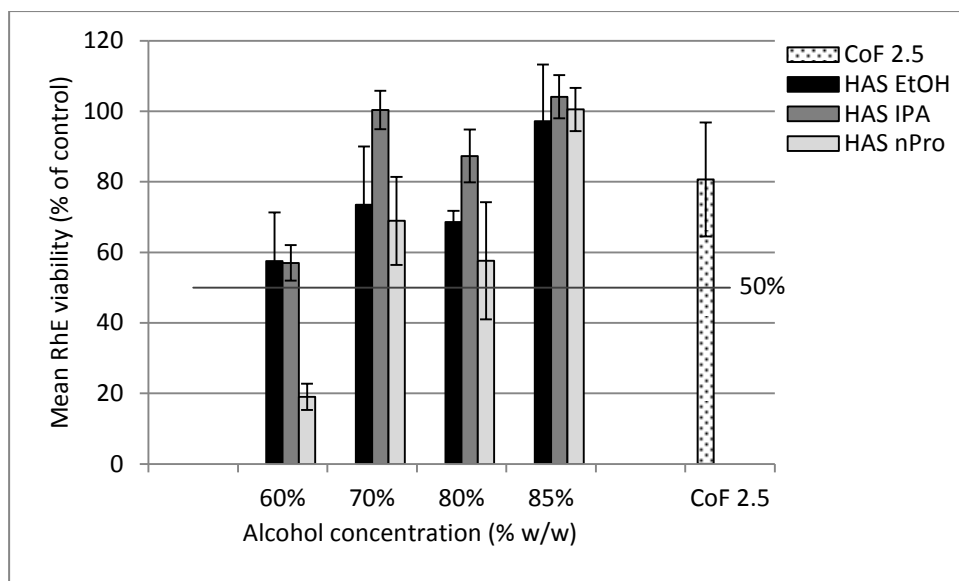


Fig. 4. Relative tissue viability obtained with EpiSkin™ small model following different topical treatment of 15 minutes: Ethanol-, Propan-2-ol- or Propan-1-ol- based HAS (respectively HAS EtOH, HAS IPA, HAS nPro) at 4 concentrations (60, 70, 80 or 85% w/w) (all HAS contained 2.5% of CoFormulates), and mixture of Co-formulates at 2.5% in DMSO (CoF 2.5) (mean issued from 4 independent experiments) (*in vitro* skin irritation test, performed acc. to OECD guideline No. 439).

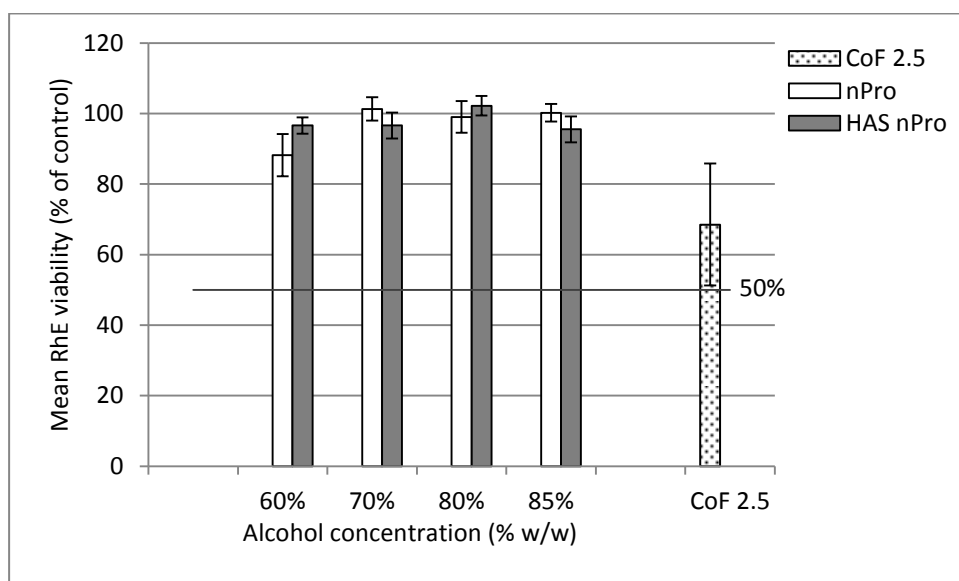


Fig. 5. Relative tissue viability obtained with VitroDerm RhE model following different topical treatment of 15 minutes: Propan-1-ol in water or in presence of 2.5% of CoFormulates (HAS nPro) at 4 concentrations (60, 70, 80 or 85% w/w), and mixture of Co-formulates at 2.5% in DMSO (CoF 2.5) (*in vitro* skin irritation test, performed according to the methodology described in OECD guideline No. 439).

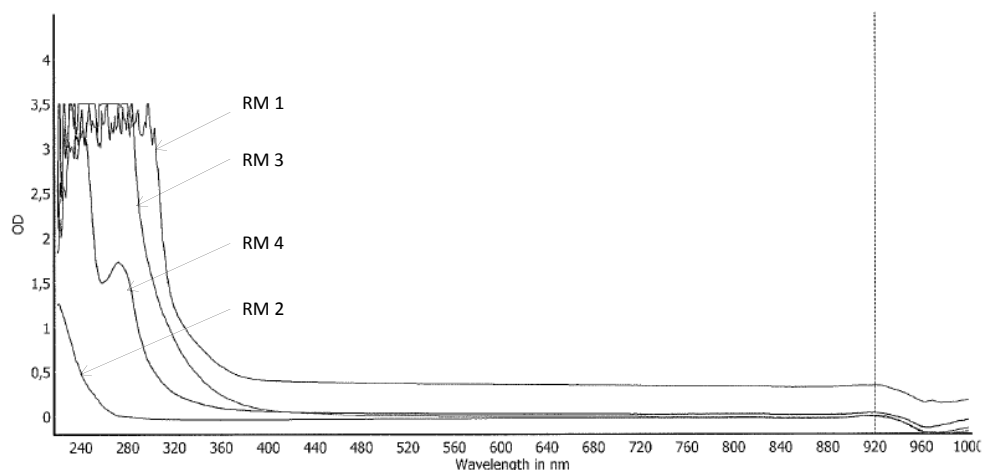


Fig. 6. Absorbance spectra of Raw Materials 1 to 4 (RM1, RM2, RM3 and RM4 - hydrating, emollient and skin protective agents) (10 mm path length quartz cuvettes) using the Spectrometer SPECTROstar NANO (BMG LABTECH) and MARS Data Analysis Software.

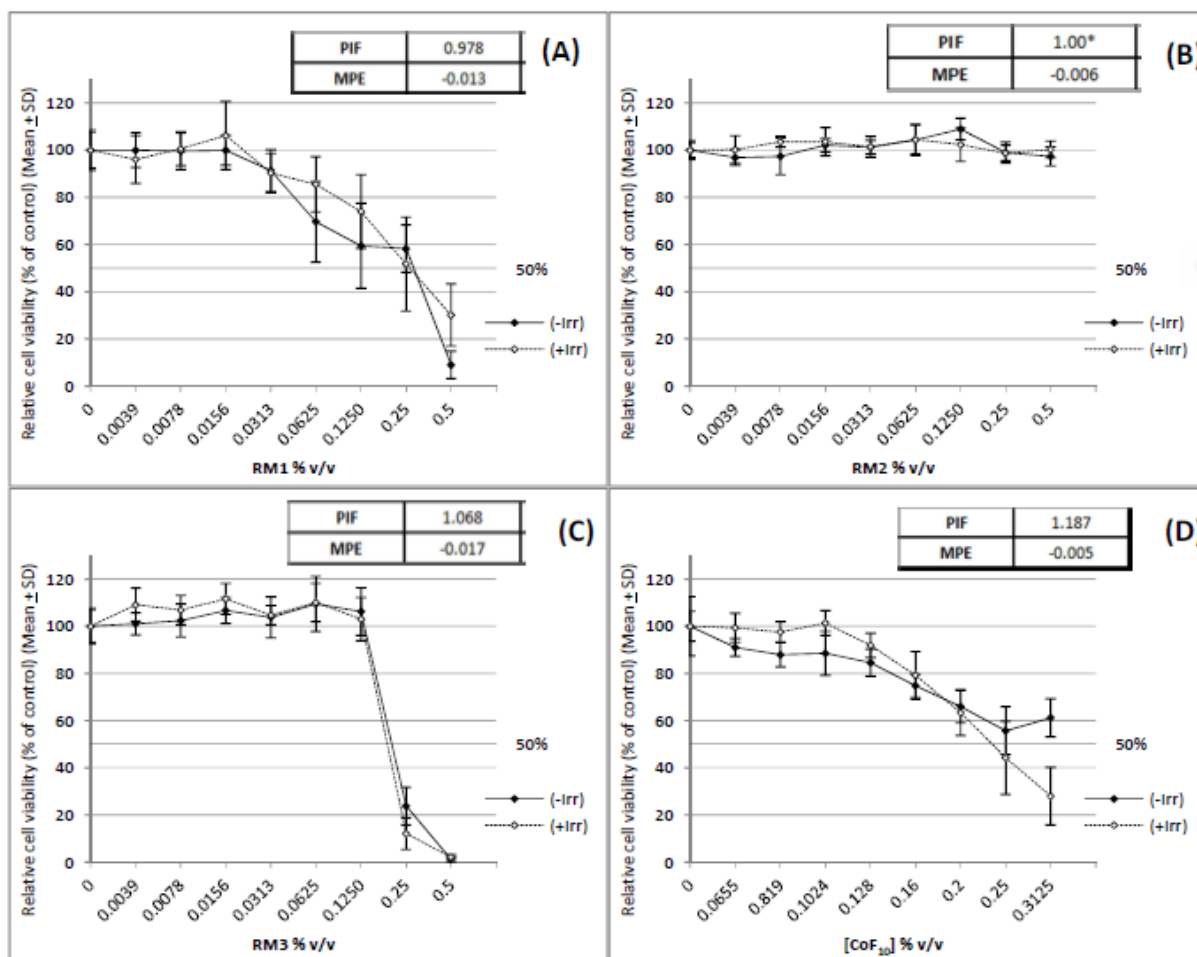


Fig. 7. Cell viability curves (mean relative viabilities \pm SD (% of control)) of BALB/c 3T3 cell cultures following treatment in sextuplicate with 8 different doses of tests substances, with (+Irr) or without (-Irr) UV/VIS irradiation ($5J/cm^2$) (*in vitro* phototoxicity test) (A) (B) & (C) DRF experiment for respectively Raw Materials 1, 2 & 3 (RM1, RM2, RM3) (D) definitive assay for CoF₁₀ (association of RM1, RM2, RM3 and RM4 (10% w/w in DMSO - hydrating, emollient and skin protective agents) (results are mean of the 2 independent experiments). Each figure includes PIF (Photo-Irritation Factor) and MPE (Mean Photo Effect) values - * indicative value due to the absence of IC₅₀ value(s).

Table 1

Mean tissue viability (mean \pm SD) obtained with EpiSkin™ small model following occlusive topical treatment of 15 minutes with alcohol solutions at 60 or 85 % w/w in water.

	Mean viability (% \pm SD) ¹	
	60 % ²	85% ²
Ethanol	70.8 \pm 5.6	66.7 \pm 10.2
Propan-2-ol	71.3 \pm 4.3	76.1 \pm 23.4
Propan-1-ol	32.9 \pm 6.4	55.7 \pm 14.6

¹ mean values including 3 RhE each

² % w/w of alcohol in water

Table 2

Mean (+Irr) BALB/c 3T3 cell cultures relative viability (% of non-irradiated cultures viabilities) (mean \pm SD) following treatment with hydro-alcoholic solutions (HAS) based on 3 different alcohols (Ethanol, Propan-2-ol and Propan-1-ol) at 4 different concentrations (60, 70, 80 & 90% w/w) in the presence of 2% w/w of co-formulates (mixture of Raw Materials (RM) RM1, RM2, RM3 and RM4 (hydrating, emollient and skin protective agents)) (3T3 NRU assay adapted from OECD guideline No. 432).

Alcohol concentration w/w in HAS	Mean ¹ (+Irr) relative viability (mean \pm SD)		
	Ethanol	Propan-2-ol	Propan-1-ol
60	99.82 \pm 8.53	87.60 \pm 10.90	110.91 \pm 26.67
70	98.90 \pm 5.64	90.37 \pm 12.81	103.94 \pm 17.07
80	100.55 \pm 9.26	93.12 \pm 10.29	97.60 \pm 10.13
85	103.30 \pm 8.14	87.73 \pm 12.40	106.40 \pm 4.97

(+Irr) = irradiated cultures (5J/cm²)

¹ mean values from 2 independent experiments, including sextuplicate cultures each

Table 3

Volatility profile of Ethanol, Propan-2-ol and Propan-1-ol, appreciated by boiling point and vapor pressure values.

	Ethanol	Propan-2-ol	Propan-1-ol
Boiling point	78 – 78.5 °C	82 to 83 °C	97.1 °C
Vapor pressure at 20°C	5.9 kPa	4.2 kPa	1.94 kPa
Volatility*	highly volatile	volatile	moderately volatile

* volatility classification based on vapor pressure (P expressed in Pascal) proposed by INRS (P<5: very low volatility; 5<P<1000 moderately volatile; 1000<P<5000: volatile; P>5000: highly volatile) (INRS 2012).

Annexe 4 - Identification des impuretés présentes dans le n-propanol

L'injection d'un mélange d'impuretés décrites dans la monographie 01/2008:2036 de la pharmacopée européenne du n-propanol, de poids moléculaire plus élevé que l'alcool a permis de conclure que les impuretés présentes dans l'alcool utilisé n'étaient pas le Butan-2-ol, Isobutanol, Butan-1-ol, Pentanol ni Hexanol (temps de rétention respectifs de 2,764, 3,205, 3,883, 6,831 et 8,425) (Fig. 50).

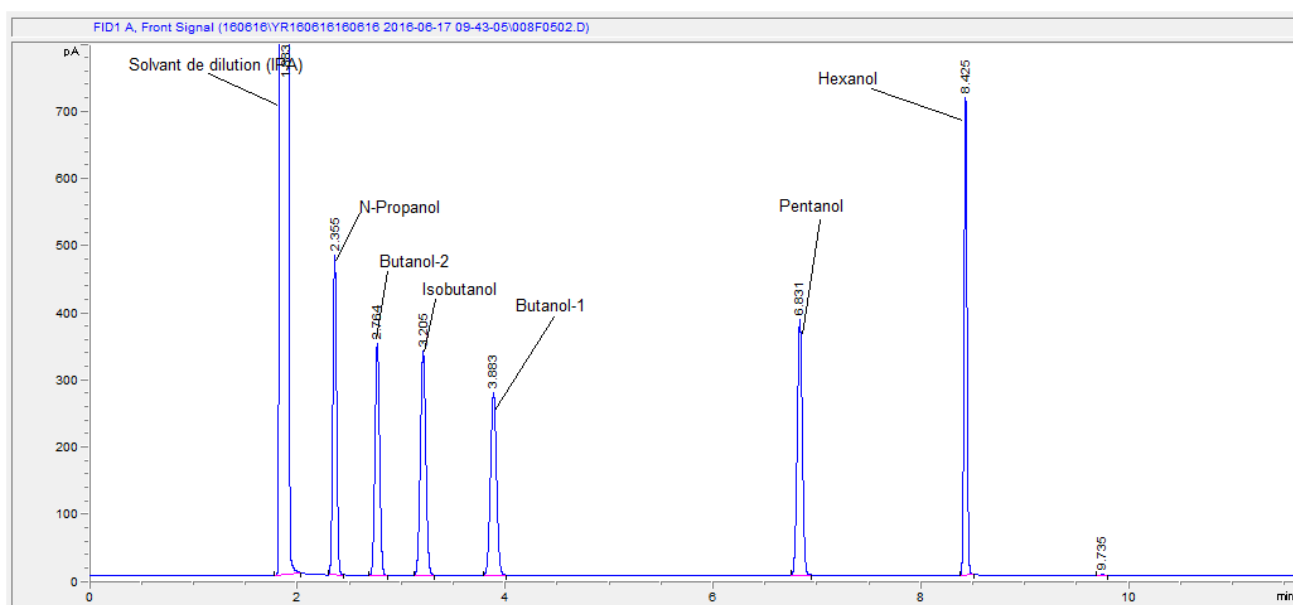


Figure 50 Chromatogramme (GC FID) du n-propanol additivé à 0,1% p/p des 5 impuretés de poids moléculaire supérieur décrites dans la monographie de la pharmacopée européenne

Annexe 5 – Evaluation de la réaction inflammatoire

L'inflammation se produit après rupture de l'homéostasie tissulaire par stress cellulaire, lésion ou infection. La réaction inflammatoire est complexe et implique plusieurs types cellulaires résidents (mastocytes et phagocytes mononucléés : macrophages et cellules dendritiques), et circulants (principalement les leucocytes (granulocytes ou polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, les lymphocytes T et B et les monocytes) et les cellules NK (Natural Killer ou cellules tueuses naturelles)). Elle implique également une multitude de médiateurs interagissant entre-eux, notamment les cytokines, chémokines, immunoglobulines, fractions du complément, médiateurs lipidiques (PAF ou Platelet Activating Factor, prostaglandines et leucotriènes), neuropeptides, les formes activées de l'oxygène et de l'azote (FAO), les métalloprotéases... Le décodage et l'intégration de l'ensemble des signaux médiés entraînent l'induction d'un programme fonctionnel avec phagocytose, exocytose, sécrétions de médiateurs divers pour aboutir à la survie, l'apoptose ou la nécrose cellulaire.

Les propriétés pro- ou anti-inflammatoires d'un composé chimique sur une cellule cible peuvent s'appréhender *in vitro* par la quantification de la transcription des gènes de certains médiateurs, par la technique de RT-q-PCR, ou encore par le dosage des protéines sécrétées par la technique ELISA. Il convient de comparer les résultats obtenus après exposition des cellules avec la substance d'essai, aux données obtenues sur la même culture cellulaire non traitée.

1. Principe et objectifs des essais mis en œuvre

1.1. qPCR en temps réel

La PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative (qPCR) est une méthode basée sur la détection de l'ADN des cellules par utilisation de molécules fluorescentes. Elle permet d'avoir une quantification rapide de l'ADN.

La méthodologie d'essai consiste à extraire les ARN cellulaires, effectuer leur transcription inverse (RT – Reverse Transcriptase) en ADN complémentaire (ADNc) puis amplifier l'ADNc obtenu par PCR par une ADN polymérase, en utilisant des amorces pour une séquence d'intérêt et une sonde marquée en 5' par un fluorochrome à des fins de quantification.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons est analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase de la réaction de PCR la plus reproductible (Fig. 51).

La PCR en temps réel fait le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

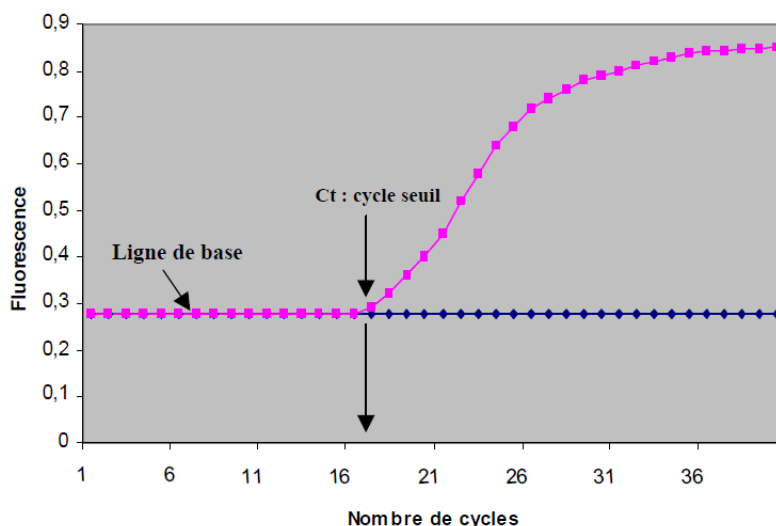


Figure 51 Modèle graphique de la PCR en temps réel (d'après Poitras & Houde 2002)

1.2. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Le test ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection et quantification de protéines par le principe de la réaction antigène-anticorps, avec une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme fixée à l'anticorps sur un substrat.

Nous avons utilisé le principe de la méthode ELISA sandwich, également appelé DAS ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA), avec révélation indirecte. Les puits d'une microplaque 96 puits sont tapissés avec une quantité connue d'anticorps de capture capables de se lier spécifiquement à l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée *coating*, l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique. Des protéines de blocage sont ajoutées pour terminer le coating (généralement du serum d'albumine bovine), en comblant les espaces libres non occupés par les anticorps de capture. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et si l'antigène recherché est présent, il se lie spécifiquement à l'anticorps de capture. La plaque est ensuite rincée pour éliminer tout ce qui n'est pas lié à l'anticorps. Un deuxième anticorps capable de se lier à l'antigène capturé, appelé anticorps de détection, est ajouté dans les puits. Dans la technique de révélation directe, cet anticorps est couplé à une enzyme (peroxydase) catalysant la formation d'un produit coloré à partir d'un substrat (TMB ou tétraméthylbenzidine). La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage

réalisée avec des concentrations connues d'antigène puisque le nombre de molécules d'anticorps de détection fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes immobilisées par l'anticorps de capture.

Il est possible d'augmenter la sensibilité de la révélation par une technique indirecte, en utilisant des anticorps de détection couplés à la biotine, et ajout de streptavidine couplée à la peroxydase catalysant la formation du produit coloré à partir du substrat (HRP - horseradish peroxidase) du fait de la forte affinité entre la streptavidine et la biotine.

2. Matériel et méthodes

2.1. Médiateurs étudiés

Nos travaux ont été effectués sur les cultures de cellules NCI H292. Ils ont porté sur l'expression génique et protéique de médiateurs de l'inflammation à la fois connus pour leur implication dans les processus inflammatoires avec activation de leur synthèse dans de nombreux types cellulaires sous l'influence de stimuli variés et déjà décrits dans la littérature comme étant exprimés par les cellules NCI H292 (Kim *et al.* 2002, Brydon *et al.* 2003, Newland & Richter 2008, Kim *et al.* 2011) (tableau 72).

Tableau 72 : Médiateurs de l'inflammation étudiés sur une culture cellulaire de NCI H292 après traitement par l'éthanol, l'isopropanol ou le n-propanol

	qPCR	ELISA
Cytokines pro-inflammatoires	IL-1 β , TNF- α , IL-6	TNF- α , IL-6
Cytokines anti-inflammatoires	TGF β 1	
Chimiokines pro-inflammatoires	IL-8, CCL2, CCL5, CCL20, CXCL1	IL-8, CCL5, CCL20
Métabolisme de l'acide arachidonique	COX2	
Mucine	MUC5AC	

Le test ELISA a été réalisé sur un nombre réduit de médiateurs, en relation avec les résultats obtenus en qPCR. En effet, comme il existe une corrélation entre l'expression des ARN et la production de protéines, les gènes dont l'expression n'a pas pu être mise en évidence par qPCR ont été exclus de l'étude de l'expression des protéines.

Les cytokines jouent un rôle important à chacune des étapes de la réponse inflammatoire (initiation, amplification, entretien ou résolution). Synthétisées et libérées par leur cellule d'origine en situation de réponse inflammatoire, elles délivrent leurs messages en réagissant avec des récepteurs membranaires spécifiques présents à la surface des cellules cibles. Une même cytokine/chemokine peut être produite par différents types cellulaires et agir sur un nombre important de cibles différentes, avec des effets autocrines, paracrines et endocrines, pouvant être synergiques ou antagonistes. Elles sont capables d'agir sur la croissance, la différenciation, la migration et l'activation des cellules inflammatoires, avec des effets à proximité du foyer d'induction (réaction inflammatoire locale) ou à distance (fièvre,

somnolence, production hépatique des protéines de la phase aiguë de la réponse inflammatoire, hyperleucocytose, diapédèse leucocytaire ...) (Henrotin *et al.* 2001, Prin *et al.* 2012, Mayol *et al.* 2013).

L'interleukine-1 β (IL-1 β), le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α / facteur nécrosant des tumeurs) et l'interleukine-6 (IL-6) sont 3 cytokines pro-inflammatoires. Elles sont principalement produites par les phagocytes mononucléés mais aussi par de nombreux types cellulaires, notamment les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, les lymphocytes T et B, les neutrophiles... Les effets associés à ces médiateurs s'exercent sur de nombreux types cellulaires et sont diverses, locaux et systémiques, responsables d'une cascade d'événements biologiques (Feghali & Wright 1997, Henrotin *et al.* 2001, Borish & Steinke 2003), parmi lesquels

- l'induction de l'expression de certains médiateurs et de leur récepteur (cas de l'IL-2 et de son récepteur par l'IL-1 β ou l'IL-6)
- l'induction de l'expression de certaines enzymes (cas de la COX-2 par l'IL-1 β et/ou le TNF- α)
- la stimulation de libération d'autres médiateurs (IL-6, IL-8, metalloprotéases, sous l'effet de l'IL-1 β & TNF- α)
- la stimulation de la synthèse hépatocytaire de protéines de la phase aiguë de l'inflammation par l'IL-1 β ou l'IL-6
- la stimulation de l'adhérence des cellules endothéliales leucocytaires par activation de l'expression des gènes des molécules d'adhésion (sous l'effet de l'IL-1 β & TNF- α).

Les signes cliniques associés sont plus ou moins sévères, tels que la fièvre ou la somnolence, mais aussi un effondrement possible de la pression artérielle, une faiblesse cardiaque, une perte de poids, une atrophie musculaire...

Il existe des systèmes de rétro-contrôle, tels que certains antagonistes spécifiques (cas de l'IL-1ra pour l'IL-1 β), la présence d'une forme soluble des récepteurs fixant la cytokine avant qu'elle ne se lie à son récepteur membranaire, l'existence de récepteurs inactifs exprimés par certaines cellules, participant à la fonction anti-inflammatoire.

Par contraste avec l'IL-1 β et le TNF- α , l'IL-6 intervient dans plusieurs processus anti-inflammatoires, en effectuant notamment un rétro-contrôle négatif par inhibition de la synthèse de l'IL-1 et du TNF, et en stimulant la synthèse de l'IL-1ra (Feghali & Wright 1997, Borish & Steinke 2003).

Le TGF- β (Transforming growth factor- β) est un peptide impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire. Il est principalement produit par les chondrocytes, ostéocytes, fibroblastes, plaquettes, monocytes et certaines cellules T. Le TGF- β est un important stimulant de la fibrose, il contribue à la formation de matrice extracellulaire, et favorise la guérison des plaies et la formation de cicatrices (Borish & Steinke 2003).

Les chimiokines partagent les mêmes caractéristiques que les cytokines, avec en plus des propriétés chemoattractantes pour les leucocytes, les attirant au niveau du foyer inflammatoire en favorisant leur adhésion à l'endothélium, leur diapédèse et leur chimiotactisme. En situation de réponse inflammatoire, elles sont produites par les leucocytes, les plaquettes et de nombreux tissus conjonctifs (chondrocytes, kératinocytes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales...) et provoquent la libération massive au sein du foyer inflammatoire d'enzymes lysosomiales, d'oxydants et de médiateurs lipidiques (Feghali & Wright 1997, Henrotin *et al.* 2001). Les chimiokines sont réparties en deux classes, selon la présence d'une séquence C-X-C (cystéine-résidu aléatoire-cystéine - chimiokines α) ou C-C (cystéine-cystéine - chimiokines β) (Mayol *et al.* 2013). Les chimiokines pro-inflammatoires étudiées sont l'IL-8 ou CXCL-8, la CCL2, la CCL5, la CCL20 et la CXCL1.

La COX-2 est un autre marqueur de l'inflammation que nous avons investigué. Il s'agit d'une des deux isoformes de la cyclo-oxygénase, dont la synthèse est induite en réponse à de nombreux stimuli comme les cytokines pro-inflammatoires, les endotoxines bactériennes, certaines fractions du complément ou encore différents agents mitogènes. Les cyclo-oxygénases constituent l'une des deux voies métaboliques de transformation de l'acide arachidonique (libéré à partir des phospholipides membranaires des cellules inflammatoires sous l'action des phospholipases A2), conduisant à la synthèse de prostanoides vasodilatateurs (prostaglandines et prostacycline) ou vasoconstricteurs (thromboxane) selon le contenu enzymatique de la cellule concernée (Henrotin *et al.* 2001). L'autre voie enzymatique du métabolisme de l'acide arachidoniques implique les lipooxygénases, induisant la formation de leucotriènes, groupe de médiateurs à action chimiotactique puissante (leucotriène B4), vasoconstricteurs, bronchoconstricteurs et augmentant la perméabilité vasculaire (leucotriènes C4, D4, E4).

Le dernier marqueur de l'inflammation étudié est le MUC5AC en relation avec la production de mucine. MUC5AC est une glycoprotéine entrant dans la composition du mucus, qui participe à la réponse inflammatoire au niveau des voies respiratoires. L'augmentation de la production de mucus suit l'augmentation de l'expression des gènes de la mucine. Parmi les nombreux gènes identifiés (plus de 20), MUC5AC est la sous-famille principale de la mucine sécrétée par les cellules caliciformes dans l'épithélium des voies respiratoires (Iwashita *et al.* 2010). Entre autres facteurs de régulation, l'expression et la sécrétion de MUC5AC sont induites par la production de COX-2 (Kim *et al.* 2002) ainsi que par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-13 et le TGF- α , ainsi que par des agents externes tels que les virus et la fumée de cigarette (Oyanagi *et al.* 2017).

2.2. Préparation des échantillons

Les essais ont été réalisés sur les cultures cellulaires NCI H292 en plaques 6 puits.

48 heures avant l'essai, les cellules ont été suspendues à une densité de 1×10^5 cellules/mL dans du milieu RPMI 10 et distribuées en plaques 6 puits à raison de 3 mL par puit puis incubées à 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'humidité, avant traitement par 30 µL de produit d'essai/puit en triplicate. La durée de traitement était de 4 heures pour la qPCR et de 24 heures pour le test ELISA.

Les 3 alcools aux 4 concentrations de 60, 70, 80 et 85% p/p dans l'eau ont été testés en deux fois 3 expérimentations (une expérimentation par technique et par alcool) indépendantes pour des raisons de plan de charge. Des témoins négatifs et positifs ont été réalisés en parallèle, correspondant respectivement à 3 puits de culture cellulaire sans ajout de traitement au milieu de culture, et 3 puits de culture exposés durant 4 ou 24 heures à 1 µg/mL de LPS.

Les durées de traitement de 4 et 24 heures et la dose de LPS utilisée en témoin positif ont été déterminées dans une expérimentation préliminaire de qPCR et de test ELISA portant sur l'expression des gènes de quelques médiateurs (IL-6, IL-8, TNF-α et IL-10 pour la qPCR et IL-6, IL-8, TNF-α, IL-10, et CCL20 pour le test ELISA) après stimulation des cellules NCI H292 par deux doses de LPS (1 et 10 µg/mL) et deux temps de traitement différents (4 et 24 heures). L'IL-10 n'a pas été retenue pour les essais définitifs en raison des résultats de l'essai préliminaire, où aucune expression génique ni production de ce médiateur n'a été observée quelles que soient les conditions de stimulation par le LPS (durée et dose).

Juste après traitement, les cultures ont été rincées à deux reprises avec du PBS stérile et replacées à l'étuve en présence de nouveau milieu de culture RPMI10 pour une durée de 20 heures avant d'engager les essais de qPCR ou de test ELISA.

2.3. qPCR en temps réel

↳ Extraction et quantification de l'ARN

L'étape d'extraction de l'ARN a été effectuée à l'aide du Kit Nucleospin RNA (Macherey Nagel), selon le mode opératoire fourni par le fabricant.

Une fois l'extraction des ARN réalisée, l'étape suivante a consisté à déterminer la quantité d'ARN extraite (ng/mL) pour chaque condition d'essai. Celle-ci a été faite à partir d'1 µL d'échantillon pur déposé sur le capteur du nanodrop, par lecture de l'absorbance sur les longueurs d'onde de 200 à 300 nm. Le ratio d'absorbance 260/280 (ARN/ARN+protéines) a également été calculé pour vérifier le critère d'acceptabilité (ratios supérieurs à 2).

A défaut de réalisation de la RT-PCR le jour même, les ARN ont été congelés à 80°C.

↳ **Rétrotranscription de l'ARN par RT-PCR**

La rétrotranscription de l'ARN en ADN a été faite par RT-PCR, à l'aide du High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystem), selon le mode opératoire fourni par le fabricant.

Durant toutes les étapes préparatoires, les ARN et réactifs ont été maintenus dans de la glace pour préserver leur intégrité.

La rétrotranscription a été effectuée en plaçant la plaque dans le thermocycleur programmé comme suit

- 25°C 10 minutes
- 37°C 120 minutes
- 85°C 5 minutes
- 4°C aussi longtemps que souhaité (car très stable)

Les cDNA obtenus ont ensuite été dilués au 20^{ème} par ajout de 80 µL d'H₂O RNase free, pour disposer d'échantillons prêts à l'emploi pour la qPCR.

A défaut de réalisation de la qPCR à la suite, les cDNA issus de la RT-PCR ont été congelés à - 80°C.

↳ **qPCR sur les cDNA**

La qPCR a été réalisée selon la technologie Taqman (Applied Biosystem), utilisant des sondes Taqman et amorces spécifiques des gènes d'intérêt et la Taq polymérase.

La sonde TaqMan présente un fluorochrome émetteur (reporter) fixé à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide et un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Lorsque le reporter et le quencher sont fixés à la sonde, le quencher inhibe toute fluorescence de l'émetteur.

Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence proportionnelle au taux d'hydrolyse de la sonde. Le résultat est proportionnel à la quantité d'ADN d'intérêt présent dans le produit de PCR en relation avec l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase spécifique à l'ADN double brin, incapable en conséquence d'hydrolyser les sondes libres.

La réaction en chaîne par polymérisation s'effectue *in vitro* dans un thermocycleur. Pour un échantillon donné d'ADN, la première étape de l'amplification est sa dénaturation initiale, qui consiste en une étape de chauffage (généralement à 95°C) permettant la déshybridation des deux brins complémentaires d'ADN par rupture des liaisons ainsi que l'activation des

polymérase. La seconde étape est celle d'hybridation où les amorces et sondes Taqman s'hybrident à leurs séquences d'ADN spécifiques. L'action de la Taq polymérase permet ensuite l'étape d'élongation avec synthèse d'amplicon (brin complémentaire) à partir des dNTPs (désoxyribonucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel utilisé.

La figure 52 ci-dessous illustre le principe de la technologie Taqman en qPCR.

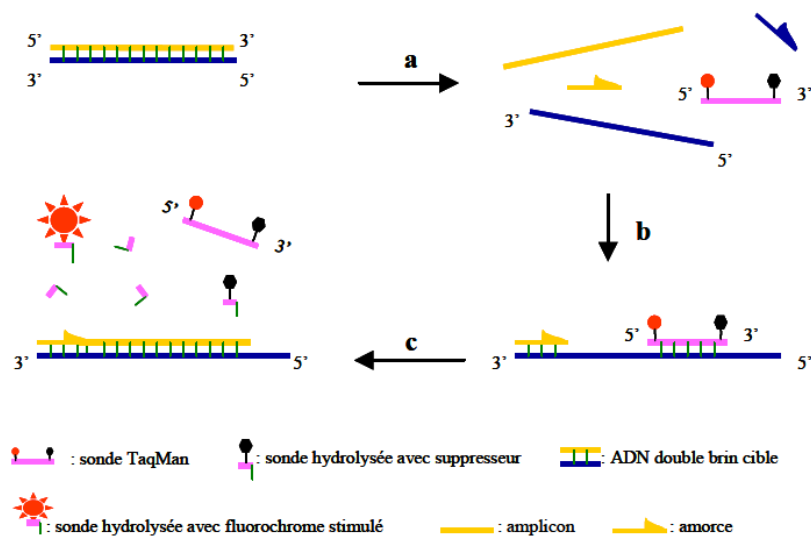


Figure 52 Principe de la technologie Taqman en qPCR : hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) d'après Poitras & Houde 2002

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppressueur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

La qPCR de l'ADN a été faite à l'aide du Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), en présence d'amorces et sondes TaqMan, selon le mode opératoire fourni par le fabricant.

Durant toutes les étapes préparatoires, les ADN et réactifs ont été maintenus dans de la glace et à l'abri de la lumière pour préserver leur intégrité.

Les amorces et sondes utilisées proviennent de ThermoFischer Scientific (séquences oligonucléiques non communiquées). En plus des gènes d'intérêt, le gène de la β -actine a été étudié. Il s'agit d'un gène d'expression invariable présent dans toutes les cellules. Il constitue ainsi un contrôle des étapes d'extraction et d'amplification et permet de réajuster les résultats obtenus sur les gènes d'intérêt pour les exprimer à teneur identique en ADN.

Un échantillon contrôle non traité sans ADN (NTC) a été analysé en parallèle des essais. Il permet de s'assurer de l'absence d'hybridation non spécifique des amorces (hybridation des amorces entre elles) et/ou de contamination des amorces ou de l'eau utilisée.

Une plaque a permis d'amplifier 8 échantillons sur 12 gènes différents (11 gènes d'intérêt et le gène de la β -actine). Un total de 7 plaques a ainsi été passé en qPCR pour les ADN des cellules H292, sur deux jours différents. Un échantillon NTC a été ajouté à l'une des plaques pour chaque jour d'expérimentation.

L'amplification a été réalisée sur 40 cycles, en plaçant la plaque dans le thermocycleur programmé comme suit :

- 95°C 10 minutes
 - puis
 - 95°C 15 secondes
 - 60°C 1 minute
-] 40 fois

Le thermocycleur était programmé avant la réalisation du MIX RT-PCR, pour limiter la durée de séjour des ADN avant leur amplification.

↳ Expression des résultats

Les données ont ensuite été analysées et normalisées par rapport au contrôle interne et aux cellules non traitées et les analyses statistiques ont été réalisées selon les méthodes du delta Ct (Cycle threshold)

La lecture de la fluorescence a été effectuée à chaque cycle, à la fin de l'étape d'élongation qui dure une minute à 60°C. Le cycle seuil « CT » (Cycle Threshold) est défini comme le numéro du cycle pour lequel l'intensité de fluorescence coupe la ligne de base ou « threshold ». Cette ligne de base a été standardisée par gène à des fins de comparaison.

Les résultats ont été exprimés en $2^{(-\Delta\Delta Ct)} \pm$ écart type (n=3 par condition), avec

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\beta \text{ actine}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{moyenne } \Delta Ct \text{ de la condition témoin (non stimulée)}$$

Au plus le résultat est élevé, au plus le gène est exprimé.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique (Mann Whitney test), pour comparer les valeurs moyennes des échantillons traités aux valeurs d'expression des gènes des cellules non traitées, avec un seuil de significativité inférieur ou égal à 5% ($p \leq 0,05$).

2.4. Protocole ELISA Sandwich

Les tests ELISA ont été réalisés sur microplaques ELISA (Corning, Ref 3690) à l'aide de kits DuoSet de chez R&D Systems, selon le mode opératoire fourni par le fabricant, avec division de tous les volumes par 2 en raison de l'utilisation de plaques ½ puits.

Un total de 7 plaques a été préparé pour le test ELISA pour l'étude de l'expression des protéines de médiation de l'inflammation après exposition des cellules H292 aux différentes

conditions d'essai (n=54), incluant les gammes standards et le blanc à des fins de quantification.

Les essais ont été effectués en 2 expérimentations indépendantes, la première portant sur les dosages de l'IL-6, IL-8 et TNF- α dans les surnageants de culture avec 4 plaques, et la seconde sur les dosages de CCL5 et CCL20 avec 3 plaques.

↳ Expression des résultats

Les données ont été normalisées par rapport au blanc et la quantité de protéines dans les différents échantillons a été calculée à partir des échantillons et de la gamme standard correspondante, à l'aide du logiciel KC4 relié au lecteur de microplaque (lecteur ELx800 Biotek Instruments).

Les résultats ont été exprimés en pg/mL \pm écart type (n=3 par condition).

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique (Mann Whitney test), pour comparer les quantités moyennes de protéines exprimées dans les surnageants des échantillons traités aux valeurs d'expression des protéines dans les surnageants des cellules non traitées, avec un seuil de significativité inférieur ou égal à 5% ($p \leq 0,05$).

3. Résultats

3.1 Résultats des marqueurs transcriptionnels

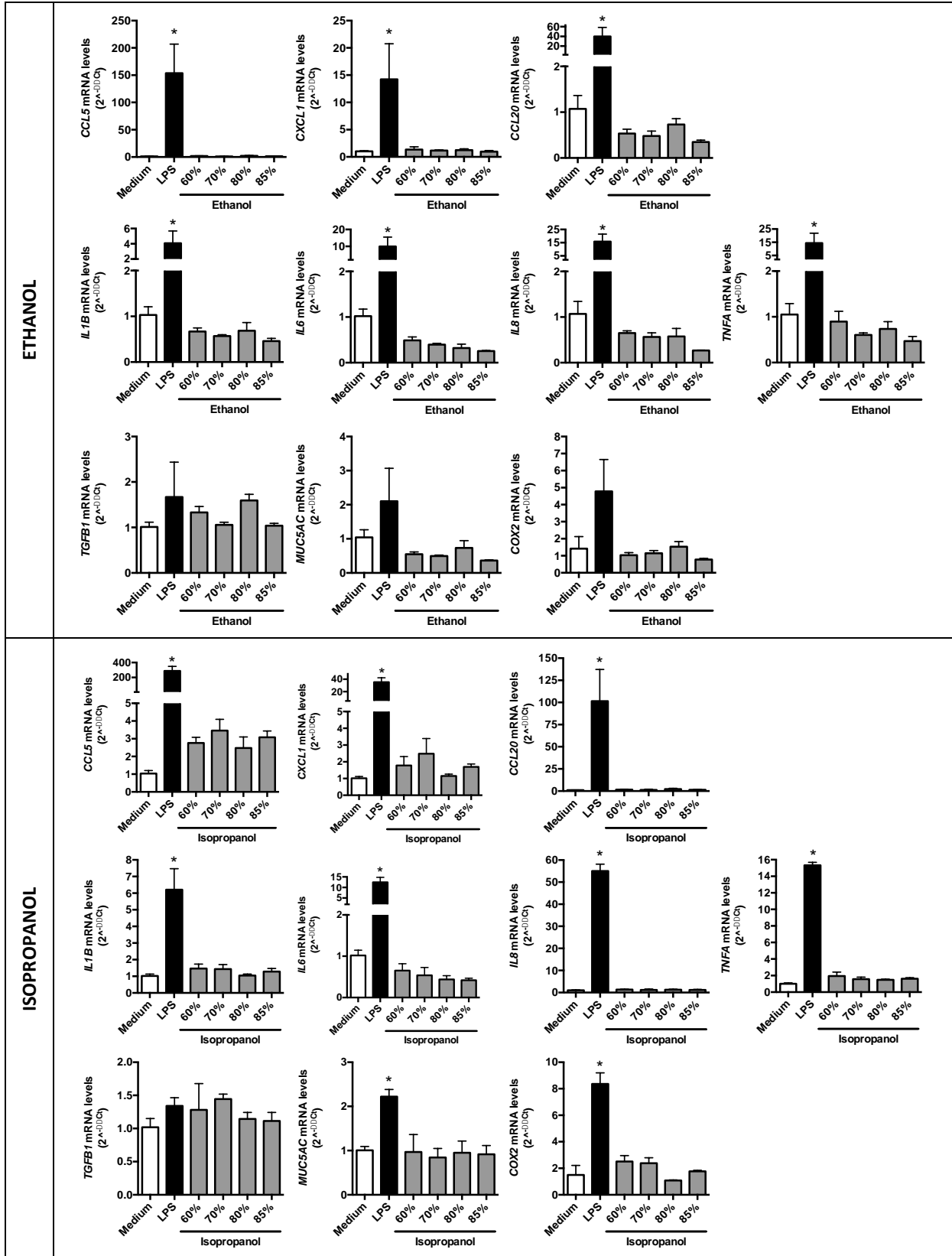
Les graphes repris en figure 53 présentent le niveau d'expression des ARNm de CCL5, CXCL1 et CCL20 (chimiokines pro-inflammatoires), de l'IL-1 β , IL6, IL8 et TNF- α (cytokines pro-inflammatoires) et du TGF β 1 (anti-inflammatoire), de MUC5AC et du marqueur de stress oxydatif COX2, suite à 4 heures de traitement par des solutions d'éthanol, isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p. Les doses d'essai correspondantes étaient

- de 6,71 à 8,91 μ L/mL (5430 à 7210 μ g/mL ou 118 à 156 mM) pour l'éthanol
- de 6,59 à 8,80 μ L/mL (5330 à 7120 μ g/mL ou 89 à 118 mM) pour l'isopropanol
- de 6,69 à 8,92 μ L/mL (5400 à 7220 μ g/mL ou 90 à 120 mM) pour le n-propanol

Les résultats obtenus avec le LPS (témoin positif de stimulation administré à 1 μ g/mL) sont également présentés.

Aucune réponse n'a été obtenue pour les ARNm de CCL2 que ce soit en condition basale ou après stimulation.

Annexe 5 : Evaluation de la réaction inflammatoire



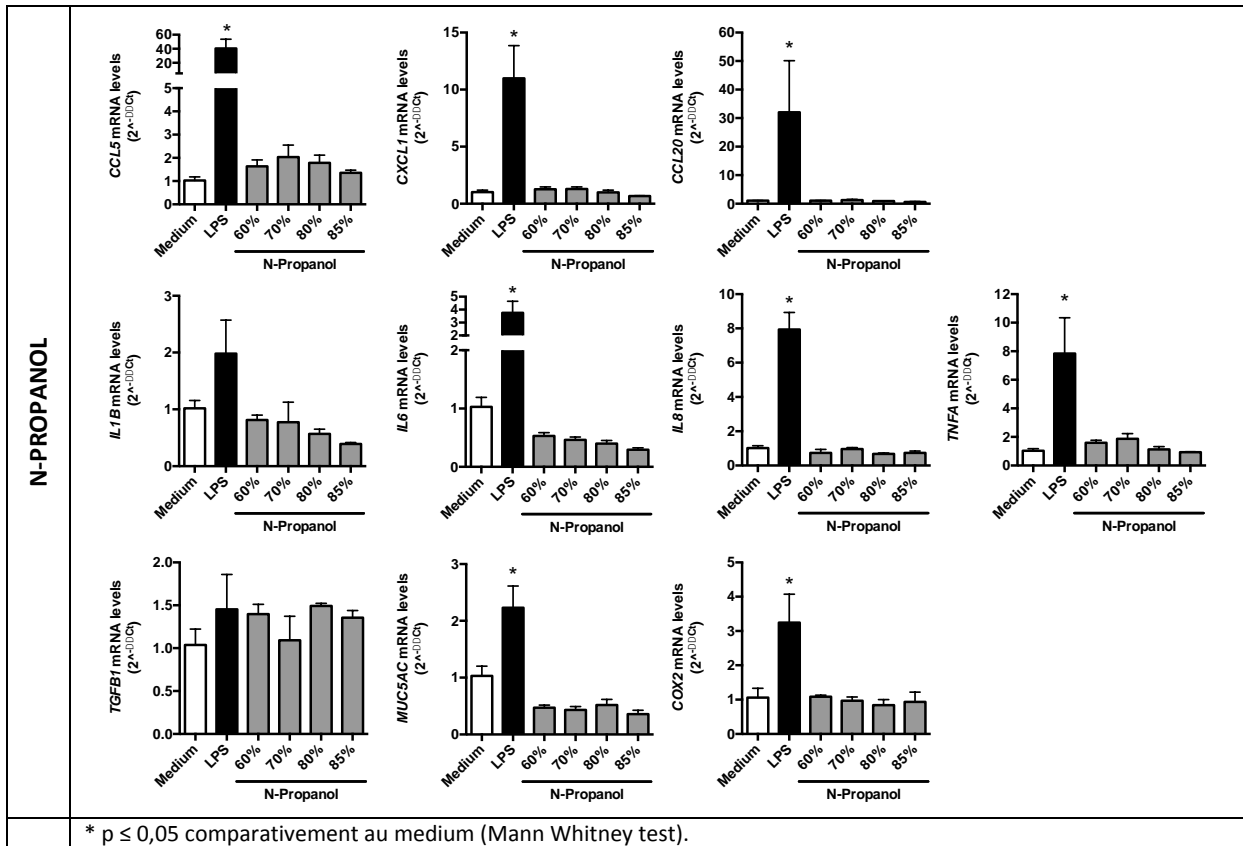


Figure 53 : Effet de l'éthanol, isopropanol et n-propanol sur la transcription de gènes de marqueurs de l'inflammation par les cellules H292

Dans ces essais, le LPS a augmenté le niveau d'expression des ARNm de l'ensemble des marqueurs étudiés, à l'exception du TGFβ1. L'effet était plus marqué et statistiquement significatif pour les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les 3 essais, et pour MUC5AC et COX2 dans deux des trois essais.

L'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol n'ont pas modulé de façon marquée l'expression des ARNm de tous les gènes analysés.

Une légère diminution de l'expression basale des ARNm de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL1B, IL6, IL8, TNFα et CCL20) ainsi que de la mucine MUC5AC ont été observées suite au traitement par l'éthanol. Concernant l'isopropanol, une légère diminution de l'expression basale des ARNm de l'IL6 a également été observée tandis qu'une légère augmentation de l'expression des chimiokines pro-inflammatoires CCL5 et CCL20 a été observée. Concernant le n-propanol, une légère diminution de l'expression des ARNm de l'IL-6, IL1β et MUC5AC a été observée, tandis qu'une légère augmentation de l'expression de CCL5 a été observée.

3.2. Résultats des marqueurs protéiques

Les graphes repris en figure 54 présentent les taux de sécrétion d'IL-6, IL-8, CCL5 et CCL20 par les cellules NCI H292 suite à 24 heures de traitement par des solutions d'éthanol,

isopropanol ou n-propanol à 60, 70, 80 ou 85% p/p. Les doses d'essai correspondantes étaient

- de 6,71 à 8,91 $\mu\text{L/mL}$ (5430 à 7210 $\mu\text{g/mL}$ ou 118 à 156 mM) pour l'éthanol
- de 6,59 à 8,80 $\mu\text{L/mL}$ (5330 à 7120 $\mu\text{g/mL}$ ou 89 à 118 mM) pour l'isopropanol
- de 6,69 à 8,92 $\mu\text{L/mL}$ (5400 à 7220 $\mu\text{g/mL}$ ou 90 à 120 mM) pour le n-propanol

Les résultats obtenus avec le LPS (témoin positif de stimulation administré à $1\mu\text{g/mL}$) sont également présentés.

Aucune sécrétion de $\text{TNF-}\alpha$ n'a été retrouvée, quelle que soit la condition d'essai.

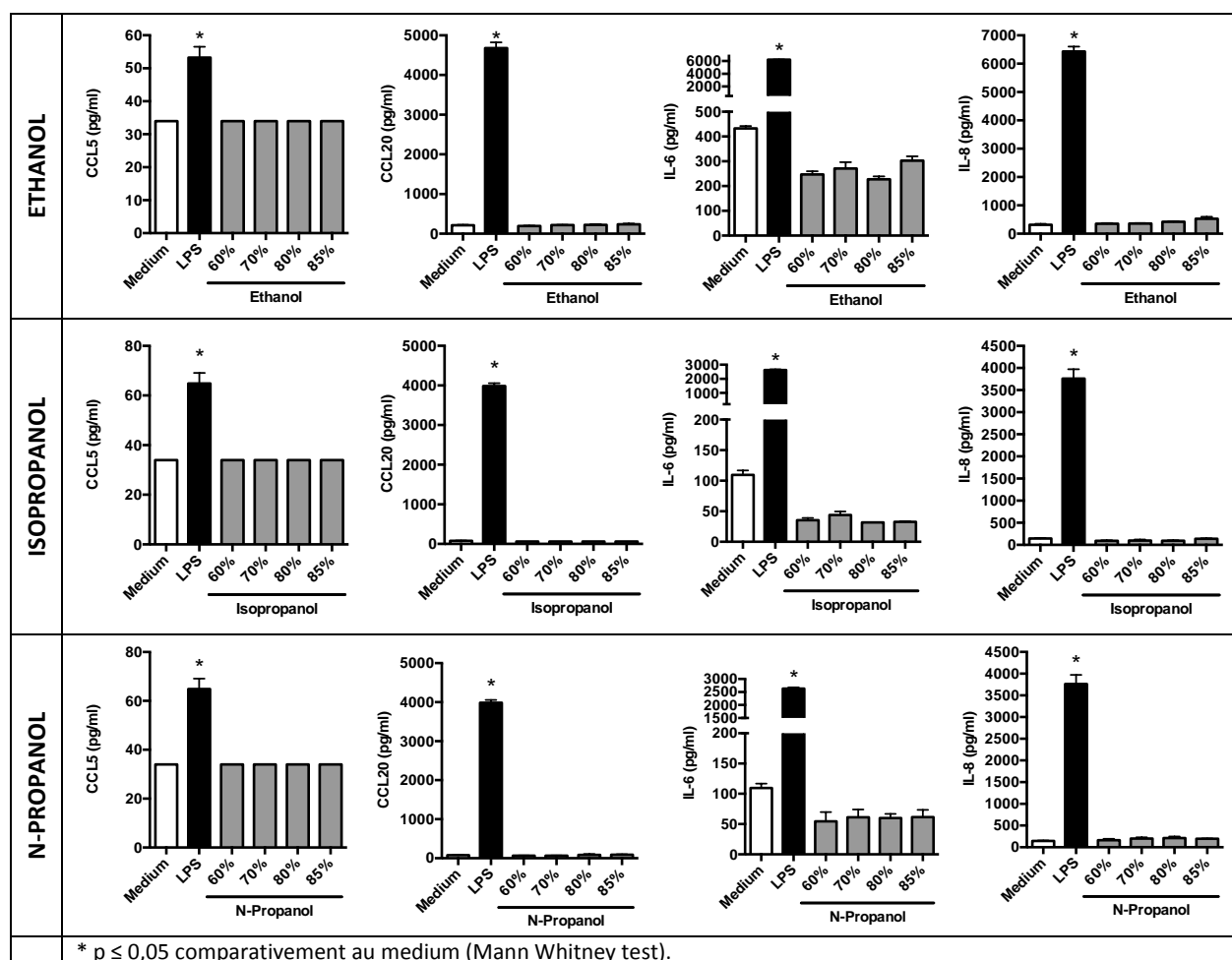


Figure 54 : Effet de l'éthanol, isopropanol et n-propanol sur la sécrétion de médiateurs de l'inflammation par les cellules H292

Dans cet essai, le LPS a augmenté fortement et de façon statistiquement significative la sécrétion de l'IL-6, de l'IL-8 et de CCL20. Une augmentation de plus faible amplitude a été observée pour CCL5.

En revanche, les différents alcools analysés n'ont pas entraîné d'augmentation des niveaux de sécrétion des cytokines et chimiokines testées. Une légère diminution de la sécrétion d'IL-6 a été observée suite au traitement par les 3 alcools, sans effet lié à la dose.

4. Conclusion

Les différents alcools testés n'induisent ni l'expression, ni la sécrétion des marqueurs inflammatoires sélectionnés. Au contraire, certains médiateurs de l'inflammation à l'état basal auraient plutôt une tendance à être inhibés par les alcools, de manière non spécifique et indépendamment des doses respectives, ce qui serait davantage en faveur d'une action anti-inflammatoire.