



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 4 juillet 2014

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à l'élaboration de VTR par voie respiratoire pour le n-hexane (n° CAS 110-54-3)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses s'est autosaisie le 24 avril 2013 en vue d'élaborer une valeur toxicologique de référence (VTR) par inhalation pour le n-hexane (N° CAS : 71-43-2).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Depuis 2004, l'Anses poursuit des travaux d'élaboration de valeurs toxicologiques de référence (VTR) accompagnés de développements méthodologiques.

Dans le cadre de la saisine de la DGS (2009) « perturbateurs endocriniens et reprotoxique de catégorie 3, une évaluation de risque sanitaire (ERS) a été publiée en avril 2014 pour 5 substances chimiques dont le n-hexane (Anses, 2014). Dans ses recommandations, l'Anses a proposé de construire une VTR par voie respiratoire pour le n-hexane à l'issue de l'expertise susmentionnée.

Selon la méthodologie suivie dans cette expertise, une démarche globale évaluant la relation dose-réponse a été adoptée en faisant le rapport de la dose critique (NOAEL ou LOAEL¹) par une marge de sécurité prenant en compte la variabilité inter-individuelle et, le cas échéant la variabilité inter-espèce et l'usage d'un LOAEL. Dans le cas du n-hexane, l'expertise réalisée sur la base de l'ensemble des données disponibles a conduit à retenir trois effets :

- des effets sur la fertilité (diminution du poids des testicules, atrophie des tubes séminifères),
- des effets sur le développement (augmentation du nombre de résorptions fœtales précoces et tardives),

¹ LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level ou Dose minimale entraînant un effet néfaste observé ; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level (= Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)

- des effets neurotoxiques (modification de la conduction nerveuse périphérique) ; les effets sur le système nerveux périphériques ont été considérés comme les effets les plus sensibles.

Une VTR est une appellation générique regroupant tous les types d'indice toxicologique qui permettent d'établir une relation entre une dose et un effet (toxique à seuil d'effet) ou entre une dose et une probabilité d'effet (toxique sans seuil d'effet). Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique), d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire) et d'un type d'effet (reprotoxique, cancérigène,...). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances.

On parle de VTR « à seuil de dose » pour les substances qui provoquent, au-delà d'une certaine dose, des dommages dont la gravité est proportionnelle à la dose absorbée et de VTR « sans seuil de dose », pour les substances pour lesquelles il existe une probabilité, même infime, qu'une seule molécule pénétrant dans l'organisme provoque des effets néfastes pour cet organisme.

En pratique, la construction de la VTR comprend les étapes suivantes :

- analyse de données disponibles,
- choix de l'effet critique,
- identification de l'hypothèse de construction, à seuil ou sans seuil de dose, en fonction du mode d'action de la substance,
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant d'établir une relation dose-réponse ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ; éventuellement dans le cas d'une dose critique obtenue sur l'animal, ajuster cette dose à l'Homme ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes pour les VTR à seuil ou une extrapolation linéaire à l'origine à partir de la dose critique pour les VTR sans seuil.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives s'appuyant sur le jugement d'experts (Afsset, 2010).

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques ». L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail « Valeurs Toxicologiques de Référence II » (GT VTR). Les travaux ont été présentés au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques le 19 décembre 2013. Ils ont été adoptés par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » réuni le 19 décembre 2013.

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 rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

L'ensemble des études permettant de caractériser le profil toxicologique du n-hexane provient d'études conduites chez l'Homme comme chez l'animal.

Le n-hexane est reconnu pour ses effets neurotoxiques chez l'Homme. L'exposition aiguë par voie respiratoire de l'Homme à de fortes concentrations de n-hexane (en général supérieur à 1 000 ppm) induit une atteinte du système nerveux central (SNC) en provoquant en premier lieu un état euphorique avec sensation d'ébriété puis une somnolence avec céphalées, vertiges et nausées. Des irritations oculaires et des muqueuses respiratoires ont également été observées.

De nombreuses études de toxicité subchronique et chronique par voie respiratoire rapportent des effets principalement neurologiques dans les secteurs professionnels où les niveaux d'exposition au n-hexane sont très élevés. Les atteintes neurologiques se traduisent par des polynévrites. Ces dernières commencent par des troubles sensitifs de type paresthésies, puis moteurs (faiblesse des jambes et des bras). A un stade plus avancé, une atteinte de la motricité atteignant principalement les membres inférieurs a été observée avec paralysie flasque et atrophie musculaire plus ou moins importante. Dans les cas les plus sévères, une atteinte du système nerveux central se traduisant par une dysarthrie, une incoordination de la démarche et des troubles de la vision (œdème maculaire) ont été observées. Ces atteintes résultent d'une dégénérescence des systèmes périphériques et centraux atteignant préférentiellement la portion distale des axones longs et de diamètre important avec une diminution de la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Des atteintes comparables ont également été observées chez l'animal (US EPA, 2005 ; INRS, 2008 ; Environnement Canada, 2009).

L'examen histopathologique des nerfs chez les animaux suggère que la substance agit par une succession d'événements impliquant une inflammation axonale entraînant une altération des neurofilaments suivie d'une démyélinisation secondaire (ATSDR, 1999). La 2,5-hexanedione serait responsable de la neurotoxicité en se liant aux groupements amines de la lysine des protéines (INRS, 2008).

Concernant les effets du n-hexane sur la fonction de reproduction, aucune étude sur l'Homme n'a été référencée dans la littérature concernant la toxicité du n-hexane sur la reproduction et la fertilité. Le n-hexane a été classé par la Commission européenne comme toxique pour la reproduction de catégorie 3 (actuelle catégorie 2 selon le Règlement dit CLP²) en raison d'un risque éventuel d'altération de la fertilité). La décision repose sur l'observation d'effets chez les rats mâles après une exposition par inhalation ou ingestion au n-hexane ou à son métabolite, la 2,5-hexanedione, dans les études de reprotoxicité. Les effets se manifestaient par des modifications histologiques dans les testicules et les épидидymes, ainsi que des modifications des caractéristiques du sperme (Environnement Canada, 2009). Les effets neurotoxiques dus aux expositions au n-hexane ont été observés à des concentrations plus faibles que celles entraînant une altération de la fertilité.

Le n-hexane n'est pas classé en tant que potentiel perturbateur endocrinien, selon les données européennes du BKH et du DHI (DHI, 2007 ; BKH, 2002). Aucune information sur le mécanisme d'action relatif aux effets sur la reproduction n'a été recensée dans la littérature. Aucune étude spécifique n'a été conduite en vue d'évaluer les propriétés hormonales du n-hexane. Par

² Règlement (CE) n° 1272/2008 ou CLP (Classification, Labelling, Packaging) du 16 décembre 2008 concernant la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances dangereuses.

conséquent, un lien de causalité entre les effets observés sur la fertilité et le développement et une perturbation endocrinienne ne peut être établi en l'état actuel des connaissances.

Concernant la génotoxicité et la cancérogénicité du n-hexane, plusieurs tests de génotoxicité à court terme ont été réalisés *in cellulo* et la plupart d'entre eux se sont révélés négatifs (US EPA, 2005). Au vu des résultats de plusieurs tests de génotoxicité *in vivo*, le n-hexane n'est pas considéré génotoxique *in vivo*. En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'évaluer le caractère cancérogène du n-hexane. Aucune étude en faveur d'une cancérogénicité liée à la seule utilisation du n-hexane n'a été identifiée (US EPA, 2005).

Les données disponibles n'évoquent pas de populations sensibles pour ce qui concerne les effets sur la reproduction. L'US EPA (2005) suggère que les rats juvéniles pourraient être moins sensibles que les adultes pour ce qui concerne les effets neurologiques (en relation avec une taille plus petite des axones, une croissance et réparation des nerfs périphériques plus importantes, une plus faible concentration de CYP 2E1 impliquant une plus faible production de 2,5-hexanedione).

Elaboration d'une VTR chronique par inhalation

Analyse des VTR existantes

Trois VTR chroniques par inhalation sont disponibles (ATSDR, 1999 ; OEHHA, 2000 ; US EPA, 2005). Les experts ont toutefois considéré que ces VTR présentaient un certain nombre de limites et ont donc choisi d'élaborer une nouvelle VTR.

Choix de l'effet critique

Les experts ont retenu comme effet critique les effets sur le système nerveux périphérique mis en évidence aussi bien dans des études épidémiologiques qu'expérimentales. La neurotoxicité périphérique est en effet reconnue comme étant l'effet le plus sensible associé à une exposition par inhalation au n-hexane chez l'Homme et chez l'animal. La LOAEC la plus basse liée à une exposition par inhalation est de 700 mg.m⁻³ (200 ppm), basée sur une modification de la conduction nerveuse périphérique chez les rats mâles, dans le cadre d'une étude de 24 semaines publiée par Ono *et al.* (Ono *et al.*, 1982).

Choix de l'étude clé

Les experts ont retenu l'étude d'Huang *et al.* (1989) comme étude clé, confortée par l'étude expérimentale d'Ono *et al.* (1982) et les études épidémiologiques de Sanagi *et al.* (1980) et de Chang *et al.* (1993).

Choix de la dose critique

L'US EPA (2005) a dérivé une BMC et BMCL³ à partir de l'étude de Huang *et al.* (1989). Les experts de l'US EPA n'ont pas eu accès aux données individuelles de l'étude. Ils ont estimé les valeurs (moyenne de diminution de la vitesse de conduction des nerfs moteurs, ainsi que les écarts type) graphiquement à partir de la figure 2 de l'article de Huang *et al.* (1989). Les experts ne disposant pas des résultats individuels de cette étude, ont choisi de retenir la BMCL de l'US EPA de 122 ppm (430 mg.m³) pour dériver la VTR.

³ BMC : Benchmark concentration, BMCL : Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMC

Ajustement dosimétrique

Une concentration équivalente humaine (HEC) a été calculée sur la base des recommandations de l'US EPA (1994) qui a développé pour la voie respiratoire différents ajustements dosimétriques en fonction des propriétés physicochimiques de la substance inhalée (particules ou gaz, fortement solubles ou peu solubles dans l'eau) et du site où sont observés les effets critiques (respiratoires ou extra-respiratoires).

Le n-hexane est considéré comme un gaz de catégorie 3 (US EPA, 1994) car :

- il présente principalement des effets extra-respiratoires (toxicité systémique),
- il est peu actif sur l'appareil respiratoire,
- il est rapidement transféré des poumons à la circulation sanguine.

D'après les recommandations de l'US EPA (1994), l'ajustement dosimétrique appliqué par défaut pour un gaz de catégorie 3 est la suivante :

$$BMCL_{HEC} = BMCL \times (Hb/g)_{rat} / (Hb/g)_{Homme}$$

Avec (Hb/g) : coefficient de partition sang/air du n-hexane

Le ratio $(Hb/g)_{rat} / (Hb/g)_{Homme}$ étant supérieur à 1 (2,86), la valeur par défaut de 1 qui est plus protectrice est appliquée.

$$BMCL_{HEC} = BMCL \times 1 = 430 \text{ mg.m}^{-3}$$

Ajustement temporel

Les animaux ont été exposés 12 heures par jour pendant 24 semaines. Pour tenir compte de la discontinuité de l'exposition, un ajustement temporel a été effectué :

$$BMCL_{HEC ADJ} = 430 \times 12/24 = 215 \text{ mg.m}^{-3}$$

Choix des facteurs d'incertitude

- Variabilité inter-espèces (UF_A)

Un ajustement dosimétrique a été réalisé et a permis de calculer une concentration équivalente humaine à l'aide de l'équation précédemment citée. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5.

$$UF_A = 2,5$$

- Variabilité intra-espèce (UF_H)

L' UF_H est appliqué pour tenir compte de la variabilité intra-espèces.

Une étude suggère que les rats sevrés seraient moins sensibles aux effets neurotoxiques du n-hexane que les rats adultes (US EPA, 2005). Par ailleurs, le CYP 2E1 est responsable du métabolisme de nombreuses substances dont le n-hexane et l'acétone. Le polymorphisme au niveau du CYP 2E1 pourrait entraîner des différences de toxicité entre les individus. Les effets neurotoxiques du n-hexane seraient dus à un métabolite toxique, le 2,5-hexanedione, produit suite à la métabolisation du n-hexane par le CYP 2E1. De plus, des différences de développement et de maturité des enzymes de phase I et II (en particulier CYP 2E1) entre les adultes et les enfants ont été montrées dans plusieurs études. Ces données suggèrent que des différences de métabolisme du n-hexane pourraient exister chez l'Homme et entre les adultes et les enfants.

Ainsi, un facteur d'incertitude de 10 a été appliqué

$$UF_H = 10$$

- Durée d'exposition dans l'étude source (UFs)

Dans l'étude de Huang *et al.* (1989), les animaux ont été exposés pendant 16 semaines, ce qui correspond à une exposition subchronique. Le n-hexane n'est pas considéré comme un toxique cumulatif mais, néanmoins, il ne peut être exclu qu'une exposition chronique entraîne des effets à des concentrations inférieures à une exposition subchronique. Par conséquent, un UF_s de 3 est appliqué pour tenir compte de cette incertitude.

$$UF_s = 3$$

Ainsi, un **facteur d'incertitude global de 75** a été appliqué pour dériver la VTR.

Calcul de la VTR

$$VTR = 215 / 75 = 3 \text{ mg.m}^{-3}$$

Effet critique et étude source	Méthode de construction	UF	Valeur VTR
Neurotoxicité (diminution de la vitesse de conduction de l'influx nerveux dans les nerfs moteurs) Huang <i>et al.</i> , 1989 : étude chez le rat	BMCL = 122 ppm <u>Ajustement temporel</u> BMCL _{ADJ} = 61,4 ppm (215 mg.m ⁻³) <u>Ajustement allométrique</u> BMC _{HEC} = 215 mg.m ⁻³	75 UF _A = 2,5 UF _H = 10 UF _S = 3	VTR = 3 mg.m⁻³ Niveau de confiance moyen/fort

Niveau de confiance :

Un niveau de confiance **moyen/fort** a été attribué à cette VTR :

- **Effet critique : moyen**

La toxicité du n-hexane sur le système nerveux périphérique est bien établie. Il n'est toutefois pas exclu que des effets reprotoxiques en lien avec une exposition *in utero* ou des effets sur le système nerveux central (SNC) puissent se produire à des concentrations inférieures à celles entraînant des effets sur le système nerveux périphérique. A ce jour, de tels effets n'ont pas été objectivés mais aucune étude n'a permis d'évaluer correctement les effets du n-hexane sur le SNC, ni sur le neurodéveloppement.

- **Etude clé : fort :**

L'étude expérimentale de Huang *et al.* (1989) est confortée par l'étude d'Ono *et al.* (1982) ainsi que par les études épidémiologiques de Sanagi *et al.* (1980) et de Chang *et al.* (1993).

- **Dose critique : fort**

Une BMCL a pu être dérivée de l'étude par estimation graphique. Un ajustement allométrique a permis de calculer une dose équivalente humaine et un facteur d'incertitude résiduel global de 75 a été appliqué à cette valeur (UF_A = 2,5 ; UF_H = 10 ; UF_S = 3).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » qui portent sur l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence par inhalation pour le n-hexane.

Effet critique et étude source	Méthode de construction	UF	Valeur VTR
Neurotoxicité (diminution de la vitesse de conduction de l'influx nerveux dans les nerfs moteurs) Huang <i>et al.</i> , 1989 : étude chez le rat	BMCL = 122 ppm <u>Ajustement temporel</u> BMCL _{ADJ} = 61,4 ppm (215 mg.m ⁻³) <u>Ajustement allométrique</u> BMC _{HEC} = 215 mg.m ⁻³	75 UF _A = 2,5 UF _H = 10 UF _S = 3	VTR = 3 mg.m ⁻³ Niveau de confiance moyen/fort

Par ailleurs, l'Agence rappelle qu'aucune étude publiée ne permet à ce jour d'évaluer de manière satisfaisante les effets du n-hexane sur le système nerveux central, ni sur le neurodéveloppement. Ceux-ci pourraient apparaître à des concentrations plus faibles que les effets sur le système nerveux périphérique.

Marc Mortureux

MOTS-CLES

n-hexane, valeur toxicologique de référence, inhalation

BIBLIOGRAPHIE

- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) (2010) Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances cancérigènes. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérigènes. Saisine n° 2004/AS16. (Afsset, Maisons-Alfort) 107p.
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2014) Evaluation des risques sanitaires des substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation : le n-hexane (n° CAS 110-54-3) (Anses, Maisons-Alfort) 207p.
- Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR) (1999) Toxicological Profile for n-Hexane, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, juillet 1999. Disponible sur <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp113.html>
- Chang CM, Yu CW, Fong KY, Leung SY, Tsin TW, Yu YL, Cheung TF, Chan SY. (1993) N-hexane neuropathy in offset printers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993 May;56(5):538-42.
- Environnement Canada (2009) Évaluation préalable pour le Défi concernant le n-Hexane. Aoput 2009. Disponible sur <http://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=Fr&xml=C1B542C5-4A04-DD1F-74D8-0E7B1459065C>
- Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) (2008) Fiche toxicologique FT 113 Hexane (INRS, Paris) 10p.
- OEHHA (2000) Chronic toxicity summary. n-hexane (normal hexane). Appendix D.3 Chronic RELs and toxicity summaries using the previous version of the Hot Spots Risk Assessment guidelines (OEHHA 1999). Air Toxics Hot Spots. Risk Assessment Guidelines. Technical Support Document For the Derivation of Noncancer Reference Exposure Levels April 2000, p292-302 (OEHHA, Oakland)
- Ono Y, Takeuchi Y, Hisanaga N, Iwata M, Kitoh J, Sugiura Y. (1982) Neurotoxicity of petroleum benzine compared with n-hexane. *Int Arch Occup Environ Health*. 1982;50(3):219-29.
- Sanagi S, Seki Y, Sugimoto K, Hirata M. (1980) Peripheral nervous system functions of workers exposed to n-hexane at a low level. *Int Arch Occup Environ Health*. 1980;47(1):69-79.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1994) Methods for derivation of inhalation reference and concentration and application of inhalation dosimetry. Environmental Criteria and Assessment Office. Office of Health and Environmental Assessment. EPA/600/8-90/066F. (US EPA, Washington DC.) 389p.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA) (2005) Toxicological review of n-hexane (CAS No. 110-54-3) in support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS), EPA/635/R-03/012, November 2005 (US EPA, Washington DC.) 223 p.