

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 12 mai 2023

NOTE¹
d'appui scientifique et technique du 02 février 2023 révisée
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relative à l'analyse de l'article de Fouyet *et al.* (2022) mis en avant par des
acteurs économiques pour rejeter une règle de classification proposée par la
Commission Européenne

L'Anses a été saisie le 6 juillet 2022 par la direction générale du travail (DGT) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR) pour la réalisation de l'appui scientifique et technique suivant : analyse de l'article de Fouyet *et al.* (2022) soumis par des acteurs économiques aux ministères de tutelles de l'Anses comme élément permettant de motiver le rejet d'une règle de classification proposée par la Commission Européenne pour les substances complexes.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

Les huiles essentielles peuvent présenter des compositions très complexes et ont donc vocation à relever, dans le cadre du Règlement REACH, de la catégorie des substances dites « UVCB² » (substances de composition variable ou inconnue, produits de réaction complexe et matériaux biologiques). Pour ce type de substances complexes (récemment regroupées sous le terme de MOCS³ - signifiant substance de plus d'un constituant), comme pour les autres types de substances, le Règlement 1272/2008 (CLP) relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges s'applique, ainsi que les règles de définition de la classe de danger pour des mélanges. En particulier, lorsqu'un UVCB

¹ Annule et remplace la note du 2 février 2023. Les corrections effectuées sont décrites en Annexe 2.

² *Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials*

³ *More than One Constituent Substance*

contient un constituant (ou une somme de constituants) présentant des dangers couverts par ce règlement au-dessus des seuils de classification, l'UVCB doit relever de la classification du constituant, même si des données sur l'UVCB ne montrent pas d'effet. Ceci est en particulier justifié par le manque de sensibilité des méthodes de tests en toxicologie et écotoxicologie faisant appel à des durées d'expositions courtes en regard de l'identification d'effets à long terme et permet, par ailleurs, de limiter le recours à des tests impliquant des animaux. Cette dernière raison étant par ailleurs un des objectifs majeurs du Règlement REACH. Ce point, très clairement expliqué dans le règlement CLP a été réexpliqué dans un document produit par la Commission Européenne en novembre 2020⁴ mais également dans la récente note de l'Anses sur la proposition de révision du Règlement CLP⁵. Ces documents rappellent que la même règle doit s'appliquer qu'il s'agisse de mélange ou d'un UVCB.

Pour sa part, des acteurs de l'économie des huiles essentielles (HE) souhaitent démontrer que cette règle ne devrait pas s'appliquer aux huiles essentielles notamment pour l'identification des propriétés de perturbation endocrinienne (PE).

Cette problématique apparaît dans un contexte réglementaire en évolution avec l'intégration en cours des critères d'identification des propriétés de PE dans le règlement CLP en se basant sur la définition de l'OMS et la perspective d'évolutions ultérieures du règlement REACH.

Une étude co-financée par le laboratoire Léa Nature est rapportée dans l'article suivant : « *Evaluation of Placental Toxicity of Five Essential Oils and Their Potential Endocrine-Disrupting Effects* » (Fouyet *et al.* 2022).

Dans ce contexte, le 6 juillet 2022, la direction générale du travail (DGT) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR) ont saisi l'Anses afin d'analyser cet article et également d'explicitier le terme de « modulateur endocrinien » mentionné dans cet article.

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Le 6 juillet 2022 l'Anses a reçu une demande de la direction générale du travail (DGT) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR) ayant conduit à la réalisation du présent appui scientifique qui devait être rendu pour le 21 octobre 2022.

La demande visait à produire une analyse critique de l'article de Fouyet *et al.* (2022) soumis par des acteurs économiques aux ministères de tutelles de l'Anses faisant valoir ces données scientifiques pour prouver que l'approche « MOCS³ » proposée par la Commission Européenne dans le cadre de la révision du règlement CLP est inapplicable aux huiles essentielles. Il était également demandé d'expliquer le terme de « modulateur endocrinien » employé dans l'article.

⁴ "Thought starter for discussion on the application of mixture rules for substances containing more than one constituent (including impurities) and potential impacts for REACH dossier evaluation process" discussed at 37th Meeting of Competent Authorities for REACH and CLP, Open session, 17-18 November 2020 CA/74/2020.

⁵ [Note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la publication de la proposition de règlement du parlement européen et du conseil modifiant le règlement \(CE\) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges](#) du 28 mars 2023

Des échanges ont eu lieu avec deux experts rapporteurs du CES REACH CLP entre juillet et septembre et le document a été présenté et validé lors de la séance du CES du 21 septembre 2022.

Cette note a été signée pour publication le 02 février 2023 et publiée le 4 février 2023.

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Substances chimiques visées par les règlements REACH et CLP » (CES REACH CLP) (Annexe 1). L'Anses a fait une analyse critique de cet article et a fait valider son analyse par le CES REACH CLP. En particulier, deux membres du CES REACH ont rapporté leur analyse, en amont de la rédaction de cette note.

Sur sollicitation de l'association COSMED⁶ et suite aux commentaires transmis par celle-ci en mars 2023 (voir Annexe 3), cette note a été révisée en mai 2023 (voir Annexe 3 pour les modifications apportées). L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE DE L'ARTICLE

Dans l'analyse de l'article, l'expertise s'est penchée sur différents éléments, tels que restitués par la publication, pour examiner la cohérence et la robustesse des conclusions au vu du protocole expérimental, de sa mise en œuvre et de l'analyse des résultats au regard d'autres données disponibles dans la littérature. L'expertise discute également le concept proposé de « modulateur endocrinien ».

1) Un modèle cellulaire peu commun et un protocole en cours de développement qui limitent la portée des conclusions en l'absence de validation et de comparaisons approfondies :

Le modèle expérimental utilisé (*hPlacentox assay*), est un protocole de test en cours de développement pour l'étude des effets de perturbation endocrinienne. Cette lignée cellulaire a bien été sélectionnée par la plateforme PEPPER⁷ (Grignard *et al.*, 2022), comme étant d'intérêt pour la caractérisation de substances au titre de la classe de danger PE, mais ce modèle est encore en cours de validation comme test de niveau 2 (au sens du modèle conceptuel de l'OCDE selon les termes du document guide 150). De ce fait, les garanties quant à des paramètres essentiels tels que sa reproductibilité, sa sensibilité, sa spécificité et son domaine d'applicabilité ne sont pas encore établies. Tant que le modèle n'est pas validé, il faut alors démontrer la robustesse du modèle pour pouvoir prétendre à la robustesse des résultats obtenus et des conclusions qui en découlent.

Compte tenu de cet état de développement en cours, il eut été utile de comparer les résultats obtenus sur la sécrétion de certaines hormones avec des résultats existants. Or, l'article ne traduit pas l'existence de recherche bibliographique permettant de contextualiser les résultats obtenus avec des résultats préexistants sur les constituants principaux par exemple.

⁶ COSMED : Association des PME de la filière cosmétique

⁷ Plateforme Public-privé sur la pré-validation des méthodes d'essai sur les Perturbateurs EndocRiniens

Concernant plus spécifiquement la lignée utilisée, JEG-3, la représentativité, sensibilité, stabilité et autres caractéristiques de la lignée cellulaire utilisée (American Type Culture Collection (ATCC HTB-36)) ne sont pas connues. La lignée JEG-3 est issue de métastases d'un choriocarcinome avec passages sur poche jugale de hamster (Kohler and Bridson, 1971) conduisant à des modifications de régulation génique par rapport aux cellules trophoblastiques *in vivo*. La seule comparaison effectuée avec d'autres modèles existants montre des résultats contradictoires : « *The results we obtained with tea tree EO (no alteration of estradiol release) appear in contradiction with previous in vitro studies that demonstrated estrogenic effects of tea tree EO in MCF-7 human breast cells* ». Pour étayer les résultats de l'étude, il aurait fallu tester plusieurs lignées. Par ailleurs, il eut été intéressant de discuter les résultats obtenus entre eux afin de comprendre si ceux-ci peuvent revêtir une signification biologique.

2) Des défauts méthodologiques ou de traçabilité pour des paramètres expérimentaux importants :

- aucune variabilité n'est indiquée pour les contrôles sur les paramètres testés (sécrétion d'h-hCG, de hPL, d'estradiol et de progestérone) à part pour la viabilité cellulaire et l'activation de P2X7 ;
- la puissance statistique utilisée varie selon les expériences. Il est étonnant de noter que pour plusieurs expériences, l'effet du diethylstilbestrol (DES), utilisé comme contrôle positif sur la sécrétion d'h-hCG et hPL, n'est statistiquement significatif qu'à $p < 0,1$. Ceci montre que le système pourrait être assez peu sensible. Avant de tirer des conclusions fortes, il eut été intéressant de discuter la variabilité de réponse obtenue avec ce contrôle positif entre ces expériences indépendantes (figure 4 versus 5 par exemple). Par ailleurs, dans la figure 5(d), l'induction de la sécrétion de h-hCG par le DES est rapporté statistiquement significative à $p < 0,01$ alors que celle induite par le benzyl salicylate, apparemment plus forte, n'est statistiquement significative qu'à $p < 0,1$. Ceci suggère de possibles erreurs de rapportage des données. Pour une analyse précise de l'article, l'Anses recommande d'avoir accès aux données brutes de ces expériences.
- les valeurs des hormones en ng/nmol/mUI pour x cellules (par exemple 1000) auraient été utiles pour comparaison avec les données publiées de la littérature ;
- aucune indication du nombre de répliquats n'est donnée pour ces contrôles. Par ailleurs, la notion de « *means of at least three independent experiments* » n'est pas détaillée, en particulier à quel niveau ces expériences sont indépendantes (même lignée mais traitement différent, ou lignées différentes ?) ;
- enfin, certaines substances analysées sont présentes dans les huiles essentielles à des teneurs largement inférieures à 80%, sans information supplémentaire sur les autres composants. Ceci induit de grandes incertitudes sur l'extrapolation directe entre les observations des propriétés de danger sur le composant principal versus l'huile essentielle. Par exemple le salicylate de benzyle est présent à seulement 2,16% dans l'huile essentielle de ylang-ylang. Il apparaît alors assez logique que les résultats obtenus avec le composant principal diffèrent de ceux obtenus avec l'HE. C'est pourtant dans ce cas que les résultats obtenus avec le composant « principal » sont les plus similaires avec l'HE. Ceci questionne sur la pertinence du modèle utilisé pour étudier le phénomène d'additivité des substances.

3) Une interprétation des résultats au-delà de leur poids de preuve issu de l'expérience :

Il est attendu qu'une substance composée de 100 à 150 constituants ne donne pas de résultats similaires par rapport au constituant « principal » lorsque celui-ci est présent entre 2% et 56%. En absence de connaissance exacte de la composition chimique de la substance aucune conclusion ne peut être établie quant à un effet différent entre le constituant « principal » et l'HE.

En revanche, les différences de résultats observées entre des HE renfermant un constituant « principal » à hauteur de 95% et ce même constituant méritent d'être investiguées. Ainsi l'HE d'orange composée de 95,18% de limonène, influence de manière différente les sécrétions d'hormones testées que son composant principal. L'HE d'orange n'induit pas de sécrétion d'estradiol aux deux faibles concentrations alors que le limonène produit une diminution de 50% de la production de cette hormone par rapport au contrôle statistiquement significative ($p < 0,05$). Une augmentation de la sécrétion d'estradiol statistiquement significative est observée à la plus forte concentration ($0,17 \times 10^{-1} \%$) de HE d'orange alors que le limonène n'est pas inducteur. Il est donc discutable de conclure sur la base de ces résultats que le « *Limonene induced an antiestrogenic effect, contrary to orange EO that induced an estrogenic effect* », ces effets étant variables selon la dose testée. Ni l'HE d'orange ni le limonène n'induisent d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) sur la sécrétion de progestérone, l'h-hCG et l'hPL, sauf pour la plus forte concentration d'EO d'orange testée qui induit une sécrétion d'h-hCG statistiquement significative ($p < 0,1$).

La gaulthérie, composée de 94,56% de salicylate de méthyle, et ce dernier n'ont pas d'effet statistiquement significatif sur la sécrétion de progestérone, d'estradiol et d'hPL. L'HE de gaulthérie entraîne des augmentations doses-dépendantes et statistiquement significative à forte dose ($p < 0,05$) de sécrétion h-hCG. Alors que le salicylate de méthyle n'entraîne aucune modulation de sécrétion hormonale par rapport au contrôle. Il apparaît donc erroné de conclure que le « *methyl salicylate induced an antiprogestational effect, opposite to wintergreen EO, which induced a progestational effect* ».

Une analyse plus nuancée des résultats obtenus, discutant de la variabilité du modèle aurait amélioré l'intérêt de cette publication.

4) Une conclusion surprenante quant à l'exclusion du danger PE (tant sur HE que sur composant) compte tenu de la base expérimentale :

Cet article rapporte que toutes les huiles essentielles testées ou leur constituant « principal » modifient la sécrétion d'au moins une hormone placentaire majeure. Aussi, la conclusion émise qui exclut que ces substances soient des perturbateurs endocriniens ne paraît pas fondée.

En effet, par une telle conclusion, les auteurs de l'article postulent que l'absence d'activation du récepteur P2X7 est suffisante pour exclure le caractère PE des substances testées : « *P2X7 receptor activation would be a common cellular mechanism of toxicity for EDCs in placenta [19,20]* ». Il est noté tout d'abord que la formulation est prudente (« *would be* » et non pas affirmative), ce qui est en écart avec une conclusion ferme sur la caractère PE. De plus, cette affirmation n'a pas de solidité scientifique suffisante pour les raisons ci-après :

- Les deux références indiquées (19 et 20) sont deux articles issus de la même équipe qui observe qu'une dizaine de PE (tous avec un noyau phénolique) augmente l'activation de P2X7 des cellules JEG-3. Ceci n'autorise évidemment pas une généralisation à tous les PE. Là encore, pour pouvoir affirmer que ce récepteur est le marqueur d'un effet apical induit par un mécanisme PE, il eut fallu l'étayer par de la littérature, voire des expériences complémentaires

simples comme l'utilisation de cellules *knock-out* pour P2X7. De plus, les résultats concernant l'utilisation du *brilliant blue* comme agent inhibiteur de l'activation de P2X7 par des PE (Fouyet *et al.*, 2022) sont très discutables car le *brilliant blue* est utilisé à la concentration de 25 µM alors que la valeur de l'EC50 est de 10 nM (Jiang *et al.*, 2000).

- Le récepteur P2X7, est un récepteur ubiquitaire dont l'activateur biologique est une des purines ou un dérivé de l'ATP et non une hormone. L'activation du récepteur P2X7, un canal ionique hétérotrimérique, par l'ATP extracellulaire induit une cytolysse et un processus apoptotique mais participe aussi au contrôle de la prolifération cellulaire (Gusic *et al.*, 2021; Illes *et al.*, 2021). Ce récepteur est exprimé dans de nombreux tissus et est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, dont celles relatives à l'inflammation mais aussi dans la prolifération, la sécrétion des cytokines, l'activation protéases, la phagocytose, l'autophagie, l'apoptose... (Fodor *et al.*, 2020; Mishra *et al.*, 2021; Martin *et al.*, 2019; Adinolfi *et al.*, 2018).

- Enfin, s'il est compréhensible au vu du contexte de cette étude qui s'intéresse à l'utilisation d'HE pendant la grossesse, qu'un indicateur (l'activation du récepteur P2X7) présenté par les auteurs comme étant impliqué dans des effets placentaires soit retenu, ce choix n'en fait pas un marqueur exclusif de la caractérisation du danger de PE au sens de la définition de l'OMS ; en effet, celle-ci s'intéresse à la réponse de l'organisme entier, et ne se résume pas à l'état d'activation d'un récepteur.

De plus, il est intéressant de noter que cette protéine, qui joue un rôle dans l'inflammation, elle-même impliquée dans les phénomènes d'allergie, n'est en réalité activée ni par les HE ni par les substances testées. Alors que, par exemple, le terpinéol a des effets allergisants connus et est banni des jouets. Les résultats obtenus dans l'article questionnent la sensibilité de ce récepteur comme marqueur d'effet néfaste au vu de cette incohérence.

5) Une notion de modulateur endocrinien introduite par les auteurs :

Enfin, les auteurs proposent de classer les HE et leur constituant « principal » comme des « modulateurs endocriniens » ou « modulateurs hormonaux ». Ces termes pourraient provenir de l'avis de l'EFSA⁸ (2013) discutant brièvement de la différence entre la « perturbation endocrinienne » et la « modulation endocrinienne (modulation physiologique) ». Dans cet avis, l'EFSA tente de distinguer les substances présentant une activité endocrinienne (*Endocrine active substances*) conduisant à un effet délétère de celles n'en induisant pas. Dans le contexte des HE, cette terminologie apparaît comme non appropriée puisque l'absence d'effet délétère n'est pas démontrée.

En effet, dans la mesure où l'existence d'une activité endocrinienne est l'une des conditions pour remplir la définition de l'OMS⁹, et sans que cela ne constitue une présomption de la classification *in fine*, l'identification des substances présentant une telle activité endocrinienne est un filtre - parmi d'autres - pour identifier des substances d'intérêt en vue de leur appliquer une démarche de priorisation des substances à propos desquelles poursuivre les investigations concernant la perturbation endocrinienne. Une approche de ce type a été suivie par l'Anses dans son avis d'avril 2021 relatif à « l'élaboration d'une liste de substances chimiques d'intérêt en raison de leur activité endocrine potentielle ».

Pour autant, l'Anses avait également, dans son avis de 2021 portant sur l'« Élaboration d'une méthodologie d'évaluation du caractère perturbateur endocrinien des substances chimiques »,

⁸ European Food Safety Authority ou Autorité européenne de sécurité des aliments

⁹ Organisation mondiale de la Santé

proposé différentes catégories de perturbateurs endocriniens en fonction du poids des données et preuves scientifiques disponibles par rapport à la caractérisation du danger, au sens de la définition de l'OMS et au vu de l'ensemble des critères.

Aussi, il est à craindre que l'introduction de la notion de « modulateur endocrinien » dans le contexte d'une révision réglementaire entretiendrait la confusion avec la classe de danger « perturbateur endocrinien » qui ne s'applique qu'en présence d'éléments indiquant la survenue d'un effet néfaste, sans apporter de concept nouveau par rapport aux mécanismes d'identification et de priorisation des substances d'intérêt déjà mis en œuvre.

4. CONCLUSION DE L'AGENCE

De sa pratique en matière d'évaluation des dangers de substances seule ou de type UVCB et de l'analyse de l'article, l'Anses tire les conclusions ci-après :

- Il est depuis longtemps connu qu'une substance composée de plusieurs constituants peut ne pas avoir le même effet qu'un de ses constituants majeurs ou majoritaire ; par conséquent il n'est pas étonnant d'observer, dans l'article relatant l'étude menée, que l'effet d'une huile essentielle (une substance complexe ayant jusqu'à 150 constituants différents) soit différent de celui de son constituant « principal »¹⁰. Néanmoins, l'article ne permet pas d'étayer une conclusion sur la manière de rendre compte des interactions (effet antagoniste / neutre / additif / synergique) entre les constituants des HE pour différentes classes d'effets, et plus particulièrement pour la classe de danger PE. A titre d'illustration, sur la base des seuls effets observables de l'étude, ces derniers apparaissent plus similaires pour une HE et son constituant à 2% que pour une HE et son constituant à 95%. Or, l'absence de prise d'information sur les constituants additionnels, rend impossible toute tentative de d'interprétation des résultats obtenus.
- L'utilisation d'un protocole expérimental récent, et en cours de validation, n'apporte pas à lui seul la robustesse scientifique suffisante aux résultats de l'étude menée. Il est aussi surprenant que les analyses statistiques concluent à des différences avec une valeur de $p < 0.1$ ce qui aboutit à surévaluer le nombre de résultats différents de ceux du contrôle. Quelle que soit la problématique biologique étudiée (de la génotoxicité, phénomène simple étudiant l'interaction d'une substance avec l'ADN à des phénomènes bien plus complexes tels que la perturbation endocrinienne), il est impossible de dresser des conclusions sur la base d'un essai unique réalisé sur une seule lignée cellulaire.
- Les résultats ne sont pas mis en regard de résultats existants, ce qui ne permet pas de conforter les résultats de ce modèle en cours de mise au point. Par ailleurs, même au sein du modèle, les résultats ne sont pas discutés entre eux pour évaluer leur pertinence biologique. A ce stade, l'Anses considère que les conclusions doivent donc être considérées comme des hypothèses de travail et non des acquis.

¹⁰ Au sens de l'article

- Pour différentes raisons détaillées ci-dessus, le raisonnement pour exclure que le caractère PE, au sens de la définition de l'OMS, tant des huiles étudiées que de leur constituant « principal » respectif, ne semble aucunement justifié.
- L'Anses estime que la notion de « modulateur endocrinien » n'apporte pas de nouveauté par rapport à la notion de substance ayant une activité endocrinienne utile dans une étape de tri et de priorisation (EFSA 2013, Anses 2021), et ne peut que générer de la confusion par rapport à un critère de classement au regard du danger (Anses, 2021).

L'enjeu du règlement CLP est de proposer des règles à la fois simples, protectrices, qui permettent de classer un très grand nombre de substances et en optimisant le recours à l'expérimentation animale. Par ailleurs, par analogie avec les classes de danger CMR¹¹, la règle des mélanges permet de pallier les limites de l'expérimentation animale. Si cette dernière reste actuellement le modèle privilégié pour prédire la toxicité pour l'Homme, elle possède une sensibilité limitée pour détecter certains effets en raison d'un nombre d'animaux faible et d'une durée d'expérimentation limitée au regard des effets chroniques. Par conséquent, il n'apparaîtrait pas proportionné, tant pour le secteur des huiles essentielles que pour les mélanges complexes en général, de tester chacune des huiles essentielles.

Ainsi, après analyse, l'Anses considère que cet article ne constitue pas un fondement solide qui permettrait de remettre en cause la méthodologie actuellement utilisée pour classer les substances complexes MOCS incluant les huiles essentielles et ce pour les raisons qui sont développées ci-dessus. Alors qu'il semble conclure sur le caractère PE de cinq huiles essentielles et de leur constituant « principal », sa limitation à observer des variations hormonales et l'activation d'un marqueur moléculaire ne permet au principal qu'une comparaison dans le contexte d'un essai *in vitro*, i.e. sans intégrer la réponse à un échelon global des organes ou de l'organisme.

Cette comparaison n'est pas dénuée d'intérêt et gagne à être creusée en la mettant en regard avec d'autres résultats publiés dans la littérature scientifique, notamment dans la perspective de la poursuite de la validation de ce protocole de niveau 2 pour la caractérisation du danger PE. L'Anses souligne que la complexité des mécanismes impliqués appelle plus vraisemblablement la mise au point d'une batterie de tests que celle d'un test isolé.

Enfin, l'Anses rappelle que ses avis précédents ont toujours recommandé l'accélération des développements de méthodes expérimentales à la fois sensibles, spécifiques et répétitives, pour permettre une priorisation au plus tôt des substances au regard de cette classe de danger PE qui vient d'être inscrite dans la dernière évolution du règlement CLP.

Pr Benoît Vallet

¹¹ Cancérogènes, Mutagènes, Reprotoxiques

MOTS-CLÉS

Huiles essentielles, perturbation endocrinienne, Règlement CLP

BIBLIOGRAPHIE

- Adinolfi, E. *et al.* (2018) The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem. Pharmacol.*, **151**, 234–244.
- Anses (2021). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'élaboration d'une liste de substances chimiques d'intérêt en raison de leur activité endocrine potentielle. Méthode d'identification et stratégie de priorisation pour l'évaluation. (saisine 2019-SA-0179). Maisons-Alfort : Anses, 27 p.
- Anses (2021). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'élaboration d'une méthodologie d'évaluation du caractère perturbateur endocrinien des substances chimiques. Contribution à la Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens 2019-2022. (saisine 2019-SA-0179). Maisons-Alfort: Anses, 60 p.
- EFSA (2013). Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA Journal*, **11(3)**:3132
- Fodor, P. *et al.* (2020) Inflammation The role of ATP in pre-eclampsia. *Microcirculation*, **27**, e12585.
- Fouyet, S. *et al.* (2022) Pregnant Women and Endocrine Disruptors: Role of P2X7 Receptor and Mitochondrial Alterations in Placental Cell Disorders. *Cells*, **11**, 495.
- Grignard, E. *et al.* (2022) Regulatory Testing for Endocrine Disruptors; Need for Validated Methods and Integrated Approaches. *Front. Toxicol.*, **3**, 821736.
- Gusic, M. *et al.* (2021) Dissecting activation steps in P2X7 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **569**, 112–117.
- Illes, P. *et al.* (2021) Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *Br. J. Pharmacol.*, **178**, 489–514.
- Jiang, L.-H. *et al.* (2000) Brilliant Blue G Selectively Blocks ATP-Gated Rat P2X7 Receptors. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 82–88.
- Kohler, P.O. and Bridson, W. (1971) Isolation of Hormone-Producing Clonal Lines of Human Choriocarcinoma1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **32**, 683–687.
- Martin, E. *et al.* (2019) Le récepteur P2X7, une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer. *médecine/sciences*, **35**, 97–99.
- Mishra, Abtar *et al.* (2021) P2X7 receptor in multifaceted cellular signalling and its relevance as a potential therapeutic target in different diseases. *Eur. J. Pharmacol.*, **906**, 174235.
- Yancu, D. and Sanderson, T. (2019) Essential oils disrupt steroidogenesis in a feto-placental co-culture model. *Reprod. Toxicol.*, **90**, 33–43.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2023). Note d'appui scientifique et technique relative à l'analyse de l'article de Fouyet et al. (2022) mis en avant par des acteurs économiques pour rejeter une règle de classification proposée par la Commission Européenne. (saisine 2022-AST-0135). Maisons-Alfort : Anses, 20 p.

ANNEXE 1 : PRESENTATION DES INTERVENANTS

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

COMITÉ D'EXPERT SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets de la présente note, ont été réalisés avec le soutien de deux experts du CES « Substances chimiques visées par les règlements REACH et CLP » (CES REACH CLP ; *quatrième mandature, du 1^{er} janvier 2021 au 31 décembre 2023*)

Président

M. Christophe MINIER – Professeur des Universités – Université Le Havre - Normandie.

Vice-président

M. Fabrizio PARISELLI – Ingénieur d'étude toxicologue – CNRS.

Membres

Mme Sylvie BALTORA-ROSSET – Professeur des Universités (Université Picardie Jules Verne) – Compétences : chimie analytique et Evaluation des risques.

Mme Isabelle BILLAULT – Maître de conférences (Université Paris Sud-Saclay) – Compétences : chimie organique et analytique, propriétés physico-chimiques des substances.

M. Christophe CALVAYRAC – Maître de conférence (Université de Perpignan Via Domitia) – Compétences : chimie analytique, devenir environnemental, dégradation biotique et abiotique, microorganismes.

M. Gwenaël CORBEL – Chargé de recherche (CNRS) - Compétences : synthèse et caractérisations de matériaux inorganiques et nano-matériaux.

M. Richard DANIELLOU – Professeur des universités, vice-doyen UFR (Université d'Orléans) - Compétences : biochimie, chimie organique, enzymes, cosmétiques.

M. Franck-Olivier DENAYER – Maître de conférences (Université de Lille Droit et Santé) - Compétences : écotoxicologie, toxicologie, perturbateur endocriniens, nanoparticules, métaux, végétaux.

Mme Laure GEOFFROY – Ecotoxicologue (INERIS) - Compétences : environnement, écotoxicologie, nanomatériaux, perturbateurs endocriniens.

M. René HABERT – Professeur des Universités émérite (Université Paris Diderot) - Compétences : endocrinologie, reproduction, développement, perturbateurs endocriniens.

M. Philippe JUVIN – Retraité - Compétences : réglementations françaises et européennes, toxicologie, prévention des risques professionnels.

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants (Laboratoire de Fougères – Anses) - Compétences : génotoxicité, toxicologie, valeurs toxicologiques de référence, hépatotoxicité, métabolisme.

M. Nicolas LOISEAU – Directeur de recherche (INRAE) - Compétences : chimie, toxicologie, hépatotoxicologie, QSAR, pharmacologie.

M. Jean MARTINEZ – Professeur émérite (Université de Montpellier (Faculté de Pharmacie)) - Compétences : chimie, pharmacologie, endocrinologie.

M. Christophe MINIER – Professeur des Universités (Université Le Havre – Normandie) - Compétences : écotoxicologie, contexte réglementaire, endocrinologie, perturbateurs endocriniens.

M. Fabrizio PARISELLI – Ingénieur d'étude toxicologue – CNRS - Compétences : toxicologie, réglementation, santé et sécurité au travail, évaluation des risques.

M. Vincent RICHARD – Ingénieur de prévention (DIRECCTE Normandie) - Compétences : risque chimique, réglementations, risques sanitaires, ICPE.

M. Bernard SALLES – Professeur émérite de Université de Toulouse - Compétences : Toxicologie générale, toxicologie et pharmacologie moléculaire, cancérogenèse, nanotoxicologie, modèles cellulaires.

Mme Paule VASSEUR – Professeur de toxicologie, chercheur toxicologue écotoxicologue (Retraîtée de l'Université de Lorraine) - Compétences : toxicologie, méthodes alternatives, santé publique, sécurité sanitaire, santé environnement, évaluation des risques sanitaires.

Mme Catherine VIGUIE – Directrice de recherche, vétérinaire (INRAE) - Compétences : endocrinologie, perturbateurs endocriniens, toxicologie, pharmacologie.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique et contribution scientifique

Mme Johanna BERNERON – cheffe de projet scientifique – Unité REACH, CLP, PE

Mme Sandrine CHARLES – cheffe de projet scientifique – Unité REACH, CLP, PE

Mme Cécile MICHEL – Cheffe de l'Unité REACH, CLP, PE.

Secrétariat administratif

Mme Patricia RAHYR – Anses

ANNEXE 2 : SUIVI DE L'ACTUALISATION DE LA NOTE

| PAGE | MODIFICATION APPORTEE | JUSTIFICATION |
|---------------------|--|---|
| Ensemble de la note | « composant » a été remplacé par « constituant » | Reprise du terme employé dans l'article analysé |
| Ensemble de la note | « mélange » a été remplacé par « UVCB » | Reprise du terme employé dans l'article analysé car terme erroné |
| 1 | Note de bas de page n°1 | Indique que cette nouvelle note est une version révisée de la précédente datant du 2 février 2023 |
| 2 | Dans la section « Contexte et Objet de la demande » une précision a été ajoutée avec un renvoi vers la note de l'ANSES sur la proposition de révision du Règlement CLP : « mais également dans la récente note de l'Anses sur la proposition de révision du Règlement CLP. Ces documents rappellent que la même règle doit s'appliquer qu'il s'agisse de mélange ou d'un UVCB. | |
| 2 et 3 | <p>Dans « Organisation des travaux le texte suivant a été ajouté : « Le 6 juillet 2022 l'Anses a reçu une demande de la direction générale du travail (DGT) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR) ayant conduit à la réalisation du présent appui scientifique qui devait être rendu pour le 21 octobre 2022.</p> <p>La demande visait à produire une analyse critique de l'article de Fouyet et al. (2022) soumis par des acteurs économiques aux ministères de tutelles de l'Anses faisant valoir des données scientifiques rendant inapplicables l'approche « MOCS3 » proposée par la Commission Européenne dans le cadre de la révision du règlement CLP pour les huiles essentielles. Il était également demandé d'expliquer le terme de « modulateur endocrinien » employé dans l'article.</p> <p>Des échanges ont eu lieu avec deux experts rapporteurs du CES REACH CLP entre juillet et septembre et le document a été présenté et validé lors de la séance du CES du 21 septembre 2022.</p> <p>Cette note a donc été signée pour publication le 02 février 2023 et publiée le 4 février 2023. »</p> | Texte ajouté pour plus de clarté sur le déroulé de l'expertise |
| 3 | Le texte suivant a été ajouté : « Sur sollicitation de l'association COSMED et suite aux commentaires transmis par celle-ci en mars 2023 (voir Annexe 3), cette note a été révisée en mai 2023 (voir Annexe 3 pour les modifications apportées). » | Ajout effectué pour justifier la publication d'une seconde version de la présente note. |
| 5 | Le texte : « Par ailleurs, si on compare avec les données de la littérature, cinq HE ont été testées sur la lignée trophoblastique BeWo en co-culture avec la lignée H295R (cellules surrénaliennes productrices d'androgènes qui augmentent la sécrétion d'hormones stéroïdes des cellules BeWo). Ce système cellulaire très sensible montre une sécrétion d'hormones stéroïdes pour deux HE et aucune induction d'hormones pour les trois autres dont l'HE orange (0.00005% et 0.0001%) (Yancu et Sanderson, 2019). Ce résultat contradictoire n'a pas été discuté. » a été supprimé | Le travail publié ici s'est cantonné à l'analyse scientifique et méthodologique de l'article analysé tel que demandé par les ministères de tutelle. Pour comparer les résultats présentés à la littérature existante, une analyse systématique de la littérature aurait été nécessaire pour être parfaitement exhaustif. Ceci n'a pas été effectué et cette comparaison unique n'a pas vocation à apparaître dans l'avis. |

| | | |
|---|--|---|
| 6 | « Cette terminologie apparaît nouvelle et non définie » a été remplacé par « Ce terme est défini par l'EFSA comme s'appliquant à une substance entraînant une modulation endocrine sans effet délétère apparent par opposition à la perturbation endocrinienne (EFSA, 2013). Dans le contexte des HE, cette terminologie apparaît comme non appropriée puisque l'absence d'effet délétère n'est pas démontrée. » | Pour accroître la lisibilité du propos. |
| 6 | Dans la section sur la notion de « modulateur endocrinien » le paragraphe a été retravaillé. Les phrases faisaient référence au document de l'EFSA ont été regroupées. | pour plus de lisibilité et éviter les redondances |
| 7 | A la fin du paragraphe concernant la notion de modulateur endocrinien le texte « dans le contexte d'une révision réglementaire » a été ajouté | Cet ajout vient ajouter du contexte au propos |

ANNEXE 3 : REPONSE DE COSMED A LA NOTE DE L'ANSES DU 2 FEVRIER 2023



**Réponse à la note de l'ANSES
N°2022-AST-0135**

publiée le 2 février 2023 et intitulée :

« Note d'appui scientifique et technique de l'ANSES relative à l'analyse de l'article de Fouyet et al (2022) mis en avant par des acteurs économiques pour rejeter une règle de classification proposée par la Commission Européenne »

Contact : Jean Marc GIROUX
Dr. en Pharmacie
Expert Toxicologue-Pharmacologue
giroux.jm@gmail.com





Contexte

La note d'appui scientifique et technique de l'Anses, rendue publique le 2 février 2023, répond à une demande de la DGPR et de la DGT¹ pour évaluer la pertinence d'une méthode scientifique d'étude des substances potentiellement perturbatrices, sur un modèle de Cellules Placentaires Humaines. Cette méthode d'étude a été élaborée et brevetée par une unité du CNRS². Elle a fait l'objet de plus de dix publications internationales dans des revues à comité de lecture à « impact factor » élevé. Elle a été classée prioritaire devant environ 250 autres tests dans le processus de validation de tests d'étude de la perturbation endocrinienne (PE) des substances sur la plateforme européenne Pepper³. Sa validation OCDE est particulièrement avancée.

Les acteurs économiques des huiles essentielles (HE) l'ont utilisée pour objectiver la différence de comportement PE entre une substance controversée isolée des HE, et des HE totales. De nombreux travaux scientifiques antérieurs avaient déjà objectivé cette différence, constituant un faisceau de preuves avec cependant un niveau de validation perfectible compte tenu des difficultés méthodologiques rencontrées. Le modèle sur Cellules Placentaires Humaines représente une avancée reconnue comme majeure dans l'étude des substances potentiellement PE.

Les acteurs économiques des HE entendent exposer auprès des autorités européennes (Commission, Echa...) l'intérêt d'introduire dans la classification des substances, notamment PE, des données scientifiques modernes et probantes.

Or, le projet de révision du règlement (CE) n°1272/2008 relatif à la classification, l'étiquetage, l'emballage des substances et des mélanges publié le 19 décembre 2022, introduit une nouvelle méthode de classification de certains dangers pour les substances à plusieurs composants, dénommées également « MOCS »⁴, telles les huiles essentielles. Ainsi, dans le cas où certaines données indiqueraient un potentiel PE d'un composant, l'ensemble de l'HE devrait être classée PE, et ce même si des données pertinentes et validées ne montrent aucun effet PE avec l'HE totale. Cette approche, qui consiste à assimiler une substance complexe à un mélange, constitue une voie de classification administrative rapide et simplifiée, et non une approche scientifique. Elle ne prévoit pas de tenir compte des différences entre un constituant et l'HE totale, sauf si les preuves fournies confirment ou renforcent le caractère dangereux estimé.

Le même projet de règlement offre toutefois la possibilité de déroger à cette classification, sous réserve de fournir des données scientifiques probantes, selon les modalités de l'Annexe I du règlement CLP. Les acteurs économiques entendent soumettre des données probantes et faire bénéficier les HE de ces dispositions dérogatoires lorsque c'est justifié.

¹Anses (2023). Note d'appui scientifique et technique relative à l'analyse de l'article de Fouyet et al. (2022) mis en avant par des acteurs économiques pour rejeter une règle de classification proposée par la Commission Européenne (saisine 2022-AST-0135). Maisons-Alfort : Anses, 12 p

² <https://www.cnrs.fr/cnrsinnovation-lalettre/actus.php?numero=943>

³ Grignard E de Jesus K and Hubert P (2022) Regulatory Testing for Endocrine Disruptors; Need for Validated Methods and Integrated Approaches. *Front. Toxicol.* 3:821736. doi: 10.3389/ftox.2021.821736

⁴ Dans le cadre du projet de révision du règlement (CE) n°1272/2008, le terme « MOCS » n'apparaîtra plus, mais le terme « substance à plusieurs composants » sera utilisé.



Le présent document discute les arguments de l'ANSES contenus dans la note N°2022-AST-0135.

1- Une expertise de l'ANSES en partie non conforme aux exigences de la norme NF X 50 -110 « Qualité en expertise »

L'Anses expose avoir réalisé l'expertise dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise - Mai 2003 ». La majeure partie des critiques et remarques soulignent un « manque de données », « recommande un accès aux données des expérimentateurs ».

- « Pour une analyse précise de l'article, l'Anses recommande d'avoir accès aux données brutes de ces expériences »,
- « il eut été utile de comparer les résultats obtenus sur la sécrétion de certaines hormones avec des résultats existants »,
- « la notion de « means of at least three independent experiments » n'est pas détaillée, en particulier à quel niveau ces expériences sont indépendantes (même lignée mais traitement différent, ou lignées différentes ?) » ;
- « aucune variabilité n'est indiquée pour les contrôles sur les paramètres testés, aucune indication du nombre de répliquats n'est donnée pour ces contrôles »
etc...

Les données, dites manquantes, étaient pourtant disponibles, pour la plupart, auprès des auteurs de la publication ou des acteurs économiques cités. Les auteurs de l'étude et les acteurs économiques n'ont pas été auditionnés préalablement à la publication de l'avis de l'Anses. Or, l'attention portée au recueil de données le plus exhaustif possible est une obligation pour un organisme d'expertise :

Le point 7.3.7 de la norme de référence NF X 50-110 précise : « Lors de la réalisation de l'expertise, l'organisme d'expertise doit : h) examiner et enregistrer les éléments remettant en cause ses connaissances ou ses convictions, en tenant compte de toutes les positions dûment argumentées sur le sujet, notamment celles contradictoires. »

Même en l'absence d'audition des auteurs et acteurs économiques, dès septembre 2022, les données « manquantes » et les réponses aux questions soulevées dans la note de l'Anses auraient pu être recueillies lors de la soutenance publique de la thèse de Mme Fouyet, où des représentants experts et qualifiés de l'Anses et de la DGPR constituaient une partie du Jury.

L'absence de recueil des données contradictoires ou manquantes constitue un écart critique par rapport à la Norme X 50-110, limitant la pertinence des conclusions de l'expertise.



2 - Des confusions terminologiques entre « substance » et « mélange » au sens des règlements REACH et CLP

Les termes « substance » et « mélange » utilisés dans les réglementations REACH et CLP sont définis précisément⁵ et renvoient à des dispositions spécifiques en matière de déclaration et modalités de classification, La rédaction de la note d'expertise comporte de nombreux passages où les termes sont confondus :

Exemple : (page 6) « ...l'effet d'une huile essentielle (un mélange allant jusqu'à 150 substances)... »

Au sens de REACH et CLP, une huile essentielle n'est pas un « mélange comportant jusqu'à 150 substances », mais une substance dite « UVCB⁶ » (substances de composition variable ou inconnue, produits de réaction complexe et matériaux biologiques) ou SNC⁷ (Substance Naturelle Complexe) allant jusqu'à 150 constituants.

Ainsi, certaines obligations et dispositions REACH/CLP, notamment sur les règles de classification applicables aux « mélanges », ne s'appliquent pas aux huiles essentielles qui sont des « substances complexes ».

3 – La notion de « modulateur endocrinien » perçue comme « nouvelle et non définie »

Un des objets de l'expertise a été d'explicitier le terme « modulateur endocrinien » utilisé dans la thèse. Les auteurs auraient *introduit* cette notion dans leurs travaux, comme une *proposition de classement*, au risque, selon l'Anses, d'amener une confusion lors des enjeux du classement CLP.

Tel que défini par l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) en 2013, la « modulation endocrinienne » est définie comme une modulation observée, mais sans effet délétère. Le caractère délétère « permet de distinguer la « perturbation endocrinienne » de la « modulation endocrinienne »⁸. Ainsi, il ne peut pas être dit que le terme « endocrine modulation », par ailleurs très largement utilisé dans la bibliographie, aurait été introduit par les auteurs.

⁵ Article 2 du règlement CLP : « substance » : un élément chimique et ses composés, à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour en préserver la stabilité et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition ; « mélange » : un mélange ou une solution constituée de deux substances ou plus.

⁶ ECHA – Guide pour l'identification et la désignation des substances dans le cadre de REACH et du CLP (version 2.1)

⁷ EFEO/IFRA Directives relatives à l'identification de substances et à la similitude des Substances Naturelles Complexes (SNC) en vertu des règlements REACH et CLP

⁸ EFSA, 2013 – Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment



L'affirmation de l'Anses relève d'une interprétation qui va au-delà des affirmations des auteurs (Fouyet et al, 2022). Ceux-ci affirment : "les huiles essentielles testées apparaissent davantage comme des modulateurs endocriniens que des perturbateurs endocriniens sur les cellules placentaires humaines".

Par conséquent, il ne s'agit pas d'une proposition pour le classement de ces substances, mais l'observation d'un résultat négatif pour l'activation du marqueur d'effet délétère sur les cellules placentaires humaines.

La notion de modulation endocrinienne est présente depuis très longtemps dans la littérature, elle n'est pas nouvelle, et dispose d'une définition claire par l'EFSA. Sur ces bases, le risque de confusion semble très limité.

4- Des résultats estimés contradictoires par rapport à la littérature

L'objet de la recherche scientifique est, par essence, de confronter des résultats contradictoires. En l'espèce, il était indispensable de vérifier que **les études comparées utilisaient des huiles essentielles, dûment caractérisées, et à des concentrations équivalentes.**

La note d'expertise estime que les résultats de Fouyet et al, 2022 (augmentation d'œstradiol statistiquement significative à la dose la plus haute testée d'HE d'orange) sont contradictoires avec l'étude de Yancu et Sanderson, 2019⁹, n'indiquant aucune induction d'hormones.

Or, la plus haute dose d'HE d'orange testée par Fouyet et al, 2022 est 100 ou 1000 fois plus élevée que celles testées par Yancu et Sanderson, 2019, respectivement. **Pour des doses équivalentes, les mêmes résultats ont été obtenus :**

- A la concentration d'HE d'orange de $0,17 \times 10^{-1}\%$ testée sur le modèle hPlacentox, une augmentation de la sécrétion d'œstradiol statistiquement significative par rapport au contrôle a été observée. Or cette dose est 100 fois plus élevée par rapport à la dose la plus haute testée par Yancu et Sanderson, 2019. **Il ne pouvait donc être dit que les résultats étaient contradictoires, car ils ne pouvaient simplement pas être comparés.**
- Aux concentrations d'HE d'orange de 0,00005% et 0,0001% ($0,5 \times 10^{-4}\%$ et $0,1 \times 10^{-3}\%$, respectivement) testées par Yancu et Sanderson, 2019 sur la lignée trophoblastique BeWo en co-culture avec la lignée H295R, aucune induction de la sécrétion d'œstradiol n'a été observée. Cette même observation a été faite par Fouyet et al, 2022 avec la méthode hPlacentox lorsqu'une concentration équivalente d'HE d'orange ($0,17 \times 10^{-3}\%$) a été testée.

⁹ Yancu, D. and Sanderson, T. (2019) Essential oils disrupt steroidogenesis in a fetoplacental co-culture model. *Reprod. Toxicol.*, 90, 33–43



Les résultats du test sur Cellules Placentaires Humaines sont donc comparables aux résultats des travaux de Yancu et Sanderson, 2019.

Le manque de caractérisation des HE est malheureusement un biais assez général dans la littérature scientifique dédiée aux HE. Concernant le caractère potentiellement PE, il est connu que les HE d'agrumes, et notamment d'oranges, peuvent contenir des résidus de pesticides aux propriétés PE avérés¹⁰. Ceci est dû au mode d'extraction par pression de l'épicarpe du fruit, et non par distillation.

Fouyet et al, 2022 ont vérifié l'absence de pesticides dans toutes les huiles essentielles testées : *"l'analyse de plus de 250 pesticides par la méthode CG-SM/SM met en évidence que les huiles essentielles testées ne contiennent aucun pesticide"*.

Ce contrôle n'apparaît pas dans les publications antérieures^{11,12} et notamment l'étude de Yancu et Sanderson, 2019 citée en référence.

Ces biais de manque de caractérisation des huiles essentielles avaient déjà affecté et rendu non plausibles les résultats d'études antérieures sur l'huile essentielle de lavande (Ramsey, 2019)¹³.

Conclusion

D'autres questions techniques et scientifiques sont évoquées dans la note d'expertise (ex : non spécificité du récepteur P2X7, phénomènes d'allergie, absence de prise d'information sur les constituants additionnels, etc...). Elles constituent un débat scientifique intéressant, mais non susceptible de remettre en cause l'intérêt de la méthode sur Cellules Placentaires Humaines dans l'objectivation des substances à caractère potentiellement endocrinien.

La note de l'Anses ne peut valablement conclure sur la base de données manquantes et sans recueillir les données complémentaires disponibles auprès des auteurs et des acteurs économiques impliqués, et ce conformément aux prescriptions de la norme NF X 50 -110 « Qualité en expertise ».

¹⁰ Fillâtre Y, Gray FX, Roy C. Pesticides in essential oils: Occurrence and concentration in organic and conventional orange essential oils from eleven geographical origins. *Anal Chim Acta*. 2017 Nov 1;992:55-66. doi: 10.1016/j.aca.2017.08.039. Epub 2017 Sep 4. PMID: 29054150

¹¹ Henley, D.V.; Lipson, N.; Korach, K.S.; Bloch, C.A. Prepubertal Gynecomastia Linked to Lavender and Tea Tree Oils. *N. Engl. J. Med*. 2007; 356, 479-485.

¹² Ramsey, J.T.; Li, Y.; Arao, Y.; Naidu, A.; Coons, L.A.; Diaz, A.; Korach, K.S. Lavender Products Associated With Premature Thelarche and Prepubertal Gynecomastia: Case Reports and Endocrine-Disrupting Chemical Activities. *J. Clin. Endocrinol Metab* 2019, 104, 5393-5405.

¹³ Giroux JM and Orjubin M. 2020 Letter to the Editor: "Lavender Products Associated With Premature Thelarche and Prepubertal Gynecomastia: Case Reports and Endocrine-Disrupting Chemical Activities" *J Clin Endocrinol Metab*. 105(7):e2677-e2678