

## ANNEXE

### de l'avis de l'Afssa du 29 janvier 2010 relatif à l'analyse critique des résultats d'une étude de toxicité sur le développement du système nerveux ainsi que d'autres données publiées récemment sur les effets toxiques du bisphénol A

---

Cette annexe présente la méthodologie et résume l'expertise des documents analysés dans l'avis de l'Afssa du 29 janvier 2010 relatif à l'analyse critique des résultats d'une étude de toxicité sur le développement du système nerveux ainsi que d'autres données publiées récemment sur les effets toxiques du bisphénol A.

#### 1. METHODOLOGIE

Les articles et les rapports scientifiques examinés par le Groupe de Travail « Bisphénol A » (GT BPA) et listés dans les références bibliographiques sont issus d'une veille bibliographique active menée au sein de la Direction des Risques Nutritionnels et Sanitaires de l'Afssa entre juin 2009 et janvier 2010 à partir des bases de données SCOPUS et PUBMED, avec la requête « bisphénol A » dans le titre/le résumé/le corps du texte. Des références antérieures à 2009 ont été sélectionnées à partir des références citées dans ces articles et les experts du GT BPA ont enrichi ce recueil par leur propre veille.

Cette annexe se focalise sur l'analyse des effets du BPA chez l'animal de laboratoire (rongeurs, primates), en particulier des effets observés après exposition à des niveaux inférieurs à la dose sans effet néfaste de 5 mg/kg p.c./j sur laquelle repose la dose journalière tolérable (DJT) de 0,05 mg/kg p.c./j établie par l'EFSA<sup>1</sup> en 2006. Ont été prioritairement retenues les études pour lesquelles les administrations ont été réalisées par voie orale (gavage) ou alimentaire (incorporation dans le régime ou l'eau de boisson).

La revue critique de la méthode expérimentale de chaque étude a notamment pris en compte des facteurs susceptibles de modifier ou de masquer l'action du BPA aux faibles doses :

- la composition du régime alimentaire : présence de phyto-œstrogènes,
- la composition des cages d'hébergement, des récipients pour l'eau de boisson des animaux : présence de polycarbonate,
- la composition de l'eau de boisson : eau du robinet, eau traitée (filtration sur charbon actif), concentration en BPA,
- la composition de la litière : présence de perturbateurs endocriniens.

Les synthèses bibliographiques réalisées par le Réseau Environnement Santé et transmises à l'Afssa en juillet, octobre et novembre 2009 ont été prises en compte. Le Réseau Environnement Santé a également été invité à présenter une synthèse bibliographique dans le cadre d'une audition qui s'est tenue le 1<sup>er</sup> décembre 2009.

Chacun des documents scientifiques retenus a été analysé par au moins 2 membres du groupe de travail et ont été discutés au cours de 3 réunions. Les conclusions du GT BPA, qui ont servi de base à l'avis de l'Afssa du 29 janvier 2010, ont été présentées et discutées lors des séances plénières des Comités d'Experts Spécialisés « Matériaux au Contact de Denrées Alimentaires » et « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » qui se sont tenues respectivement les 21 et 13 janvier 2010.

---

<sup>1</sup> Autorité européenne de sécurité des aliments

Ont été écartées de cette analyse les études impliquant des voies d'administration non orales, telles que les injections sous-cutanées, intra-péritonéales ou par via des pompes placée sous la peau, sauf lorsque celles-ci révélaient des paramètres comparables avec les résultats des études *per os*. De même, les études dont les critères de jugement avaient uniquement une finalité de compréhension mécanistique (par exemple, modulation de l'expression de certains gènes) n'ont pas été retenues.

Les caractéristiques méthodologiques (notamment le nombre d'animaux par lot, le nombre de doses testées, la présence de témoin positif) ainsi que les principaux résultats obtenus dans chaque étude sont résumés et commentés. La qualité des études a été évaluée selon l'approche de Klimisch *et al.* (1997), telle que décrite par l'Afsset dans un document guide de juillet 2007<sup>2</sup>. Cette cotation est comprise entre 1 et 4, selon les critères présentés dans le tableau 1. Les références retenues pour l'analyse sont listées par thème et par ordre alphabétique.

**Tableau 1** : Critères pour la cotation selon l'approche de Klimisch *et al.* (1997)

COTATION	CATEGORIE DE VALIDITE
<b>1</b> - 1a - 1b - 1c - 1d	<b>Valide sans restriction</b> - Etude BPL respectant les tests standardisés (OCDE, EC, EPA, FDA, etc.) - Comparable à une étude standardisée - Protocole en accord avec une méthode standardisée nationale (AFNOR, DIN, etc.) - Protocole en accord avec les méthodes standards scientifiquement acceptées et suffisamment détaillé
<b>2</b> - 2a - 2b - 2c - 2d - 2e - 2f - 2g	<b>Valide avec restriction</b> - Etude standardisée sans documentation détaillée - Etude standardisée avec restrictions acceptables - Comparable à une étude standardisée avec restrictions acceptables - Protocole en accord avec les méthodes standardisées nationales, avec restrictions acceptables - Etude bien documentée et en accord avec les principes scientifiques, acceptable pour l'évaluation - Méthode de calcul acceptée - Données provenant d'ouvrages de références et de collecte de données
<b>3</b> - 3a - 3b - 3c	<b>Non valide</b> - Document insuffisant pour l'évaluation - Déficiences méthodologiques significatives - Protocole inconcevable
<b>4</b> - 4a - 4b - 4c - 4d - 4e	<b>Non évaluable</b> - Résumé - Littérature secondaire - Référence originale non disponible - Référence originale dans un autre langage que le langage international (anglais) - Documentation insuffisante pour l'évaluation

S'agissant des études relatives à la libération de BPA à partir des biberons en polycarbonate ainsi que d'autres récipients (conserves, canettes), la cotation de Klimish ne peut pas être appliquée. La classification suivante a donc été adoptée :

- 1 = nouvelles données,
- 2 = confirmation de données déjà publiées,
- 3 = non pertinent dans le cadre de l'expertise menée par le GT BPA.

<sup>2</sup> [http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/665904925967833733338285157123/07\\_32\\_ccap.pdf](http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/665904925967833733338285157123/07_32_ccap.pdf)

## 2. IDENTIFICATION DES BIAIS EXPERIMENTAUX

Plusieurs paramètres ont été identifiés comme source potentielle de biais expérimentaux dans les études de toxicité du BPA sur les animaux de laboratoire (en dehors du nombre d'animaux testés par lot, du nombre de doses, de la présence de témoins positif et négatif) :

- la nature des cages d'hébergement/des récipients de distribution de l'eau pour les animaux
- la composition du régime alimentaire
- la voie d'administration
- la qualité de l'eau
- la nature de la litière.

### 2.1 La nature des cages

L'étude de Howdeshell *et al.* (2003) souligne l'importance de la nature du plastique utilisé dans la fabrication des cages d'hébergement pour rongeurs. Ces auteurs ont étudié le transfert de BPA à partir de la paroi de cages en polycarbonate (neuves et usagées), en polysulfone, en polypropylène et en verre. Pour cela, de l'eau à pH neutre a été déposée dans les cages placées à température ambiante. Au bout d'une semaine, l'eau a été récupérée et son éventuel effet œstrogénique a été déterminé par un test de prolifération sur cellules MCF7 (E-Screen). L'effet des cages a également été contrôlé *in vivo* sur souris immatures par un test utéro-trophique.

Les résultats obtenus montrent que seules les cages en polypropylène et en verre ne libèrent pas de BPA. Les cages en polycarbonate et en polysulfonate en libèrent peu lorsqu'elles sont neuves (respectivement 0,3 et 1,5 µg/l), mais les cages en polycarbonate usagées en libèrent 1000 fois plus que les cages neuves (310 µg/l par rapport à 0,3 µg/l). Les femelles immatures placées dans les cages en polycarbonate usagé ont un poids moyen d'utérus (calculé sur plus de 20 portées d'au moins 6 femelles de 19 jours) supérieur de 16% à celui des femelles placées dans les cages neuves. Les auteurs concluent que les animaux sont soumis à une exposition chronique au bisphénol A qui peut intervenir par contact ou par léchage des parois.

### 2.2 La composition du régime

La plupart des régimes commerciaux pour rongeurs utilisent le soja comme source de protéines et contiennent donc des phyto-œstrogènes de type isoflavones et coumestranes dont les propriétés œstrogéniques sont largement décrites. Cependant, la littérature mentionne également d'autres régimes alimentaires et d'une manière globale, on peut les classer selon 3 types :

- des régimes totalement semi-synthétiques où l'apport en protéines est sous forme de caséine (régimes purifiés, rarement utilisés),
- des régimes conventionnels de type croquette où l'apport en protéines se fait à partir du soja ou d'autres légumineuses : dans ces régimes, les taux de phyto-œstrogènes sont variables, et pour la plupart n'excèdent pas 600 mg/kg. Cependant, des études comparatives permettent d'observer l'impact de la présence de phyto-œstrogènes dans les régimes sur les études comportementales et métaboliques.
- des régimes plus spécialement élaborés pour les études de la perturbation endocrinienne et qui sont dépourvus de protéines de soja, donc de phyto-œstrogènes. Plusieurs articles indiquent que la présence de phyto-œstrogènes dans le régime a un impact sur la réponse œstrogénique.

En 2003, Owens *et al.* ont publié les résultats d'une étude portant sur les teneurs en phyto-œstrogènes des régimes commerciaux utilisés dans le programme OCDE de validation du test utéro-trophique chez le rat. Ces tests de validation ont été réalisés avec le BPA et le nonylphénol sur des femelles immatures et adultes ovariectomisées. Les concentrations en phyto-œstrogènes (somme des teneurs en génistéine, daidzéine et coumestrol) dans les régimes commerciaux variaient de 150 à 350 mg/kg d'aliment, mais certains pouvaient en contenir jusqu'à 600 mg/kg. Les résultats obtenus ont montré que les poids relatifs des utérus (rapportés à la masse corporelle) étaient corrélés à la teneur en phyto-œstrogènes dans les régimes. Un effet utéro-trophique a été observé pour les régimes contenant des teneurs élevées d'isoflavones, alors que des teneurs faibles ou modérées ne semblaient pas affecter la réponse du test utéro-trophique au nonylphénol ou au BPA (testé à la dose

de 600 mg/kg/j). Les auteurs ont conclu que l'utilisation de régimes contenant une teneur en phyto-œstrogènes inférieure à 325-375 mg/kg n'interférait pas avec le résultat du test utéro-trophique. Si cette étude permet d'avoir des données précises sur les teneurs en phyto-œstrogènes du régime capables d'affecter l'effet utéro-trophique du BPA chez la rate, mesuré conformément à la directive OCDE, elle utilise une forte dose de BPA et ne considère que le poids de l'utérus.

Dans une revue bibliographique, Jensen *et al.* (2007) ont répertorié la plupart des régimes commerciaux utilisés en expérimentation animale et ont analysé la littérature afin de préciser les teneurs en phyto-œstrogènes de ces régimes et les effets observés sur différentes cibles (test utéro-trophique, minéralisation osseuse, cancérogenèse, etc.). Cette revue confirme que la génistéine et la daidzéine sont les principaux phyto-œstrogènes retrouvés dans les régimes contenant du soja. Les auteurs concluent que les régimes contenant des concentrations élevées de phyto-œstrogènes influent sur la réponse expérimentale. Ils concluent également que toutes les cibles biologiques ne présentent pas la même sensibilité et appellent à la prudence dans l'interprétation des résultats obtenus en présence de phyto-œstrogènes. Si, dans beaucoup d'études, les seuils au-delà desquels les réponses sont influencées par les phyto-œstrogènes se situent entre 300 et 400 mg/kg d'aliment, quelques travaux montrent que certaines cibles toxicologiques telles que le comportement ou le développement de cancers hormono-dépendants peuvent être affectées par des teneurs nettement plus faibles.

Cette analyse a le mérite de prendre en compte plusieurs types de protocoles incluant des expositions périnatales et des études à long terme. Elle met en garde vis-à-vis des multiples incidences que peuvent avoir les phyto-œstrogènes dans les études relatives aux perturbateurs endocriniens. Il est dommage que cette analyse n'ait pas inclus quelques régimes totalement dépourvus de soja.

Thigpen *et al.*, (2007) ont évalué l'effet (croissance, ouverture vaginale, distance ano-génitale) produit chez les rongeurs par des régimes ayant différentes concentrations en phyto-œstrogènes. Dans cette étude, les auteurs ont nourri dès la gestation des souris CD1 et des rats F344 et Sprague Dawley, avec des régimes commerciaux dont les teneurs en phyto-œstrogènes ont été mesurées. Les résultats montrent que pour une espèce et une souche donnée, le gain de poids quotidien, la distance ano-génitale et l'ouverture vaginale sont corrélées à la teneur en phyto-œstrogènes du régime. Pour un régime donné, l'effet sur l'avancement de la puberté varie d'une espèce à l'autre et les auteurs identifient les rats Sprague Dawley comme peu sensibles et donc peu compatibles avec des études de perturbation endocrinienne. Pour les régimes à très faible teneur en phyto-œstrogènes, l'ouverture vaginale peut être très tardive (42<sup>ème</sup> jour).

Cette étude montre l'importance du régime alimentaire, en particulier des teneurs en phyto-œstrogènes de l'aliment dans la réponse œstrogénique et suggère d'éviter l'utilisation de régimes commerciaux fortement dosés en phyto-œstrogènes pour la mise en évidence de tels effets.

Les travaux de Ruhlen *et al.* (2008) chez la souris CD1 visent à comparer des régimes commerciaux contenant ou ne contenant pas de soja, sur des critères de toxicité sur la reproduction et du développement. Le schéma expérimental a consisté à nourrir des mères, puis la génération F1 correspondante, avec un régime dépourvu de soja (PMI 5K96) où l'apport en protéines est principalement assuré par de la caséine. En parallèle, dans les mêmes conditions, des animaux ont été nourris avec les régimes à base de protéines de soja PMI 5008 (gestation/lactation) et PMI 5001 (post-sevrage). Les teneurs en phyto-œstrogènes des régimes n'ont pas été mesurées, mais les activités œstrogéniques d'extraits méthanoliques de chacun des aliments ont été évaluées par un test de prolifération cellulaire (MCF7).

Les résultats, exprimés en mg/kg d'équivalent génistéine, sont de 3,9 pour l'aliment PMI 5K96, 40,0 mg/kg pour PMI 5008 et 25,8 mg/kg pour PMI 5001. Les principaux paramètres mesurés sont les niveaux circulants en œstradiol au cours de la gestation chez les mères et les fœtus, le poids des nouveau-nés puis des jeunes, le poids de différents organes liés à la reproduction ainsi que du tissu adipeux chez F1 et les niveaux circulants de leptine. Contrairement aux attentes, les taux sériques d'œstradiol sont plus élevés chez les fœtus dont les mères ont été nourries avec le régime dépourvu de soja que chez les fœtus provenant du lot recevant le régime classique et ces taux sont associés à des effets adverses sur la reproduction qui rappellent un syndrome d'œstrogénisation fœtale. Chez les femelles, il induit une puberté précoce et augmente la réponse utéro-trophique à l'œstradiol. Chez les mâles, il augmente le volume prostatique et entraîne une altération des paramètres de la reproduction à l'image des composés œstrogéniques. A l'âge adulte, ces animaux deviennent obèses et produisent un taux anormal de leptine.

Les auteurs concluent que les animaux de laboratoire qui sont soumis depuis plusieurs générations à des régimes riches en phyto-œstrogènes développent un processus adaptatif qui se traduit par un syndrome d'œstrogénisation lorsqu'ils passent à un régime dépourvu de phyto-œstrogènes, ce qui n'est pas sans conséquence pour des études expérimentales censées mettre en évidence des perturbations endocriniennes. Si cette alerte mérite d'être prise en compte, les données concernant les effets métaboliques doivent être interprétées avec prudence en raison de différences substantielles dans la composition des régimes (teneurs en lipides, protéines, glucides, proportion de saccharose).

Néanmoins, d'autres travaux ont fait état de perturbations métaboliques induites par les phyto-œstrogènes. En 2004, Lephart *et al.* ont comparé chez le rat les effets sur la prise alimentaire, le comportement alimentaire et sur la masse grasseuse ainsi que sur les paramètres sériques associés au métabolisme général, de régimes l'un riche (600 mg/kg) et l'autre pauvre (15 mg/kg) en isoflavones du soja. L'étude démarre à partir de la conception et se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Elle montre que les animaux soumis à un régime sans soja sont plus gras et ont un taux de leptine plus élevé alors qu'ils mangent moins que les autres. Ces effets s'accompagnent d'une augmentation du taux circulant d'insuline et d'une diminution des taux de glucose, de T3 et d'une moins bonne régulation thermique, permettant aux auteurs de conclure que les phyto-œstrogènes du régime interviennent sur le métabolisme général et sur le comportement alimentaire.

Cette étude souligne les effets pro-adipogéniques des régimes exempts de soja mais ne permet pas d'exclure un effet nutritionnel dû aux autres constituants, faute d'indications précises sur la composition du régime sans soja et sur l'origine des protéines de ce régime.

Hartley *et al.* (2003) ont étudié l'impact des phyto-œstrogènes du régime sur le comportement social du rat mâle adulte. Ces travaux ont porté sur 2 lots de 60 rats, l'un soumis à un régime dépourvu de soja (Harlan Teklad 2016) et l'autre contenant 150 à 250 mg d'isoflavones (génisteine et daïdzéine) par kg d'aliment (Harlan, Teklad 2018). Les consommations d'eau et d'aliments sont mesurées pendant 14 jours, puis les animaux sont placés en cages individuelles pendant 4 jours avant de réaliser des tests comportementaux (test d'interaction sociale et mesure de l'anxiété). Des dosages de corticostérone sont réalisés avant et après le stress induit par les deux tests d'anxiété. La vasopressine et l'ocytocine sont dosées juste après l'induction d'un stress manuel. Aucun effet n'a été observé sur la consommation de nourriture, la croissance et le taux d'ocytocine. Les niveaux de base du cortisol et de vasopressine sont identiques dans les deux lots, mais après l'induction du stress, les animaux recevant le régime riche en phyto-œstrogènes ont des taux plus élevés. Dans le lot recevant l'aliment contenant du soja, les animaux sont moins actifs et plus anxieux.

Ces résultats indiquent que la présence de phyto-œstrogènes dans le régime peut influencer le comportement des animaux et créer un biais expérimental. Cette étude étant réalisée chez l'adulte, les effets neurocomportementaux observés ne sont pas en lien avec un effet sur le développement. Par ailleurs, il y a tout lieu de penser que ces effets sont rapidement réversibles. En effet, avant de débiter l'expérience, les animaux étaient tous soumis à un régime standard contenant 150 mg/g d'isoflavones de soja (génisteine et daïdzéine) ; ce qui n'a pas empêché d'observer une différence entre les 2 lots après une période expérimentale de 14 jours seulement. L'ensemble de ces données montre que la présence de phyto-œstrogènes a une incidence sur la réponse œstrogénique (en particulier sur le test utéro-trophique), le métabolisme général le développement et le comportement alimentaire et social.

### 2.3 Le mode d'administration

La plupart des études aux faibles doses font appel à une administration par injection sous-cutanée, qui permet de maîtriser avec davantage de précision la quantité administrée par jour et par unité de poids corporel. L'utilisation de pompes osmotiques facilite les études d'exposition chronique. Mais ces modes d'administration présentent l'inconvénient de ne pas tenir compte de paramètres toxicocinétiques tels que la biodisponibilité ou le métabolisme intestinal, voire hépatique.

Les études en lien avec les contaminations alimentaires privilégient les expositions *per os*, soit en utilisant des sondes de gavage, soit en déposant directement les composés à tester dans la cavité buccale à l'aide d'une micropipette (Palanza *et al.*). Dans ce cas, le véhicule utilisé pour solubiliser et administrer les substances à tester peut modifier l'absorption ou introduire des composés eux-mêmes actifs sur les cibles étudiées. Ainsi, les protocoles utilisant de l'huile d'olive, riche en polyphénols, ne

permettent pas d'écarter un éventuel risque d'interaction entre ces polyphénols et des perturbateurs endocriniens testés à faible dose.

Afin d'estimer l'incidence de la voie d'administration sur les formes et les niveaux circulants de BPA, Taylor *et al.* (2008) ont administré à des souris des doses uniques de BPA radiomarqué. Un premier lot a reçu le BPA par injection sous-cutanée et le second a été traité par gavage. Deux doses ont été testées (35 et 395 µg/kg) et les concentrations plasmatiques ont été mesurées au cours des 24 h qui suivent le traitement. Bien que les cinétiques à 3 et 6 h soient sensiblement différentes entre les 2 lots, les taux plasmatiques en BPA libre sont semblables à 24 h, suggérant qu'aux doses testées, la voie d'administration n'affecte pas les niveaux circulants. Néanmoins, cette étude ne prend pas en considération des conditions d'administration répétée, plus proches de la réalité d'une exposition au BPA.

## 2.4 La qualité de l'eau

L'eau du robinet peut contenir des contaminants chimiques à l'état de traces, dont certains présentent une activité de type perturbation endocrinienne. Le BPA pouvant entrer dans la composition des matériaux au contact de l'eau utilisés dans les réseaux d'eau potable, la possibilité de la présence de BPA dans l'eau du robinet est à considérer dans le cadre des expérimentations animales. La filtration sur charbon actif en grains a une efficacité très variable, les pourcentages d'élimination variant de 25 à 75 % (Stackelberg *et al.*, 2007).

Il convient de noter que la DRASS Midi-Pyrénées et l'Agence de l'eau Adour Garonne ont réalisé une campagne d'analyses en 2006-2007. Le BPA a été recherché dans 10 échantillons d'eau brute d'origine souterraine, 31 échantillons d'eau brute de surface et 40 échantillons d'eau de boisson destinée à la consommation humaine. Tous les résultats étaient inférieurs à la limite de quantification de la méthode de 50 ng/l.

L'ensemble des données de la littérature évoque pour le BPA éventuellement présent dans l'eau de boisson destinée à la consommation humaine, des concentrations de l'ordre du nanogramme par litre. Ainsi, Wenzel *et al.* (2003) ont détecté du BPA dans les eaux de surface (rivières) d'Autriche, Belgique, Suisse, Allemagne et Pays-Bas à des concentrations de l'ordre de dizaines ou de centaines de ng/l (0,8 µg/l au maximum). Dans l'eau de boisson, les résultats étaient inférieurs à la limite de détection de 8 ou 11 ng/l (un seul distributeur d'eau a rapporté une valeur de 0,12 µg/l qui était supérieure à la valeur dans l'eau brute correspondante).

Les travaux de Kuch & Ballschmiter (2001) en Allemagne ont montré des concentrations en BPA allant de 500 pg/l à 16 ng/l dans les eaux de rivière et de 300 pg/l à 2 ng/l dans l'eau de boisson.

## 2.5 La nature et la qualité de la litière

Les litières peuvent être constituées de sciures ou de copeaux de bois ou encore de rafles de maïs. Certains bois (conifères, eucalyptus) contiennent des composés potentiellement œstrogéniques (polyphénols, terpènes) qui peuvent être absorbés par les animaux (léchage). Il en est de même des rafles de maïs qui peuvent être contaminées par la zéaralénone, une mycotoxine plus œstrogénique que les phyto-œstrogènes du soja et connue pour être responsable d'infertilité dans certains élevages d'animaux de rente.

A ce jour, très peu d'études précisent comment ces litières ont été prises en compte dans l'expérimentation.

### 3. ANALYSE DÉTAILLÉE DES ÉTUDES DE TOXICITÉ DU BPA

La dose journalière tolérable (DJT) du BPA de 0,05 mg/kg p.c./j a été établie par l'EFSA en 2006 à partir d'une dose sans effet néfaste de 5 mg/kg p.c./j dans une étude de reprotoxicité sur 2 générations chez la souris (Tyl *et al.*, 2006) et d'un facteur de sécurité de 100 (10 pour la variabilité inter-espèce et 10 pour la variabilité inter-individus).

Les études de toxicité examinées par le GT BPA ont été classées en 3 catégories, selon les résultats observés aux doses inférieures à 5 mg/kg p.c./j :

1. les études concluant à l'absence de toxicité,
2. les études considérées comme des signaux d'alerte
3. les études dont les résultats n'ont pas été jugés préoccupants par le GT BPA.

#### 3.1 Etudes concluant à l'absence de toxicité aux doses inférieures à 5 mg/kg p.c./j

##### 3.1.1 A dietary developmental neurotoxicity study of bisphenol in rats, WIL-186056, septembre 2009, 4796p.

Stump *et al.* (2009), American Chemistry Council

###### Cotation 1a

###### Objectif de l'étude :

Rechercher des effets neurotoxiques (morphologiques et/ou fonctionnels) chez les jeunes rats après exposition continue de la mère pendant la gestation (développement embryonnaire et fœtal) puis pendant la lactation jusqu'au sevrage (21 jours après la naissance, développement postnatal) : étude menée suivant la ligne directrice 426 de l'OCDE explorant notamment des fonctions motrices, l'apprentissage et la mémoire, ainsi que l'évolution pondérale du cerveau et la neuropathologie.

###### Méthode :

- Animaux : rats Crl:CD(SD) rats, 24 femelles/dose

- Administration :

- o Doses de 0,15 ; 1,5 ; 75 ; 750 et 2250 mg/kg d'aliment (correspondant à 0,01 ; 0,12 ; 5,85 ; 56,4 ; 164 mg/kg p.c./j pendant la gestation et 0,03 ; 0,25 ; 13,1 ; 129 ; 410 mg/kg p.c./j pendant la lactation, compte tenu des consommations alimentaires moyennes).
- o Etude complémentaire : 2250 mg/kg d'aliment
- o Durée d'exposition de l'étude principale : GD0 au PND21 (1<sup>er</sup> jour de la gestation jusqu'au sevrage, au 21<sup>ème</sup> jour après la naissance)
- o Durée d'exposition de l'étude additionnelle : GD0 au PND11 (1<sup>er</sup> jour de la gestation jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour après la naissance)

- Paramètres étudiés :

- o mères (F0) : poids corporel, consommation alimentaire, examen clinique détaillé, poids et examen microscopique des foies et des reins.
- o Petits (F1) : observation quotidienne, pesée et examen physique à intervalles réguliers, reflexe de redressement, perfusion cérébrale *in situ*, neuropathologie et morphométrie, activité motrice, apprentissage et mémoire (labyrinthe en eau de Biel), sursaut auditif, séparation balano-préputiale, ouverture vaginale.

###### Résultats :

Selon la ligne directrice 426 de l'OCDE, la plus forte dose est fixée pour induire une certaine toxicité maternelle (par exemple, réduction du gain de poids de 10% par rapport aux témoins). Cet effet a été observé aux doses de 750 et 2250 mg/kg sous forme d'une réduction du gain de poids respectivement de 9,5% et 22,4%, mais uniquement pendant la gestation, accompagnée d'une réduction parallèle de la consommation alimentaire. Aucun autre signe de toxicité maternelle n'a été retenu par les auteurs. Les dépilations observées chez les mères à 750 et 2250 mg/kg et la légère agitation des animaux traités n'ont pas été considérées comme liées au BPA.

Même en présence de toxicité maternelle aux deux plus fortes doses, aucun effet délétère sur le développement physique et comportemental de la génération F1 n'a été retenu par les auteurs.

Au vu des convulsions cloniques dites de type « pop corn » observées chez quelques individus F1 aux doses supérieures de la gamme testée (1 mâle et 1 femelle à 750 mg/kg d'aliment sur 22 individus de chaque sexe ; 1 mâle et 3 femelles à 2250 mg/kg d'aliment sur 23 individus de chaque sexe), une étude additionnelle a été menée sur un plus grand nombre de portées pour reproduire l'étude principale, mais seulement à la plus forte dose et jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour après la naissance

(PND11). Aucune convulsion n'a alors été observée. L'analyse des données historiques montrent que ce type de convulsion au PND11 a déjà été observé mais à une fréquence plus faible et uniquement chez les femelles (2/244).

#### Conclusions de l'étude par les auteurs :

La dose sans effet adverse (NOAEL) retenue par les auteurs est de 75 mg/kg d'aliment administrée à la mère, correspondant à une exposition de 5,85 mg/kg p.c./j pendant la gestation et 13,1 mg/kg p.c./j pendant la lactation (compte tenu de la différence de poids des mères avant et après la mise bas). La dose de 5,85 mg/kg p.c./j est très proche de la dose de 5 mg/kg p.c./j sur laquelle repose la DJT.

L'absence d'effet sur le développement du système nerveux permet de conclure que le produit n'est pas un neurotoxique dans la gamme de doses testée, au sens de la ligne directrice 426 de l'OCDE.

#### Commentaires du GT BPA :

- L'étude a été réalisée en conformité avec la ligne directrice 426 de l'OCDE (tests, examens histopathologiques...) selon les bonnes pratiques de laboratoire.

- La gamme de doses choisies est suffisamment large. Le pas entre chaque niveau de doses faibles (x10) et de doses fortes (x3) est correct, en revanche celui entre les doses intermédiaires (1,5 et 75 mg/kg) peut être sujet à critique (x50) par rapport aux recommandations de la ligne directrice de l'OCDE.

- L'absence de groupe témoin positif dans l'étude n'est pas dommageable car l'ensemble des tests et des équipements automatiques utilisés ont été validés avec des substances de référence dans le cadre d'études qui se sont achevées entre mai et septembre 2008 (la partie expérimentale de l'étude sur le BPA ayant été menée entre juillet et novembre 2008).

- Le GT BPA regrette l'absence de groupes toxicocinétiques qui, bien que non requis par la ligne directrice 426 de l'OCDE, auraient permis de préciser l'exposition interne des mères, des fœtus et nouveau-nés.

- Contrairement aux auteurs qui ont conclu à l'absence d'effet sur le développement physique de la progéniture, le GT BPA retient une réduction de poids moyen en présevrage de 5,6 % au PND14-17 pour 750 mg/kg d'aliment et de 8,3% au PND 11-21 pour 2250 mg/kg d'aliment.

- Dans l'étude complémentaire, la relation dose/effet n'a pas été recherchée (une seule dose testée, 2250 mg/kg d'aliment) et il aurait été intéressant qu'au moins la dose de 750 mg/kg d'aliment soit reprise. Ici encore, une évaluation de l'exposition plasmatique aurait pu aider à l'interprétation des résultats.

- Le contrôle des conditions expérimentales est insuffisant tant dans l'étude principale que dans l'étude additionnelle, notamment du fait de la concentration élevée en phyto-œstrogènes dans le régime alimentaire (312 à 333 mg/kg d'isoflavones).

**En conclusion, le GT BPA retient l'absence de neurotoxicité du BPA sous réserve d'étayer ces résultats par une étude complémentaire avec plusieurs doses autour de la dose de 5 mg/kg p.c./j, ciblée sur la recherche d'apparition de convulsions, avec un contrôle attentif des conditions expérimentales (alimentation, litière) et comprenant la mesure des concentrations plasmatiques chez les mères traitées et les jeunes.**

### **3.1.2 *In utero* and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility and anatomy of female LE rats.**

Ryan B.C., Hotchkiss A.K., Crofton K.M., Gray E.A. *Toxicological Sciences* (2010) 114: 133-48.

#### **Cotation 2c**

##### Objectif de l'étude :

Etablir si l'exposition périnatale (*in utero* et pendant l'allaitement) à des faibles doses d'éthinyl œstradiol (EE2) et de BPA perturbe les comportements liés au dimorphisme sexuel, l'âge pubertaire et les fonctions reproductives chez le rat Long Evans (LE).

##### Méthode :

- Gavage de 2 groupes femelles gestantes composés respectivement de lots de 13 à 29 femelles/dose (groupe 1) et 6 à 14 femelles/dose (groupe 2), depuis le 7<sup>ème</sup> jour de la gestation (GD7) jusqu'au sevrage des petits (PND 18) par de l'huile de maïs (témoins), de l'éthinyl œstradiol (0,05 - 50 µg/kg avec 4 niveaux de dose pour le groupe 1 et 7 pour le groupe 2) ou du BPA (2, 20 ou 200 µg/kg avec 3 niveaux de dose pour le groupe 1 et 2 pour le groupe 2).

- Paramètres mesurés sur les femelles F1:

- au PND2 : sexe, poids corporel, distance anogénitale
- à partir PND 23 : ouverture vaginale



- après sevrage : fertilité et fécondité (sur 4 mois), préférence à la saccharine (test sur le 1<sup>er</sup> groupe pendant 5 j), activité (avant et après administration d'EE2 pendant 14 j), réceptivité sexuelle (lordose) après ovariectomie bilatérale et après administration de 50 µg/kg d'EE2 et injection sous-cutanée de 0,5 mg de progestérone.
- Morphométrie des organes génitaux externes (longueur et profondeur de la fente urétrale, distance uréthro-vaginale, distance ano-génitale).

#### Résultats :

Aucun effet du BPA sur les paramètres étudiés, alors que l'exposition pré- et néonatale à l'EE2 entraîne les effets suivants :

- chute du poids corporel des mères (aux doses  $\geq 15$  µg/kg)
- chute des implantations, du nombre et du p.c. des petits au PND2 (50 µg/kg)
- puberté précoce (5 µg/kg)
- chute de la fécondité des femelles F1
- chute de la préférence à la saccharine des femelles F1 adultes
- suppression de la réceptivité sexuelle aux doses de 15 et 50 µg/kg non restaurée par l'administration d'EE2 et de progestérone

#### Conclusion de l'étude :

L'exposition pré- et néonatale à de faibles doses de BPA (2-200 µg/kg p.c. soit 40 à 4000 fois supérieures aux niveaux moyens d'exposition de la population américaine estimés par NHANES) n'induit aucun effet significatif sur le poids des mères et des petits, les caractères sexuels primaires (distance anogénitale, ouverture vaginale, morphologie des organes génitaux externes), la fertilité, la fécondité et le dimorphisme sexuel comportemental, confirmant ainsi les résultats d'études multigénérationnelles (dont celles de Cagen *et al.*, 1999 ; Ema *et al.*, 2001 ; Tinwell *et al.*, 2002 et Tyl *et al.*, 2002).

#### Commentaires du GT BPA :

- *Le protocole d'étude est bien décrit et approuvé par l'US-EPA. La durée de traitement couvre la majorité de la période de différenciation sexuelle. La gamme de doses du témoin positif et de BPA est appropriée et les écarts entre chaque dose est acceptable ( $\times 10$  au maximum comme recommandé par l'OCDE). Les tests/méthodes sont correctement validés. Il est particulièrement intéressant de noter que le produit de référence, l'éthinyl œstradiol, œstrogène de synthèse, répond positivement dans cette étude.*

- *Cette étude a été conduite chez le rat Long Evans, que certains auteurs considèrent comme insensible aux œstrogènes (Vom Saal, 2008). Pour justifier l'utilisation du modèle rat Long Evans, les auteurs ont effectué quelques comparaisons avec le rat Sprague Dawley démontrant notamment une réponse similaire au test de réceptivité sexuelle (ovariectomie/traitement EE<sub>2</sub> et progestérone) et une relation dose/effet comparable entre les lignées LE et SD en termes de poids utérin des femelles ovariectomisées après traitement par l'EE<sub>2</sub> (0,5 – 250 µg / kg)*

- *Les tableaux de résultats ne permettent pas de vérifier le nombre exact d'animaux étudiés dans les différents lots et donc de juger de la puissance de l'étude pour détecter les différents effets (de ce point de vue, les auteurs signalent eux-mêmes que les effectifs d'animaux utilisés pour détecter les effets sur la fertilité/fécondité sont restreints). Les résultats sont néanmoins suffisamment détaillés pour permettre une interprétation. A noter que certains de ces résultats (toxicité maternelle et fertilité de la F0 ; effet sur les mâles F1) ne sont qu'un rappel de travaux antérieurement publiés.*

- *Le GT BPA regrette l'absence de dosages plasmatiques qui auraient permis de préciser l'exposition périnatale des rats.*

- *Un contrôle régulier de la présence de pesticides et de métaux lourds dans l'eau de boisson est assuré mais il n'est pas mentionné de contrôle de la teneur en BPA.*

- *Les animaux sont hébergés dans des cages en polycarbonate.*

- *Le régime alimentaire des animaux contient une teneur élevée en phyto-œstrogènes (de l'ordre de 400 mg/kg d'isoflavone selon les données du fournisseur).*

- *Les conditions de luminosité ont une périodicité non conventionnelle (14h de lumière et 10h de nuit) qui peuvent influencer les analyses comportementales.*

- *Note : l'occurrence d'effets chez les mâles n'a pas été recherchée dans cette étude. Ils ont été publiés par Howdeshell *et al.* (2008) uniquement pour des paramètres liés à la reproduction.*

*Malgré les quelques réserves soulignées ci-dessus, le GT BPA retient les résultats de cette étude qui ne montre pas d'effets du BPA.*

**En conclusion, le GT BPA retient l'absence de toxicité du BPA dans cette étude sur les caractères sexuels primaires (distance anogénitale, ouverture vaginale, morphologie des organes génitaux externes), la fertilité, la fécondité et le dimorphisme sexuel comportemental chez la rate.**

### 3.1.3 Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol a, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male Long Evans Hooded rat.

Howdeshell K.L., Furr J., Lambright C.R., Wilson V.S., Ryan B.C., Gray Jr L.E. *Toxicological Sciences* (2008) 102: 371–382.

#### Cotation 2c

##### Objectif de l'étude :

Etablir si l'exposition périnatale (*in utero* et pendant l'allaitement) à de faibles doses d'éthinyl œstradiol (EE<sub>2</sub>) et de BPA perturbe des fonctions reproductives chez le rat mâle Long Evans (LE).

##### Méthode :

Gavage de rats Long Evans par 0,2 ; 20 et 200 µg/kg/jour de BPA ou 0,05 et 50 µg/kg/jour d'EE<sub>2</sub> (éthinyl œstradiol) de GD7 au PND18 (du 7<sup>ème</sup> jour de gestation au 18<sup>ème</sup> jour après la naissance).

Paramètres mesurés : distance ano-génitale au PND2 (2<sup>ème</sup> jour après la naissance) et persistance des mamelons au PND14 (14<sup>ème</sup> jour après la naissance).

Euthanasie au PND150 (150<sup>ème</sup> jour après la naissance) ou au PND229 et mesures hormonales (œstradiol, testostérone, corticostérone, T4, LH et PRL) avec analyse du sperme et histopathologie des organes sexuels.

##### Résultats :

Aucun effet significatif du BPA n'est observé sur les paramètres étudiés, contrairement aux animaux témoins traités avec l'éthinyl œstradiol.

##### Commentaires du GT BPA :

- Le GT BPA retient les conclusions de cette étude qui ne met pas en évidence d'effets du BPA aux faibles doses testées. Les effets observés avec le témoin positif (EE<sub>2</sub>) montrent la fiabilité du modèle et du protocole employés et la sensibilité de la souche de rat Long Evans (les résultats sont similaires à ceux obtenus dans des études réalisées chez les rats Sprague Dawley et Wistar).

- Le GT BPA regrette l'absence de dosages plasmatiques qui auraient permis de préciser l'exposition périnatale des rats.

- Un contrôle régulier de la présence de pesticides et de métaux lourds dans l'eau de boisson est assuré mais il n'est pas mentionné de contrôle de la teneur en BPA.

- Les animaux sont hébergés dans des cages en polycarbonate.

- Le régime alimentaire des animaux contient une teneur élevée en phyto-œstrogènes (de l'ordre de 400 mg/kg d'isoflavone selon les données du fournisseur).

- Les conditions de luminosité ont une périodicité non conventionnelle (14h de lumière et 10h de nuit) qui peuvent influencer les analyses comportementales.

- Note : l'occurrence d'effets chez les femelles n'a pas été recherchée dans cette étude. Ils ont été publiés par Ryan et al. (2010).

- Le GT BPA regrette l'absence de mesure des concentrations plasmatiques.

**En conclusion, le GT BPA retient l'absence de toxicité du BPA sur les caractères sexuels primaires (distance anogénitale, morphologie des organes génitaux externes) et les fonctions reproductives chez le rat mâle.**

## 3.2 Etudes considérées comme des signaux d'alerte

### 3.2.1 Alterations in male infant behaviors towards its mother by prenatal exposure to bisphenol A in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) during early suckling period.

Nakagami A., Negishi T., Kawasaki K., Imai N., Nishida Y., Ihara T., Kuroda Y., Yoshikawa Y., Koyama T., *Psychoneuroendocrinology* (2009) 34: 1189-1197.

#### Cotation 2e

##### Objectif de l'étude :

Evaluer l'effet de l'exposition périnatale (*in utero* et durant l'allaitement) au BPA sur le développement neurocomportemental chez le primate non humain en vue de consolider l'extrapolation à l'homme des observations sur rongeurs montrant une altération du dimorphisme comportemental sexuel après exposition périnatale au BPA.

##### Méthode :

- Administration sous-cutanée de 10 µg de BPA/kg p.c./j délivrés par une pompe osmotique (changée tous les 28 jours) à 18 femelles (+19 témoins recevant le véhicule) du 20<sup>ème</sup> jour de gestation (GD20) au 160<sup>ème</sup> jour après la naissance (PND160), de façon à obtenir un taux sanguin équivalent à celui d'une ingestion de 5 mg/kg/j chez le rat.
- Comparaison des interactions comportementales mère/enfant (4-5 mâles, 6-10 femelles) aux PND 31-60 et 61-90 par enregistrement vidéo bihebdomadaire de variables comportementales maternelles (14) et infantiles (14) pendant une dizaine de minutes.
- Exploitation des données par analyse uni et multi-variée (analyse permettant de déterminer des scores discriminants).

##### Résultats :

- Analyse univariée : effet significatif du BPA sur 3 comportements infantiles et 1 comportement maternel :
  - o chez les petits mâles : les comportements « d'enlacement » et « d'exploration sociale » sont diminués à l'âge de 2 mois et le comportement « de regards externes » sont augmentés à 2 et 3 mois.
  - o Chez les mères de mâles, le comportement de « regards externes » est augmenté aux âges de 2 et 3 mois.
- Analyse multivariée (ACP) : après administration de BPA, les scores discriminants des petits mâles s'apparentent plus à ceux des petits témoins femelles qu'à ceux des petits mâles du groupe témoin. Par contre, aucun effet n'est relevé chez les femelles. Concernant le comportement maternel, les mères de petits mâles exposées au BPA présentent des scores discriminants plus proches de ceux des mères témoins de petits femelles que de ceux des mères témoins de petits mâles.

##### Conclusion de l'étude :

Les auteurs concluent que le comportement « regard externe » est le comportement le plus affecté par le BPA chez les petits mâles et les mères des petits mâles. Le BPA semble avoir un effet sur la différenciation sexuelle de l'interaction comportementale mères/enfant, dans le sens d'une féminisation des petits mâles.

Le modèle singe *cynomolgus* permettrait une meilleure mise en évidence des effets des perturbateurs endocriniens, en particulier du BPA (par rapport au modèle rongeur sur rat ou souris).

##### Commentaires du GT BPA :

- *Exposition au BPA : le taux plasmatique en BPA mesuré chez les mères uniquement au 50<sup>ème</sup> jour de gestation, est inférieur à la limite de détection (12,5 ng/ml) ; aucune mesure n'est disponible chez les petits. La différence de métabolisme selon la voie d'administration n'est pas prise en compte. Aucune relation dose/effet ne peut être établie (1 seule dose).*

- *Interprétation : seules 1 à 3 variables sur 14 sont modifiées dans des enregistrements de courte durée (10 minutes) du comportement des singes. Leur signification reste à établir d'autant que, comme le soulignent les auteurs, aucune explication en termes de retentissement psychologique ne peut être donnée aux résultats.*

*La voie d'administration (non orale), l'absence de témoin positif, l'absence de données sur l'exposition réelle des petits, sur la teneur en phyto-œstrogènes dans l'alimentation et de BPA dans l'eau, le fait qu'une seule dose ait été testée et la signification des effets observés rendent l'interprétation de cette étude délicate.*

**En conclusion, le GT BPA interprète cependant les résultats de cette étude comme un signal d'alerte.**

### 3.2.2 Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice.

Palanza P., Gioiosa L., vom Saal F.S., Parmigiani S., *Environmental Research* (2008) 108: 150–157.

#### Cotation 2g

Cet article est une méta-analyse des travaux menés par cette équipe chez la souris CD-1, sur les effets neurologiques et comportementaux du BPA, avec une seule dose de 10 µg/kg/j administrée par voie orale.

- **Comportement maternel**

Le comportement de la génération F1 (15 femelles par groupe) a été examiné après administration de BPA selon 3 scénarios :

- 1) pendant la gestation uniquement (du 14<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de gestation)
- 2) pendant la gestation et poursuivie après la naissance jusqu'à l'âge adulte
- 3) uniquement après la naissance jusqu'à l'âge adulte.

#### Résultat :

Des modifications du comportement maternel des souris de la génération F1 apparaissent uniquement lorsque celles-ci ont été exposées soit *in utero* soit à l'âge adulte (scénarios 1 et 3), mais pas après les deux périodes d'exposition combinées (scénario 2). Ces modifications correspondent à une diminution du temps que les mères accordent à leurs petits et une augmentation du temps où elles restent seules dans la cage (temps de repos isolé). Néanmoins, cela n'entraîne aucun effet sur le poids des petits à la naissance, suggérant que le niveau de soin de ces mères est adéquat.

#### Commentaire du GT BPA :

*La signification pour la santé humaine des effets observés n'est pas établie (temps que les souris accordent à leurs petits). Les auteurs n'expliquent pas pourquoi la séquence BPA - BPA n'entraîne aucune modification (à part l'augmentation du temps de repos isolé pour la mère).*

- **Comportement exploratoire et émotionnel**

Le comportement des jeunes de mères traitées a été évalué dans les situations et aux âges suivants :

- test de réaction à un environnement nouveau avant la puberté (entre le 28<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour après la naissance, PND 28-30) ; mères traitées de GD11 au PND 7 (du 11<sup>ème</sup> jour de gestation au 7<sup>ème</sup> jour après la naissance)
- test d'exploration en open-field à l'âge adulte ; mères traitées de GD 11 à GD 18 (du 11<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de gestation)
- test du labyrinthe à l'âge adulte ; mères traitées de GD11 au PND 7.

Le Méthoxychlore (pesticide aux effets œstrogéniques reconnus) a été utilisé comme témoin positif (dose de 20 µg/kg/j).

#### Résultats :

L'exposition à une dose de 10 µg/kg/j de GD11 au PND7 modifie les comportements exploratoires et l'anxiété à l'âge adulte (open-field, labyrinthe), ainsi que la curiosité (avant la puberté), qui sont sexuellement différenciés chez les témoins (Gioiosa *et al.*, 2007<sup>3</sup>).

#### Commentaires du GT BPA :

*Cette étude suggère des effets persistants après une exposition périnatale au BPA sur des comportements sexués du cerveau. Toutefois, la signification pour la santé humaine des effets observés n'est pas établie (curiosité, anxiété). Il est regrettable qu'une seule dose ait été utilisée. Pour que ces résultats puissent être pris en compte dans le cadre d'une évaluation des risques sanitaires ils devraient être confirmés par une nouvelle étude menée avec plusieurs doses.*

- **Fonction cérébrale dopaminergique**

#### Méthode :

Cette partie de la publication résume des études de l'effet de l'exposition prénatale du BPA sur le développement de la fonction dopaminergique du cerveau. Des souris (3 par sexe) ont reçu du BPA par voie orale du GD11 au GD18 et ont subi le test de CPP (Conditioned Place Preference) induit par injection d'amphétamine au PND60 (âge adulte).

#### Résultats :

Les femelles traitées (exposition fœtale) ne présentent pas le conditionnement induit par les amphétamines observé chez les femelles témoins.

<sup>3</sup> Gioiosa L., Fissore E., Ghirardelli G., Parmigiani S., Palanza P. (2007). Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm. Behav.* 52: 307-16

Commentaires du GT BPA :

Ces résultats sont discutés par rapport à des résultats antérieurs, suggérant un effet œstrogénique sur le développement cérébral (par exemple, différence liée au sexe du volume et du nombre de cellules au niveau du locus coeruleus cérébral) et notamment sur la mise en place du système monoaminergique.

- **Commentaires du GT BPA sur cette méta-analyse**

La pertinence de cette méta-analyse porte sur l'étude globale d'une faible dose de BPA en fonction de la fenêtre d'exposition, dans des conditions expérimentales très proches puisque réalisées par une même équipe.

Les effets comportementaux apparaissent très sensibles, mais une seule dose et une seule espèce ont été étudiées. L'absence de témoin positif, l'absence de données sur l'exposition réelle des petits, sur la teneur en phyto-œstrogènes dans l'alimentation et de perturbateurs endocriniens dans la litière (râfles de maïs), le fait qu'une seule dose ait été testée, la signification des effets observés rendent l'interprétation de ces études délicate.

**En conclusion, le GT BPA** interprète cependant les résultats de cette méta-analyse comme un signal d'alerte.

### 3.2.3 Travaux de Salian et al. sur l'appareil reproducteur mâle après une exposition périnatale au BPA

#### a) Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male offspring perinatally exposed to bisphenol A.

Salian S., Doshi T., Vanage G. *Life Sciences* (2009) 85: 11-18.

#### Cotation 3

##### Objectif de l'étude :

Déterminer si l'atteinte de la spermatogenèse liée à une exposition périnatale au BPA relève d'une altération de l'expression des récepteurs stéroïdiens et de leurs cofacteurs dans le testicule.

##### Méthode :

- Administration par gavage de 1,2 ou 2,4 µg/kg p.c./j de BPA dans de l'huile de sésame à des lots de 8 rates (souche Holtzman) depuis le 12<sup>ème</sup> jour de gestation (GD12) jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour après la naissance (PND21).
- Réduction des portées à 5 mâles élevés jusqu'au sevrage, puis sélection de 24 mâles/lot au PND75 pour constitution d'une génération F2 (idem pour F3).
- Analyses immuno-histochimiques des corégulateurs des récepteurs (SRC-1, GRIP-1, p/CIP et NCoR) sur coupes de testicules (3 par individu soit 72 / lot / génération)

##### Résultats :

- Effets observés aux 2 doses dans les 3 générations (F1, F2 et F3), alors que seules les femelles F0 ont été exposées pendant la gestation et la lactation :
  - o diminution du marquage SRC-1 dans les tubules au stade III.
  - o augmentation du marquage GRIP-1 dans les tubules au stade IX ainsi que dans les spermatides allongées.
  - o augmentation du marquage p/CIP aux stades précoces (uniquement à faible dose pour F2 et F3).
  - o chute du marquage NCoR des cellules de Leydig (noyau et cytoplasme).

##### Conclusion de l'étude :

Les perturbations de l'expression des corégulateurs des récepteurs stéroïdines induites par le BPA pourraient potentiellement affecter la lignée germinale sur plusieurs générations et avoir d'importantes implications sur la fertilité.

##### Commentaires du GT BPA :

- A l'évidence, le rôle des cofacteurs des récepteurs stéroïdiens n'est pas encore bien établi, comme l'atteste par exemple certains modèles de souris KO pour GRIP-1 et NCoR. Les auteurs se livrent donc à une interprétation prudente sur les variations observées et formulent des hypothèses sur les mécanismes d'un effet trans-générationnel.

- Le GT BPA note le choix des doses fondé sur des résultats non publiés, l'absence de justification du choix de la souche, l'absence de données sur la baisse annoncée de fertilité des 3 générations (pas de corrélation possible avec les résultats immuno-chimiques), l'absence de dosage hormonaux,

*l'absence de spermogramme et d'analyse de sperme. Cette étude suggère un effet trans-générationnel qui doit être vérifié.*

*L'absence de témoin positif, l'absence de données sur l'exposition réelle des petits, sur la teneur en perturbateurs endocriniens dans la litière (cosses de riz), le fait que l'alimentation des rats soit préparée par le laboratoire (régime non standardisé), l'absence de relation dose-réponse et la signification des effets observés rendent l'interprétation de cette étude délicate.*

**En conclusion, le GT BPA** interprète cependant les résultats de cette étude comme un signal d'alerte.

### **b) Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring.**

Salian S., Doshi T., Vanage G. Life Sciences (2009) 85: 742-752.

#### **Cotation 3**

##### Objectif de l'étude :

Etablir les effets de l'exposition périnatale au BPA chez le rat mâle sur les paramètres de fertilité et sur l'expression des récepteurs SR à l'âge adulte (étude sur 3 générations).

##### Méthode :

Des rates femelles Holtzman F0 ont reçu par gavage du BPA (1,2 et 2,4 µg/kg p.c. /j) ou du diéthylstilbestrol (DES, 10 µg/kg p.c./j) du 12<sup>ème</sup> jour de gestation (GD12) au 21<sup>ème</sup> jour après la naissance P(ND21) de 8 mères F0/dose.

Les portées ont été réduites à 4-5 mâles à la naissance, puis les petits élevés, avant sélection de 24 mâles/groupe au PND75

La fertilité a été évaluée sur F1, F2 et F3 (n=24 mâles/groupe). Seule la génération F1 a été exposée jusqu'au sevrage. Les récepteurs aux stéroïdes (SR) ont été localisés au niveau des testicules (par immunohistochimie) des générations F1, F2 et F3 au PND125.

Les poids corporels, les poids des organes reproducteurs, le nombre et la mobilité des spermatozoïdes, et les concentrations hormonales (F1) ont également été mesurés au PND125.

##### Résultats :

- Le DES, témoin positif, entraîne un effet trans-générationnel sur la fertilité : il augmente le délai nécessaire à l'accouplement et diminue fortement le nombre de femelles accouplées (seulement 25-30% des femelles se sont accouplées). Le BPA n'affecte pas l'indice d'accouplement (plus de 80% de femelles accouplées ne sont pas significativement différentes des témoins), mais il augmente le délai nécessaire à l'accouplement. Ceci est observé sur plusieurs générations.

- Pour le DES, les pertes pré- et post-implantatoires sont très augmentées dans toutes les générations. Pour le BPA, les pertes pré-implantatoires sont significativement augmentées seulement à 2,4 µg/kg p.c. pour la génération F3 et les pertes post-implantatoires sont significatives augmentées seulement pour la génération F3 aux deux doses.

- La taille des portées des femelles accouplées avec des mâles F1, F2 ou F3 a été diminuée après exposition au BPA ou au DES, de façon plus marquée pour le DES.

Chez les petits (au 125<sup>ème</sup> jour après la naissance), une augmentation trans-générationnelle du poids corporel est rapportée pour les groupes exposés au BPA (sauf en F1 à 2,4 µg/kg p.c.). Aucun effet n'est mis en évidence sur le poids relatif des organes reproducteurs avec le BPA.

La diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes est comparable à celle du DES alors que des lésions dégénératives testiculaires sont décrites dans le seul groupe DES (quelques lésions ponctuelles ont été décrites avec BPA, non reliées au traitement)

Des dosages hormonaux (LH, FSH, E<sub>2</sub> et testostérone) conduits seulement sur les mâles F1 montrent une diminution significative des concentrations de toutes les hormones testées (sauf LH à la forte dose). Cette diminution n'est pas proportionnelle à la dose de BPA.

L'analyse immunochimique montre une diminution de l'expression des récepteurs aux androgènes dans les cellules de Sertoli dans toutes les générations à faible dose (1,2 µg/kg p.c./j), mais uniquement dans la génération F3 à forte dose (2,4 µg/kg p.c./j) ainsi qu'une diminution de l'expression des récepteurs aux œstrogènes ERβ (aux deux doses) dans toutes les générations et une augmentation de ERα en F1 (aux deux doses).

##### Conclusion de l'étude :

Cette étude montre un effet trans-générationnel sur la fertilité mâle et l'expression des récepteurs stéroïdiens testiculaires après une exposition périnatale au BPA à faibles doses. Cet effet serait médié par l'atteinte de la lignée germinale.

Commentaires du GT BPA :

Les résultats ne permettent pas d'établir de relation dose-réponse. Il aurait été souhaitable de comparer les modifications hormonales avec celles induites par le DES en F1 et de disposer des résultats pour les générations F2 et F3 (corrélation spermogramme/modifications hormonales). De plus, les résultats immunohistochimiques sont à interpréter avec précaution, en particulier pour ER $\alpha$  (sensibilité et reproductibilité de la mesure) ; les résultats avec le DES seraient nécessaires.

L'absence de données sur l'exposition réelle des petits, sur la teneur en perturbateurs endocriniens dans la litière (cosses de riz), le fait que l'alimentation des rats soit préparée par le laboratoire (non standardisé) et l'absence de relation dose-réponse rendent l'interprétation de cette étude délicate.

**En conclusion, le GT BPA** interprète cependant les résultats de cette étude comme un signal d'alerte.

### c) Neonatal exposure of male rats to bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis.

Salian S., Doshi T., Vanage G. *Toxicology* (2009) 265: 56-67.

#### Cotation 3

##### Objectif de l'étude :

Etudier l'effet de l'exposition au BPA dans les premiers jours de la vie sur la fertilité et l'expression de protéines de jonction des cellules de Sertoli (SCJP) chez le rat mâle.

##### Méthode :

Des rats mâles (Holtzman, n=24) ont été exposés au BPA par voie sous-cutanée à des doses de 0,6 à 10  $\mu\text{g}/\text{rat}$  (100, 200, 400, 800 et 1600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c.) durant les 5 premiers jours après la naissance (PND1 à 5). Le diéthylstilbestrol (DES) a été utilisé comme témoin positif (1600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c.).

La fertilité mâle a été évaluée à l'âge adulte. Au PND75, les mâles sont accouplés avec des femelles ; un lot de femelles est sacrifié au 20<sup>ème</sup> jour de gestation et un autre à la mise bas. Au PND125, une analyse immunohistochimique des protéines de jonction des cellules de Sertoli (SCJP) a été menée sur des coupes de testicule des rats exposés à la dose de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c. (déterminée comme la dose la plus faible pour altérer la fertilité) et 1600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c. En parallèle, pour la dose de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c., la localisation des SCJP a été déterminée aux PND 15, 30, 45 et 90.

##### Résultats :

Une augmentation significative des pertes post-implantatoires, une réduction de la taille des portées, des modifications du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes ainsi que des modifications des dosages hormonaux ont été observées après traitement des mâles en période néonatale. Ces effets interviennent à partir de la dose de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c. qui a été identifiée comme la dose minimale avec effet adverse (LOAEL). Des modifications d'expression des protéines de jonction des cellules de Sertoli ont été observées (baisse de Cx-43, augmentation de N-Cadhérine et Zo-1) à cette dose et à 1600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c.

##### Conclusion de l'étude :

L'exposition au BPA dans les premiers jours de la vie du rat mâle altère la fertilité. Les modifications de l'expression des protéines de jonction des cellules de Sertoli pouvant contribuer à cet effet, les auteurs proposent que ces protéines soient considérées comme des biomarqueurs d'effet testiculaire du BPA et d'autres œstrogénomimétiques.

##### Commentaires du GT BPA :

La voie d'administration est sous-cutanée rendant délicate l'interprétation de cette étude. Les résultats ne permettent pas de mettre en évidence une relation dose-réponse sur tous les paramètres mesurés (résorptions, taille des portées, concentrations hormonales). Les lésions testiculaires n'ont pas été étudiées pour la dose de 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c. Concernant les modifications d'expression des protéines de jonction, il aurait été intéressant d'analyser un groupe traité par le DES ou un autre œstrogène de référence. Les auteurs ont contrôlé les biais possibles en utilisant des cages en polypropylène et une alimentation sans soja.

La voie d'administration, l'absence de données sur la teneur en perturbateurs endocriniens dans la litière (cosses de riz), le fait que l'alimentation des rats soit préparée par le laboratoire (régime non standardisé) et l'absence de relation dose-réponse rendent l'interprétation délicate.

**En conclusion, le GT BPA** interprète cependant les résultats de cette étude comme un signal d'alerte.

**d) Commentaires du GT BPA sur les 3 études de Salian et al. (2009)**

Les auteurs considèrent avoir mis en évidence des effets trans-générationnels sur la fertilité et l'expression des récepteurs stéroïdiens testiculaires après exposition périnatale des mâles. Quelques incohérences sont rassemblées ci-après, qui ne permettent pas d'utiliser directement les résultats de ces études pour évaluer les risques pour la santé humaine.

- Les auteurs mettent en évidence une altération du temps nécessaire pour l'accouplement en F1, F2, F3 pour tous les groupes traités tandis que l'index d'accouplement n'est pas affecté pour BPA (nombre de femelles accouplées).
- Les auteurs rapportent une augmentation des pertes post-implantatoires en F3 pour tous les groupes traités, alors que la taille des portées des groupes BPA est diminuée pour toutes les générations.
- Concernant les poids corporels des petits, des augmentations pour F1, F2 et F3 sont rapportées, sauf pour le BPA en F1, à 2,4 µg/kg p.c./j.
- La numération de spermatozoïdes et leur mobilité semblent réduites de façon comparable entre BPA et DES pour toutes les générations, alors que des lésions histologiques du testicule concernent seulement les groupes DES.

L'analyse immunohistochimique présente aussi certains résultats incohérents : diminution trans-générationnelle de l'expression de récepteurs aux androgènes à 1,2 µg/kg p.c./j pour les trois générations et seulement en F3 à 2,4 µg/kg/j. Concernant l'augmentation de l'expression de ERα en F1 et la diminution trans-générationnelle de ERβ, il faudrait s'assurer de la sensibilité et de la reproductibilité de la mesure et fournir les résultats avec le DES.

**En conclusion, le GT BPA** interprète cependant les résultats de ces 3 études de Salian et al. (2009) comme un signal d'alerte, sans signification démontrée pour la santé humaine.

**3.2.4 Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats.**

Braniste V., Jouault A., Gaultier E., Polizzi A., Buisson-Brenac C., Leveque M., Martin P.G., Theodorou V., Fioramonti J., Houdeau E. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2010) 107: 448-453.

**Cotation 2e**Objectif de l'étude :

Rechercher des effets du BPA sur la perméabilité intestinale chez des femelles ovariectomisées et chez de jeunes rats après exposition périnatale.

Méthode :

Les expérimentations ont été menées :

- 1) sur des lots de 5-15 rates Wistar ovariectomisées nourries avec un aliment standard et recevant par gavage du BPA dans l'huile de maïs pendant 15 jours (0, 0,05 et 5 mg/kg ; témoin positif = 0,6 mg/kg de benzoate d'œstradiol dans l'huile de maïs). Au cours des 5 derniers jours de l'administration, une injection sous-cutanée quotidienne de 2 mg/kg d'un antagoniste ER (ICI 182.780) a été effectuée dans 3 lots recevant du BPA à 5 mg/kg et dans le lot témoin positif traité par le benzoate d'œstradiol.
- 2) sur des lots de 8-13 rates recevant quotidiennement par gavage 5 mg/kg de BPA dans l'huile de maïs pendant la gestation et l'allaitement (GD15 au PND21). Au sevrage, les petits ont été nourris avec l'aliment standard.

Des mesures de la perméabilité intestinale (chambres de Ussing) et de l'inflammation digestive (myéloperoxydase) provoquée par l'administration intracolique de TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique) ont été effectuées. La sensibilité à la douleur viscérale a également été mesurée par électromyographie chez les rates ovariectomisées soumises à une distension colorectale, laquelle induit des contractions abdominales dont l'intensité permet d'évaluer la réponse viscéro-motrice.

Résultats :

Le BPA diminue de manière dose-dépendante (2 doses testées) la perméabilité intestinale chez les femelles ovariectomisées. Cet effet, analogue à celui produit par les œstrogènes, est tributaire d'un resserrement des jonctions serrées de l'épithélium intestinal. Le BPA à la dose de 5 mg/kg réduit également la sévérité de l'inflammation digestive et augmente la sensibilité à la douleur viscérale. Chez les rats dont la mère a été traitée avec 5 mg/kg de BPA, on observe, uniquement chez les femelles, une diminution de la perméabilité intestinale et une augmentation de la réponse inflammatoire.



Commentaires du GT BPA :

Les résultats montrent des effets au niveau intestinal sur la descendance, mais ils ne reposent, pour l'essentiel, que sur une seule dose (5 mg/kg p.c./j). Le protocole expérimental vise à explorer des mécanismes d'action et non à mettre en évidence une relation dose/effet. L'article discute les effets liés à une modification de la perméabilité intestinale au cours des premiers jours de la vie. L'effet sur les adultes est observé chez des animaux ovariectomisés.

L'absence de données sur l'exposition réelle des petits, sur la teneur en phyto-œstrogènes dans l'alimentation et en perturbateurs endocriniens dans la litière, en BPA dans l'eau, l'absence d'information sur la nature des cages, le fait qu'une seule dose ait été testée au cours de l'exposition périnatale et la signification des effets observés rendent l'interprétation de cette étude délicate.

**En conclusion, le GT BPA** interprète cependant les résultats de cette étude comme un signal d'alerte.

### 3.2.5 Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life.

Newbold R.R., Jefferson W.N., Padilla-Banks E., *Environmental Health Perspectives* (2009) 117: 879-885.

#### Cotation 2e

##### Objectifs :

Etudier si une exposition prénatale des souris au BPA peut entraîner des effets à long terme sur les tissus de l'appareil reproducteur femelle.

##### Méthodes :

Des souris femelles CD-1 ont été traitées du 9<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jour de gestation (GD9-16) aux doses de 0,1, 1, 10, 100 et 1000 µg BPA/kg p.c./j (5 mères/dose) par injection sous-cutanée. Une analyse histologique a été menée sur les organes génitaux des femelles F1, prélevés une fois que celles-ci ont atteint l'âge adulte (16-18 mois).

##### Résultats :

Une fréquence élevée de kystes ovariens a été observée dans tous les lots traités mais de manière statistiquement significative uniquement pour la dose de 1 µg BPA/kg p.c./j.

De manière similaire à ce qui a été rapporté pour le diéthylstilbestrol (DES) dans d'autres études, une augmentation progressive des lésions proliférantes de l'oviducte en fonction de la dose de BPA a été mise en évidence.

Chez quelques animaux traités, ont été relévéés des hyperplasies atypiques de l'utérus, des polypes endométriaux, des sarcomes du cervix et des adénocarcinomes mammaires. Les femelles du groupe 0,1 µg BPA/kg p.c./j ont montré le taux le plus élevé de tumeurs au niveau de l'appareil reproducteur (36% des souris traitées).

##### Conclusion de l'étude :

Les auteurs suggèrent que le BPA administré à des périodes critiques de la différenciation peut provoquer à long terme des tumeurs bénignes ou malignes de l'appareil reproducteur femelle.

##### Commentaires du GT BPA :

Cette étude repose sur une exposition au BPA pendant une fenêtre critique de la gestation et met en évidence des effets plus marqués aux faibles doses (0,1 et 1 µg/kg p.c./j). Certaines conditions expérimentales ont été contrôlées (régime, cage) mais pas la litière (copeaux de bois) ni les biberons d'eau qui sont en polycarbonate. De plus, l'administration par voie sous-cutanée du BPA et l'absence de témoin positif rendent l'interprétation de cette étude délicate.

**En conclusion, le GT BPA** interprète cependant les résultats de cette étude comme un signal d'alerte.

### 3.2.6 Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure.

Murray T.J., Maffini M.V., Ucci A.A., Sonnenschein C., Soto A.M. *Reproductive Toxicology* (2007) 23: 383-390.

#### Cotation 2e

##### Objectif de l'étude :

Déterminer si l'exposition *in utero* à de très faibles doses de BPA peut conduire à des effets délétères sur le développement de la glande mammaire ou favoriser l'apparition de pathologies mammaires qui ne se manifesteraient qu'à l'âge adulte.

##### Méthode :

Des rates Wistar ont reçu une administration sous-cutanée continue (pompe osmotique) de 2,5, 25, 250 et 1000 µg/kg p.c./j de BPA à partir du 9<sup>ème</sup> jour de gestation et jusqu'à la parturition. Des sacrifices sont réalisés au 50<sup>ème</sup> jour (PND50, puberté) et au 95<sup>ème</sup> jour (PND95, adulte) après la naissance pour une analyse histologique des glandes mammaires. Des contrôles ont été effectués sur l'œstrogénicité du régime et de l'eau de boisson ainsi que des cages et des litières (test E-Screen).

##### Résultats :

- Les paramètres de reproduction mesurés (taille des portées, poids des animaux du 1<sup>er</sup> au 110<sup>ème</sup> jour après la naissance, sexe ratio, âge de l'ouverture vaginale, distance anogénitale) n'indiquent aucune différence entre les rats traités et les témoins à l'exception de la distance anogénitale (PND4) chez les mâles exposés à la dose de 250 µg/kg p.c./j.
- Une hyperplasie des glandes ductiles de la mammelle est observée dès la plus faible dose aux PND50 et PND95. Cette hyperplasie fait également apparaître une expression accrue du récepteur ER alpha et de l'antigène Ki67 qui est un marqueur de prolifération. Des carcinomes *in situ* sont observés chez 33% des animaux au PND95 pour les 2 plus fortes doses.

##### Commentaires du GT BPA :

*Ces résultats confirment et précisent une étude précédente de la même équipe menée sur la souris<sup>4</sup>. Plusieurs doses ont été testées, le protocole est rigoureux, le potentiel œstrogénique du régime, des cages et de la litière a été évalué, l'eau de boisson est contenue dans des biberons en verre. Toutefois, l'étude ne fait pas apparaître de relation dose-réponse claire. De plus, l'administration par voie sous-cutanée du BPA et l'absence de témoin positif rendent l'interprétation de cette étude délicate.*

**En conclusion, le GT BPA interprète cependant les résultats de cette étude comme un signal d'alerte.**

---

<sup>4</sup> Munoz-de-Toro M., Markey C.M., Wadia P.R., Luque E.H., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146: 4138-4147.

### 3.3 Etudes dont les résultats n'ont pas été jugés préoccupants par le GT BPA et dont les conclusions n'ont pas été retenues comme signal d'alerte

#### 3.3.1 Effects of neonatal exposure to bisphenol a on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus.

Bosquiazzo V.L., Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. *Biology of Reproduction* (2009) 82: 86-95.

##### Cotation 3a

###### Objectif de l'étude :

Déterminer si une exposition au BPA durant les premiers jours de la vie affecte la réponse utérine aux stimuli stéroïdiens.

###### Méthode :

- Injection sous-cutanée de 0,05 ou 20 mg/kg p.c./jour de BPA ou de 0,2 µg/kg p.c./j de DES (diethylstilbestrol, témoin positif) à des rates après la naissance (PND 1, 3, 5 et 7). A l'âge de 80 jours (PND80), les animaux sont ovariectomisés (OVX) puis soumis à un traitement hormonal substitutif (Progestérone + E2).
- Paramètres mesurés : expression de VEGF (Vascular endothelial growth factor) extrait des cornes utérines (PCR), immunohistochimie de l'expression des récepteurs œstrogènes ER $\alpha$  et du co-répresseur NCOR1, et quantification de la prolifération endothéliale par analyse d'image.

###### Résultats :

- o Augmentation de l'expression de VEGF des cellules endothéliales utérines chez les rates OVX + E2 (vérification du modèle).
- o Corrélation entre l'expression de VEGF et la prolifération endothéliale.
- o Diminution de l'expression des récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  à la faible dose de BPA (0,05 mg/kg/jour).
- o Augmentation de l'expression du co-répresseur NCOR1 aux 2 doses de BPA, associée à la modification de VEGF à la plus faible dose (0,05 mg/kg/jour)

###### Conclusions de l'étude :

Chez des jeunes rates exposées juste après la naissance à de faibles doses de BPA ou de DES puis ovariectomisées à l'âge adulte, la prolifération de l'endothélium utérin et l'expression de VEGF sont diminuées après stimulation par les stéroïdes ovariens (P+E2). Le VEGF étant essentiel pour l'implantation, les auteurs suggèrent un effet néfaste des faibles doses de BPA ou DES sur la fertilité.

###### Commentaires du GT BPA :

*Les données sont insuffisantes pour réaliser une analyse critique, en particulier le manque de détails sur le protocole expérimental. De plus, l'administration du BPA par voie sous-cutanée ne permet pas d'extrapoler ces résultats à la voie orale.*

**En conclusion, le GT BPA ne retient pas les conclusions des auteurs, en raison des limitations méthodologiques.**

#### 3.3.2 Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior

Braun J.M., Yolton K., Dietrich K.N., Hornung R., Ye X., Calafat A.M., Lanphear B.P. *Environmental Health Perspectives* (2009) 117 (12): 1945-1952.

##### Cotation 3b

###### Objectif :

Etudier l'association entre l'exposition prénatale au BPA (mesurée par la concentration urinaire à 16 et 26 semaines de grossesse et à l'accouchement) et le comportement de l'enfant à 2 ans (mesuré par le test de comportement BASC-2).

###### Méthode :

L'étude porte sur 249 couples mère-enfant de Cincinnati (Ohio, Etats-Unis) issus d'une cohorte recrutée en 2003 pour l'étude de l'exposition à des contaminants de l'environnement (dont le plomb). Les urines maternelles ont été collectées au cours des semaines 16 et 26 de grossesse et à l'accouchement. Les urines de la semaine 16 ont en fait été collectées entre la semaine 11,2 et la semaine 21,4. Les concentrations urinaires en BPA ont été analysées par HPLC/MS (BPA total libre+conjugué).

Le comportement des enfants a été évalué à l'âge de 2 ans à l'aide du test BASC-2 préscolaire, qui utilise des questionnaires renseignés par les parents permettant d'affecter des scores composites "externalisant" (hyperactivité et agressivité) et "internalisant" (dépression, anxiété et somatisation) et

de calculer le BSI (*behavior symptom index*) reflétant le niveau général des troubles du comportement. En principe, les tendances des parents à décrire leurs enfants d'une façon excessivement négative sont détectées par le test. Les scores de 40 à 60 sont considérés normaux, ceux de 60 à 69 comme "à risque élevé", et ceux supérieurs ou égaux à 70 comme à risque « cliniquement significatif ».

L'association entre les concentrations en BPA et le comportement a été analysée par régression linéaire et les résultats analysés par quartiles de concentration urinaire en BPA pour chaque temps de grossesse (soit une répartition des résultats urinaires en 4 groupes).

#### Résultats :

- Les concentrations médianes en BPA étaient respectivement de 1,8 ng/ml, 1,7 ng/ml et 1,3 ng/ml à la 16<sup>ème</sup>, 26<sup>ème</sup> semaine de grossesse et à l'accouchement. La concentration moyenne de BPA toutes mesures confondues était de 2 ng/ml d'urine (les concentrations moyennes en BPA à chaque temps de la grossesse ne sont pas indiquées).

- Les scores composites moyens (externalisant, internalisant et BSI) étaient respectivement de 47,6 (écart-type de 7,8, fourchette de scores 30-84), 44,8 (écart-type de 7, fourchette de scores 31-68) et 50,4 (écart-type de 6,8, fourchette de scores 34-74).

- Les auteurs mentionnent une association entre concentrations urinaires en BPA (pondérées par la créatinine) réparties en quartiles à 16 semaines de grossesse et le score externalisant/BSI pour tous les enfants, mais les résultats indiquent que la variation n'est significative que chez les filles (les données par quartile ne sont pas présentées). En fait, il existe une association positive entre concentration en BPA à la 16<sup>ème</sup> semaine de grossesse et les scores externalisants seulement lorsque la mesure a été réellement effectuée avant la 16<sup>ème</sup> semaine de grossesse (au minimum à la semaine 11,2), sans toutefois que ne soit indiqué le degré de signification. Aucune autre variation entre la concentration urinaire en BPA et le score n'est significative, que ce soit pour l'ensemble des enfants ou par sexe, et quelle que soit la durée de la grossesse au moment du recueil des urines.

- Les concentrations moyennes en BPA pondérées par la créatinine ne sont pas significativement différentes avant et après la 16<sup>ème</sup> semaine.

- Des analyses complémentaires portant sur les concentrations maternelles en plomb et en cotinine sériques et sur le QI maternel ne sont pas présentées. D'après les auteurs, ces variables ne modifient pas les conclusions de l'étude. Il en est de même pour l'inclusion des mères pour lesquelles on ne dispose pas de l'ensemble des prélèvements urinaires.

#### Conclusions des auteurs :

L'exposition prénatale au BPA pourrait être associée à des comportements externalisants chez l'enfant de 2 ans, particulièrement chez les filles.

#### Commentaires du GT BPA :

- *Concernant la concentration en BPA dans les urines des mères :*

- *Les auteurs indiquent que les concentrations en BPA dans les urines sont stables pendant au moins 6 mois, voire jusqu'à 30 mois, mais certains échantillons ont été conservés jusqu'à 4-5 ans avant analyse.*
- *L'exposition est estimée par une quantification du BPA total (somme de BPA sous forme libre et de ses métabolites sous forme conjuguée) mesuré sur un prélèvement unique à 3 temps de la grossesse, ce qui est peu pertinent dans la mesure où les éléments de toxicocinétique du BPA ne sont pas pris en compte (demi-vie du BPA de quelques heures, les formes conjuguées de BPA ne sont pas toxiques). Les données pondérées par la concentration en créatinine indiquent qu'il n'y a pas de différence entre les concentrations en BPA à 16 ou 26 semaines de de grossesse ou à l'accouchement (la corrélation est qualifiée de "faible", coefficient de Pearson < 0,11).*

- *Concernant les résultats des tests :*

- *Le test BASC-2 est couramment utilisé pour évaluer les aspects du comportement d'individus dans des populations américaines en milieu préscolaire et scolaire et suivre éventuellement les variations de scores individuels dans le temps. Il est normalisé à cet effet. Il est décliné en 3 classes d'âge (2-5 ans, 6-11 ans et 11-22 ans) dont les deux dernières sont considérées plus pertinentes par Merrel et Harlacher (2008). Le GT BPA note que les auteurs utilisent le test à l'extrême limite inférieure de l'âge de validité (2 ans) mentionné par la société PsyCorp qui le commercialise.*
- *Les scores du BASC-2 sont normalisés pour la population américaine à une moyenne de 50 avec un écart-type de 10. Les résultats décrits sont donc relatifs à une perception américaine de la normalité du comportement.*

- Le score moyen le plus élevé est de 53,9 (écart-type 1,3). L'étude des associations entre concentrations en BPA et effets sur le comportement porte donc sur des variations qui sont "dans la norme" des variations interindividuelles.
- Aucune information n'est fournie concernant les valeurs individuelles de concentration en BPA pour les mères dont les enfants ont obtenu des scores composites hors de la norme.
- Les conclusions en matière de score composite, en fonction du quartile de concentration moyenne en BPA maternel pour chaque prélèvement, ne sont pas étayées par des valeurs statistiques significatives, hormis l'association entre la concentration en BPA maternelle à 16 semaines et le score externalisant ainsi que le BSI des filles. Les valeurs moyennes des scores par quartile pour l'association en question se situent cependant dans l'échelle de normalité du test. Longnecker (2009) considère également que les données présentées sont insuffisantes pour étayer une différence de comportement liée au BPA entre filles et garçons.
- Les concentrations en BPA mesurées "à la 16<sup>ème</sup> semaine" de grossesse sont en réalité échelonnées (elles sont effectuées à l'occasion d'une visite prénatale) entre les semaines 11,2 et les semaines 21,4 soit une plage de plus de 10 semaines. Les auteurs utilisent cette amplitude pour présenter une association sur les mesures réellement antérieures à la 16<sup>ème</sup> semaine. Cependant, l'effectif déjà limité de l'échantillon analysé globalement (249) est ainsi réduit de moitié, fragilisant l'étude, et les données réparties ne sont pas présentées.
- Les limitations de l'étude sont nombreuses et certaines sont avancées par les auteurs eux-mêmes, parmi lesquelles, les incertitudes liées à la quantification correcte du BPA et à l'exposition postnatale au BPA des enfants. Aucune donnée n'est présentée concernant le régime alimentaire des mères de l'étude, ni les expositions possibles des enfants à d'autres substances durant les mois qui ont suivi l'accouchement. Ceci est à rapprocher de la qualité initiale de la cohorte, recrutée pour l'étude des toxiques environnementaux dont le plomb dans le domicile (nécessité pour entrer dans l'étude d'habiter dans un logement antérieur à 1978). La plombémie des mères a été prise en compte (les résultats ne sont pas décrits), mais pas celle des enfants. Les auteurs notent que l'échantillon n'est pas représentatif : les familles vivent dans des logements anciens) et possèdent un niveau d'éducation et de revenu plus élevés que la population générale. Le BASC-2 étant normalisé par rapport à la population générale américaine, les scores sont ajustés pour tenir compte de certains de ces facteurs confondants tels que l'éducation ou le revenu mais pas la qualité du logement.

**En conclusion, le GT BPA ne retient pas les conclusions des auteurs, en raison des limitations méthodologiques.**

### 3.3.3 Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats.

Fernández M., Bianchi M., Lux-Lantos V., Libertun C. *Environmental Health Perspectives* (2009) 117: 757-762.

#### Cotation 2e

##### Objectif de l'étude :

Explorer les effets d'une faible dose et d'une forte dose de BPA durant les premiers jours de la vie sur des paramètres de la reproduction chez la rate.

##### Méthode :

- Injections sous-cutanées quotidiennes d'huile de ricin (témoin) ou de BPA à faible dose (50 µg correspondant à 2,5-6,2 mg/kg p.c.) et forte dose (500 µg correspondant à 25-62 mg/kg) durant les 10 premiers jours de la vie de rats Sprague-Dawley.

- Paramètres mesurés :

- 3 jours après la fin du traitement (13<sup>ème</sup> jour après la naissance) :
  - taux plasmatique de LH et de FSH de base et après stimulation à la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) (mesures *in vivo*) ;
  - pulsativité du GnRH sur des cellules isolées de l'hypothalamus (mesures *ex vivo*) issues de biopsies de rats traités au BPA ;
  - production de LH et de FSH par des cellules hypophysaires en culture en présence de GnRH (mesures *in vitro*) ;
- du 60<sup>ème</sup> à 120<sup>ème</sup> jour après la naissance : poids corporel et ouverture vaginale.
- au 120<sup>ème</sup> jour :
  - mesure du taux plasmatique de LH et de FSH de base et après stimulation à la GnRH (mesures *in vivo*) ;

- production de LH et de FSH par des cellules hypophysaires en culture en présence de GnRH (mesures *in vitro*) ;
- production de phosphate d'inositol par des cultures de cellules hypophysaires issues de biopses de rats traités au BPA après addition au milieu de culture de GnRH, d'antagoniste de GnRH (Cetrorelix) ou du mélange des deux (mesures *in vitro*) ;
- activation de l'ERK<sub>1/2</sub> (Extracellular signal-regulated Kinase) dans les cultures des cellules hypophysaires après stimulation par le GnRH (10<sup>-7</sup> M) (mesures *in vitro*).

#### Résultats :

- Trois jours après la fin du traitement, le taux de LH plasmatique de base et après stimulation par le GnRH est diminué seulement à la forte dose de BPA. La FSH n'est pas modifiée. La pulsatilité de la GnRH est augmentée aux deux doses mais l'intervalle entre les pics est plus grand.

- Le BPA entraîne une ouverture vaginale précoce (effet dose-dépendant sur la base de 2 doses testées). Pour la plus forte dose, les femelles adultes restent en œstrus traduisant un cycle très perturbé.

- A PND120, les taux plasmatiques de LH et de FSH de base (*in vivo*) ne sont pas modifiés par le BPA. Après stimulation par le GnRH, seule la forte dose réduit l'augmentation de LH. Comme au PND13, la pulsatilité de la GnRH est augmentée par les deux doses, mais l'intervalle entre les pics est plus important. *In vitro*, le GnRH a les mêmes effets qu'*in vivo*. Le GnRH stimule moins la production de phosphate d'inositol après traitement par la forte dose de BPA. L'activation de l'ERK<sub>1/2</sub> de cellules pituitaires prélevées sur les animaux traités et testée *in vitro* est réduite par les deux doses de BPA.

#### Conclusions de l'étude :

Le traitement par le BPA durant les premiers jours de la vie altère les paramètres de la reproduction chez le jeune et l'adulte. Il provoque une maturation précoce du complexe hypothalamo-hypophysaire et une accélération de la puberté, altère la pulsatilité du GnRH chez le jeune et l'adulte et la réponse hypophysaire de l'adulte au GnRH.

#### Commentaires du GT BPA :

*Cette étude présente l'intérêt d'étudier la corrélation entre les résultats in vivo et in vitro et de suivre sur le long terme des animaux. Néanmoins, le nombre d'animaux utilisés est faible. Comme suggéré par les auteurs, les hypothèses formulées sont à vérifier.*

*Une autre faiblesse qui limite l'interprétation de cette étude en termes de risque sanitaire est la voie d'administration du BPA (injection sous-cutanée). Les auteurs ont contrôlé les biais possibles liés aux cages (métalliques) et aux biberons (en verre), mais ils ne fournissent aucune information quant à la présence de BPA dans l'eau de boisson et la nourriture, ni sur la présence de phyto-œstrogènes dans la nourriture.*

*Les investigations menées sur cellules hypophysaires prélevées sur des animaux traités puis cultivées pendant 5 jours, indiquent des effets à faibles doses. Néanmoins, les limites du modèle (en particulier le temps de culture) restreignent la portée de ces résultats.*

**En conclusion, le GT BPA retient que la plupart des effets ne sont observés qu'à la forte dose, supérieure à la NOAEL de 5 mg/kg p.c./j.**

### 3.3.4 Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice

Izzotti A., Kanitz S., D'Agostini F., Camoirano A., De Flora S. *Mutation Research* (2009) 679: 28–32.

#### Cotation 3b

##### Objectifs :

Déterminer le seuil de détection des adduits à l'ADN par post marquage au <sup>32</sup>P dans un système acellulaire et évaluer la formation d'adduits à l'ADN dans le foie et les cellules mammaires de souris femelles CD-1 ayant reçu du BPA dans l'eau de boisson (200 mg/kg de poids corporel) pendant huit jours consécutifs.

##### Méthode :

- Administration de BPA dans l'eau de boisson (eau du robinet) correspondant à une exposition de 200 mg BPA/kg p.c. /j à 5 souris adultes pendant 8 jours (ou 5 souris témoins non exposées au BPA) puis prélèvement du foie et de glandes mammaires.

- Extraction de l'ADN soit directement dans le réactif (essai *in vitro*) soit à partir des foies ou des cellules mammaires (prélèvements poolés pour chacun des 2 groupes de 5 souris).

- Les adduits à l'ADN, détectés par une mesure de <sup>32</sup>P, ont été quantifiés par calcul du rapport de l'activité détectée dans les adduits à l'ADN et dans les nucléotides normaux (sans adduits). Les

résultats sont exprimés en nombre d'adduits pour  $10^8$  nucléotides (limite de détection de 0,1 adduit pour  $10^8$  nucléotides).

#### Résultats :

L'administration de BPA à des souris entraîne la formation d'adduits à l'ADN dans le foie (niveaux 3 à 4 fois plus élevés que chez les témoins) et dans les cellules mammaires (4,7 fois plus élevé que chez les témoins). D'après les auteurs, la réaction du BPA avec de l'ADN de thymus de veau, en présence de fractions microsomales hépatiques, entraîne la formation d'adduits à l'ADN selon une relation dose-dépendante. Les auteurs concluent que leurs travaux confortent l'hypothèse d'un rôle potentiel du BPA dans la cancérogénèse mammaire.

#### Commentaires du GT BPA :

*Plusieurs faiblesses méthodologiques apparaissent dans cet article, en particulier la méthode de détection choisie pour caractériser les lésions de l'ADN in vivo. Le niveau de base des adduits à l'ADN dans les tissus d'animaux témoins, obtenu à partir d'un seul pool de cellules, paraît élevé.*

**En conclusion, le GT BPA estime que, sans confirmation, ces résultats ne sont pas préoccupants, le niveau d'adduits étant très faible alors que la dose administrée est élevée (200 mg/kg p.c./j).**

### **3.3.5 Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of Self-Reported Male Sexual Dysfunction**

Li D., Zhou Z., Qing D., He Y., Wu T., Miao M., Wang J., Weng X., Ferber J.R., Herrinton L.J., Zhu Q., Gao E., Checkoway H., Yuan W. *Human Reproduction* (2010) 25(2):519-27.

#### **Cotation 3b**

##### Objectif de l'étude :

Rechercher les effets du BPA sur l'activité sexuelle chez l'homme.

##### Méthode :

- Etude épidémiologique menée en Chine avec une cohorte (2004-2008) de :
  - o 230 hommes exposés professionnellement (1 usine de production de BPA et 3 usines de production de résines),
  - o 404 hommes témoins issus de « plusieurs » usines (matériaux de construction, fournisseurs d'eau, textiles, électronique, commerces, ...) du même secteur géographique que l'usine de production de BPA où les travailleurs « ne sont pas exposés » (284 volontaires et 120 maris de femmes travaillant dans ces usines non exposées).
- Le protocole comporte des mesures de la teneur de BPA dans l'atmosphère sur les lieux de travail, l'historique des expositions, le monitoring individuel, un inventaire des équipements de protection, des mesures d'hygiène ainsi que le relevé des expositions à d'autres produits.
- Les volontaires ont été répartis en sous-groupes en fonction des critères ci-dessus. Les mesures de BPA ont été réalisées pour chacun au poste de travail et à défaut, la valeur moyenne de l'atelier a été retenue. La mesure d'exposition est exprimée en valeur cumulée. Les concentrations urinaires de BPA (spot) ont été mesurées chez les volontaires.
- Des questionnaires individuels intégrant l'*International Index of Erectile Function Inventory* ont été renseignés par les enquêtés eux-mêmes.
- L'analyse a été réalisée par odds ratios avec un intervalle de confiance de 95%.

##### Résultats :

Après ajustement pour les facteurs de confusion (âge, milieu social, consommation tabac et alcool, maladie chronique, durée d'exposition, etc.), les personnes exposées au BPA présentent un risque plus élevé de dysfonctionnement sexuel (3 à 7 fois). Une relation dose-effet est mise en évidence sauf pour le désir sexuel. Ces effets apparaissent dès un an d'exposition.

##### Commentaires du GT BPA :

*Les échantillons de sous-population étudiés sont faibles. Compte tenu du questionnaire, des mesures effectuées (teneurs dans l'air et analyses d'urines), il est difficile de s'assurer que les volontaires n'avaient pas deviné le but de l'essai (effet d'une exposition à un ou plusieurs produits chimiques). Le GT BPA note qu'un questionnaire à remplir soi-même (sans enquêteur) représente un risque accru de biais de réponse.*

*Même si les conclusions s'avéraient exactes, elles ne pourraient pas s'appliquer à des personnes non exposées professionnellement au BPA. Ces résultats*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces résultats nécessitent d'être confirmés dans et en dehors d'une exposition professionnelle pour permettre de dresser des conclusions en termes de santé humaine.**

### 3.3.6 Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat

Monje L., Varayoud J., Munoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. *Reproductive Toxicology* (2009) 28(4): 435-442.

#### Cotation 3a

##### Objectif de l'étude :

Etablir si l'exposition néonatale au BPA altère les fonctions hypothalamiques contrôlant le comportement sexuel des femelles adultes chez le rat Wistar.

##### Méthode :

- Injection sous-cutanée de 0 (huile de maïs), 0,05 ou 20 mg/kg de BPA, toutes les 48h du 1<sup>er</sup> au 7<sup>ème</sup> jour de la vie (PND1-7). La faible dose est comparable à la dose de référence (RfD) fixée par l'US-EPA. La dose interne serait du même ordre de grandeur que celle d'une administration orale compte tenu des faibles capacités métaboliques du très jeune enfant (travaux de Taylor *et al.*, 2008<sup>5</sup>), montrant l'équivalence des doses après exposition orale vs autres voies en période néonatale)
- Au PND85 ovariectomie bilatérale (10 femelles/lot).
- Au PND100 :
  - o Stimulation œstrogénique (implantation sous-cutanée de capsules contenant du 17 $\beta$  œstradiol) en vue de la mesure (immunohistochimie) de l'expression des récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  et à la progestérone PR et de leurs cofacteurs (co-activateur SRC-1 et co-répresseur REA) dans 2 zones cérébrales impliquées dans le comportement sexuel (aire médiane pré-optique et noyau ventro-médian)
  - o Analyse comportementale après injection sous-cutanée de 10  $\mu$ g de benzoate d'œstradiol et de 500  $\mu$ g de progestérone, administrés respectivement 24h et 4h avant enregistrement vidéo de la réceptivité sexuelle (coefficient de lordose<sup>6</sup> et intensité de lordose) et du comportement proprioceptif (mouvement des oreilles, sauts et déplacements) sur 10 minutes ou 10 accouplements (5 femelles par lot).

##### Résultats :

- Diminution de l'expression des récepteurs ER $\alpha$  dans les 2 aires cérébrales aux 2 doses. Diminution de l'expression des récepteurs PR dans le noyau ventro-médian après administration de la faible dose mais pas après administration de la forte dose.
- Augmentation de l'expression de SRC-1 à faible dose dans l'aire préoptique mais diminution de celle-ci dans le noyau ventro-médian toujours à faible dose ; la forte dose n'a aucun effet sur l'expression de SRC-1 quelle que soit l'aire cérébrale.
- Augmentation de l'expression de REA dans le noyau ventro-médian aux 2 doses, mais aucune modification dans l'aire préoptique.
- Pas de modification de la réceptivité (coefficient et intensité de lordose), mais altération du comportement proprioceptif (mouvement des oreilles, sauts et déplacements) aux 2 doses.

##### Conclusion de l'étude :

L'étude montre une altération permanente du contrôle cérébral de la réponse œstrogénique en lien avec l'exposition néonatale au BPA et suggère que le mécanisme d'action implique une altération de l'expression des cofacteurs des récepteurs ER $\alpha$ .

##### Commentaires du GT BPA :

- *Exposition au BPA : les auteurs soulignent que le choix des doses est compatible avec les doses de référence, cependant la cinétique sanguine n'est pas discutée (le protocole d'injections sous-cutanées à intervalle de 48h n'est pas argumenté).*
- *Interprétation des résultats : d'une façon générale, les diagrammes ne permettent pas de mettre en évidence de relation dose effet (le GT BPA note que les résultats ont été obtenus avec seulement 2 doses) pour aucun des paramètres mesurés hormis les expressions d'ER $\alpha$  et de REA qui sont modifiées aux 2 doses, uniquement dans le noyau ventro-médian. Ces travaux laissent donc entrevoir une différence de sensibilité selon l'aire cérébrale. Les tests comportementaux sont difficilement interprétables (2 mesures à intervalle de 2 semaines sur 5 animaux) d'autant que seules 2 variables dont la signification reste à établir (sauts, bonds) sont modifiées aux 2 doses.*

**En conclusion, le GT BPA ne retient pas les résultats de cette étude comme significatifs.**

<sup>5</sup> Taylor J.A., Welshons W.V., vom Saal F.S. (2008). No effect of route of exposure (oral, subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24 h after administration in neonatal female mice. *Reprod. Toxicol.* 25: 169-76.

<sup>6</sup> Lordose : cambure de la colonne vertébrale.



### 3.3.7 Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation

Sargis R., Johnson D., Choudhury R., Brady M. *Obesity* (2009) in press, doi:10.1038/oby.2009.419.

#### Cotation 3b

##### Objectifs de l'étude :

Analyser *in vitro* le rôle du BPA via l'activation du récepteur des glucocorticoïdes sur l'adipogenèse des cellules de la lignée 3T3-L1 (préadipocytes).

##### Méthodes :

Etude des effets de divers perturbateurs endocriniens à des concentrations de 100 pmol/l à 1 µmol/l du BPA, du DCHP (dicyclohexyl phtalate), de l'endrine, du TF (tolylfluaniid) sur l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes dans les préadipocytes de la lignée 3T3-L1 en présence de déhydrocorticostérone (DHC) nécessaire à la différenciation des préadipocytes en adipocytes.

Les cellules 3T3-L1 sont transfectées avec une construction contenant un reporter lié à la luciférase dont l'activité est déclenchée par l'activation du récepteur des glucocorticoïdes.

L'adipogenèse est étudiée par la mesure de la coloration par l'*Oil Red O* et l'immunoblotting de protéines spécifiques des adipocytes (adiponectine, récepteur β à l'insuline, CCAAT/enhancer binding protein α).

##### Résultats :

- Sur 13 perturbateurs endocriniens sélectionnés, seuls 4 dont le BPA activent le récepteur aux glucocorticoïdes.

- A la concentration testée (100 nmol/l), les perturbateurs endocriniens sélectionnés n'initient pas l'adipogenèse lorsqu'ils sont administrés seuls, la présence de DHC étant nécessaire. Dans ces conditions, les protéines spécifiques des adipocytes sont largement exprimées avec un effet moindre pour le BPA que pour les autres perturbateurs endocriniens.

Les perturbateurs endocriniens induisent une accumulation de lipides dans les adipocytes.

##### Conclusion de l'étude :

Les perturbateurs endocriniens ne peuvent promouvoir la différenciation des préadipocytes qu'en synergie avec d'autres facteurs de différenciation. Cette action passe par l'activation du récepteur des glucocorticoïdes.

##### Commentaires du GT BPA :

*Les conclusions de cet article ne sont pas totalement conformes aux données obtenues. Les résultats montrent que le BPA complète l'effet de l'agoniste partiel (déhydrocorticostérone) du récepteur aux glucocorticoïdes (GR), mais ils ne démontrent pas que cette action est médiée par GR, les effets observés pouvant aussi impliquer PPAR-γ. Par exemple, aucune courbe dose-réponse du BPA sur le GR de 1 pM à 1 µM n'est présentée. L'utilisation d'un agoniste fort de GR permet aux auteurs d'induire l'expression de c/EBPα et de l'adiponectine. Pour le BPA, une seule concentration (100 nM) semble vraiment induire l'expression de l'adiponectine et aucun effet sur c/EBPα n'est observé. Par ailleurs, la lignée de préadipocytes ne correspond plus à la cellule d'origine.*

**En conclusion, le GT BPA ne retient pas les résultats de cette étude *in vitro* comme significatifs, qu'il s'agisse du BPA ou des autres substances testées.**

### 3.3.8 Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat

Somm E., Schwitzgebel VM, Toulotte A., Cederrroth CR, Combescure C., Nef S., Aubert ML, Hüppi P. *Environmental Health Perspectives* (2009) 117:1549-1555.

#### Cotation 3b

##### Objectif de l'étude :

Déterminer si l'exposition périnatale au BPA joue un rôle sur l'adipogenèse de l'animal prépubère.

##### Méthode et résultats :

Les rates Sprague-Dawley ont consommé de l'eau contenant 1 mg/l de BPA du 6<sup>ème</sup> jour de la gestation jusqu'au sevrage des petits, au 21<sup>ème</sup> jour (PND21) correspondant à une exposition estimée de 70 µg BPA/kg p.c./j.

- A la naissance, le poids corporel, le sexe ratio et le nombre de petits par portée sont déterminés.

- Au PND21, le poids corporel et la distance anogénitale sont mesurés. Pour une partie des animaux, la graisse péri-épididymaire, la graisse paramétriale, le tissu adipeux brun et le foie sont pesés et préparés pour la quantification des ARN. La graisse paramétriale est étudiée par histologie.

Dans la graisse paramétriale et le foie des femelles, l'expression des gènes lipogéniques (C/EBP- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  SREBP-1C), d'enzymes lipogéniques (LPL, FAS, SCD-1, ACC), d'inhibiteurs de lipogenèse (GATA-2, Pref-1), le transporteur de glucose (GLUT4) est déterminée. Dans le sang, les taux de glucose, de cholestérol, de triglycéride et d'acides gras non estérifiés sont mesurés.

- Pour une autre partie des animaux, suivis de la 4<sup>ème</sup> à la 14<sup>ème</sup> semaine, une moitié reçoit une nourriture standard et l'autre moitié une alimentation riche en graisses. Le poids des animaux est suivi chaque semaine. A terme, les mâles sont soumis à un test de tolérance au glucose.

#### Résultats :

- A la naissance, le traitement par le BPA durant la gestation ne modifie pas le sex-ratio ni la taille des portées. Par contre, les nouveau-nés des deux sexes ont un poids supérieur aux témoins.

- Au PND21, seul le poids des femelles traitées reste augmenté. La graisse paramétriale est plus abondante et présente des adipocytes hypertrophiés. Dans ces cellules, les gènes lipogéniques et ceux des enzymes lipogéniques sont surexprimés. Dans le foie, les taux d'ARN de SREBP-1C, ACC et FAS sont augmentés. Les taux de glucose et de lipides circulants sont normaux.

- De 4 à 14 semaines, l'évolution du poids corporel des mâles BPA recevant l'alimentation standard est semblable à celle des témoins. Par contre, les mâles exposés au BPA et recevant le régime riche en graisses ont un poids supérieur à celui des témoins. Chez les femelles, le poids est supérieur à celui des témoins pour les deux régimes testés. Chez les mâles recevant le régime riche en graisses, la réponse au test de tolérance au glucose est normale.

#### Conclusion de l'étude :

L'exposition périnatale au BPA augmente l'adipogenèse au moment du sevrage chez les femelles. Chez les mâles adultes, l'augmentation de poids est observée si le régime est riche en graisses.

#### Commentaires du GT BPA :

*Les cages et les biberons sont en polypropylène (absence de BPA), l'eau de boisson des témoins contient une quantité insignifiante de BPA et la nourriture contient peu de phyto-œstrogènes.*

*Néanmoins, cette étude présente plusieurs déficiences méthodologiques : nombre limité de portées (8), une seule dose testée ; l'unité expérimentale semble être le petit et non la portée (même si un ajustement est fait sur la taille de la portée pour les comparaisons de poids). L'histologie du tissu adipeux paramétrial aurait dû être couplée à un marquage BrdU afin de préciser l'état prolifératif des adipocytes.*

*Cette étude suggère que l'exposition périnatale au BPA augmente la sensibilité à la prise de poids, de façon sexe-dépendante, même après le sevrage. Compte tenu de l'intérêt des résultats, cette étude nécessiterait d'être confirmée à travers une étude plus robuste du point de vue méthodologique.*

**En conclusion, le GT BPA ne retient pas les résultats de cette étude en tant que signal d'alerte, en raison des limitations méthodologiques.**

## 4. DONNEES RELATIVES A L'EXPOSITION AU BISPHENOL A

### 4.1 Données relatives à la libération de BPA à partir des biberons en polycarbonate

Le BPA est autorisé dans l'Union Européenne pour la fabrication de matériaux en contact avec les aliments avec une limite de migration spécifique (LMS) de 0,6 mg/kg d'aliment. Dans son avis initial de 2006 sur le BPA, l'EFSA a retenu une concentration maximale de 50 µg/l dans les boissons, notamment dans les boissons destinées aux nourrissons, pour calculer l'exposition.

Dans son avis du 27 octobre 2008 relatif au BPA dans les biberons en polycarbonate susceptibles d'être chauffés au four à micro-ondes, l'Afssa a pris en compte les données d'Ehlert *et al.* (2008) et Kawamura *et al.* (1998) relatives à la migration du BPA à partir de biberons contenant de l'eau distillée, chauffés au four à micro-ondes dans des conditions réalistes :

- 3 cycles de chauffage de 3 minutes (Ehlert *et al.*, 2008),
- 5 minutes de chauffage (Kawamura *et al.*, 2008).

Les valeurs obtenues dans ces études sont comprises entre 0,1 et 0,7 µg/l de BPA transféré à l'eau contenue dans le biberon. Ces valeurs sont très inférieures à la concentration maximale de 50 µg/l retenue par l'EFSA.

Par ailleurs, l'Afssa rappelait que pour qu'un enfant de 3 mois et pesant 6,1 kg ingère une quantité de BPA équivalente à la Dose Journalière Tolérable (DJT) de 50 µg/kg p.c./j, les 1060 ml d'eau<sup>7</sup> ou de lait qu'il consomme chaque jour au biberon devraient contenir 287 µg de BPA par litre, soit près de 6 fois la concentration maximale retenue par l'EFSA.

L'Afssa concluait que lorsque le contenu des biberons en polycarbonate est chauffé au four micro-ondes pendant une durée inférieure à 10 minutes, la quantité de BPA transférable à l'aliment est très inférieure à 50 µg/l.

Elle faisait également remarquer que la dureté de l'eau et les traces de liquide vaisselle sont des facteurs qui favorisent le transfert de BPA à partir de récipients en polycarbonate.

Compte tenu de la publication récente de travaux relatifs à la migration de BPA à partir de récipients en polycarbonate (biberons, bouteilles), l'Afssa a mené une analyse bibliographique afin d'évaluer l'impact de ces données sur les conclusions de son avis du 27 octobre 2008.

#### • **Remarques générales**

Le BPA transféré à l'aliment à partir d'un récipient en polycarbonate (PC) provient principalement de la dégradation chimique du polymère plutôt que de la migration (diffusion de monomère résiduel dans le polymère et dissolution dans l'aliment). Cette libération dépend des conditions de température, de temps et de la nature du contenu testé (eau distillée, eau du robinet, simulants alimentaires). En situations défavorables (pH élevé, eau dure), la quantité de BPA libérée peut être plus élevée que celle prise en compte dans l'avis de l'Afssa de 2008, mais il convient de signaler que de telles conditions sont très éloignées des conditions d'utilisation (chauffage d'un biberon de lait pour nourrisson).

Certains travaux ont comparé diverses marques de biberons (sans les citer). Les résultats montrent que les teneurs résiduelles de BPA en tant que monomère dans le PC varient considérablement (par exemple, Ehlert *et al.*, 2008), tandis que les concentrations de BPA dans les milieux testés varient peu. Comme mentionné ci-dessus, ce phénomène s'explique par le fait que le BPA provient principalement de la dégradation du polymère (et non de la migration de monomère résiduel) et que la stabilité de la liaison chimique du polycarbonate ne varie pas selon la marque du biberon. Pour cette raison, les éventuelles différences entre les marques ne sont pas abordées dans ce rapport.

Les études réalisées pour estimer les quantités de BPA transférées aux boissons contenues dans des biberons en PC peuvent être regroupées en 3 catégories :

1. Conditions réalistes d'utilisation : chauffage du biberon par bain-marie ou par micro-ondes (De Coensel *et al.*, 2009 ; Dutch report, 2005 ; Le *et al.*, 2008 ; Ehlert *et al.*, 2008 ; Kubwabo *et al.*, 2009 ; Maragou *et al.*, 2007).

<sup>7</sup> Valeur retenue dans l'avis de l'EFSA de 2006 sur la base de l'étude allemande DONALD (Kiertsing *et al.*, 1998).

2. Chauffage maintenu pendant de longues durées, de 24 à 240 heures (Cao and Corriveau, 2008 ; Dutch report, 2005 ; Kubwato *et al.*, 2009 ; Maia *et al.*, 2009).
3. Chauffage à très haute température pour la stérilisation à domicile (Brede *et al.*, 2003 ; Le *et al.*, 2008 ; Ehlert *et al.*, 2008 ; Maia *et al.*, 2009).

A partir de ces diverses conditions testées, on peut conclure que :

- Pour une température inférieure à 60 °C, le transfert de BPA à l'eau est faible et la concentration finale est inférieure à 1 µg/l.
- Au-delà de cette température (en particulier pour de l'eau bouillante) les concentrations s'étendent de 14 à 137 µg/l (avec une forte variabilité selon le pH).
- La concentration maximale de 137 µg/l correspond à une situation très éloignée de la réalité, l'eau ayant servi à la stérilisation du biberon (bouillie, pH > 9) utilisée pour remplir le biberon puis a été chauffée 10 minutes à ébullition.
- Les détergents, en particulier ceux très alcalins destinés aux machines à laver, attaquent fortement le PC surtout à températures élevées, favorisant ainsi la libération de BPA dans la boisson mise ultérieurement dans le biberon.

Sur la base de ces résultats et afin de minimiser la libération de BPA, le GT BPA recommande d'éviter :

1. de mettre des boissons très chaudes (>60 °C) dans le biberon
2. d'utiliser de l'eau préalablement bouillie pour reconstituer le lait maternisé
3. de laver les biberons avec un détergent à hautes températures (>50 °C)
4. de chauffer à très forte température l'aliment (eau, lait, soupes...) dans des biberons ou des récipients en polycarbonate.

- **Analyse bibliographique détaillée**

#### **4.1.1 Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: water hardness as the most relevant factor**

Biedermann-Brem S. and Grob K., *European Food Research and Technology* (2009) 228: 679-684.

##### **Cotation 1**

###### Objectif de l'étude :

Etudier l'effet de la dureté de l'eau et du pH sur la libération de BPA à partir de biberons en PC.

###### Méthode :

Les biberons (n = 2) sont remplis de 200 ml d'eau (1-eau désionisée, pH 5,0 ; 2- eau du robinet, dureté<sup>8</sup> de 35 °f, pH 7,7 ; 3- eau d'une fontaine, dureté de 22 °f, pH 7,4 ; 4- eau d'une fontaine, dureté de 37 °f, pH 7,5) et sont chauffés au four à micro-ondes La concentration en BPA est mesurée par HPLC-FLD, avec une limite de détection de 0,5 µg/l.

###### Résultats :

La libération du BPA augmente fortement avec le pH de l'eau. Ainsi, lorsque l'eau du robinet est portée à ébullition, l'évaporation du CO<sub>2</sub> entraîne une élévation du pH jusqu'à 9-9,5, ce qui conduit à une dégradation chimique du PC et accélère la libération du BPA d'un facteur 10 à 100. Le pire cas a été observé avec l'eau ayant servi à la stérilisation du biberon au four à micro-ondes (portée à ébullition pendant plusieurs minutes) puis ré-utilisée pour préparer le lait : les concentrations de BPA observées étant de 36 µg/l après 5 minutes et 137 µg/l après 10 minutes de chauffage. Par contre, la concentration était seulement de 1 µg/l après 5 minutes et de 23 µg/l après 10 minutes lorsque de l'eau non bouillie était utilisée.

###### Commentaires du GT BPA :

*Les conditions testées sont très éloignées des conditions réalistes d'utilisation.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

<sup>8</sup> Dureté exprimée en degré français (°f) : 1 °f correspond à 10<sup>-4</sup> mol/l soit 4 mg de calcium ou 2,4 mg de magnésium par litre d'eau.

#### 4.1.2 Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: mechanisms of formation and investigation of worst case scenarios

Biedermann-Brem S., Grob K., Fjeldal P. *European Food Research and Technology* (2008) 227: 1053-1060.

##### Cotation 2

###### Objectif de l'étude :

Expliquer les résultats de Brede *et al.*, (2003) qui décrivent l'augmentation des concentrations en BPA avec le nombre de cycles de lavage.

###### Méthode :

Des conditions « pires cas » de lavage au lave-vaisselle ont été recherchées. En effet, les détergents pour lave-vaisselle sont fortement alcalins et conduisent à l'attaque chimique du polycarbonate. Des biberons (4 marques, 1 à 2 biberons/marque/essai) ont été soumis à plusieurs tests.

- La teneur résiduelle en BPA à la surface interne des biberons est estimée en agitant 10 ml de MTBE (méthyltertiobutyléther) dans le biberon (quantité considérée comme dissolvant 1 mg de biberon soit 50 nm d'épaisseur de PC). Les résultats obtenus avec les biberons neufs sont comparés à ceux obtenus après 30 cycles de lavage/séchage en lave-vaisselle.

- L'effet du pH est étudié avec 100 ml de l'eau du robinet (pH 6), une solution d'acide citrique (pH 2) ou de bicarbonate de soude (pH 9) à 80 °C pendant 1h.

- Un mauvais positionnement du biberon dans le lave-vaisselle est simulé en plaçant un biberon contenant 10 ml d'une solution de détergent ou de l'eau du robinet seule en position horizontale (plusieurs marques testées) puis placé à évaporation à 90 °C pendant 2h.

La concentration en BPA est mesurée par HPLC-FLD, avec une limite de détection de 0,01 µg/l.

###### Résultats :

Les concentrations en BPA les plus élevées ont été obtenues lors d'un rinçage insuffisant (mauvais fonctionnement de la machine ou biberon mal positionné) suivi par un séchage à température élevée. Dans ces conditions, les valeurs observées restaient cependant au-dessous des 50 µg/l retenus par l'EFSA.

###### Commentaires du GT BPA:

*Ce travail montre que le BPA est libéré par attaque chimique (pH alcalin) et que les tests de migration réalisés selon les essais réglementaires ne permettent pas de simuler des scénarios « pire-cas ». De nombreuses conditions d'essai ont été réalisées, mais le nombre exact de biberons testés et les protocoles expérimentaux ne sont pas clairement décrits dans la publication.*

*Les conditions testées sont très éloignées des conditions réalistes d'utilisation.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

#### 4.1.3 Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing

Brede C., Fjeldal P., Skjevraak I., Herikstad H., *Food Additives and Contaminants* (2003) 20: 684-689.

##### Cotation 1

###### Objectif de l'étude :

Etudier les effets du lavage en lave-vaisselle, de l'eau bouillante et du brossage de biberons en PC neufs ou usagés sur la libération de BPA.

###### Méthode :

Des biberons en PC (n = 12) ont été soumis à des lavages répétés au lave-vaisselle (169 cycles) puis testés, remplis avec de l'eau désionisée bouillante (200 ml) pendant 1 h à 100 °C.

La concentration en BPA est mesurée par GC-MS, avec une limite de détection de 0,1 µg/l.

###### Résultats :

Les concentrations en BPA observées avec des biberons neufs sont d'environ 0,2 µg/l ; elles augmentent avec le nombre de cycles de lavage pour atteindre 17 µg/l après 51 cycles puis diminuent légèrement après 169 cycles.

###### Commentaires du GT BPA :

*Les conditions testées sont très éloignées des conditions d'utilisation.*

*Au moment de la publication de cette étude (2003), les résultats avaient été considérés comme surprenants par la communauté scientifique, car la présence de BPA était expliquée à l'époque par un phénomène de migration que l'on supposait diminuer au cours de l'utilisation. Les travaux mis en*

œuvre suite à ce travail ont permis de démontrer que la source de BPA est en fait la dégradation du PC et non la migration du monomère résiduel.

**En conclusion, le GT BPA** estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons. Il retient également que la libération de BPA provient principalement de la dégradation du polycarbonate.

#### 4.1.4 Migration of bisphenol a from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions

Cao X.-L. and Corriveau J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008) 56: 6378-6381.

##### Cotation 3

###### Objectif de l'étude :

Mesurer la libération de BPA à partir de biberons et de bouteilles en PC en conditions extrêmes.

###### Méthode :

La libération de BPA à partir de biberons (n = 3) et de bouteilles en PC réutilisables (n = 2) a été mesurée en remplissant totalement le récipient avec de l'eau bouillante puis en le plaçant dans un four à 70°C pendant 1 à 6 jours.

La concentration en BPA a été mesurée au moyen d'un automate de SPME (solid phase microextraction) couplé à de la GC-MS, avec une limite de détection de 0,5 µg/l.

###### Résultats :

Les concentrations observées augmentent avec le temps de contact selon une relation polynomiale de second degré (de type  $y = ax^2 + bx$ , où y est la concentration en BPA et x le temps de contact), atteignant des valeurs comprises entre 61 et 105 µg/l après 48 heures.

###### Commentaires du GT BPA :

Il n'est pas spécifié si l'eau utilisée était de l'eau désionisée ou de l'eau du robinet. Néanmoins, les auteurs mentionnent l'utilisation d'eau du robinet pour les solutions standard, en raison d'une concentration trop élevée de BPA dans l'eau désionisée. Il semble donc probable que l'eau de robinet ait aussi été utilisée pour les essais. Le pH de l'eau était de 7, ce qui correspond à un pH avant chauffage. L'augmentation du pH de l'eau par évaporation du CO<sub>2</sub> pourrait expliquer la libération de BPA.

Les conditions du test sont très éloignées des conditions d'utilisation.

**En conclusion, le GT BPA** estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.

#### 4.1.5 Study on the migration of bisphenol-A from baby bottles by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS

De Coensel N., David F., Sandra P., *Journal of Separation Science* (2009) 32: 1-8.

##### Cotation 2

###### Objectif de l'étude :

Etudier la libération de BPA à partir de biberons en PC dans des conditions proches des conditions réelles d'utilisation.

###### Méthode :

Les essais ont été menés avec des biberons en PC (2 marques, n = 4, 1 biberon par température testée) remplis d'eau embouteillée (200 ml) et chauffés à 37, 53, 65 ou 86°C au moyen de fours à micro-ondes de 500 W ou de 1000 W pendant 60 secondes ou de 20 à 90 secondes respectivement) puis laissés au contact de l'eau pendant 30 ou 90 minutes. Dans une autre expérience, des biberons ont été testés 100 fois aux différentes températures (n = 4, 1 biberon par température testée). L'effet du mode de chauffage (bain-marie ou par micro-ondes) a été testé à 37-40°C et l'influence du temps de contact a été étudié (0, 30 ou 60 minutes). Des biberons en verre ont été utilisés comme témoins.

La concentration en BPA est mesurée au moyen d'un automate de SPME (solid phase microextraction) couplé à de la GC-MS, avec une limite de détection de 0,12 ng/l.

###### Résultats :

La concentration de BPA est de 13 ng/l après 30 minutes à 37°C de 90 ng/l à 53°C et de 1,5 µg/l à 86°C. Aucune différence n'a été observée entre un chauffage à 37-40°C au bain-marie et par micro-ondes. Aucun effet de la puissance du four à micro-onde (1000 ou 500 W ; test à 37°C), ni du temps

de contact n'a été mis en évidence (0 à 60 min). Les auteurs notent que toutes les eaux testées (désionisée, embouteillées) présentaient des traces de BPA (moyenne des eaux embouteillées =  $8 \pm 1,5$  ng/l). La libération de BPA est plus importante au cours des premiers cycles de chauffage (variables selon la température testée, de 15 à 296 ng/l à 37 et 65°C respectivement) puis diminue pour atteindre une valeur constante après 60 cycles (< 20 ng/l à 37°C et 226 ng/l à 65°C). A noter qu'après 20 cycles de chauffage, aucune différence entre les marques de biberons testées n'a été relevée. La stérilisation (10 minutes dans l'eau bouillante) augmente de 4 à 7 fois la libération de BPA (20 à 90 ng/l sans et avec stérilisation respectivement). Les auteurs postulent que le BPA libéré lors de la stérilisation s'adsorbe sur les parois du biberon lors du séchage.

Commentaires du GT BPA :

*La publication est basée sur une méthode particulièrement sensible. Le milieu testé est de l'eau en bouteille. Le protocole expérimental est bien décrit et robuste : il repose sur des essais répétés 100 fois et intègre des biberons en verre comme témoin.*

*Ces valeurs sont obtenues dans des conditions proches des conditions d'utilisation.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

#### 4.1.6 Migration of BPA and plasticizers from plastic feeding utensils for babies

Dutch Food and Consumer Product Safety Authority, Report no. ND05o410, June 2005

##### Cotation 2

Objectif de l'étude :

Vérifier que des biberons et des ustensiles de cuisine en plastiques souples commercialisés aux Pays-Bas sont conformes à la réglementation des matériaux au contact des denrées alimentaires.

Méthode :

Des biberons neufs (n = 22, provenant de 14 marques) et usagés (n = 20 provenant de 11 marques, durée d'utilisation de 3 à 36 mois) ont été testés à 40°C pendant 24 heures avec 100 ml de simulants (eau distillée ou acide acétique 3%) pour vérifier la conformité au contact alimentaire.

La concentration en BPA est mesurée par HPLC-FLD, avec une limite de détection de 2,5 µg/l dans l'eau distillée et 3,9 µg/l dans l'acide acétique.

Résultats :

La concentration maximale mesurée était de 5 µg/l dans l'eau distillée pour 4 des 20 biberons usagés. Pour les autres biberons usagés et l'ensemble des biberons neufs, les valeurs étaient inférieures à la limite de détection. Cette étude ne montre pas de différence selon les marques ou la durée d'utilisation des biberons.

Commentaires du GT BPA :

*Cette étude montre la conformité du BPA testés dans les conditions d'essais réglementaires. Les valeurs obtenues sont très inférieures à la limite de migration spécifique (LMS) de 600 µg/l.*

*Les conditions du test (temps de contact de 24h) sont très éloignées des conditions d'utilisation.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

#### 4.1.7 Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating

Ehlert K.A., Beumer C.W.E., Groot M.C.E., *Food Additives and Contaminants* (2008) 25: 904–910.

##### Cotation 2

Objectif de l'étude :

Mesurer la libération de BPA à partir de biberons en PC après un chauffage au four à micro-ondes.

Méthode :

Des biberons en PC (n = 18 provenant de 18 marques) ont été analysés pour leurs teneurs résiduelles en BPA (en tant que monomère, en mettant 10 ml de dichlorométhane sur un fragment d'1g de biberon) et sa libération dans de l'eau distillée (100 ml) après 3 cycles de chauffage au four à micro-ondes à 100°C pendant 3 minutes. Les biberons sont testés 2 fois.

La concentration en BPA est mesurée par GC-MS, avec une limite de détection de 0,1 µg/l.

Résultats :

Les concentrations moyennes mesurées dans l'eau étaient inférieures à 1 µg/l (comprises entre 0,1 et 0,7 µg/l). La teneur résiduelle initiale en BPA dans les biberons en PC s'étend de 1,4 à 35,3 mg/kg. Aucune corrélation entre la teneur en BPA résiduelle et la concentration dans l'eau a été relevée, confirmant que le BPA provient d'une dépolymérisation et non d'une migration. Les auteurs ont également conclu que les micro-ondes n'ont pas d'influence sur la libération du BPA.

Commentaires du GT BPA :

*Cette étude, financée par Plastics Europe, a été réalisée par un centre de transfert de technologies indépendant (TNO, Pays-Pays).*

**En conclusion, le GT BPA estime que les données obtenues dans des conditions compatibles avec les conditions d'utilisation (3 minutes de chauffage au four à micro-ondes) peuvent être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

#### 4.1.8 Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles

Kubwabo C., Kosarac I., Stewart B., Gauthier B.R., Lalonde K., Lalonde P.J., *Food Additives and Contaminants* (2009) 26: 928–937.

**Cotation 2**Objectif de l'étude :

Mesurer la libération de BPA à partir de divers types de récipients en plastiques incluant des biberons en PC, de biberons en plastiques autres que le PC, des bouteilles d'eau réutilisables en PC et dans des conditions d'usage répété.

Méthode :

Des biberons en PC (n = 14, provenant de 9 marques) et en plastiques autres que le PC (n = 10 dont 3 en polyéther sulfone, 5 en polypropylène et 2 non renseignés), remplis avec de l'eau, de l'éthanol à 10% ou de l'éthanol à 50% ont été maintenus à 40°C dans un bain marie pendant 8, 24 ou 240 h. Des essais ont également été réalisés en remplissant les biberons avec de l'eau bouillante ou de l'éthanol à 10% à 85°C, puis en les maintenant à 60°C pendant 24h.

L'effet du lavage au lave-vaisselle a été étudié avec les biberons en PC (un lavage par jour à 55°C pendant 6 jours)

La concentration en BPA est mesurée par GC-EI/MS/MS, avec une limite de détection de 0,04 ng/l.

Résultats :

Les concentrations en BPA mesurées à partir de biberons en PC s'élèvent de 0,11 µg/l dans l'eau à 40°C pendant 8 h à 2,39 µg/l dans l'éthanol à 50% à 40°C pendant 240 h. La libération de BPA à partir de bouteilles en PC augmente avec la température (60°C) et le temps, la valeur maximale étant de 6,5 µg/l pour un chauffage à 60°C pendant 24 h. Des traces de BPA ont été relevées pour les récipients non-PC (<0,1 µg/l après 10 j à 100°C). Le nettoyage répété des biberons au lave-vaisselle n'a pas d'effet significatif sur la libération de BPA. Concernant les bouteilles d'eau en PC réutilisables, les concentrations mesurées vont de 0,01 à 2,16 µg/l (40°C pendant 2 à 240h).

Commentaires du GT BPA :

*Ces résultats concordent avec ceux déjà publiés dans la littérature.*

**En conclusion, le GT BPA estime que les données obtenues dans des conditions proches des conditions d'utilisation (essais à 40°C) peuvent être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

#### 4.1.9 Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles

Maia J., Cruz J.M., Sendón R., Bustos J., Sanchez J.J., Paseiro P., *Food Research International* (2009) 42: 1410–1414.

**Cotation 1**Objectif de l'étude :

Etudier l'effet de divers types de détergents sur la libération de BPA à partir de biberons en PC.

Méthode :

Cinq détergents et un agent blanchissant ont été testés pour en évaluer l'impact sur la libération de BPA par des biberons en PC. Des biberons du commerce (nombre d'échantillons non précisé) ont été découpés en pièces de 10 cm<sup>2</sup>. Les essais ont été réalisés en plaçant 3 pièces (soit 30 cm<sup>2</sup>) dans 15



ml de solution aqueuse avec 1% de détergent pendant 1h à 120°C, puis 30 min à température ambiante et enfin 120h (5 j) à 25°C. Après rinçage avec de l'eau distillée, les pièces en PC ont été exposées à 3 cycles d'1 h à 120°C suivis de 30 min à température ambiante.

La concentration en BPA est mesurée par HPLC-FLD, avec une limite de détection de 5 µg/l.

#### Résultats :

La libération de BPA dans les solutions de lavage après 1h à 120°C varie de 22 à 54 800 µg/l, la valeur minimale étant relevée pour l'un des 2 détergents utilisés pour le lavage à la main de la vaisselle et la valeur maximale pour l'autre détergent (probablement avec un pH neutre). Les détergents pour le lavage en lave-vaisselle induisent des libérations de BPA allant de 809 à 30 900 µg/l. La libération de BPA reste élevée après rinçage par l'eau distillée suivi d'une incubation pendant 1h à 120°C. A noter que dans le cas du témoin, réalisé avec de l'eau distillée seule, la libération de BPA est de 109 µg/l après 1h à 120°C. L'agent blanchissant n'induit pas de libération de BPA (concentration mesurée inférieure à la limite de détection dans le premier cycle et de 45 µg/l dans le deuxième cycle d'1h à 120°C).

#### Commentaires du GT BPA :

*Les concentrations de BPA observées s'expliquent par la température élevée (120°C), par un rapport polycarbonate/liquide plus important qu'en conditions réelles (2 cm<sup>2</sup>/ml au lieu d'environ 0,8 cm<sup>2</sup>/ml) et par le pH fortement alcalin des détergents pour lave-vaisselle. Les auteurs n'apportent cependant aucune explication et ne fournissent aucune information concernant la composition ou le pH de ces détergents.*

*Le GT BPA note l'intérêt de ces travaux concernant l'utilisation d'un détergent pour lavage de la vaisselle à la main (pH neutre, mais sans information sur son identité ou sa composition) ayant entraîné une libération élevée dans la solution de lavage, ainsi que dans l'eau distillée chauffée dans le biberon après rinçage (simulant une boisson consommée dans un biberon lavé). Les conditions de l'étude ne sont pas représentatives des conditions d'utilisation (1 h/120°C), mais après ajustement du rapport « surface du biberon sur volume de la boisson », la libération serait 320 fois au-dessus de la limite de 50 µg/l. Si ces résultats étaient confirmés par d'autres travaux, ils pourraient indiquer une situation amenant à une libération de BPA plus élevée que celle prise en considération jusqu'à présent.*

*Les conditions du test sont très éloignées des conditions d'utilisation.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

#### 4.1.10 Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions

Maragou N.C., Makri A., Lampi E.N., Thomaidis N.S., Koupparis M.A., *Food Additives and Contaminants* (2008) 25: 373–383.

#### Cotation 2

##### Objectif de l'étude :

Etudier la libération de BPA à partir de biberons en PC dans des conditions proches des conditions d'utilisation : effet de la stérilisation dans l'eau bouillante, du lavage en lave-vaisselle ou avec une brosse et de la température.

##### Méthode :

La libération de BPA à partir de biberons en PC (n = 31, provenant de 6 marques) a été étudiée avec des simulants aqueux (eau ou acide acétique à 3%) en conditions d'utilisation répétée. Les tests ont été effectués avec un chauffage à 70°C pendant 2 heures ou par remplissage avec de l'eau bouillante suivi d'un contact pendant 45 min à température ambiante. La température était le principal facteur étudié. Des expériences sont menées par cycles répétés d'un lavage à 60°C, rinçage avec de l'eau distillée, stérilisation 10 min dans l'eau bouillante, puis essai de migration dans le simulant à 70°C pendant 2h.

La concentration en BPA est mesurée par HPLC-FLD, avec une limite de détection de 2,5 µg/l et 1,8 µg/l dans l'eau et l'acide acétique respectivement.

##### Résultats :

Au cours de 15 premiers cycles, dans les essais menés à 70°C, la concentration en BPA dans l'eau est inférieure à la limite de détection. Les concentrations en BPA sont mesurables uniquement après remplissage avec de l'eau bouillante (condition testée à partir du 16<sup>ème</sup> cycle), avec une valeur maximale de 14,3 µg/l. Ni l'acidité du simulant (pour simuler les jus de fruit) ni le lavage avec brossage manuel n'ont augmenté la concentration de BPA. L'étude de la libération de BPA avec de l'eau bouillante a montré une augmentation pendant les 4 à 8 premiers cycles puis une diminution jusqu'au

12<sup>ème</sup> cycle d'utilisation. Les auteurs observent une diminution de la libération de BPA avec le nombre de cycles de stérilisation de 10 min dans l'eau bouillante (en contradiction avec l'étude de Brede *et al.*, 2003). Ils concluent à la présence de BPA résiduel sur la paroi des biberons en PC et à l'absence de dégradation du PC.

Commentaires du GT BPA :

*Ces résultats concordent avec ceux déjà publiés. Les essais menés à 70 °C pendant 2h n'ont pas détecté de BPA dans l'eau. Seuls les essais réalisés avec des biberons remplis d'eau bouillante puis laissés en contact 45 min conduisent à une libération de BPA variant de 2,4 à 14,3 µg/l.*

*Ces conditions sont très éloignées des conditions d'utilisation et les limites de détection sont trop élevées pour que les résultats des essais menés à 70 °C puissent être pris en compte.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition des nourrissons.**

#### 4.1.11 Conclusions du GT BPA

Afin d'estimer l'exposition alimentaire au BPA des nourrissons (cf. paragraphe 4.3), le GT BPA a retenu 3 études menées dans des conditions proches des conditions d'utilisation des biberons. Il s'agit de l'étude de Ehlert *et al.*, 2008 (3 fois 3 minutes à 100°C), de De Coensel *et al.*, 2009 (30 minutes à 37°C) et de Kubwabo *et al.*, 2009 (8h à 40°C). La concentration en BPA varie de < 0,1 à 0,7 µg/l.

## 4.2 Données relatives à la libération de BPA à partir d'autres récipients pour bébés

### 4.2.1 Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates

Cao XL, Dufresne G, Belisle S, Clement G, Falicki M, Beraldin F, Rulibikiye A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008) 56: 7919-7924.

#### Cotation 2

##### Objectif de l'étude :

Mesurer la concentration en BPA dans des préparations liquides pour nourrissons contenues dans des conserves métalliques, commercialisées au Canada, en vue d'estimer l'apport journalier en BPA.

##### Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 21 échantillons par GC-MS, avec une limite de détection de 0,5 ng/g.

##### Résultats :

Le BPA est détecté dans tous les échantillons à des concentrations variant de 2,27 ng/g à 10,2 ng/g. L'apport journalier pour les bébés de 0-1-mois est estimé à 1,35 µg/kg p.c./j.

##### Commentaires du GT BPA :

*Cette étude confirme la présence de BPA dans les laits maternisés liquides, par migration à partir des résines qui recouvrent l'intérieur des boîtes de conserve. Ces concentrations sont légèrement inférieures à celles généralement observées dans les boîtes de conserves.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants au BPA par les laits maternisés.**

### 4.2.2 Levels of bisphenol A in canned soft drink products in Canadian markets

Cao XL, Corriveau J, Popovic S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009) 57:1307-1311.

#### Cotation 2

##### Objectif de l'étude :

Mesurer la libération du bisphenol A dans des canettes de soda conservées à température ambiante commercialisées au Canada.

##### Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 72 échantillons de boissons en canette par GC-MS, avec une limite de détection de 0,045 µg/l.

##### Résultats :

Les concentrations en BPA mesurées varient de 0,03 à 4,5 µg/l. Dans 75 % des échantillons, la concentration en BPA était inférieure à 0,5 µg/l et dans 85% des cas à 1 µg/l. Sur la base de la teneur maximale observée (4,5 µg/l) et d'une consommation d'1 canette de soda, l'apport journalier pour 1 adulte de 60 kg est estimé par les auteurs à 0,027 µg/kg p.c./j.

##### Commentaires du GT BPA :

*Cette étude montre la présence de BPA dans les boissons en canette, par migration à partir des résines qui recouvrent l'intérieur des canettes.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des adultes et des enfants au BPA par la consommation de boissons en canette.**

### 4.2.3 Bisphenol a in baby food products in glass jars with metal lids from Canadian markets

Cao XL, Corriveau J, Popovic S, Clement G, Beraldin F, Dufresne G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009) 57: 5345-5351

#### Cotation 2

##### Objectif de l'étude :

Mesurer la concentration en BPA dans des préparations pour bébé contenues dans des petits pots en verre munis d'un couvercle en métal enduit d'un film plastique.

##### Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 99 produits pour bébé issus de 7 fournisseurs par GC-MS, avec une limite de détection de 0,18 ng/g.

Résultats :

Parmi ces 99 produits, 15 ont des teneurs inférieures à la limite de détection (0,18 ng/g) et 70 inférieures à 1 ng/g. La moyenne est de 1,1 ng/g et la valeur maximale est de 7,2 ng/g. La teneur en BPA des pots de fruits (0,6 ng/g) est inférieure à celle des légumes (1,2 ng/g).

Commentaires du GT BPA :

*Cette étude montre que les couvercles en métal enduits d'un film plastique peuvent libérer du BPA dans les aliments contenus dans des petits pots en verre.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants au BPA par la consommation d'aliments dans des pots en verre à couvercle métallique.**

#### 4.2.4 Migration of bisphenol A from can coatings to liquid infant formula during storage at room temperature

Cao XL, Corriveau J, Popovic S. *Journal of Food Protection* (2009) 72: 2571-2574.

**Cotation 1**Objectif de l'étude :

Mesurer la teneur en BPA dans les laits maternisés liquides (lait de soja et lait de vache) contenus dans des conserves après stockage à température ambiante.

Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 2 lots de 21 échantillons de laits maternisés liquides (4 produits à base de soja et 17 produits à base de lait de vache) contenus dans des conserves. Le 1<sup>er</sup> lot a été analysé en 2007 et le 2<sup>nd</sup> lot 10 mois plus tard juste avant la date limite d'utilisation, par GC-MS avec une limite de détection de 0,5 ng/g.

Résultats :

Pour 13 des 21 échantillons, une augmentation d'au moins 10% de la concentration en BPA est observée après 10 mois de stockage. Les valeurs sont comprises entre 2,3 et 10 µg/l en 2007 et 2,8 et 12 µg/l 10 mois plus tard. Une diminution d'au moins 10% est observée pour l'un des 21 échantillons. Dans les autres cas, la variation est inférieure à 10%.

Pour le lait de vache, la concentration en BPA est proportionnelle au temps de contact (durée de stockage), avec une différence selon les fabricants. La concentration moyenne en BPA est de 5 ng/g en 2007 et 6,8 ng/g en 2008.

Pour le lait à base de soja, la différence n'est pas significative (5,8 et 5,3 ng/g respectivement)

Commentaires du GT BPA :

*Cette étude montre que l'effet du stockage à température ambiante est très limité.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants au BPA par les laits maternisés (même si les auteurs précisent que 16 des 21 échantillons ont dépassé la date limite de consommation).**

#### 4.2.5 Enquête sur la migration potentielle de bisphénol A dans les préparations liquides en conserve pour nourrissons selon leur durée d'entreposage à la température ambiante

Santé Canada, Décembre 2009, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-emball/bpa/index-fra.php>

**Cotation 1**Objectif de l'étude

Examiner les changements éventuels des concentrations de BPA dans les préparations liquides en conserve pour nourrissons commercialisées au Canada, après un entreposage prolongé (10 mois) à la température ambiante.

Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans les conserves restantes non ouvertes (toutes du même lot pour chaque produit) des 21 produits de préparation liquide en conserve pour nourrissons (4 produits à base de soja et 17 produits à base de lait de vache) qui ont été analysés dans le cadre d'une précédente enquête. Les échantillons ont été analysés en duplicat par GC-MS avec une limite de détection moyenne de 0,5 ng/g.

Résultats :

En 2007, les concentrations de BPA variaient de 1,14 à 5,44 ng/g pour une moyenne globale de 2,88 ng/g. Après l'entreposage à la température ambiante pendant 10 mois, les concentrations en BPA

variaient de 1,39 à 6,18 ng/g pour une concentration moyenne globale de 3,64 ng/g dans les mêmes produits du même lot.

La comparaison des mêmes produits analysés à 10 mois d'intervalle révèle autant d'augmentations que de diminutions. L'augmentation relevée dans 9 des 21 produits pourrait être attribuée aux variations dans un même lot et à la répétabilité de l'analyse. Ces observations indiquent la possibilité d'une migration du BPA des revêtements intérieurs des boîtes de conserve pendant un entreposage prolongé à la température ambiante. On doit noter que la date de péremption de 16 des 21 produits était atteinte depuis 10 à 206 jours au moment de l'analyse. Toutefois, aucune corrélation évidente entre la date de péremption d'un produit et le degré de migration n'a été observée.

Les différences entre les revêtements intérieurs utilisés par les fabricants de préparations liquides en conserve pour nourrissons ou les méthodes de stérilisation des conserves (température et durée) auxquelles ils ont recours pourraient expliquer la variation de la concentration en BPA entre les préparations liquides en conserve pour nourrissons. Les observations montrent aussi que le contenu de la conserve peut influencer sur la migration du BPA.

Commentaires du GT BPA :

*Comme les travaux de Cao et al. (2009), cette étude montre que l'effet du stockage à température ambiante sur la libération de BPA est très limité. Néanmoins, le GT BPA s'interroge sur l'origine des écarts entre les valeurs observées dans ces 2 études dont les protocoles expérimentaux apparaissent similaires.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants au BPA par la consommation de laits maternisés.**

#### 4.2.6 Enquête sur la présence de bisphénol A dans les préparations liquides en conserve pour nourrissons

Santé Canada, Août 2008, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-emball/bpa/index-fra.php>

##### Cotation 2

Objectif de l'étude

Mesurer la concentration en BPA dans des préparations destinés aux bébés et préemballés dans des conserves, commercialisées au Canada.

Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 21 préparations liquides en conserve pour nourrissons de diverses marques. Ces produits comprenaient 8 marques de 4 entreprises. Parmi ces 21 produits, 17 étaient à base de lait et 4 à base de soja, 18 étaient des préparations concentrées et 3 étaient des préparations prêtes à consommer. Pour les préparations concentrées, les résultats ont été ajustés en tenant compte du facteur de dilution recommandé. Avant l'analyse, tous les échantillons ont été entreposés à la température ambiante. Les échantillons ont été analysés en duplicat par GC-MS avec une limite de détection moyenne de 0,5 ng/g.

Résultats :

Les concentrations de BPA variaient de 1,14 à 5,44 ng/g pour une moyenne de 2,88 ng/g.

Commentaires du GT BPA :

*Cette étude confirme la présence de BPA dans les laits maternisés liquides, par migration à partir des résines qui recouvrent l'intérieur des boîtes de conserve.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants au BPA par la consommation de laits maternisés.**

#### 4.2.7 Enquête sur la présence de bisphénol A dans les préparations en poudre vendues en conserve à l'intention des nourrissons

Santé Canada, Juillet 2009, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-emball/bpa/index-fra.php>

##### Cotation 2

Objectif de l'étude

Mesurer la concentration en BPA dans des préparations en poudre vendues en conserve à l'intention des nourrissons, commercialisées au Canada.

Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 38 préparations en poudre vendues en conserve, provenant de 11 marques et 6 entreprises différentes. Parmi les 38 produits, 31 étaient à base de lait

et 7 étaient à base de soja. Les échantillons ont été analysés par GC-MS avec une limite de détection moyenne de 0,13 ng/g.

Résultats :

Les concentrations de BPA étaient inférieures à la limite de détection dans les 38 produits analysés.

Commentaires du GT BPA :

*Cette étude confirme la présence de BPA dans les laits maternisés en poudre, par migration à partir des résines qui recouvrent l'intérieur des boîtes de conserve.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants au BPA par la consommation de laits maternisés.**

#### 4.2.8 Enquête sur la présence de bisphénol A dans les aliments pour bébés préemballés dans les pots en verre à couvercle métallique

Santé Canada, Juillet 2009, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-emball/bpa/index-fra.php>

##### Cotation 2

Objectif de l'étude

Mesurer la concentration en BPA dans les aliments destinés aux bébés et préemballés dans les pots en verre à couvercle métallique.

Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 122 produits alimentaires destinés aux bébés et préemballés en pots de verre avec un couvercle métallique, provenant de 7 marques (6 entreprises différentes). En raison d'une interférence causée par les matrices alimentaires, la présence de BPA dans 23 échantillons n'a pas pu être quantifiée. Parmi ces produits, 14 correspondaient à des mets composés, 7 étaient à base de fruits, 1 à base de légumes et le dernier était une boisson.

Parmi les 99 produits dont la teneur en BPA a pu être quantifiée, 34 produits étaient à base de légumes, 31 correspondaient à des mets composés, 29 étaient à base de fruits, 3 étaient des desserts, 1 était à base de céréales et le dernier était une boisson. Ces produits étaient représentatifs d'au moins 80 % de la part de marché des produits alimentaires destinés aux bébés et préemballés en pots de verre avec un couvercle métallique vendus au Canada. Les échantillons ont été analysés en duplicat par GC-MS avec une limite de détection moyenne de 0,18 ng/g.

Résultats :

Dans 15 % des produits, la concentration en BPA était inférieure à la limite de détection. Dans près de 70 % des produits, elle était inférieure à 1,0 ng/g. La concentration moyenne en BPA dans tous les produits a été établie à 0,95 ng/g. Les variations entre les concentrations de BPA dans les différents produits alimentaires pour bébés (de 0,19 à 7,22 ng/g) pourraient être dues aux différents revêtements du couvercle métallique ou aux conditions de stérilisation (température et durée) appliquées aux divers produits alimentaires pour bébés.

Commentaires du GT BPA :

*Cette étude montre que les couvercles en métal enduits d'un film plastique peuvent libérer du BPA dans les aliments contenus dans des petits pots en verre.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants au BPA par la consommation d'aliments dans les pots en verre à couvercle métallique.**

#### 4.2.9 Conclusions du GT BPA

Afin d'estimer l'exposition alimentaire au BPA des nourrissons (cf. paragraphe 4.3), le GT BPA a retenu 2 études ayant mesuré la présence de BPA dans des préparations liquides pour nourrissons. Dans l'étude de Cao *et al.* 2009 (21 échantillons), la moyenne des analyses menées à 10 mois d'intervalle est de 5 et 6,8 ng [BPA]/g et la valeur maximale est de 12 ng [BPA]/g.

Dans l'étude de Santé Canada 2008 (21 échantillons analysés), la moyenne est de 2,88 ng [BPA]/g, avec une valeur maximale de 5,44 ng [BPA]/g et une valeur minimale de 1,14 ng [BPA]/g.

### 4.3 Estimation de l'exposition alimentaire au BPA des nourrissons

Afin d'estimer l'exposition alimentaire au BPA des nourrissons, la consommation journalière de lait prise en compte est de 174 ml/kg de poids corporel (Kersting *et al.*, 1998)<sup>9</sup>. Trois sources d'exposition ont été retenues : les biberons en polycarbonate (PC), les laits maternisés et le lait maternel.

#### **Exposition à partir des biberons en PC**

Sur la base des études de Ehlert *et al.*, (2008), De Coensel *et al.* (2009) et Kubwabo *et al.* (2009), l'exposition des nourrissons serait de 0,017 à 0,12 µg/kg p.c./j.

#### **Exposition via les laits maternisés**

Sur la base des études de Cao *et al.* (2009) et de Santé Canada (2008), l'exposition des nourrissons serait de 0,20 à 2,1 µg/kg p.c./j.

#### **Exposition via l'allaitement maternel<sup>10</sup>**

Le GT BPA a retenu 2 études ayant mesuré la présence de BPA dans le lait maternel. Dans l'étude de Sun *et al.*, 2004 (23 échantillons obtenus auprès de femmes japonaises), la moyenne est 0,61 µg [BPA libre]/l et la valeur maximale de 0,97 µg [BPA libre]/l. Dans l'étude de Ye *et al.*, 2006 (20 échantillons obtenus auprès de femmes américaines), les valeurs moyennes et maximales sont respectivement de 1,3 et 6,3 µg [BPA libre]/l et de 1,9 µg et 7,3 µg [BPA total]/l.

Sur la base de ces 2 valeurs en BPA total dans le lait maternel, l'exposition des nourrissons serait de 0,33 à 1,27 µg/kg p.c./j.

Le tableau 2 suivant présente le bilan des estimations de l'exposition alimentaire au BPA des nourrissons, selon les scénarios retenus.

**Tableau 2 : Estimations de l'exposition alimentaire au BPA des nourrissons, selon les scénarios retenus pour une consommation quotidienne de 174 ml/kg p.c.**

Source d'exposition	Valeur maximale	Moyenne	Valeur minimale
Biberons en PC <i>Estimation de l'exposition</i>	0,7 ng/ml 0,12 µg/kg p.c. /j	0,11 ng/ml 0,019 µg/kg p.c. /j	0,1 ng/ml 0,017 µg/kg p.c. /j
Laits maternisés <i>Estimation de l'exposition</i>	12 ng/g 2,1 µg/kg p.c. /j	2,88 ng/g 0,50 µg/kg p.c. /j	1,14 ng/g 0,20 µg/kg p.c. /j
<b><i>Estimation de l'exposition totale</i></b>	<b>2,2 µg/kg p.c. /j</b>	<b>0,52 µg/kg p.c. /j</b>	<b>0,22 µg/kg p.c. /j</b>
Lait maternel <i>Estimation de l'exposition</i>	7,3 µg/l 1,27 µg/kg p.c. /j	1,9 µg/l 0,33 µg/kg p.c. /j	

**Afin d'affiner ces estimations de l'exposition des nourrissons, le GT BPA recommande d'acquérir des données françaises sur la présence de BPA dans le lait maternel et les laits maternisés.**

<sup>9</sup> Kersting, M., Alexy, U., Sichert-Hellert, W., Manz, F. and Schoch, G. (1998). Measured consumption of commercial infant food products in German infants: results from the DONALD study. Dortmund Nutritional and Anthropometrical Longitudinally Designed. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27: 547-552.

<sup>10</sup> Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., and Nakashima, K. (2004). Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 18, 501-7.

Ye X., Kuklennyik Z., Needham L.L., Calafat A.M. (2006). Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 831(1-2):110-5.

#### 4.4 Données relatives à la libération de BPA à partir de conserves et de bouteilles en polycarbonate

Concernant les populations autres que les nourrissons (adultes et enfants ayant une alimentation diversifiée), d'autres sources d'exposition alimentaire au bisphénol A sont à considérer, telles que les conserves, les boissons conditionnées en cannette, les récipients en plastique, etc.

##### 4.4.1 Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain

Mariscal-Arcas M., Rivas A., Granada A., Monteagudo C., Murcia M.A., Olea-Serrano F. *Food and Chemical Toxicology* (2009) 47: 506-510.

##### Cotation 2

###### Objectif de l'étude :

Mesurer la concentration en BPA dans des conserves et des récipients pouvant être chauffés dans un four à micro-ondes pour estimer l'exposition alimentaires des femmes enceintes en Espagne.

###### Méthode

L'étude a porté sur une cohorte mère-fils d'un hôpital de Grenade (2000-2002), les femmes ayant répondu à un questionnaire de fréquence de consommation alimentaire le lendemain de l'accouchement. Le nombre d'individus retenu dans l'étude n'est pas précisé. Les données de contamination en BPA utilisées dans ce calcul d'exposition ne sont pas les concentrations en BPA dans les aliments, mais la quantité de BPA libérée à partir des boîtes vidées, emplies d'eau désionisée et autoclavées 30 min à 125°C. Les récipients pour micro-onde ont été testés avec de l'eau désionisée chauffée 1 minute. Les analyses ont été réalisées par HPLC-FLD avec une limite de quantification de 22,8 ng/ml et ont porté sur 45 produits en conserve (20 de légumes, 10 de légumineuses, 5 de viandes, 10 de poisson), 20 boissons en canette et 20 récipients en plastique.

###### Résultats :

Les teneurs moyennes en BPA mesurées s'étendaient de 1,3 µg/l pour les récipients utilisables au four à micro-ondes à 25 µg/l pour les conserves de légumes secs (la teneur maximale était de 54 µg/l pour les conserves de légumes et légumes secs). Sur la base de ces résultats, l'exposition des femmes enceintes en Espagne a été estimée à 1,1 µg/j.

###### Commentaires du GT BPA :

*Cette étude montre la migration de BPA à partir des résines qui recouvrent l'intérieur des boîtes de conserve et de récipients en plastiques chauffés dans un four à micro-ondes.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition alimentaire au BPA en lien avec la consommation de conserves et l'utilisation de récipients en plastiques chauffés dans un four à micro-ondes.**

##### 4.4.2 Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons

Le H.H., Carlson E.M., Chua J.P., Belcher S.M., *Toxicology Letters* (2008) 176: 149–156.

##### Cotation 2

###### Objectif de l'étude :

Mesurer la libération de BPA à partir de bouteilles en PC neuves et usagées, étudier son activité œstrogéno-mimétique et sa toxicité sur des cellules neuronales immatures.

###### Méthode (concernant uniquement la mesure de la libération de BPA) :

La libération de BPA dans de l'eau distillée (100 ml) à partir de bouteilles en PC neuves (n = 3) et usagées (n = 5) ainsi que de bouteilles en polyéthylène haute densité (PEHD, n = 3) a été mesurée à température ambiante (22°C) pendant 1, 3, 5 et 7 jours. A 100°C, 2 bouteilles en PC neuves et 1 bouteille usagée ont été testées pendant 24h. Les essais ont été menés en triplicat.

Le dosage de BPA a été réalisé par méthode immuno-chimique (ELISA) avec une limite de détection allant de 0,05 à 10 µg/l selon les essais.

###### Résultats :

La libération de BPA à partir de bouteilles en PC usagées est inférieure à 1 µg/l (0,21 à 0,93 µg/l) après 1 à 7 jours à température ambiante et inférieure à 2 µg/l après 24 h à 100°C. Pour les bouteilles neuves, la libération de BPA est inférieure à 1 µg/l (0,08 à 0,36 µg/l) après le 1<sup>er</sup> jour, puis augmente entre 0,7 et 1,33 µg/l après 7 jours à température ambiante. A 100°C, les valeurs restent inférieures à 8 µg/l après 24 h à 100°C (3,84 à 7,67 µg/l). La libération de BPA augmente donc avec le temps et la



température de l'eau (elle était 15 à 55 fois plus élevée à 100°C qu'à 22°C). Concernant les bouteilles en PEHD, les concentrations en BPA varient de < limite de détection à 0,19 µg/l.

Commentaires du GT BPA :

*Les valeurs concordent avec celles publiées dans la littérature.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données ne peuvent pas être retenues dans le cadre d'une estimation de l'exposition de la population française, car ce type de bouteilles d'eau en PC ne sont pas commercialisées en France.**

#### 4.4.3 Détermination of bisphenol A in canned fatty foods by coacervative microextraction, liquid chromatography and fluorimetry

Perez-Bendito M.D., Bravo S.R., Lunar Reyes M.L., Garcia Prieto A., Food Additives and Contaminants 26 (2009), 265–274.

##### Cotation 2

Objectif de l'étude :

Mesurer la concentration en BPA dans des conserves commercialisées en Espagne.

Méthode :

La concentration en BPA dans les aliments contenus dans des boîtes de conserve de produits de la pêche (n = 4, thon/ maquereau/sardine à l'huile d'olive, moules sauce piquante) et de viande (n = 2, boulettes de viande/porc cuisiné) ont été mesurées par HPLC-FLD avec une limite de quantification de 15 à 29 ng/g.

Résultats :

La concentration de BPA dans les conserve de produits de la pêche variait de 20 à 129 ng/g et celle dans la viande de non-déetectable (< 9 ng/g) à 37 ng/g.

Commentaires du GT BPA :

*Les valeurs concordent avec celles publiées dans la littérature.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition alimentaire au BPA en lien avec la consommation de conserves.**

#### 4.4.4 Enquête sur la présence de bisphénol A dans les eaux embouteillées

Santé Canada, Juillet 2009, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-embal/bpa/index-fra.php>

##### Cotation 1

Objectif de l'étude

Mesurer la concentration en BPA dans des eaux embouteillées commercialisées au Canada.

Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 54 différentes eaux embouteillées provenant de 21 marques (16 entreprises), correspondant à des eaux minérales, des eaux de source aromatisées et non aromatisées, gazéifiées et non gazéifiées. Les récipients étaient soit en verre, en métal, en polyéthylène haute densité (PEHD), en polyéthylène téréphtalate (PET) et en polycarbonate (PC). Les eaux embouteillées dans des récipients en PC étaient en bonbonnes de 18,5 l.

Au total, 68 échantillons prélevés dans 56 eaux embouteillées ont été recueillis. Chaque échantillon a été analysé en duplicat par GC-MS avec une limite de détection de 0,5 µg/l.

Résultats :

La concentration de BPA dans les échantillons des 51 eaux qui n'étaient pas embouteillées dans des récipients en PC était inférieure à la limite de détection. La présence de BPA a été détectée dans 13 des 17 échantillons issus de 4 des 5 eaux embouteillées dans des récipients en PC. Les concentrations variaient de 0,50 à 8,82 µg/l, avec une moyenne de 1,5 µg/l.

Commentaires du GT BPA :

*Les valeurs concordent avec celles publiées dans la littérature.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition au BPA par la consommation d'eaux embouteillées.**

#### 4.4.5 Enquête sur la présence de bisphénol A dans boissons en canette

Santé Canada, Mars 2009, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-emball/bpa/index-fra.php>

##### Cotation 1

###### Objectif de l'étude

Mesurer la concentration en BPA dans des boissons en canette, commercialisées au Canada.

###### Méthode :

La concentration en BPA a été mesurée dans 72 boissons en canette de type boissons hypocaloriques, ordinaires, aromatisées aux fruits, boissons énergisantes et d'autres variétés. Ces produits étaient représentatifs d'au moins 84% de la part de marché des boissons rafraîchissantes vendues au Canada. Tous ces produits étaient gazéifiés à l'exception de 4 boissons à base de thé. Chaque échantillon a été analysé en duplicat par GC-MS avec une limite de détection de 0,045 µg/l.

###### Résultats :

Du fait de la sensibilité de la méthode, la présence du BPA a été détectée dans les échantillons de toutes les boissons, sauf dans 2 produits de soda tonique et 1 boisson énergisante. Il semble que le chlorhydrate de quinine, fréquemment utilisé comme amérisant dans les boissons de type tonique, pourrait faire obstacle à l'extraction du BPA.

Dans 75% des produits, la concentration en BPA était inférieure à la limite de détection ; 85% des produits contenaient moins de 1 µg/l. La contamination moyenne de l'ensemble des produits a été établie à 0,57 µg/l. Les différences entre les revêtements ou les conditions de stérilisation de la canette (température, durée, etc.) utilisés par les compagnies de boissons pourraient expliquer la variation de la concentration de BPA dans les boissons en canette (de 0,032 à 4,5 µg/l). L'exposition fortuite à la chaleur (par exemple au soleil) pendant l'entreposage ou le transport des boissons en canette pourrait aussi accroître de la libération de BPA dans la boisson.

###### Commentaires du GT BPA :

*Les valeurs concordent avec celles publiées dans la littérature.*

**En conclusion, le GT BPA estime que ces données peuvent être retenues pour estimer l'exposition au BPA par la consommation de boissons en canette.**

#### 4.5 Données relatives à des sources non alimentaires d'exposition au BPA

Enfin, d'autres sources d'exposition non alimentaire au BPA devraient être investiguées, comme le suggèrent les 2 publications suivantes.

##### 4.5.1 Assessment of human exposure to bisphenol A, triclosan and tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium

Geens T., Roosens L., Neels H., Covaci A. *Chemosphere* (2009) 76: 755–760.

##### Cotation 1

L'étude porte sur l'analyse par LC-MS/MS des résidus de BPA, de tétrabromobisphénol A (TBBPA) et de triclosan dans les poussières prélevées dans 18 logements et 2 bureaux en Belgique (Flandres). Les valeurs médianes rapportées pour le BPA sont de 1500 ng/g dans les logements et de 6500 ng/g pour les 2 bureaux. Les valeurs observées dans les logements sont 3 fois plus élevées que celles précédemment rapportées aux Etats-Unis (Rudel *et al.*, 2003) ou en Allemagne (Volkel *et al.*, 2008). Ces écarts ne sont pas expliqués. En se basant sur les calculs de Lakind et Naiman (2008) (extrapolation à partir des concentrations urinaires) d'une exposition quotidienne (toutes voies confondues) de 3500 ng pour un adulte de 70 kg, les auteurs estiment, sans le démontrer, que l'inhalation est une voie mineure d'exposition au BPA.

###### Commentaires du GT BPA :

*Les auteurs n'apportent aucune information ni aucune hypothèse expliquant l'origine du BPA dans les poussières domestiques. Ces données mériteraient d'être vérifiées.*

*En complément, les données déjà publiées sur la présence de BPA dans les poussières intérieures et dans l'air extérieur sont présentées dans le tableau 3.*

**Tableau 3 : Données relatives à la présence de BPA dans les poussières intérieures et dans l'air extérieur.**

Pays	Matrice	Concentrations de BPA	Référence
USA	Poussière bureau et maison	0,25 – 0,48 µg/g	Rudel <i>et al.</i> , 2001*
USA	Air intérieur en milieu professionnel et résidentiel	< 0,1 – 1,80 ng/m <sup>3</sup>	Wilson <i>et al.</i> , 2001*
	Air extérieur	< 0,1 – 2,50 ng/m <sup>3</sup>	
	Poussière sol d'une salle de classe	1,04 – 4,51 µg/g	
USA	Air intérieur en milieu résidentiel	< 0,1 – 29 ng/m <sup>3</sup>	Wilson <i>et al.</i> , 2003*
	Air intérieur des garderies	2,81 – 8,80 ng/m <sup>3</sup>	
	Air extérieur en milieu résidentiel	< 0,1 – 4,41 ng/m <sup>3</sup>	
	Air extérieur à la garderie	0,16 – 4,72 ng/m <sup>3</sup>	
	Poussière domicile	0,707 – 1,89 µg/g	
	Poussière garderie	0,57 – 3,26 µg/g	
USA	Poussière domestique	Médiane : 820 ng/g	Rudel <i>et al.</i> , 2003
Allemagne	aérosols	5 – 15 pg/m <sup>3</sup>	Berkner <i>et al.</i> , 2004*
Japon	Air urbain	< 0,1 – 1,92 ng/m <sup>3</sup>	Matsumoto <i>et al.</i> , 2005*
USA	Air intérieur en milieu résidentiel	< 0,09 - 193 ng/m <sup>3</sup>	Wilson <i>et al.</i> , 2007
	Air intérieur des garderies	< 0,09 – 8,99 ng/m <sup>3</sup>	
	Air extérieur en milieu résidentiel	< 0,09 – 44,6 ng/m <sup>3</sup>	
	Air extérieur à la garderie	< 0,09 – 51,5 ng/m <sup>3</sup>	
	Poussière domestique	< 2 – 707 ng/g	
	Poussière garderie	< 2 – 156 ng/g	
Allemagne	Poussière domestique	Médiane : 555 ng/g	Volkel <i>et al.</i> , 2008
Belgique	Poussière domestique	535 – 9730 ng/g	Geens <i>et al.</i> , 2009
	Poussière de bureau	4685 – 8380 ng/g	

\* in Tsai *et al.* (2006)

**En conclusion, le GT BPA** estime que des études devraient être mises en œuvre pour confirmer ou infirmer la présence de BPA dans les poussières domestiques en France.

#### 4.5.2 Exposure analysis of bisphenol A in surface water systems in North America and Europe

Klecka G.M., Staples C.A., Clark K.E., van der Hoeven N., Thomas D.E., Hentges S.G. *Environmental Science and Technology* (2009) 43: 6145–6150.

##### Cotation 1

Cet article est une revue de 89 études ayant recherché le BPA dans les eaux de surface entre 1997 et 2007. Sur la base de 1068 analyses d'eaux d'Amérique du Nord et de 848 eaux européennes, le BPA était détecté dans 20-51% des échantillons. Les concentrations médianes étaient de 0,081 µg/l en Amérique du Nord et de 0,01 µg/l en l'Europe : les 95<sup>èmes</sup> percentiles étaient respectivement de 0,47 et de 0,35 µg/l.

##### Commentaires du GT BPA :

Le GT BPA souligne que ces données ne concernent que les eaux de surface et ne tiennent pas compte de l'impact des traitements de potabilisation.

La présence de BPA dans les eaux de surface et les eaux de boisson destinées à la consommation humaine a déjà été abordée dans ce rapport (se reporter page 6).

Par ailleurs, à la demande de la Direction générale de la santé, le Laboratoire d'études et de recherche en hydrologie (LERH) de l'Afssa prévoit de réaliser en 2010 une campagne nationale d'analyses du BPA dans les eaux brutes et les eaux de boisson. L'échantillonnage devrait comporter 250 couples eau brute/eau traitée, soit 500 échantillons. L'objectif est de mesurer la présence de BPA dans les ressources, l'efficacité des filières de traitement et l'éventuel apport des matériaux utilisés dans les réseaux de distribution. Les résultats devraient être disponibles le premier semestre 2011.

**En conclusion, le GT BPA** estime que les données de Klecka et al. (2009) ne peuvent pas être retenues pour estimer l'exposition humaine par la consommation d'eau de boisson.

#### 4.5.3 Autres sources non alimentaires d'exposition au BPA

En plus des 2 sources potentielles d'exposition au BPA évoquées ci-dessus, d'autres sources sont à considérer, telles que :

- Les papiers et les cartons recyclés, en raison de la présence de BPA dans les papiers à impression thermique (fax et tickets de caisse<sup>11</sup>, RAR 2010). L'éventuel transfert du BPA du carton vers les denrées alimentaires n'est pas établi et devrait être recherché. Il conviendrait également de déterminer l'exposition humaine résultant du contact cutané avec ces papiers à impression thermique, d'autant que le métabolisme par cette voie peut différer de celui par administration orale.
- Les matériaux plastiques en PVC pouvant contenir du BPA.
- Les pansements dentaires.

Afin de réduire, par des produits de substitution, l'exposition au bisphénol A de la population et, en particulier, des femmes enceintes et des jeunes enfants, le GT BPA rappelle l'importance d'un processus rigoureux d'évaluation des risques de tout produit candidat à la substitution au bisphénol A. Ce processus d'évaluation s'inscrit dans le cadre de la réglementation européenne pour laquelle une réévaluation sur la base des connaissances scientifiques actuelles des monomères autorisés antérieurement serait pertinente.

A titre d'exemple, le PES (polyéther sulfone) utilisé en remplacement du PC pour les biberons est un matériau plastique ayant pour monomère le bisphénol S dont la toxicité est moins connue que celle du bisphénol A (l'évaluation européenne datant de 2000 ne repose que sur 4 études de génotoxicité<sup>12</sup> et ne comporte pas d'étude menée à long terme sur des animaux de laboratoire).

#### 4.5.4 Autres composés œstrogéno-mimétiques présents dans l'alimentation

Les risques potentiels liés à l'exposition de l'homme au BPA doivent être évalués dans le cadre plus large de l'exposition aux composés œstrogéno-mimétiques présents dans l'alimentation, qu'il s'agisse de composés d'origine naturelle comme les phyto-œstrogènes ou de composés de synthèse comme les nonylphénols.

Ainsi, les produits laitiers constituent la principale source de stéroïdes alimentaires et l'apport total pour un adulte est estimé par Hartmann *et al.* (1998) à 80-100 ng par jour (soit environ 2 ng/kg p.c./j). Les concentrations d'œstradiol mesurées dans le lait indiquent des valeurs de l'ordre de 20 ng/l (Courant *et al.*, 2007). La mesure par bio-essai du potentiel œstrogénique (exprimé en équivalent œstradiol) serait de 20 à 40 ng EEQ/l dans la bière (Promberger *et al.*, 2001) et de 84 ng EEQ/l dans le vin (Klinge *et al.*, 2003). Par ailleurs, des teneurs de quelques ng EEQ/l ont été mesurées dans des aliments à base de soja (Takamura-Enya *et al.*, 2003).

Dans le lait humain, les teneurs en œstrogènes varie en fonction du stade de lactation de 34 à 124 ng/l (Adugamov and Chernikov, 1985).

Thomson & Grounds (2005) estiment ainsi que le BPA représenterait 7% du potentiel œstrogénique apporté par les aliments, les isoflavones représentant 51%, les alkylphénols 25% et les flavonoïdes 17%.

<sup>11</sup> Parmi 13 papiers à impression thermique analysés, 11 contenaient entre 8 et 17 g/kg de BPA (Biedermann S., Tschudin P., Grob K., Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, submitted manuscript).

<sup>12</sup> Test de mutation génique sur bacteria (négatif), Aberration chromosomique sur culture de cellules mammaliennes (positif), Test de mutation génique sur culture de cellules mammaliennes (négatif), Test du micro-noyau (négatif).

## 5. AUTRES ETUDES ANALYSEES PAR LE GT BPA

Parmi les données examinées par le GT BPA, figurent également des études de mesure des niveaux d'imprégnation chez l'homme ainsi que des articles ou des rapports de synthèse sur l'évaluation des risques liés au BPA.

### 5.1 Données d'imprégnation chez l'homme

#### 5.1.1 GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children

Becker K., Göen T., Seiwert M., Conrad A., Pick-Fuß H., Müller J., Wittassek M., Schulz C., Kolossa-Gehring M. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (2009) 212: 685-692.

##### Cotation 2c

###### Objectif :

Etude d'imprégnation à partir de mesures du BPA glucuro-conjugué dans 600 urines d'enfants résidant en Allemagne.

###### Méthode :

A partir d'une cohorte de 1790 enfants allemands âgés de 3 à 14 ans, un sous-échantillon de 600 enfants a été sélectionné pour respecter une stratification F (classe d'âge, sexe, origine). Les classes d'âge retenues sont : 3-5, 6-8, 9-11 et 11-13 ans.

Considérant que le BPA est absorbé quasi-totalement puis éliminé presque complètement dans les urines sous forme de glucurono-conjugué, les auteurs estiment que l'urine est le fluide biologique le plus approprié pour mesurer l'exposition.

Le BPA total a été mesuré sur les urines matinales après hydrolyse enzymatique des conjugués et dérivatisation par GC/MS-MS avec standard interne et une limite de quantification de 0,15 µg/l.

###### Résultats :

Le BPA a été détecté dans 99% des échantillons. Les concentrations médianes chez les 4 groupes d'âge variaient entre 2,1 et 3,5 µg/l, celles du 95<sup>ème</sup> percentile entre 11 et 23 µg/l. La valeur maximale était de 205 µg/l et la moyenne de 2,74 µg/l. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Calafat *et al.* (2008<sup>13</sup>) de l'étude NHANES 2003-2004 qui indiquent pour des jeunes de 6 à 11 ans des valeurs de 3,6 µg/l en moyenne et 16 µg/l au 95<sup>ème</sup> percentile. Aucune différence entre les sexes n'a été observée, en revanche des concentrations plus élevées ont été mesurées pour les enfants de 3-5 ans par rapport à l'ensemble de la cohorte (moyennes géométriques : 3,55 et 2,66 µg/l, respectivement).

Sur la base de ces concentrations et de la quantité d'urine estimée, la médiane de l'exposition journalière serait de 0,05 µg/kg p.c., soit environ 1000 fois moins que la DJT proposée par l'EFSA. Celle du 95<sup>ème</sup> percentile serait de 0,37 ou 0,22 µg/kg p.c. (selon les hypothèses de calcul) et le maximum de 7 µg/kg p.c., également inférieure à la DJT.

###### Commentaires du GT BPA :

*Un seul échantillon d'urine matinale de chaque individu a été analysé. Compte tenu de la vitesse de métabolisation chez l'homme (demi-vie de 4 à 5h selon les travaux de Volkel *et al.*, 2002) et du fait que la variation intra-individuelle peut être aussi élevée que la variation inter-individuelle, les résultats de cette étude fournissent des informations d'ordre qualitatif (présence d'une imprégnation au BPA) plutôt que quantitatif.*

**En conclusion, le GT BPA retient que les résultats de cette étude témoignent d'une imprégnation de la population des enfants allemands par le BPA.**

#### 5.1.2 Exposure to bisphenol a and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants

Calafat A.M., Weuve J., Ye X., Jia L.T., Hu H., Ringer S., Huttner K., Hauser R., *Environmental Health Perspectives* (2009) 117: 639-644.

##### Cotation 1d

###### Objectif :

Etude d'imprégnation à partir des mesures du BPA dans les urines de 54 enfants prématurés provenant de 2 hôpitaux des Etats-Unis (Boston).

<sup>13</sup> Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A., Needham L.L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116(1):39-44.

Méthode :

Les mesures ont été réalisées sur les urines de 54 prématurés ayant un âge gestationnel corrigé (âge gestationnel + âge après la naissance) d'au plus 44 semaines. Les urines ont été collectées à partir des couches. Les concentrations de BPA libre et de BPA total ont été mesurées par HPLC-MS après une extraction de type liquide-solide. La limite de détection était de 0,4 µg/l.

Résultats :

Les résultats montrent que pendant cette phase critique du développement, les bébés étaient exposés à des niveaux de BPA (libre et conjugué) environ un ordre de grandeur plus élevés que ceux de la population générale des enfants et des adultes (30 µg/l en moyenne et maximum proche de 1000 µg/l). Une différence importante des concentrations de BPA est observée suivant que les urines proviennent d'un hôpital ou de l'autre. Les dispositifs médicaux en plastique n'ont pas été analysés, mais la corrélation avec les métabolites de DEHP indiquent que des articles plastifiés en PVC seraient la source principale d'exposition.

Commentaires du GT BPA :

**Le GT BPA attire l'attention sur le fait que ces données sont spécifiques aux prématurés en soins médicaux intensifs et perfusés avec des dispositifs médicaux contenant du BPA. Ils ne peuvent donc pas être extrapolés à des nouveau-nés en général.**

*Cette étude montre également que les prématurés peuvent métaboliser le BPA puisque 90% du BPA est retrouvé sous forme conjuguée chez plus des ¾ des prématurés.*

**En conclusion, le GT BPA retient que les résultats de cette étude témoignent que les plastiques utilisés dans les dispositifs médicaux peuvent être une source d'exposition au BPA et que celui-ci est métabolisé chez les prématurés.**

### 5.1.3 Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol a concentrations

Carwile J.L., Luu H.T., Bassett L.S., Driscoll D.A., Yuan C., Chang J.Y., Ye X., Calafat A.M., Michels K.B., *Environmental Health Perspectives* (2009) 117: 1368-1372.

#### Cotation 3b

Objectif :

Etude de l'effet de la consommation de boissons froides contenues dans des bouteilles en polycarbonate (PC) sur la concentration urinaire en BPA.

Méthode :

77 étudiants du Harvard College ont été soumis à une période « d'épuration » de 7 jours au cours de laquelle leurs boissons fraîches devaient être stockées dans des récipients en inox. Les urines témoins ont été collectées au cours de 2 des 3 derniers jours de cette période, entre 16h et 20h. Des bouteilles en polycarbonate (PC) ont ensuite été distribuées pour une semaine « d'expérimentation » et devaient être utilisées pour toutes les boissons froides. Les urines ont été collectées à 2 reprises entre 17h et 20h au cours des trois derniers jours de cette période « d'expérimentation ».

Les concentrations en BPA libre et conjugué (après action de β-glucuronidase/sulfatase) étaient mesurées par HPLC/MS-MS avec une limite de détection de 0,4 µg/l (prise d'essai de 100 µl d'urine).

Résultats :

La concentration en BPA était inférieure à limite de détection dans 9 échantillons de la période « d'épuration » et dans 3 échantillons de la période « d'expérimentation ».

La moyenne géométrique était de 1,2 µg/g créatinine (Intervalle de Confiance 95% : 1,0 – 1,4) pendant « l'épuration » et de 2,0 µg/g créatinine (Intervalle de Confiance 95% : 1,7 – 2,4) pendant « l'expérimentation ». L'augmentation moyenne des concentrations de BPA associée à l'utilisation des bouteilles en PC était de 69% (de 40 à 102%).

Conclusion de l'étude :

Les boissons contenues dans des bouteilles en PC contribuent à l'exposition au BPA.

Commentaires du GT BPA :

*La nature des boissons qui ont été mises dans les bouteilles, la durée du temps de contact avec le PC avant consommation ainsi que la température de la boisson n'ont pas été précisées. Or, une température, un pH et/ou une dureté élevée sont des facteurs majorant la libération de BPA à partir du polycarbonate (cf. chapitre précédent sur l'exposition au BPA), en particulier s'il s'agit d'une autre boisson que de l'eau.*

*L'intérêt de cette étude apparaît limité, d'autant que les auteurs n'excluent pas des biais méthodologiques tels qu'un meilleur respect du protocole durant la phase « d'épuration » par rapport à la phase « d'expérimentation ».*

**En conclusion, le GT BPA ne retient pas les résultats de cette étude en termes de contribution des bouteilles en polycarbonate à l'apport global en BPA, en raison des limitations méthodologiques. Mais le GT BPA retient qu'ils témoignent d'une imprégnation de la population des étudiants américains par le BPA.**

#### 5.1.4 Sensitive and selective method for the determination of bisphenol-A and triclosan in serum and urine as pentafluorobenzoate-derivatives using GC-ECNI/MS

Geens T., Neels H, Covaci A. *Journal of Chromatography B* (2009) 877 (31): 4042-4046.

##### Cotation 3a

###### Objectif :

Mise au point et validation d'une méthode d'analyse permettant de mesurer les concentrations de BPA et de triclosan<sup>14</sup> dans des échantillons d'urine et de sérum humains par GC-MS/MS.

###### Méthode :

Les concentrations urinaires et sériques de BPA ont été mesurées chez 20 adolescents belges. Les échantillons urinaires ou sériques ont subi une digestion par la  $\beta$ glucuronidase / sulfatase permettant de mesurer le BPA total (libre et conjugué). Après une étape d'extraction liquide-solide, les échantillons sont dérivatisés avant d'être analysés par GC-MS/MS. Les limites de quantification étaient de 0,5 et 0,2  $\mu$ g/l dans le sérum et l'urine, respectivement.

###### Résultats :

Le BPA a été détecté dans 100% des échantillons urinaires. Les valeurs médianes trouvées pour le BPA urinaire sont de 1,25  $\mu$ g/l (valeurs variant de 0,58 à 5,2  $\mu$ g/l). Les concentrations de BPA sérique (seulement 10% d'échantillons positifs) varient entre < 0,5  $\mu$ g/l et 0,59  $\mu$ g/l.

###### Conclusion de l'étude

La méthode développée et validée permet la détermination simultanée du BPA et du triclosan et l'urine apparaît comme une matrice appropriée dans le cadre d'études de biomonitoring.

###### Commentaires du GT BPA :

*L'essentiel de l'article est méthodologique. Les concentrations de BPA mesurées ne peuvent pas être interprétées, en raison du nombre restreint d'échantillons analysés et de données démographiques non renseignées (origine, sexe et âge).*

**En conclusion, le GT BPA retient que les résultats de cette étude témoignent d'une imprégnation de la population des adolescents belges par le BPA.**

#### 5.1.5 Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)

Ye X., Pierik F.H., Angerer J., Meltzer H.M., Jaddoe V.W.V., Tiemeier H., Hoppin J.A., Longnecker M.P. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (2009) 212: 481–491.

##### Cotation 3b

###### Objectif :

Déterminer les concentrations de plusieurs contaminants dont le BPA dans des urines de femmes enceintes en Norvège. Les résultats sont enrichis de 2 initiatives similaires : Initiative Generation R (Jaddoe *et al.*, 2006<sup>15</sup>) réalisée à Rotterdam aux Pays-Bas dans laquelle les urines de 100 femmes enceintes ont été collectées et pour lesquelles des mesures de BPA ont été réalisées et l'initiative NHANES (CDC, 2008<sup>16</sup>) aux Etats-Unis dans laquelle les concentrations en BPA ont été mesurées dans 87 urines de femmes enceintes.

###### Méthode :

Dans le cadre d'un programme national débuté en 1999, le sang et les urines de femmes enceintes ont été collectés à l'occasion d'une échographie réalisée la 17<sup>ème</sup> ou la 18<sup>ème</sup> semaine de grossesse.

<sup>14</sup> Triclosan : anti-microbien utilisé dans les produits cosmétiques et suspecté d'induire une résistance microbienne.

<sup>15</sup> Jaddoe V.W., Mackenbach J.P., Moll H.A., Steegers E.A., Tiemeier H., Verhulst F.C., Witteman J.C., Hofman A. (2006). The generation R study: design and cohort profile. *Eur. J. Epidemiol.* 21(6): 475-484.

<sup>16</sup> CDC (2008). National Health and Nutrition Examination Survey Data. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Hyattsville, MD. Available from <http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/datalink.htm>, accessed on 22-Jan-2010.

Les urines de 110 femmes ont été poolées à raison de 11 urines par pool. La quantité de BPA absorbée par jour a été déterminée par la formule suivante : (Concentration dans l'urine x Volume de l'urine) / poids corporel. Le volume d'urine est estimé à 2 l (Brantsaeter *et al.*, 2009<sup>17</sup>) et le poids corporel moyen est estimé à 73,5 kg.

Résultats :

La concentration moyenne de BPA dans les urines poolées de 110 femmes enceintes était de 4,5 µg/l ce qui est proche des concentrations mesurées dans le cadre des 2 autres initiatives référencées : 2,52 dans le cadre de Generation R (différence significative avec les résultats norvégiens) et 3,93 µg/l dans le cadre de NHANES (pas de différence significative).

Conclusion de l'étude :

Les apports journaliers maximaux que les auteurs ont dérivé des données collectées en Norvège sont approximativement de 0,1 µg/kg p.c., très inférieurs à la DJT définie par l'EFSA (0,05 mg/kg p.c./j).

Commentaires du GT BPA :

*La méthode d'analyse du BPA n'est pas décrite. Le fait de pooler les urines présente plusieurs biais, principalement celui de ne pas pouvoir rendre compte de l'étendue des concentrations individuelles. Le calcul d'apport journalier est également biaisé, d'autant plus que des valeurs par défaut ont été utilisées pour le volume d'urine quotidienne et le poids.*

**En conclusion, le GT BPA retient cependant que les résultats de cette étude témoignent d'une imprégnation de la population des femmes enceintes norvégiennes par le BPA.**

---

<sup>17</sup> Brantsaeter A.L., Haugen M., Julshamn K., Alexander J., Meltzer H.M. (2009). Evaluation of urinary iodine excretion as a biomarker for intake of milk and dairy products in pregnant women in the Norwegian mother and child cohort study (MoBa). *Eur. J. Clin. Nutr.* 63:347-54.



## 5.2 Articles ou rapports de synthèse sur l'évaluation des risques liés au BPA

Le GT BPA a examiné les articles et les rapports de synthèse sur l'évaluation des risques liés au BPA listés ci-dessous. Compte tenu de la nature de ces données, elles ne sont pas résumées dans cette annexe.

Ces données ont permis de dresser un panorama des diverses positions internationales relative à l'estimation des risques liés au BPA et d'identifier les points critiques au sein de la communauté scientifique (métabolisme chez l'homme et plus particulièrement chez le nouveau-né, adéquation des tests standardisés de toxicologie pour caractériser la toxicité des composés perturbateurs endocriniens, hypothèse d'une relation dose-réponse non linéaire et d'une toxicité plus importante aux faibles doses).

### **Risk to all or none? A comparative analysis in the health risk assessment of bisphenol A**

Beranius A., Ruden C., Hakansson H., Hanberg A., *Reproductive Toxicology* (2010) 29: 132–146.

### **Health risk assessment procedures of endocrine disrupting compounds within different regulatory frameworks in the European Union**

Beranius A., Ruden C., Hanberg A., Hakansson H., *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (2009) 55: 111-122.

### **A CASCADE of effects of bisphenol A**

Bondesson M., Jönsson J., Pongratz I., Olea N., Cravedi J.P., Zalko D., Håkansson H., Halldin K., Di Lorenzo D., Behl C., Manthey D., Balaguer P., Demeneix B., Fini J.B., Laudet V., Gustafsson J.A. *Reproductive Toxicology* (2009) 28: 563-567.

### **Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A ?**

Ginsberg G. and Rice D.C., *Environmental Health Perspectives* (2009) 117: 1639-1643.

### **Bisphenol A workshop of German Federal Environment Agency – March 30-31, 2009. Work group report: public health issues of bisphenol A.**

Gies A., Heinzow B., Dieter H.H., Heindel J., *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (2009) 212: 693-696.

### **BPA: traditional toxicology testing is inadequate and concerns extend beyond aneuploidy.**

Hunt P.A. and Hassold T. *Trends in Genetics* (2009) 25: 15-16.

### **Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A.**

Myers J.P., vom Saal F.S., Akingbemi B.T., Arizono K., Belcher S., Colborn T., Chahoud I., Crain D.A., Farabollini F., *et al. Environmental Health Perspectives* (2009) 114: 309-315.

### **Evidence on the developmental and reproductive toxicity of bisphenol A**

OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency, Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch), Draft May 2009 (297 p), version finale d'octobre 2009 (302 p) et analyses des commentaires issus de la consultation publique.

### **Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure**

Vom Saal F.S., *Reproductive Toxicology* (2007) 24: 131–138.

### **References from the published scientific literature concerning bisphenol A, focusing on “low dose” *in vivo* effects, molecular mechanisms based primarily on *in vitro* studies, sources of exposure and pharmacokinetics**

Vom Saal F.S., August 2008, 164p, <http://endocrinedisruptors.missouri.edu/vomsaal/vomsaal.html>

## Abréviations

---

Afssa : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
AJMT : Apport Journalier Maximum Estimé  
BPA : Bisphénol A  
BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire  
CEDI : Cumulative Estimated Daily Intake (apport journalier cumulé estimé)  
DES : Diéthylstilbestrol  
DJT : Dose Journalière Tolérable  
EE2 : Ethinyl œstradiol  
EFSA : Autorité Européenne de Sécurité Sanitaire des Aliments  
ER : Récepteur œstrogénique  
F1 : 1<sup>ère</sup> génération  
F2 : 2<sup>ème</sup> génération  
F3 : 3<sup>ème</sup> génération  
GC : gas chromatography (chromatographie en phase gazeuse)  
GD : Gestational day (jour de gestation)  
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone (gonadolibérine)  
GT BPA : Groupe de Travail « Bisphénol A » de l'Afssa  
HPLC : High performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)  
LOAEL : Lowest observed adverse effect level (Dose minimale avec effet nocif observé)  
MCDA : Matériaux au Contact des Denrées Alimentaires  
MOE : Margin Of Exposure (Marge d'exposition)  
MS : Mass spectrometry (spectrométrie de masse)  
NOAEL : No observed adverse effect level (Dose sans effet nocif observé)  
PC : Polycarbonate  
p.c. : poids corporel  
PE : Perturbateur Endocrinien  
PND : Postnatal Day (jour après la naissance)  
SNC : Système Nerveux Central  
US-FDA : U.S. Food and Drug Administration

## Références bibliographiques analysées

- American Chemistry Council (2009). DNT study: A dietary developmental neurotoxicity study of bisphenol in rats, WIL-186056, September 2009, 4796p.
- Aydođan M., Korkmaz A., Barlas N., Kolankaya D. (2009). Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug Chem Toxicol.* 1-11. doi: 10.3109/01480540903286468.
- Becker K., Göen T., Seiwert M., Conrad A., Pick-Fuß H., Müller J., Wittassek M., Schulz C., Kolossa-Gehring M. (2009). GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212: 685–692.
- Bendito M.D., Bravo S.R., Lunar Reyes M.L., Garcia Prieto A. (2009). Determination of bisphenol A in canned fatty foods by coacervative microextraction, liquid chromatography and fluorimetry. *Food Addit Contam.* 26: 265-274.
- Beronius A., Ruden C., Hanberg A., Hakansson H. (2009). Health risk assessment procedures of endocrine disrupting compounds within different regulatory frameworks in the European Union. *Regul Toxicol Pharmacol.* 55(2):111-22.
- Beronius A., Ruden C., Hakansson H., Hanberg A. (2010). Risk to all or none? A comparative analysis in the health risk assessment of bisphenol A, *Reprod. Toxicol.* 29: 132–146.
- Biedermann-Brem S., Grob K., Fjeldal P. (2008). Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: mechanisms of formation and investigation of worst case scenarios. *Eur. Food Res. Technol.* 227: 1053-1060.
- Biedermann-Brem S. and Grob K. (2009). Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: water hardness as the most relevant factor *Eur. Food Res. Technol.* 228: 679-684.
- Bondesson M., Jönsson J., Pongratz I., Olea N., Cravedi J.P., Zalko D., Håkansson H., Halldin K., Di Lorenzo D., Behl C., Manthey D., Balaguer P., Demeneix B., Fini J.B., Laudet V., Gustafsson J.A. (2009). A CASCADE of effects of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 28(4):563-7.
- Bosquiaz V.L., Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. (2010). Effects of Neonatal Exposure to Bisphenol A on Steroid Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Endothelial Cell Proliferation in the Adult Rat Uterus. *Biol. Reprod.* 82(1):86-95.
- Braniste V., Jouault A., Gaultier E., Polizzi A., Buisson-Brenac C., Leveque M., Martin P.G., Theodorou V., Fioramonti J., Houdeau E. (2010). Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(1):448-53.
- Braun J.M., Yolton K., Dietrich K.N., Hornung R., Ye X., Calafat A.M., Lanphear B.P. (2009). Prenatal Bisphenol A Exposure and Early Childhood Behavior. *Environ. Health Perspect.* 117 (12): 1945-1952.
- Brede C., Fjeldal P., Skjevraak I., Herikstad H. (2003). Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam.* 20: 684–689.
- Calafat A.M., Weuve J., Ye X., Jia L.T., Hu H., Ringer S., Huttner K., Hauser R. (2009). Exposure to Bisphenol A and Other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants. *Environ. Health Perspect.* 117: 639-644.
- Cao X.-L. and Corriveau J. (2008). Migration of Bisphenol A from Polycarbonate Baby and Water Bottles into Water under Severe Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6378–6381.
- Cao XL, Corriveau J, Popovic S. (2009a). Levels of bisphenol A in canned soft drink products in Canadian markets. *J Agric Food Chem.* 57(4):1307-11.
- Cao XL, Corriveau J, Popovic S. (2009b). Migration of bisphenol A from can coatings to liquid infant formula during storage at room temperature. *J Food Prot.* 72(12): 2571-4.
- Cao XL, Corriveau J, Popovic S, Clement G, Beraldin F, Dufresne G. (2009c). Bisphenol A in baby food products in glass jars with metal lids from Canadian markets. *J Agric Food Chem.* 57(12):5345-51.
- Cao XL, Dufresne G, Belisle S, Clement G, Falicki M, Beraldin F, Rulibikiye A.,(2008). Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *J Agric Food Chem.* 56(17):7919-24
- Carwile J.L., Luu H.T., Bassett L.S., Driscoll D.A., Yuan C., Chang J.Y., Ye X., Calafat A.M., Michels K.B. (2009). Polycarbonate Bottle Use and Urinary Bisphenol A Concentrations. *Environ. Health Perspect.* 117: 1368-1372.
- De Coensel N., David F., Sandra P. (2009). Study on the migration BPA from baby bottles by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS. *J. Sep. Sci.* 32: 1-8.
- Dutch Food and Consumer Product Safety Authority, June 2005. Report no. ND05o410, Migration of BPA and plasticizers from plastic feeding utensils for babies.
- Ehlert K.A., Beumer C.W.E., Groot M.C.E. (2008). Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Addit. Contam.* 25: 904–910.
- Fernández M., Bianchi M., Lux-Lantos V., Libertun C. (2009). Neonatal Exposure to Bisphenol A Alters Reproductive Parameters and Gonadotropin Releasing Hormone Signaling in Female Rats. *Environ. Health Perspect.* 117: 757-762.
- Geens T, Neels H, Covaci A. (2009a). Sensitive and selective method for the determination of bisphenol-A and triclosan in serum and urine as pentafluorobenzoate-derivatives using GC-ECNI/MS. *J. Chrom B* 877(31): 4042-4046.
- Geens T., Roosens L., Neels H., Covaci A. (2009b). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 76: 755–760.
- Gies A., Heinzow B., Dieter H.H., Heindel J. (2009). Bisphenol A workshop of German Federal Environment Agency – March 30-31, 2009. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 212: 693-696.

- Ginsberg G. and Rice D.C. (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A ?. *Environ. Health Perspect.*, 117(11):1639-43.
- Howdeshell K.L., Furr J., Lambright C.R., Wilson V.S., Ryan B.C., Gray Jr L.E. (2008). Gestational and Lactational Exposure to Ethinyl Estradiol, but not Bisphenol A, Decreases Androgen-Dependent Reproductive Organ Weights and Epididymal Sperm Abundance in the Male Long Evans Hooded Rat. *Toxicol Sci.* 102(2): 371–382.
- Hunt P.A. and Hassold T. (2009). BPA: traditional toxicology testing is inadequate and concerns extend beyond aneuploidy. *Trends in Genetics* 25 (1): 15-16.
- Izzotti A., Kanitz S., D'Agostini F., Camoirano A., De Flora S. (2009). Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. *Mutat Res.* 679(1-2):28-32.
- Klecka G.M., Staples C.A., Clark K.E., van der Hoeven N., Thomas D.E., Hentges S.G. (2009). Exposure Analysis of Bisphenol A in Surface Water Systems in North America and Europe. *Environ. Sci. Technol.* 43: 6145–6150.
- Kubwabo C., Kosarac I., Stewart B., Gauthier B.R., Lalonde K., Lalonde P.J. (2009). Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam.* 26: 928–937.
- Le H.H., Carlson E.M., Chua J.P., Belcher S.M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Letters* 176: 149–156.
- Li D., Zhou Z., Qing D., He Y., Wu T., Miao M., Wang J., Weng X., Ferber J.R., Herrinton L.J., Zhu Q., Gao E., Checkoway H., Yuan W. (2010). Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of Self-Reported Male Sexual Dysfunction *Hum Reprod.* 25(2):519-27.
- Maia J., Cruz J.M., Sendón R., Bustos J., Sanchez J.J., Paseiro P. (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International* 42: 1410–1414.
- Maragou N.C., Makri A., Lampi E.N., Thomaidis N.S., Koupparis M.A. (2008). Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Addit Contam.* 25: 373–383.
- Mariscal-Arcas M., Rivas A., Granada A., Monteagudo C., Murcia M.A., Olea-Serrano F. (2009). Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem. Tox.* 47: 506-510.
- Monje L., Varayoud J., Munoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. (2009). Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. *Reprod. Toxicol.* 28(4):435-42.
- Murray T.J., Maffini M.V., Ucci A.A., Sonnenschein C, Soto A.M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod. Toxicol.* 23:383-390.
- Myers J.P., vom Saal F.S., Akingbemi B.T., Arizono K., Belcher S., Colborn T., Chahoud I., Crain D.A., Farabolini F., Guillette L.J. Jr, Hassold T., Ho S.M., Hunt P.A., Iguchi T., Jobling S., Kanno J., Laufer H., Marcus M., McLachlan J.A., Nadal A., Oehlmann J., Olea N., Palanza P., Parmigiani S., Rubin B.S., Schoenfelder G., Sonnenschein C., Soto A.M., Talsness C.E., Taylor J.A., Vandenberg L.N., Vandenberg J.G., Vogel S., Watson C.S., Welshons W.V., Zoeller R.T. (2009). Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A. *Environ. Health Perspec.*, 114: 309-315.
- Nakagami A., Negishi T., Kawasaki K., Imai N., Nishida Y., Ihara T., Kuroda Y., Yoshikawa Y., Koyama T. (2009). Alterations in male infant behaviors towards its mother by prenatal exposure to bisphenol A in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) during early suckling period. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 1189-1197.
- OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency, Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch), Evidence on the developmental and reproductive toxicity of bisphenol A. Draft May 2009 (297 p), version finale d'octobre 2009 (302p) et commentaires issus de la consultation publique.
- Palanza P., Gioiosa L., vom Saal S.F., Parmigiani S. (2008). Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. *Environmental Research* 108: 150–157.
- Ryan B.C., Hotchkiss A.K., Crofton K.M., Gray E.A. (2010). In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility and anatomy of female LE rats. *Toxicol Sci.* 114(1):133-48.
- Salian S., Doshi T., Vanage G. (2009). Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male offspring perinatally exposed to bisphenol A. *Life Science*, 85: 11-18.
- Salian S., Doshi T., Vanage G. (2009). Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 265(1-2):56-67.
- Salian S., Doshi T., Vanage G. (2009). Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 85(21-22):742-52.
- Sargis R., Johnson D., Choudhury R., Brady M. (2009) Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity* (in press, doi:10.1038/oby.2009.419).
- Somm E., Schwitzgebel V.M., Toulotte A., Cederroth C.R., Combesure C., Nef S., Aubert M.L., Hüppi P. (2009). Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. *Environ. Health Persp.*, 117:1549-1555.
- Vom Saal F.S. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure *Reproductive Toxicology* 24: 131–138.
- Von Saal F.S. (2008). References from the published scientific literature concerning bisphenol A, focusing on “low dose” in vivo effects, molecular mechanisms based primarily on in vitro studies, sources of exposure and pharmacokinetics., 164p posted on <http://endocrinedisruptors.missouri.edu/vomsaal/vomsaal.html>

Ye X., Pierik F.H., Angerer J., Meltzer H.M., Jaddoe V.W.V., Tiemeier H., Hoppin J.A., Longnecker M.P. (2009). Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212: 481–491.

### Autres références

- Afssa (2008a). Avis du 24 octobre 2008 relatif au Bisphénol A dans les biberons en polycarbonate susceptibles d'être chauffés au four à micro-ondes.
- Afssa (2008b). Avis du 21 novembre 2008 relatif à l'évaluation des expositions et des risques sanitaires liés au Bisphénol A dans l'eau destinée à la consommation humaine.
- Afssa (2009). Note du 7 juillet 2009 relative à la publication de Stahlhut et al. (2009) sur l'élimination urinaire du Bisphénol A chez l'homme.
- Alyea R.A. and Watson C.S. (2009). Differential regulation of dopamine transporter function and location by low concentrations of environmental estrogens and 17 $\beta$ -estradiol. *Environ. Health Perspect.* 117:778–783.
- Andrade A.J.M., Grande S.W., Talsness C.E., Grote K., Chahoud. I (2006). A dose–response study following *in utero* and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227: 185-192.
- Adugamov L.F. and Chernikov M.P. (1985). Study of protein synthesis regulating hormones in human milk, *Probl. Endokrinol. (Mosk)*. 31(1):31-3.
- Andrewa M.N., Dunstana R.H., O'Connorb W.A., Van Zwienc L., Nixona B., MacFarlanea G.R. (2008). Effects of 4-nonylphenol and 17 $\beta$ -ethynylestradiol exposure in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*: Vitellogenin induction and gonadal development. *Aquatic Toxicology* 88: 39–47.
- Benotti M.J., Trenholm R.A., Vanderford B.J., Holady J.C., Stanford B.D., Snyder S.A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 43: 597–603.
- Brantsaeter A.L., Haugen M., Julshamn K., Alexander J., Meltzer H.M. (2009). Evaluation of urinary iodine excretion as a biomarker for intake of milk and dairy products in pregnant women in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Eur. J. Clin. Nutr.* 63(3):347-354.
- Cagen S.Z., Waechter J.M.Jr., Dimond S.S., Breslin W.J., Butala J.H., Jekat F.W., Joiner R.L., Shiotsuka R.N., Veenstra G.E., Harris L.R. (1999). Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30: 130-9.
- CDC (2008). National Health and Nutrition Examination Survey Data. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Hyattsville, MD. Available from <http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/datalink.htm>, accessed on 22-Jan-2010.
- Courant F., Antignac J.P., Maume D., Monteau F., Andre F., Le Bizec B. (2007). Determination of naturally occurring oestrogens and androgens in retail samples of milk and eggs. *Food Addit. Contam.* 24:1358–1366.
- Daxenberger A., Ibarreta D., Meyer H.H.D. (2001). Possible health impact of animal oestrogens in food. *Hum. Reprod. Update* 7:340–355
- Dekant, W., Völkel, W. (2008). Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 228 (1): 114-134.
- EFSA (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A) question number EFSA-Q-2005-100, adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* 428: 1-75.
- EFSA (2008). Toxicokinetics of Bisphenol A. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC), question number EFSA-Q-2008-382, adopted on 9 July 2008. *The EFSA Journal* 759: 1-10.
- Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kiguchi, M., Ikka, T., and Harazono, A. (2001). Rat two generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol* 15, 505-23.
- Falconer I. R. (2006). Are endocrine disrupting compounds a health risk in drinking water? *Int. J. Environ. Res. Public Health* 3(2): 180-184.
- FDA (2008). Draft Assessment of Bisphenol A for Use In Food Contact Applications (Draft version 08/14/2008), 105 p.
- Gioiosa L., Fissore E., Ghirardelli G., Parmigiani S., Palanza P. (2007). Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm. Behav.* 52: 307-16.
- Howdeshell K.L., Peterman P.L., Judy B.M., Taylor J.A., Orazio C.E., Ruhlen R.L., vom Saal F.S., Welshons W. V. (2003). Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ. Health Perspect.* 111: 1180–1187.
- Jaddoe V.W., Mackenbach J.P., Moll H.A., Steegers E.A., Tiemeier H., Verhulst F.C., Witteman J.C., Hofman A. (2006). The generation R study: design and cohort profile. *Eur. J. Epidemiol.* 21(6): 475-484.
- Jakacka M., Ito M., Weiss J., Chien P.Y., Gehm B.D., Jameson J.L. (2001). Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J. Biol. Chem.* 276(17): 13615-21.
- Jobling S., Burn R.W., Thorpe K., Williams R., Tyler C. (2009). Statistical modeling suggests that antiandrogens in effluents from wastewater treatment works contribute to widespread sexual disruption in fish living in English rivers, *Environ. Health Perspect.* 117: 797–802.

- Kang J-H. and Kondo F. (2003). Determination of Bisphenol A in Milk and Dairy Products by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Food Prot.* 66(8): 1439-1443.
- Kersting M., Alexy U., Sichert, Hellert W., Manz F., Schoch G. (1998). Measured consumption of commercial infant food products in German infants: results from the DONALD study. Dortmund Nutritional and Anthropometrical Longitudinally Designed. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27: 547-552.
- Klimish H.J., Andrae M., Tillman U. (1997). A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. *Regul. Toxicol. Pharm.* 25: 1-5.
- Klinge C.M., Risinger K.E., Watts M.B., Beck V., Eder R., Jungbauer A. (2003). Estrogenic activity in white and red wine extracts. *J. Agric. Food Chem.* 51:1850–1857.
- Kuch H.M. and Ballschmiter K. (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.* 35(15):3201-6.
- Lakind, J.S. and Naiman, D.Q. (2008.) Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: estimates from the 2003–2004 NHANES urinary BPA data. *J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol.* 18: 608-615.
- Legler J. (2001). Development and application of reporter gene assays for the assessment of (xeno-)estrogenic compounds in the aquatic environment. PhD thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands., 132 pp.
- Leskinen P., Michelini E., Picard D., Karp M., Virta M. (2005). Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere* 61(2): 259–266.
- Longnecker M.P. (2009), Human Data on Bisphenol A and Neurodevelopment, *Environ. Health Persp.*, 117(12): A531-A532.
- Melnick R., Lucier G., Wolfe M., Hall R., Stancel G., Prins G., Gallo M., Reuhl K., Ho S.M., Brown T., Moore J., Leakey J., Haseman J., Kohn M. (2002). Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ. Health Perspect.* 110(4): 427-31.
- McNeal T.P., Biles J.E., Begley T.H., Craun J.C., Hopper M.L., Sack C.A. (2000). Determination of suspected endocrine disruptors in foods and food packaging. In: *Analysis of Environmental Endocrine Disruptors*, Vol. 747, pp 33–52. American Chemical Society, Washington.
- Merrel K.W. and Harlacher J.E. (2008), Behavior Rating Scales, In: *Personality Assessment*, Archer R. P, Smith S.R. Ed., Routledge, pp 247-280.
- Munoz-de-Toro M., Markey C.M., Wadia P.R., Luque E.H., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146 : 4138-4147.
- Murk A.J., Legler J., van Lipzig M.M., Meerman J.H., Belfroid A.C., Spenkelink A., van der Burg B., Rijs G.B., Vethaak D. (2002). Detection of estrogenic potency in waste water and surface water with three in vitro bioassays. *Environ Toxicol Chem* 21(1): 16-23.
- Narbonne J.F., Clerandau C., Minier C., Morin B. and Besselink H., Screening of oestrogen-like activity in tap and mineral drinking waters, Bio-Detectors Workshop 2009. Amsterdam 24 and 25 September 2009.
- Narita S., Goldblum R.M., Watson C.S., Brooks E.G., Estes D.M., Curran E.M., Midoro-Horiuti T. (2007). Environmental Estrogens Induce Mast Cell Degranulation and Enhance IgE-mediated Release of Allergic Mediators. *Environ. Health Persp.* 115:48–52.
- NTP (2008). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A, September 2008, NIH Publication No. 08 – 5994, 321p.
- Otaka H., Yasuhara A., Morita M., (2003). Determination of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in Human Milk Using Alkaline Digestion and Cleanup by Solid-Phase Extraction, *Analytical Sciences* 19: 1663-1666.
- Promberger A., Dornstauder E., Fruhwirth C., Schmid E.R., Jungbauer A. (2001). Determination of estrogenic activity in beer by biological and chemical means. *J. Agric. Food Chem.* 49: 633–640.
- Routledge, EJ and JP Sumpter, (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 241-248
- Rudel R.A., Camann D.E., Spengler J.D., Korn L.R., Brody J.G. (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ. Sci. Technol.* 37: 4543–4553.
- Ruhlen R.L., Howdeshell K.L., Mao J., Taylor J.A., Bronson F.H., Newbold R.R., Welshons W.V., vom Saal F.S. (2008). Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the "fetal estrogenization syndrome" and obesity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect.* 116(3): 322-8.
- Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L. (2007). Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds *Sci. Total Environ.* 377 (2-3), pp. 255-272.
- Sun Y., Irie M., Kishikawa N., Wada M., Kuroda N., Nakashima K. (2004). Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 18: 501-7.
- Takamura-Enya T., Ishihara J., Tahara S., Goto S., Totsuka Y., Sugimura T., Wakabayashi K. (2003) Analysis of estrogenic activity of foodstuffs and cigarette smoke condensates using a yeast estrogen screening method. *Food Chem. Toxicol.* 41: 543–550.
- Taskeen A. and Naeem I. (2009), Bisphenol A Toxicity in milk: A Review, *Nature and Science* 7: 83-85.
- Taylor J.A., Welshons W.V., vom Saal F.S. (2008). No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24h after administration in neonatal female mice. *Reprod Toxicol.* 25(2):169-76.

- Thomson B.M. and Grounds P.R. (2005). Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Addit. Contam.* 22(1): 65-72.
- Tinwell H., Haseman J., Lefevre P.A., Wallis N., Ashby J. (2002). Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol. Sci.* 68: 339-48.
- Tsai, W.-T. (2006). Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: A review. *J. Environ. Sci. Health – part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol.* 24 (2): 225-255.
- Tyl R.W., Myers C.B., Marr M.C., Castillo N.P., Seely J.C., Sloan C.S., Veselica M.M., Joiner R.L., Van Miller J.P., Simon G.S. (2006). Three-generation evaluation of dietary para-nonylphenol in CD (Sprague-Dawley) rats. *Toxicol. Sci.* 92: 295-310.
- Tyl R. W., Myers C. B., Marr M.C., Thomas B.F., Keimowitz A.R., Brine D.R., Veselica M.M., Fail P.A., Chang T.Y., Seely J.C., Joiner R.L., Butala J.H., Dimond S.S., Cagen S.Z., Shiotsuka R.N., Stropp G.D., Waechter J.M. (2002). Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 68, 121-46.
- Van der Linden S.C., Heringa M.B., Man Ha-Y., Sonneveld E., Puijker L.M., Brouwer A., van der Burg B. (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol* 42: 5814-5820.
- Volkel W., Kiranoglu M., Fromme H. (2008). Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol. Lett.* 179, 155–162.
- Vom Saal F., Timms B.G., Montano M.M., Palanza P., Thayer K.A., Nagel S.C., Dhar M.D., Ganjam V.K., Parmigiani S., Welshons W.V. (1997). Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 2056-61.
- Weiss J., Bernhardt M.L., Laronda M.M., Hurley L.A., Glidewell-Kenney C., Pillai S., Tong M., Korach K.S., Jameson J.L. (2008). Estrogen actions in the male reproductive system involve estrogen response element-independent pathways. *Endocrinol.* 149(12): 6198-206.
- Wilson, N.K., Chuang, J.C., Morgan, M.K., Lordo, R.A., Sheldon, L.S. (2007). An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ.Res.*103 (1): 9-20.
- Welshons W.V., Thayer K.A., Judy B.M., Taylor J.A., Curran E.M., vom Saal F.S. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ. Health Persp.* 111: 994-1006.
- Wenzel A., Müller J., Ternes T., Study on endocrine disrupters in drinking water Final Report ENV.D.1/ETU/ 2000/0083 February 26, 2003
- Wolford S.T. and Argoudelis C.J. (1979). Measurement of estrogens in cow's milk, human milk and dairy products, *J. Dairy Science* 62:1458-1463
- Ye X., Kuklennyk Z., Needham L.L., Calafat A.M. (2006). Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 831(1-2):110-5.