

RAPPORT D'ÉVALUATION DU RISQUE LIÉ À L'UTILISATION DE LA QUASSINE DANS LES PRODUITS COSMÉTIQUES

Rapport d'expertise adopté par la Commission de Cosmétologie du 07 Juin 2011

SOMMAIRE

1. CONTEXTE, OBJET ET MODALITES DE TRAITEMENT DE LA SAISINE	3
2. IDENTIFICATION DE LA QUASSINE.....	3
2.1. IDENTITE CHIMIQUE DE LA SUBSTANCE	3
2.2. DESCRIPTION BOTANIQUE	4
2.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA QUASSINE.....	5
3. CADRE REGLEMENTAIRE	5
3.1. REGLEMENTATION DANS LES PRODUITS COSMETIQUES ET USAGE(S) DANS CE DOMAINE	5
3.2. CLASSIFICATION CLP SELON LE REGLEMENT 1272/2008	5
4. AUTRES USAGES DE LA SUBSTANCE.....	5
4.1. USAGE DANS L'ALIMENTAIRE	5
4.2. AUTRES USAGES	6
5. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DU DANGER.....	7
5.1. DONNEES DE GENOTOXICITE	7
5.2. TOXICITE AIGUE.....	7
5.2.1. <i>Par voie orale</i>	7
5.2.2. <i>Par voie parentérale</i>	7
5.3. TOXICITE A DOSES REPETEES.....	7
5.4. TOXICITE SUR LA REPRODUCTION ET LE DEVELOPPEMENT	8
5.4.1. <i>Etude sur des rats femelles gestantes (Margaria, 1963)</i>	8
5.4.2. <i>Etudes sur des rats mâles (Raji et Bolarinwa, 1997)</i>	8
5.4.3. <i>Etudes des mécanismes d'action</i>	11
5.5. CANCEROGENESE	12
6. RESUME DES EFFETS OBSERVES, CHOIX DE L'EFFET CRITIQUE ET JUSTIFICATION DE LA NOAEL RETENUE.....	13
7. EVALUATION DE L'EXPOSITION DE LA SUBSTANCE POUR UN USAGE COSMETIQUE ...	14
8. CONCLUSION	14
9. BIBLIOGRAPHIE.....	15

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: IDENTITE CHIMIQUE DE LA SUBSTANCE QUASSINE 3
TABLEAU 2: PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA QUASSINE 5

1. CONTEXTE, OBJET ET MODALITES DE TRAITEMENT DE LA SAISINE

Par lettre du 21 janvier 2009, Madame la Ministre de la Santé, de la Jeunesse et des Sports et de la Vie Associative a saisi l'Afssaps sur la part du risque attribuable aux ingrédients cosmétiques reprotoxiques et/ou perturbateurs endocriniens. Cette saisine s'inscrit dans le cadre du plan d'action « fertilité » du gouvernement. Les autres agences ont aussi été saisies, chacune dans son domaine de compétence.

Dans ce contexte, l'Afssaps a identifié plusieurs substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes sur la base de données identifiées par le document du DHI (Danish Hydraulic Institute (DHI) ; 2007)¹, afin de procéder à leur évaluation.

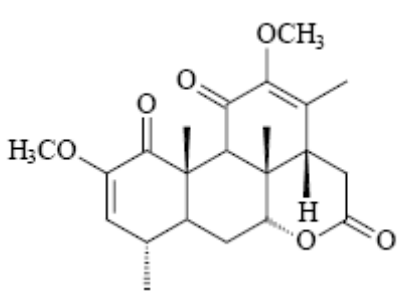
Sur la base d'études *in vitro* et *in vivo* publiées dans le CIR (Cosmetic Ingredients Review (CIR) ; 2008), la quassine fait partie des substances identifiées et a fait l'objet d'une évaluation du danger qui est présentée dans ce rapport.

Ainsi le présent rapport d'évaluation s'est fondé principalement sur le rapport du CIR (2008) et du comité scientifique de l'alimentation humaine (Scientific committee on food (SCF) ; 2002).

2. IDENTIFICATION DE LA QUASSINE

2.1. Identité chimique de la substance

Tableau 1: Identité chimique de la substance quassine

Nom Inci	Quassin	SCF 2002
Numéro CAS	76-78-8 / 68915-32-2	SCF 2002
Numéro EINECS	200-985-9 / 272-809-9	
Noms chimiques / IUPAC	(+)-Quassin ; Nigakilactone D / Extrait de Quassia	SCF 2002
Nom français	Quassine	SCF 2002
Formule chimique		SCF 2002
Structure		C ₂₂ H ₂₈ O ₆

¹ Danish Hydraulic Institute (DHI), 2007. Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals.

2.2. Description botanique

La quassine est extraite de l'écorce de *Quassia amara* L. ou de *Picrasma excelsa* [Sw.] Planchon. Ces deux espèces appartiennent à la famille des Simaroubacées (SCF, 2002), qui sont des plantes tropicales principalement présentes en Océanie, en Asie et en Amérique du Sud.

Classification du genre *Quassia* (APG II., 2003 ; Guo *et al.*, 2005 ; Cachet *et al.*, 2009) :

Selon la **classification APG II** (2003)² :

Rosides

Sapindales

Simaroubaceae

Quassia

D'un point de vue chimique, la quassine appartient à la classe des quassinoïdes, aussi appelés « principes amers » de la famille des Simaroubaceae (Simaroubacées) qui sont des triterpènes modifiés.

Les quassinoïdes sont classés en 5 groupes : C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₂ et C₂₅, qui présentent deux types de squelettes moléculaires terpéniques : tétracyclique et pentacyclique.

Les substances tétracycliques n'ont pas d'oxygène en C₂₀ tandis que celles appartenant à la structure pentacyclique possèdent une oxygénation en C₂₀. (Guo *et al.*, 2005)

Selon Guo *et al.* (2005), les deux premiers quassinoïdes isolés par Clark et ses collaborateurs au début des années 1930, sont la quassine et la néoquassine. Ces travaux ont été complétés par Valenta et ses collaborateurs dans les années 1960 grâce à la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN). Dans les années 1990 les travaux sur la séparation des fractions contenant les quassinoïdes se sont poursuivis. Aujourd'hui, plus de 150 quassinoïdes ont été isolés et caractérisés et certains possèdent des propriétés pharmacologiques.

Selon l'Association Française de Protection des Plantes (AFPP), le *Quassia amara* L. est un arbre tropical originaire du Brésil et de Guyane cultivé en Colombie, au Panama, en Amérique du Sud et sur la côte ouest de l'Inde. Il est désigné sous le nom commun de « Quassia du Surinam ».

Il est souvent confondu avec un autre bois tropical : celui du *Picrasma excelsa* (Sw.) Planch. (Simaroubaceae), dénommé « Quassia de la Jamaïque ».

L'extrait d'écorce du *Quassia* du Surinam contient principalement la quassine et la néoquassine.

L'extrait d'écorce du *Quassia* de la Jamaïque contient principalement, la picrasmine.

Ces substances de la famille des quassinoïdes ont pour nom commun « quassine », ce qui implique de nombreuses confusions dans la littérature.

En plus de ces substances principales, les extraits contiennent d'autres quassinoïdes tels que: l'isoquassine, la 18-hydroxyquassine et des alcaloïdes comme la canthine-6-one, la 2-méthoxycanthine-6-one présentant des propriétés anti-microbiennes et cytotoxiques.

Moyens d'obtention : l'extraction du bois du *Quassia amara* L. et du *Picrasma excelsa* (Sw) Planch fourni environ 0,65 g de quassine par kg de bois.

² Classification APG II, dite classification phylogénétique, est une classification botanique des angiospermes établie selon les travaux de l'Angiosperms Phylogeny Group

2.3. Propriétés physico-chimiques de la quassine

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques de la quassine

Aspect	liquide visqueux de couleur marron foncé, et d'odeur caractéristique (<i>Quassia amara</i>)	Fiche AFPP ³
Formule brute	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	Fiche AFPP ³
Poids Moléculaire	388,46	Fiche AFPP ³
Point de fusion (°C)	222°C	Toxnet ⁴
Solubilité	soluble à température ambiante	Fiche AFPP ³
Tension de vapeur	9,98.10 ⁻¹⁴ Torr (à 25 °C)	Fiche AFPP ³
Coefficient de partage LogP ou logKow	0,940	Toxnet

3. CADRE REGLEMENTAIRE

3.1. Réglementation dans les produits cosmétiques et usage(s) dans ce domaine

La quassine est référencée dans la base de données Cosing⁵ de la Commission européenne mais elle n'est pas réglementée.

Il est indiqué qu'elle est utilisée comme dénaturant dans les produits cosmétiques.

3.2. Classification CLP selon le règlement 1272/2008

La quassine (n°CAS : 76-78-8 et 68915-32-2) n'est pas classée par le règlement n°1272/2008 du Parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n°1907/2006.

4. AUTRES USAGES DE LA SUBSTANCE

La quassine semble être utilisée à la fois dans le domaine de l'alimentation et pour ses propriétés pharmacologiques.

De nombreux autres usages sont référencés dans la littérature scientifique.

4.1. Usage dans l'alimentaire

Dans l'aliment, la quassine est utilisée comme agent aromatisant amer.

Cependant la substance quassine ne peut être ajoutée en tant que tel aux denrées alimentaires ou aux arômes. Elle peut être présente dans la denrée alimentaire soit naturellement, soit à la suite d'une adjonction d'arômes préparés à partir de matières de base naturelles.

La quassine est mentionnée dans les publications du Conseil de l'Europe⁶.

En Europe, la quassine était inscrite à l'Annexe II de la Directive 88/838/CEE des arômes destinés à être employés dans les denrées alimentaires et des matériaux de base pour leur production. Ses concentrations étaient limitées dans les denrées alimentaires, les boissons, la confiserie sous forme de pastilles et les boissons alcoolisées.

³ AFPP : Association Française de Protection des Plantes - <http://www.afpp.net>

⁴ Base de données du National Library of Medicine (US) : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

⁵ Base de données des substances cosmétiques de la Commission Européenne : <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/>

⁶ Natural Source of Flavourings, Report n°3, Council of Europe Publishing, 2008

En 2002, le SCF (Scientific Committee on Food), a publié un avis relatif à l'évaluation de la quassine. Les conclusions de cet avis indiquent entre autre que les données disponibles ne permettent pas de conclure sur l'évaluation du danger, que les données d'exposition sont manquantes et par conséquent, aucune évaluation du risque ne peut être établie.

Il est à noter que la directive 88/388/CEE a été actualisée afin de tenir compte des progrès techniques et scientifiques. Ainsi cette dernière a été remplacée par le règlement n°1334/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes qui sont destinées à être utilisées dans et sur les denrées alimentaires.

Ce règlement précise que la quassine est une substance qui ne peut être ajoutée en tant que telle aux denrées alimentaires.

Toutefois, il est indiqué des teneurs maximales en quassine naturellement présente dans les arômes et les ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes. Les denrées alimentaires pour lesquelles la quassine est soumise à restriction sont les suivantes :

- boisson non alcoolisées : concentration maximale de 0,5 mg/kg ;
- produits de boulangerie : concentration maximale de 1 mg/kg ;
- boissons alcoolisées : concentration maximale de 1,5 mg/kg.

Il est également indiqué que les matériaux de base *Quassia amara* et *Picrasma excelsa* à partir desquels sont issus les arômes et les ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes, ne peuvent être utilisés que pour la production de boissons et de produits de boulangerie.

Aux Etats-Unis, la quassine (*Picrasma excelsa* (Sw.) Planch, ou *Quassia amara* L.) est classée par le CFR (« Code federal of regulations », 2002) comme pouvant être sans risque lorsqu'elle est utilisée dans l'aliment (« may be safely used in food »).

4.2. Autres usages

Les quassinoïdes présentent un certain nombre d'activités biologiques *in vitro* et/ou *in vivo*, notamment, comme médicaments et semblent aussi être utilisés comme insecticide et herbicide (Guo *et al.*, 2005). Leur utilisation en Europe en tant que biocides est interdite depuis 2006.

5. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DU DANGER

5.1. Données de génotoxicité

Woo *et al.*, 2007, indiquent que le potentiel génotoxique de l'extrait de Quassia de la Jamaïque a été examiné par le MHLW (« Ministry of Health, Labour and Welfare ») au Japon. Un résumé des résultats est fourni dans cette publication.

Le test d'Ames utilisant *Salmonella typhimurium* sur souches TA98, TA100, TA1535, TA1537 et *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101, montre des résultats positifs doses dépendantes pour toutes les souches exceptées la TA1535 avec activation métabolique S9 mix. (Asanoma et Tamura, 2006, cité dans Woo *et al.*, 2007).

Dans un test d'aberrations chromosomiques réalisé sur des cellules pulmonaires d'hamster chinois (CHP), il est noté une augmentation dose dépendante du nombre d'aberrations de structure avec ou sans activation métabolique (Hayashi *et al.*, rapport d'étude cité dans Woo *et al.*, 2007).

Par contre, l'extrait du Quassia de la Jamaïque ne montre pas de potentiel génotoxique dans le test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse de souris ou dans le test de synthèse non programmé de l'ADN *in vivo* sur du foie de rat (Hayashi *et al.*, rapport d'étude cité dans Woo *et al.*, 2007).

5.2. Toxicité aiguë

5.2.1. Par voie orale

Une étude de toxicité aiguë a été réalisée en 1997 par Garcia *et al.* (cité dans le CIR, 2008⁷ et dans le SCF, 2002⁸). Cette étude est réalisée chez 25 souris albinos mâles traitées par voie orale avec un extrait aqueux de Quassia dont la concentration en quassine n'est pas rapportée.

Les souris sont réparties en 5 groupes, chacun des groupes étant traité aux doses suivantes : 0,5 mL d'eau distillée (groupe contrôle), 250, 500, 750 et 1000 mg/kg pc.

Aucune mortalité, ni aucun signe de toxicité n'ont été rapportés au cours des 48 heures d'observation : DL₅₀ > 1000 mg/kg pc.

5.2.2. Par voie parentérale

Garcia *et al.*, (1997) (cité dans le CIR 2002), ont étudié la toxicité aiguë de la quassine par voie intrapéritonéale sur souris mâles albinos (10 animaux/groupe). Les doses administrées sont 500 et 1000 mg/kg pc. et un groupe contrôle ayant reçu le véhicule (0,5 mL d'eau distillée).

Après une période de 4 heures, le groupe ayant reçu la dose de 500 mg/kg pc./j, a présenté des signes de toxicité tels qu'une pilo-érection, une diminution de l'activité motrice et une perte partielle du réflexe de redressement. Les effets sont réversibles après 24 heures.

Le groupe ayant reçu la plus forte dose (1000 mg/kg pc.) a présenté aussi après une période de 4 heures, des signes de toxicité tels qu'une pilo-érection, une perte du réflexe de préhension postérieur et diminution de l'activité motrice. Les animaux de ce groupe sont morts dans les 24 heures.

5.3. Toxicité à doses répétées

Margaria (1963) (cité dans le SCF 2002), a réalisé une étude de toxicité sur 8 semaines chez des rats âgés de 2 ans avec un extrait de bois de Quassia.

La méthode de préparation de l'extrait de Quassia est indiquée. Il est précisé la provenance du bois de Quassia. Ce dernier a été fourni sous forme de gros copeaux, par la Maison Domenico Ulrich de Turinpar. L'auteur précise qu'un gramme de bois de quassia permet d'obtenir en moyenne après extraction alcoolique, 30 mg d'extrait sec.

⁷ Cosmetic Ingredient Review (2008). Final report of the safety assessment of alcohol denat., including SD alcohol 3-A, SD alcohol 30, SD alcohol 39, SD alcohol 39-B, alcohol 39-C, SD alcohol 40, SD alcohol 40-B, and SD alcohol 40-C, and the denaturants, Quassin, Brucine sulphate / Brucine, and Denatonium benzoate. International Journal of Toxicology. 27 (suppl.1), p. 1-43.

⁸ Scientific Committee on Food (SCF), Opinion of the scientific committee on food on Quassin, 25 juillet 2002.

L'extrait de bois de quassia préparé a été administré par gavage à 10 rats âgés de 20 à 25 mois. La souche et le sexe des animaux ne sont pas indiqués. La dose administrée est de 50 mg/kg d'extrait de bois de quassia. Les animaux témoins ont reçu de l'eau. Les animaux ont été traités 6 jours/semaine. Chaque semaine, le poids et les paramètres hématologiques ont été mesurés.

A la fin de l'expérimentation, tous les rats ont été sacrifiés. Certains organes tels que le cœur, le foie, les reins, les glandes surrénales, la rate, ont été pesés chez 3 rats seulement.

Les poids corporels des animaux du groupe témoin et du groupe traité sont similaires et sont restés similaires tout au long de l'étude. Les paramètres hématologiques ont révélé une très faible différence entre les deux groupes. Le poids des organes du groupe traité n'a pas montré de différence significative *versus* celui du groupe témoin. Cependant 2 animaux du groupe contrôle et un animal du groupe traité sont morts durant la 2^{ème} semaine de l'étude. Les auteurs expliquent ces morts comme résultant probablement d'un processus inflammatoire des bronches (observées *post-mortem*). Ceci pourrait être également expliqué comme une conséquence du gavage (fausse route).

Garcia *et al.*, (1997) (cité dans le SCF 2002), ont administré à 12 rats Wistar femelles (4 animaux/groupe), 0,5 mL d'eau distillée (groupe contrôle), 500 et 1000 mg/kg pc./j. Les auteurs se sont focalisés sur les éventuels effets de la quassine sur le système nerveux central. Après 9 jours de traitement, aucun effet sur le système nerveux central n'a été observé.

Woo *et al.*, 2007 indiquent l'existence d'une étude (Sato, 2005) de toxicité répétée de 90 jours chez le rat mâle et femelle exposés par voie orale (dans l'alimentation) à des concentrations de 50, 500 et 5000 ppm d'extrait du Quassia de la Jamaïque. Les résultats montrent des signes d'hépatotoxicité à la dose de 5000 ppm, se traduisant par une augmentation de la γ -glutamyltranspeptidase chez les femelles et une augmentation en valeurs absolues et relatives du poids des foies reflétant une hypertrophie des cellules hépatiques diffuses chez les deux sexes, mais particulièrement chez les femelles à cette dose (Sato, 2005).

5.4. Toxicité sur la reproduction et le développement

5.4.1. Etude sur des rats femelles gestantes (Margaria, 1963)

La publication de Margaria (1963, citée dans le SCF 2002), comporte outre une étude de toxicité à des doses répétées, une étude d'organogenèse, péri et post natalité chez des rats femelles gestantes traitées avec de l'extrait sec de Quassia à 100 mg/kg pc./j à partir de la seconde moitié de la gestation et pendant la période de lactation. Il est à noter que le résumé d'étude d'une page de Margaria (1963) ne précise pas la voie d'administration. Cependant, l'étude de toxicité répétée citée dans la même publication laisse penser que la voie d'administration est orale et la substance est probablement distribuée dans l'eau.

La période d'administration a commencé à des temps différents pour chacune des 3 rats femelles dans les groupes traités, soit à J7, J6 et J5 avant la mise bas.

Le nombre de petits dans chaque portée est le suivant : 14, 8 et 12 chez les 3 rats femelles du groupe contrôle et 10, 6 et 10 chez les animaux traités à J7, J6 et J5 avant la mise bas respectivement.

Il apparaît une légère baisse du nombre de petits dans les groupes traités *versus* le groupe contrôle.

Le poids des petits dans chaque portée est enregistré à J1, J7, J14 et J21 après la naissance. Il n'y a pas de différence significative du poids entre les petits nés de parents traités et les petits du groupe contrôle.

L'auteur indique qu'il n'y a pas de différences qualitatives ou quantitatives entre le groupe traité *versus* le groupe contrôle mais ne fournit pas de précision supplémentaire pour argumenter cette conclusion.

5.4.2. Etudes sur des rats mâles (Raji et Bolarinwa, 1997)

Raji et Bolarinwa (1997) ont conduit une étude sur des rats Wistar albinos afin d'évaluer l'effet sur la fertilité d'un extrait méthanolique non défini du *Quassia amara*, de la quassine et d'un alcaloïde le 2-méthoxycanthine-6-one⁹. La quassine et la 2-méthoxycanthine-6-one ont été obtenus en fractionnant l'extrait du *Quassia amara*.

Plusieurs séries d'essais ont été réalisés :

⁹ La 2-méthoxycanthine-6-one est un alcaloïde isolé à partir d'un extrait méthanolique de la tige en bois de *Quassia amara* (Njar *et al.*, 1993)

Essai 1 : Un extrait du *Quassia amara* a été administré à 15 rats (5 animaux/groupe), dans l'eau de boisson pendant 8 semaines à des doses de 100 ; 1000 ; 2000 mg/kg pc./j. Le groupe contrôle a reçu du tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate Buffered Saline*).

Essai 2 : 15 autres rats ont été traités de la même manière que dans l'essai 1, cependant l'exposition a été suivie d'une période de réversibilité de 8 semaines sans traitement.

Essai 3 : De la quassine a été administrée à 15 rats (5 rats/groupe) aux doses de 0,1 ; 1 ; 2 mg/kg pc./j. pendant 8 semaines. L'exposition a été suivie d'une période de réversibilité de 8 semaines sans traitement. Le groupe contrôle a reçu du tampon phosphate salin (PBS).

Essai 4 : De la 2-méthoxycanthine-6-one a été administrée à 15 rats (5 rats/groupe) aux doses de 0,1 ; 1 ; 2 mg/kg pc./j. pendant 8 semaines. L'exposition a été suivie d'une période de réversibilité de 8 semaines sans traitement. Le groupe contrôle a reçu du tampon phosphate salin (PBS).

Essai 5 : 15 rats (5 rats/ groupe) ont reçu par voie IP et pendant 8 semaines :

- une solution de la LH d'ovine à 0,5 µg/mL ;
- simultanément un extrait du *Quassia amara* dans du méthanol à 2000 mg/kg pc./j par voie orale et de la LH d'ovine 0,5 µg/mL par voie IP, ou ;
- simultanément de la quassine 2 mg/kg pc./j. par voie orale et de la LH d'ovine 0,5 µg/mL par voie IP.

L'exposition des animaux a été suivie d'une période de réversibilité de 8 semaines sans traitement. Le groupe contrôle a reçu du tampon phosphate salin (PBS).

Il est à noter que la voie d'administration du PBS dans les groupes contrôles n'est pas claire. En effet, dans la publication, il n'est pas indiqué que les témoins des administrations par voie orale ont reçu de l'eau de boisson. Juste après les descriptions de la partie méthodologie, les auteurs indiquent que les témoins reçoivent une solution saline. Il est fort probable que cette phrase concerne l'administration par voie IP.

Il est à noter que la publication n'est pas explicite concernant la période de réversibilité des essais 3, 4 et 5. En effet après avoir présenté l'essai 1 puis l'essai 2, il est indiqué que les mêmes procédures ont été réalisées avec les autres substances (quassine, 2-méthoxycanthine-6-one, LH d'ovine). Cependant c'est seulement dans la partie résultats de la publication qu'il est fait référence indirectement aux essais 3, 4 et 5 qui se sont poursuivis par une période de réversibilité.

A la fin de l'expérimentation, tous les rats ont été sacrifiés. Les vésicules séminales, les épидидymes, les testicules et les anté-hypophyses ont été prélevés et pesés. Les concentrations plasmatiques en LH, FSH et testostérone ont été mesurées. Les concentrations plasmatiques en testostérone issues des cellules de Leydig qui ont été prélevées, sont mesurées. La numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes ont été évalués.

Les résultats montrent :

Aucun effet significatif de l'extrait du *Quassia amara*, de la quassine ou de la 2-méthoxycanthine-6-one sur le poids corporel des rats *versus* le groupe contrôle n'a été rapporté. Cependant, une baisse significative du poids moyen des testicules, des vésicules séminales et des épидидymes est rapportée chez les rats exposés à l'extrait du *Quassia amara* et à la quassine (essais 1 et 3) ; mais aucune différence relative aux poids moyens des organes sus-cités n'est montrée quand les rats sont exposés à la 2-méthoxycanthine-6-one.

Le poids des organes des animaux de l'essai 2, n'est pas significativement différent avant et après la période de réversibilité.

Le poids des anté-hypophyses est significativement augmenté dans ces groupes traités *versus* le groupe contrôle.

Il a été observé une baisse significative du nombre de spermatozoïdes des groupes traités avec l'extrait du *Quassia amara* et de la quassine *versus* le groupe traité par la 2-méthoxycanthine-6-one et le groupe contrôle.

Le nombre de spermatozoïdes ne diffère pas après la période de réversibilité de 8 semaines pour les rats traités avec un extrait du *Quassia amara*, de la quassine et de la 2-méthoxycanthine-6-one.

De plus, le nombre de spermatozoïdes, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes, des rats traités avec un extrait du *Quassia amara* + LH d'ovins et de la quassine + LH d'ovins, ne montrent pas de différences significatives *versus* le groupe contrôle.

Les concentrations plasmatiques en LH, FSH et testostérone sont significativement diminuées chez les animaux traités avec un extrait du *Quassia amara* et avec la quassine.

Les concentrations plasmatiques en LH, FSH et testostérone sont inchangées chez les animaux traités avec de la 2-méthoxycanthine-6-one.

Aucun changement significatif des concentrations plasmatiques en LH, FSH et testostérone après la période de réversibilité n'est rapporté.

La concentration plasmatique en testostérone ne montre pas de différence significative entre le groupe des rats traités par un extrait du *Quassia amara* + LH d'ovins et quassine + LH d'ovins *versus* le groupe contrôle.

Il est noté une baisse significative de la production de testostérone par les cellules de Leydig extraites des rats traités par un extrait du *Quassia amara* et la quassine, *versus* le groupe contrôle.

Afin de déterminer si la diminution en testostérone pourrait être réversible, des cellules de Leydig isolées de chaque rat traité sont incubées pendant 3 heures en présence de 50 ng/mL de LH d'ovins. Les résultats montrent que l'hormone LH d'ovins semble ne pas inverser l'action inhibitrice des cellules de Leydig traitées par un extrait du *Quassia amara* et la quassine.

Ces résultats sont discutés par les auteurs :

Les résultats relatifs à l'extrait du *Quassia amara* et la quassine montrent des effets sur la fonction reproductive des rats mâles, ce qui n'a pas été montré pour la 2-méthoxycanthine-6-one.

L'extrait du *Quassia amara* et la quassine semblent avoir un effet sur la diminution des poids des testicules, des épидидymes et des vésicules séminales et du nombre de spermatozoïdes.

Il est observé également, une diminution des concentrations plasmatiques en testostérone, LH et FSH.

Le poids des testicules, des épидидymes, des vésicules séminales, le nombre de spermatozoïdes et les concentrations en testostérone sont diminués lorsque les rats sont traités par l'extrait du *Quassia amara* et la quassine, alors que ces changements ne sont pas observés chez le groupe contrôle et le groupe traité par la 2-méthoxycanthine-6-one.

Les auteurs indiquent qu'au vu du nombre de spermatozoïdes normaux et de la concentration plasmatique en testostérone, chez les rats traités par l'hormone LH d'ovins, il est plausible que la diminution des sécrétions gonadotrophines est impliquée dans l'inhibition des cellules de Leydig. Cette action apparaît être liée à l'effet de la LH d'ovins sur la sécrétion de testostérone.

Les résultats ont montré une inhibition des cellules de Leydig *in vitro*, après exposition à un extrait du *Quassia amara*, à la quassine, cependant cette inhibition n'est pas observée après exposition à la 2-méthoxycanthine-6-one.

Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle l'atrophie des organes reproducteurs observée soit une conséquence d'une exposition à l'extrait du *Quassia amara* qui induit une inhibition de la sécrétion en testostérone, nécessaire pour la croissance, le développement des organes reproducteurs mâles. La diminution du nombre de spermatozoïdes apparaît être liée à la diminution de la concentration plasmatique en testostérone et en FSH (car ces 2 hormones sont impliquées dans l'initiation et la régulation de la spermatogenèse).

Les auteurs notent aussi que les diminutions des concentrations plasmatiques en testostérone, LH et FSH chez les rats traités par un extrait du *Quassia amara* et la quassine soient accompagnées par une augmentation significative du poids de l'anté-hypophyse. Cette observation permet de suggérer deux sites d'action de la quassia sur la reproduction mâle : (i) l'hypophyse (action centrale), (ii) les cellules de Leydig (action périphérique) :

Selon les auteurs, l'hypothèse fondée sur une possible action sur l'hypophyse est montrée par l'action réversible de la LH d'ovins sur la sécrétion de testostérone quand les rats sont traités par un extrait du *Quassia amara* et la quassine. L'augmentation du poids de l'anté-hypophyse, pourrait aussi résulter d'une sur-stimulation *via* le système de rétrocontrôle négatif. D'un autre côté, l'inhibition des cellules de Leydig *in vitro*, implique que ces dernières pourraient être un site d'action de l'extrait du *Quassia amara*.

Les résultats semblent montrer que l'extrait du *Quassia amara* et la quassine ont un effet négatif sur la production de testostérone.

Par ailleurs, ces résultats suggèrent que l'extrait de *Quassia amara* inhibe la stéroïdogénèse mais ne semble pas affecter la viabilité des cellules de Leydig *in vivo*. Ces résultats, corroborés par Njar *et al.*, 1995, cité dans Raji et Bolarinwa (1997), montrent que l'extrait du *Quassia amara* et la quassine ne sont pas des substances létales pour les cellules de Leydig *in vitro*.

En outre, l'action réversible de l'extrait du *Quassia amara* sur la stéroïdogénèse *in vitro*, conforte l'étude *in vivo* dans laquelle, les fonctions normales de la reproduction mâle sont réversibles après 8 semaines d'arrêt du traitement.

Cependant, la LH d'ovins semble produire une réversibilité apparente de la sécrétion en testostérone *in vivo* mais n'est pas reproduite *in vitro*.

Fondé sur l'incapacité de la LH d'ovins à produire un effet sur l'action inhibitrice de l'extrait du *Quassia amara* sur les cellules de Leydig *in vitro*, les auteurs suggèrent que l'extrait du *Quassia amara*, la quassine pourrait agir sur le récepteur à la LH.

5.4.3. Etudes des mécanismes d'action

Etude chez des rats mâles (Parveen *et al.*, 2003) :

Parveen *et al.*, (2003) ont étudié l'effet d'un extrait du *Quassia amara* chez des rat mâles Wistar albinos.

Vingt rats mâles albinos (4 animaux par groupe) ont été traités de la façon suivante : un groupe contrôle recevant le véhicule, les 4 autres groupes recevant par injection intramusculaire 0,1 mL de l'extrait de quassine pendant 15 jours, à partir d'une solution à 12,5% ; 25% ; 50% et 100% (véhicule non précisé).

Vingt-quatre heures après la dernière injection, des prélèvements sanguins ont été effectués sur les animaux puis ces derniers sont sacrifiés.

Il est à noter que l'âge des rats n'est pas précisé dans la publication. Les auteurs précisent uniquement que ce sont des rats adultes de 175 à 200g. Il pourrait s'agit de rats âgés entre 6 à 8 semaines.

Les analyses de sperme ont été réalisées à partir d'échantillons provenant de la queue de l'épididyme

Aucun changement relatif au comportement et au poids corporel des rats n'a été observé pour tous les groupes traités. Toutefois, il est observé une diminution dose-dépendante des poids des testicules pour les groupes traités aux concentrations 50 et 100 % et de l'épididyme pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle. Des anomalies morphologiques telles que les doubles têtes (bicéphalies), les doubles queues (biphidies), des têtes détachées (acéphalies) et des queues fragiles sont observées, il n'est cependant pas précisé les groupes concernés par ces anomalies dans la publication et s'il existe ou pas une relation dose-réponse. Une diminution dose-dépendante de l'activité α -glucosidase est observée pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle. Les paramètres biochimiques et hématologiques retenus pour mesurer la fonction de la prostate et des vésicules séminales ne sont pas modifiés par le traitement par l'extrait du *Quassia amara* pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle.

Aucune modification hématologique n'est rapportée.

Les résultats de cette étude montrent que l'extrait du *Quassia amara* a un effet sur l'intégrité structurale et fonctionnelle du sperme *in vivo* et ceci suggère un effet du *Quassia amara* sur la fertilité. Il est observé une diminution du poids des testicules et de l'épididyme. Un effet dû aux changements hormonaux seuls aurait dû se traduire par une diminution du poids de tous les organes de la reproduction.

Les auteurs supposent que les faibles poids de ces 2 organes (testicules et épидидymes) chez les animaux traités reflètent un effet combiné d'une part pour l'altération du statut androgène et d'autre part par la diminution du nombre de spermatozoïdes contenus dans ces organes.

La diminution du nombre de spermatozoïdes et le nombre élevé d'anomalités morphologiques des spermatozoïdes pourraient refléter une perturbation de la spermatogenèse testiculaire.

La présence de queues fragiles, de têtes détachées, la perte de motilité des spermatozoïdes, la diminution d' α -glucosidase tissulaire (enzyme impliquée dans la modification de la membrane des cellules spermatiques), suggèrent que l'épididyme peut aussi être une cible de toxicité de la *Quassia amara*.

Etude *in vitro* sur cellules de Leydig de rats (Njar *et al.*, 1995) :

Njar *et al.*, (1995) ont étudié l'effet d'un extrait méthanolique du *Quassia amara*, de quassine et d'un alcaloïde la 2-méthoxycanthine-6-one sur la production de testostérone par les cellules de Leydig de rats *in vitro*. La quassine et la 2-méthoxycanthine-6-one ont été obtenues à partir de l'extrait de *Quassia amara* selon la méthode décrite par Njar *et al.*, (1993). Les concentrations étudiées sont 0 ; 5 ; 15 ; 25 ng/mL.

Les effets de ces substances ont été étudiés en associant la LH (*Luteinizing Hormone*) et la théophylline. En effet, dans le processus de spermatogenèse, la LH stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig des testicules. Quant à la théophylline, celle-ci semble être impliquée dans l'inhibition du cycle AMP qui lui-même semble impliqué dans l'activation des hormones masculines (Lynwood 1977).

Les résultats de l'étude montrent que la quassine, la quassine + LH (50 ng/mL) la quassine + théophylline (10 mM) inhibent la production de testostérone des cellules de Leydig *in vitro*.

La 2-méthoxycanthine-6-one ne montre aucun effet sur la production de testostérone. La 2-méthoxycanthine-6-one + LH et la 2-méthoxycanthine-6-one + théophylline montrent une augmentation de la sécrétion de testostérone.

Ces résultats suggèrent que la quassine pourrait agir sur le récepteur à LH. Les auteurs avancent également l'hypothèse selon laquelle l'effet direct de la quassine sur les voies de la stéroïdogénèse semble plausible. Selon les auteurs, cette hypothèse est fondée sur l'observation que l'effet inhibiteur de la quassine sur la sécrétion basale et la sécrétion stimulée de testostérone par LH a été mis en évidence.

L'effet de la quassine sur les cellules de Leydig a été aussi étudié : les cellules ont été traitées avec la LH et/ou la quassine. Un contrôle négatif a été réalisé. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de la LH (25 ; 50 ; 75 et 100 ng/mL). Les résultats montrent que la production de testostérone est augmentée dans les cellules traitées avec la LH seule, la quassine seule et la quassine + LH + théophylline par rapport au témoin.

Par ailleurs, la viabilité cellulaire a été mesurée avant et après le traitement par les différents composés. Aucune cytotoxicité n'est observée aux concentrations testées.

5.5. Cancérogenèse

Woo *et al.*, 2007, rapporte une évaluation du potentiel promoteur de l'extrait du *Quassia* de la Jamaïque chez 125 rats Fisher 344 âgés de 5 semaines (25 animaux/groupe) dans une étude d'hépatocancérogenèse à moyen-terme.

Le protocole suivi d'initiation/promotion est celui de de Solt et Fraber (1976).

Les rats sont d'abord exposés par voie intrapéritonéale, une seule injection d'un initiateur, le diéthylnitrosamine (DEN, pureté > 99%), à la dose de 200 mg/kg pc./j.

Deux semaines après l'exposition à l'initiateur, les animaux sont exposés, pendant 6 semaines, par voie orale (dans l'alimentation), à 500 ppm de phénobarbital (contrôle positif) et à 500, 5000, 30000 ppm d'extrait de *Quassia* de Jamaïque (correspondant approximativement à 50, 500, 3000 mg/kg pc./j).

Le phénobarbital et l'extrait du *Quassia* de la Jamaïque sont de qualité commerciale. L'extrait du *Quassia* de la Jamaïque contient 11,7% de quassine et 42,4% de néoquassine.

A la semaine 3 tous les animaux sont hépatectomisés (2/3 du foie). Les animaux sont sacrifiés à la semaine 8.

Les résultats montrent qu'après l'hépatectomie, 2 à 3 rats sont retrouvés morts dans chaque groupe.

A la dose de 30000 ppm d'extrait du *Quassia* de la Jamaïque, il est observé une forte diminution du poids des animaux. A partir de la semaine 5 jusqu'à la semaine 8, il est observé un gain de poids corporel des animaux.

Les animaux exposés aux faibles doses d'extrait du *Quassia* de la Jamaïque ne montrent pas de différences avec le groupe contrôle en termes de poids corporel et de consommation alimentaire tout au long de l'étude.

Au sacrifice, les rats du groupe traité par 30000 ppm d'extrait du *Quassia* de la Jamaïque montrent une diminution de leurs poids corporels. Il est également observé une augmentation relative et absolue dose-dépendante du poids des foies chez les rats exposés à l'extrait du *Quassia* de la Jamaïque à 5000 ppm d'extrait du *Quassia* de la Jamaïque et un doublement du poids relatif à 30000

ppm *versus* le groupe contrôle. Chez les contrôles positifs, il est observé une augmentation relative et absolue du poids des foies, tandis que les poids corporels ne varient pas.

D'un point de vue histopathologique, les animaux du groupe exposé à 5000 ppm et 30000 ppm montrent une hypertrophie des cellules diffuses du foie avec une augmentation dose-dépendante dans la sévérité, alors que les animaux du groupe exposé à 500 ppm de phénobarbital montrent une hypertrophie centro-lobulaire des cellules du foie.

Les mesures quantitatives des foyers hépatiques glutathion-s-transférase placentaire positifs (GST-P+), révèlent une augmentation non significative du nombre et de la surface des foyers à la dose de 5000 ppm d'extrait du Quassia de la Jamaïque et une augmentation statistiquement significative à la dose de 30000 ppm, les valeurs étant 3 fois supérieures au témoin initié par le DEN uniquement.

Par contre, à la dose de 500 ppm d'extrait du Quassia de la Jamaïque, le nombre et la surface des foyers sont diminués alors que les différences sont statistiquement non significatives.

Le phénobarbital (témoin positif) augmente de 2 fois le nombre et la surface des foyers hépatiques GST-P+ par rapport aux témoins.

Les résultats montrent que l'extrait du Quassia de la Jamaïque à la forte dose possède un potentiel promoteur hépatique chez le rat.

6. RESUME DES EFFETS OBSERVES, CHOIX DE L'EFFET CRITIQUE ET JUSTIFICATION DE LA NOAEL RETENUE

Les études de toxicité sur la quassine sont peu nombreuses et de mauvaise qualité. Lorsque les essais sont réalisés avec de l'extrait du *Quassia amara*, l'extrait n'est pas défini.

Il s'agit principalement d'études mécanistiques qui nous permettent d'aboutir de conclure sur les effets liés aux fonctions de la reproduction chez les mâles :

- inhibition de la production de testostérone par les cellules de Leydig (Njar *et al.*, 1995) ;
- diminution des poids des testicules, des épидидymes et des vésicules séminales et du nombre de spermatozoïdes (Raji et Bolarinwa 1997) ;
- diminution des concentrations plasmatiques en testostérone, LH et FSH (Raji et Bolarinwa 1997) ;
- effet sur l'intégrité structurale et fonctionnelle du sperme *in vivo* et donc sur la fertilité (Parveen *et al.*, 2003) ;

Concernant la génotoxicité, l'extrait du Quassia de la Jamaïque montre des résultats positifs *in vitro* (test d'Ames, test d'aberrations chromosomiques) et négatifs *in vivo* (test du micronoyau sur moelle osseuse de souris, test UDS).

Concernant la cancérogenèse, l'étude d'initiation-promotion de Woo *et al.*, 2007, montre que l'extrait du Quassia de la Jamaïque augmente l'incidence des foyers enzymatiques altérés au niveau hépatique chez le rat et par conséquent peut être considéré comme un promoteur de tumeurs.

Toutefois, le SCF (2002) a pu proposer sur la base des données disponibles une LOEL d'après les études de Njar *et al.*, 1995 et Raji et Bolarinwa 1997. La LOEL retenue pour la quassine par le SCF est de 0,1 mg/kg pc./j (LOEL) et aucune NOEL n'a pu être établie

Le SCF (2002) émet néanmoins des réserves concernant l'étude de Raji et Bolarinwa (1997), en indiquant que le nombre d'animaux par groupe est seulement de 5, qu'aucune analyse histopathologique n'a été réalisée et que les informations sur la reproduction incluant la taille des portées sont insuffisantes.

Sur la base des études disponibles il n'est pas possible de définir le profil toxicologique complet de la substance. En outre, le peu d'études montre néanmoins, que la quassine est probablement reprotoxique. Ainsi, ces études ne permettent pas de retenir une NOAEL ni de mener à bien l'évaluation du risque.

Il serait ainsi nécessaire de disposer de données suivantes:

- une étude de reprotoxicité menée selon les lignes directrices de l'OCDE ;
- une étude de toxicité sub-chronique ;

- le passage percutané de la quassine (en absence de données une absorption de 100% devrait être appliquée) ;
- d'exposition et les conditions d'utilisation.

7. EVALUATION DE L'EXPOSITION DE LA SUBSTANCE POUR UN USAGE COSMETIQUE

Après avoir interrogé l'industrie cosmétique, cette dernière n'a fourni aucune donnée d'utilisation de la quassine (réponse de COSMED), par conséquent l'exposition ne peut être déterminée.

8. CONCLUSION

Compte tenu de la faible qualité des études, du faible nombre de données permettant de caractériser le danger, par conséquent il est impossible de réaliser une évaluation du risque de la substance quassine utilisée dans les produits cosmétiques. Ainsi, la Commission de cosmétologie du 03 mai 2011 propose de l'inscrire à l'Annexe II des substances interdites. Néanmoins, il convient de transmettre ce rapport à la Commission européenne afin de saisir le comité scientifique d'experts européens pour la sécurité des consommateurs CSSC (ou *SCCS Scientific Committee on Consumer Safety*), afin de procéder à son évaluation si toutefois, la quassine est utilisée par d'autres Etats membres.

9. BIBLIOGRAPHIE

Association Française de Protection des Plantes (AFPP), Fiche version 1 du 26 novembre 2007.

Cachet, N., Hoakwie, F., Bertani, S., Bourdy, G., Deharo, E., Stien, D., Houel, E., Gornitzka, H., Fillaux, J., Chevalley, S., Valentin, A., Jullian, V. (2009). Antimalarial activity of simalikalactone E, a new quassinoid form *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 4393-4398.

CFR (2002). US Code of Federal Regulations. Title 21. §172.510.

Cosmetic Ingredient Review. (2008). Final report of the safety assessment of alcohol denat., including SD alcohol 3-A, SD alcohol 30, SD alcohol 39, SD alcohol 39-B, alcohol 39-C, SD alcohol 40, SD alcohol 40-B, and SD alcohol 40-C, and the denaturants, Quassin, Brucine sulphate / Brucine, and Denatonium benzoate. *International Journal of Toxicology*. 27 (suppl.1), p 1-43.

Council of Europe (2008) Natural Source of Flavourings, Report n°3

Danish Hydraulic Institute (DHI), 2007. Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals.

Garcia, G.M., Gonzalez, S.M.C., Pazos, L.S. (1997). [Pharmacologic activity of the aqueous wood extract from *Quassia amara* (Simurabaceae) on albino rats and mice.] *Rev. Biol. Trop.*, 44-45, 47-50.

Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A., Sindelar, R.D. (2005). Biologically active quassinoides and their chemistry: potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 173-190.

Margaria, R. (1963). Analisi dei gruppi lattinici di una quassina greggia. Communication et relation au Comité pour l'Etude des Bossions Alcooliques Aromatisées de la Federvini. Milan, Institut de Physiologie de l'Université, pp. 1-10.

Njar, V.C.O., Alao, T.P., Okogun, J.I., Holland, H.L. (1933). 2-methoxycnathin-6-one : a new alkaloid from the stem wood of *Quassia amara*. *Planta medica*, 59(3), 259-261.

Njar, V.C.O., Alao, T.O., Okugun, J.I., Raji, Y., Bolarinwa, A.F., Nduka, E.U. (1995). Antifertility activity of *Quassia amara*: Quassin inhibits the steroidogenesis in rat leydig cells *in vitro*. *Planta Med.* 61, 180-182.

Parveen, S., Das, S., Prakash Kundra, C., Pereira M.MJ. (2003). A comprehensive evaluation of the reproductive toxicity of *Quassia amara* in male rats. *Reproductive toxicology*, 17, 45-50.

Raji, Y., Bolarinwa, A.F. (1997). Antifertility activity of *Quassia amara* in male rats – *in vivo* study. *Life Sci.*, 61, 1067-1074.

Scientific Committee on Food (SCF), Opinion of the scientific committee on food on Quassin, 25 July 2002.

The Angiosperme phylogeny group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399-436.

Woo, G.H., Shibutani, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Takahashi, M., Lee, K.Y., Hirose, M. (2007). Promoting potential of a Jamaica quassia extract in a rat medium-term hepatocarcinogenesis bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1160-1164.