

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 7 août 2015

## **AVIS**

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

**relatif à à l'auto-saisine 2015-SA-0001**

**« Analyse des résultats de l'étude récente de toxicité du Bisphénol A (BPA) administré par gavage à des rats Sprague Dawley exposés du 6<sup>ème</sup> jour de gestation au 90<sup>ème</sup> jour post-natal et publiée dans Toxicological Sciences (Delclos et al., 2014) »**

---

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

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

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

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

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses s'est autosaisie le 23 décembre 2014 pour la réalisation de l'expertise suivante : « analyse des résultats de l'étude récente de toxicité du Bisphénol A (BPA) administré par gavage à des rats Sprague Dawley exposés du 6<sup>ème</sup> jour de gestation au 90<sup>ème</sup> jour après la naissance et publiée dans Toxicological Sciences (Delclos et al., 2014) ».

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

L'Agence a été saisie le 9 juin 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) afin d'évaluer les risques sanitaires (ERS) liés à l'exposition à des substances reprotoxiques de catégorie 3<sup>1</sup> (R3) (selon la directive 67/548/CEE<sup>2</sup>) et/ou perturbatrices endocriniennes (PE) présentes dans des produits de consommation mis sur le marché en France. Cette expertise vise la population générale, incluant les populations vulnérables, et les personnes en milieu de travail manipulant des produits de consommation dits « grand public » du fait de leur activité professionnelle (hors fabrication, transformation, distribution et élimination).

Dans ce contexte, l'Anses a publié en 2013 un avis relatif à : « l'évaluation des risques liés au Bisphénol A (BPA) pour la santé humaine et aux données toxicologiques et d'usage des bisphénols S, F, M, B, AP, AF, et BADGE » concernant les risques du bisphénol A (BPA) pour la

---

<sup>1</sup> Les substances classées reprotoxiques de catégorie 3 selon la directive 67/548/CEE sont désormais classées toxiques pour la reproduction de catégorie 2 selon le règlement (CE) n° 1272/2008 ou CLP (Classification, Labelling, Packaging). Dans ce document, la classification est indiquée selon le règlement CLP.

<sup>2</sup> Directive [67/548/CEE](#) du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses

santé humaine prenant en compte non seulement les expositions liées aux produits de consommation mais aussi celles en lien avec d'autres milieux (eaux de boisson, denrées alimentaires, poussières domestiques, air). Cet avis résulte des travaux d'expertise réalisés par un groupe de travail dédié « perturbateurs endocriniens et reprotoxiques de catégorie 3 » (GT PE) mis en place par l'Anses en 2010. Le rapport d'expertise sur les effets sanitaires du BPA produit par le GT PE a été soumis à plusieurs collectifs d'experts de l'Anses et validé par le Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » en février 2013 (Anses, 2013).

Dans le rapport d'expertise de l'Anses publié en mars 2013 portant sur les risques du BPA pour la santé humaine, les experts recommandaient de suivre les résultats des travaux conduits sous l'égide du National Toxicology Program (NTP) et financés dans le cadre d'un programme conjoint Food and Drug Administration/National Institute of Environmental Health Sciences (US) (FDA/NIEHS) en vue, le cas échéant, de revoir les conclusions de l'expertise de l'Anses. L'article publié par Delclos *et al.*, en février 2014 intitulé « *Toxicity evaluation of Bisphenol A administered by gavage to Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90* » rapporte de façon succincte les résultats de l'étude de l'U.S.FDA/NCTR, 2013.

L'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 est une étude animale de grande envergure d'exposition continue au BPA du sixième jour de gestation (GD6) jusqu'au 90<sup>ème</sup> jour après la naissance, date à laquelle un certain nombre d'animaux est euthanasié et les tissus prélevés. Elle répond aux critères de Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et suit les lignes directrices propres au NTP. L'étude comprend une large gamme de doses testées (2,5 – 8 – 25 – 80 – 260 – 840 – 2 700 – 100 000 – 300 000 µg/kg pc/j) administrées par gavage gastrique (mères ou jeunes après 5 jours) ou buccal pour les nouveau-nés à partir du premier jour après la naissance. Cette étude descriptive repose essentiellement sur l'observation de critères globaux morpho-histologiques et biochimiques. Deux groupes témoins positifs de caractérisation d'effets œstrogéniques ont été inclus dans l'étude : traitement à l'éthinylœstradiol (EE2) à 0,5 et 50 µg/kg pc/j. Deux groupes témoins négatifs ont également été inclus (véhicule<sup>3</sup> et sans traitement).

L'Anses a décidé de s'autosaisir pour analyser cette étude en vue, notamment, d'évaluer si les nouvelles données de l'U.S.FDA/NCTR, 2013 sont de nature à influencer les conclusions de l'expertise collective de l'Anses, 2013. Cette étude a par ailleurs été évaluée par l'EFSA (EFSA, opinion 2015). Les données de Churchwell *et al.*, 2014 complètent l'étude de l'U.S.FDA/NCTR, 2013 sur le versant de la toxico-cinétique du BPA. Cette publication a également été soumise à l'évaluation des experts rapporteurs mandatés par l'Anses.

## 2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Substances ». L'Anses a confié l'expertise à plusieurs experts rapporteurs du groupe de travail « perturbateurs endocriniens et reprotoxiques de catégorie 3 » ayant des compétences en toxicologie, en particulier des experts spécialistes des effets sur la glande mammaire, les systèmes reproducteurs mâle et femelle et les maladies métaboliques. Les travaux ont été présentés au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques le 11 juin 2015. Ils ont

<sup>3</sup> *Vehicle control* correspondant au groupe contrôle négatif ayant reçu le véhicule ou diluant.

été adoptés par le CES « Substances » le 30 juin 2015. Chaque expert a été mandaté pour expertiser une partie précise du rapport l'U.S.FDA/NCTR, 2013 sur le bisphénol A.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

Les résultats de l'expertise présentés ci-après reprennent les commentaires des experts. Ils portent sur des points particuliers du rapport de l'U.S.FDA/NCTR, 2013; également soumis et évalué par l'EFSA (EFSA opinion 2015). Les données de Churchwell *et al.*, 2014 complétant l'étude de l'US FDA/NCTR, 2013 sur le versant de la toxicocinétique du BPA ont également été soumises à l'évaluation des experts rapporteurs mandatés par l'Anses. Ces nouvelles données sont analysées car elles sont susceptibles d'influencer l'interprétation des résultats rapportés dans le rapport de l'U.S.FDA/NCTR, 2013.

Le présent avis n'a pas pour objet de présenter une expertise complète des effets sanitaires du BPA, mais de mettre en perspective les résultats des études de l'U.S. FDA/NCTR, 2013 avec les travaux d'expertise déjà réalisés par l'Anses sur le BPA.

Ainsi les questions posées dans le cadre de cette expertise sont les suivantes :

**- concernant l'identification des effets du BPA sur la santé humaine :**

Selon la démarche de catégorisation des effets du BPA sur la santé humaine telle que présentée dans les rapports d'expertise de l'Anses (2011, 2013), les effets suivants ont été considérés avérés chez l'animal et utilisés pour l'évaluation des risques du BPA.

- Effets sur la glande mammaire
- Effets sur le système reproducteur féminin
- Effets sur le métabolisme et l'obésité
- Effets sur le cerveau et le comportement

Au vu des résultats du rapport de l'U.S.FDA/NCTR, 2013, ces effets sont-ils toujours pertinents à considérer pour l'ERS du BPA ?

**- concernant la relation dose-réponse et le choix de la valeur repère à utiliser pour l'évaluation des risques.**

Au vu des résultats de l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013, et notamment des effets observés sur la glande mammaire et le système reproducteur femelle, les doses critiques sélectionnées dans l'expertise de l'Anses (2013) en vue de dériver les valeurs repères utilisées pour l'ERS sont-elles toujours pertinentes ?

**- concernant les effets du BPA aux faibles doses.**

Dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 les animaux ont été exposés par voie orale à une large gamme de doses de BPA allant de 2,5 à 2700 µg/kg/j et ont été comparés à deux groupes témoins négatifs de rats n'ayant pas été traités au BPA. Néanmoins, il ressort des dosages sanguins de BPA effectués sur des rats des différents groupes que les rats « témoins négatifs » étaient exposés au BPA. Ces résultats sont détaillés dans l'étude de Churchwell *et al.*, 2014.

Ainsi, se posait la question de savoir comment considérer ces observations dans le cadre de l'interprétation des résultats du rapport de l'U.S.FDA/NCTR, 2013 ?

**3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES « SUBSTANCES » ET DU GROUPE DE TRAVAIL « PERTURBATEURS ENDOCRINIENS »**

Cette étude a la particularité de caractériser l'exposition interne sérique (BPA conjugué et aglycone) des animaux. Ces résultats posent toutefois des difficultés d'interprétation des données rapportées, liées notamment à la présence de BPA chez les animaux témoins négatifs (situation prévisible concernant une substance ubiquitaire telle que le BPA et probablement commune à l'ensemble des études du même type). Les données d'exposition interne rapportées dans cette étude et publiée par Churchwell *et al.*, 2014 posent ainsi un questionnement relatif à la distinction des animaux témoins négatifs et des animaux exposés aux plus faibles doses, et *in fine* à l'interprétation des effets à ces faibles doses. Ces observations suggèrent que la colonie, dont proviennent les mères, a été constamment exposée au BPA, possiblement par l'intermédiaire des cages, des biberons et de la nourriture, exposition dont on ne peut exclure qu'elle puisse entraîner ou masquer un effet. Il est à noter toutefois, que le bruit de fond n'a été que très rarement contrôlé dans l'ensemble des études prises en compte par le GT PE lors de son expertise précédente (Anses, 2011 – 2013). Il n'est donc pas exclu que le même constat puisse s'appliquer à ces autres études.

**3.1. Aspects analytiques**

Les aspects analytiques de la méthodologie de mesure du niveau d'exposition interne en BPA, rapportés dans la publication de Churchwell *et al.*, 2014, ont été pris en considération par les experts.

Les auteurs de l'article ayant fait état d'une présence de BPA chez les animaux témoins, l'interprétation relative à l'absence d'effet observé pour les expositions à faibles doses a soulevé des interrogations de la part des experts. Le terme « contamination » n'est pas forcément le plus approprié pour qualifier cette présence de BPA résiduel parmi les témoins négatifs. Dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013, comme dans l'ensemble des études concernant cette substance, il s'agit en effet d'un bruit de fond, ou d'un niveau basal, qu'il est difficile de supprimer en-deçà d'une certaine limite. Ceci constitue une des caractéristiques connues et attendues pour une telle substance ubiquitaire. La problématique posée est donc celle de la caractérisation objective de ce niveau de bruit de fond et des conséquences de son interprétation. Cependant, cette étude a le mérite de l'avoir mesuré, ce qui ne doit pas être interprété négativement compte tenu de la rareté d'une telle prise en compte dans les autres études du même type.

D'autre part, les experts soulignent les efforts faits dans cette étude pour contrôler et caractériser ce « bruit de fond » en BPA. Les auteurs présentent de façon détaillée, les dispositions prises lors de la conduite de l'étude, les règles de décision mises en place à partir de cette caractérisation et

les qualités de la méthode analytique. Le traitement des valeurs de « blancs » n'est toutefois pas toujours explicité dans l'article de Churchwell *et al.*, 2014.

Du point de vue des experts, la méthodologie analytique, la qualité des données produites et le mode de rendu des résultats apparaissent donc adéquats et de bon niveau. Cependant, l'appréciation du détail des données de validation est rendue difficile par les renvois successifs à des références dans lesquelles ces aspects analytiques sont décrits. Ceci génère un manque de visibilité sur l'incertitude associée à chaque valeur mesurée, notamment dans la zone des doses les plus faibles. Le point critique le plus limitant de cette étude de Churchwell *et al.*, 2014 porte sur la variabilité des résultats, qui affecte directement l'interprétation de différences significatives entre les différents sous-groupes d'animaux, en particulier entre les témoins négatifs et les 3 premières doses (soit 2,5 - 8 et 25 µg/kg pc/j). Ainsi, les niveaux d'exposition réels n'ont pas été comparés aux valeurs des groupes témoins. De fait, on ne peut pas parler de limites analytiques pour cette étude mais plutôt de difficulté d'interprétation des résultats à faibles concentrations vis-à-vis du niveau basal observé dans les témoins négatifs.

En conclusion, en l'état des éléments apportés par l'étude de Churchwell *et al.*, 2014 la différence entre les niveaux d'imprégnation mesurés chez les animaux témoins négatifs et chez les animaux exposés aux trois plus faibles doses n'a pas fait l'objet d'une analyse statistique par les auteurs, ce qui limite l'interprétation associée aux effets toxicologiques recherchés à ces faibles doses.

### 3.2. Analyse statistique des données

Les analyses statistiques des lésions relevées par histopathologie aux jours 21 et 90 après la naissance ont été réalisées avec le test Poly-K (K fixé à 3). Le test Poly-k est une méthode fondée sur le test de tendance de Cochran-Armitage qui exploite l'effet suspecté pour améliorer la puissance statistique. A la suite du test Poly-K, deux autres méthodes statistiques ont été utilisées pour analyser les scores de sévérité des lésions : (i) un test couplant le test de Jonckheere-Terpstra (Jonckheere, 1954 ; Terpstra, 1952) et celui de Shirley-Williams (Shirley, 1977 ; Williams, 1986) et (ii) le test RTE (nonparametric relative treatment ; Brunner, Domhof, & Langer, 2002).

Le « *Technical University of Denmark* » (DTU, 2015) jugeant les analyses statistiques proposées par Delclos *et al.* (2014) correctes mais avec des choix trop conservateurs, une nouvelle analyse des données sur « l'hyperplasie des glandes mammaires » au jour 90 après la naissance a été effectuée en intégrant dans l'analyse seulement les femelles avec un score de sévérité de lésion  $\geq 2$  et en groupant le témoin « *naive control*<sup>4</sup> » et le groupe témoin « *vehicle control*<sup>5</sup> ». Avec cette nouvelle analyse, le DTU conclut à un accroissement statistiquement significatif du nombre de femelles présentant une hyperplasie des tissus mammaires à la dose de 80 µg/kg pc/j de BPA, mais sans observer de relation entre la dose et la réponse. L'absence de relation dose-réponse claire aux faibles doses peut être liée à une sensibilité limitée aux faibles doses et/ou à un résultat faux-positif.

Les experts considèrent que pour améliorer la puissance statistique (et donc diminuer le taux de faux négatifs), il serait souhaitable de regrouper les témoins, lorsque l'on peut supposer qu'il n'y a pas d'effet du véhicule sur le paramètre mesuré. Cependant, cette stratégie de tests statistiques, à savoir réaliser sept tests statistiques indépendants pour comparer le groupe témoin et chaque dose testée, peut conduire à des faux positifs (de 0 à 2 résultats faux positifs dans le cas d'une loi binomiale avec un  $p=0,05$ ,  $n=7$  et un risque alpha de 5%) sans correction des valeurs de p (par exemple, la correction de Bonferroni pour contrôler l'erreur de l'ensemble des tests statistiques).

<sup>4</sup> *Naive control* correspondant au groupe témoin négatif n'ayant pas reçu de véhicule ou diluant.

<sup>5</sup> *Vehicle control* correspondant au groupe témoin négatif ayant reçu le véhicule ou diluant.

Ainsi, il n'est pas possible de savoir si l'effet statistiquement significatif à la dose de 80 µg/kg pc/j mis en évidence par la ré-analyse conduite par le DTU est dû à un faux positif ou à l'amélioration de la puissance statistique.

En conclusion, la ré-analyse conduite par le DTU ne remet pas en cause l'analyse statistique initiale conduite par l'U.S.FDA/NCTR, 2013. Les experts considèrent que les outils de l'analyse statistique mis en œuvre par Delclos *et al.*, 2014 sont appropriés.

### 3.3. Effets sur la glande mammaire

Les effets d'une exposition chronique à différentes doses de BPA (2,5 - 2700 µg/kg pc/j et à des doses plus importantes de 100 000 - 300 000 µg/kg pc/j) depuis le jour 6 de la gestation (GD6) sont analysés sur des glandes mammaires de rats mâles et femelles au stade juvénile (sevrage, correspondant au jour 21 après la naissance) pour visualiser les effets d'une exposition néonatale, et à l'âge adulte (au jour 90 après la naissance), c'est-à-dire en période d'activité génitale.

L'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 n'utilise ni la terminologie ni les critères méthodologiques généralement utilisés pour analyser les effets des perturbateurs endocriniens sur la glande mammaire et utilisés dans les études précédemment retenues par l'Anses en 2013. Ces différences ne permettent pas la comparaison directe des résultats de cette étude avec les effets critiques pris en considération dans les études clés retenues par l'Anses en 2013.

Classiquement d'un point de vue méthodologique, les effets sur l'architecture et la morphométrie sont observés au sevrage (au jour 21 après la naissance) sur la 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> glande mammaire selon la technique de « glande étalée » (« *Whole Mount* ») couplée à un examen histologique. A l'âge adulte (au jour 90 après la naissance), l'analyse porte préférentiellement sur l'évaluation histologique de l'hyperplasie canalaire et dans certains cas de l'hyperplasie lobuloalvéolaire. Ainsi, l'analyse en « glande étalée » permet une meilleure évaluation, notamment en raison d'une meilleure sensibilité pour la quantification des structures relatives au développement mammaire et du fait de la présence de la totalité de la glande (par comparaison à l'analyse sur coupe histologique (Davis et Fenton, 2013). Cette procédure habituelle n'a pas été considérée dans le rapport U.S.FDA/NCTR, 2013. D'autres différences concernent la définition de l'hyperplasie canalaire ("*ductal hyperplasia*"). En effet, le terme d'hyperplasie canalaire employé dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013, au jour 21 et au jour 90 après la naissance, est défini par les auteurs comme une « augmentation relative du nombre de branchements canaux, incluant les bourgeons alvéolaires, par unité de surface » alors que la définition retenue par l'Anses en 2013 est fondée sur une augmentation du nombre de couches de cellules épithéliales des canaux (Durando *et al.*, 2007 ; Murray *et al.*, 2007).

Par ailleurs, aucune micrographie n'illustre les lésions d'« hyperplasie canalaire » sur coupe histologique dans le rapport de l'U.S.FDA/NCTR, 2013. Ce rapport de l'U.S.FDA/NCTR, 2013 ne mentionne pas d'analyse de prolifération. Enfin, aucune analyse n'est effectuée au jour 50 post-natal, période clé de développement de la glande mammaire (stade de maturité qui marque la fin de la puberté) et de sensibilité optimale à un carcinogène.

Ainsi, selon les experts, l'analyse de l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 limitée aux coupes histologiques (avec une seule coupe/glande) ne permet pas de conclure à un effet de type « hyperplasie canalaire », comme défini par les auteurs, mais plutôt à des modifications de la morphogénèse mammaire.

Au jour 21 après la naissance un test de tendance a été réalisé aux doses 2,5 à 2700 µg/kg pc/j chez les femelles. Celui-ci a révélé une « hyperplasie canalaire » statistiquement significative dans les groupes traités aux doses de 2700 µg BPA/kg/j et 100 000 µg/kg pc/j avec un degré de

sévérité minimal. Dans le groupe contrôle positif, l'EE2 n'a pas eu d'effet. Le BPA n'a pas eu d'effet sur la densité des bourgeons terminaux (*terminal end buds* ou TEBs). A l'inverse, chez le mâle, un effet de l'EE2 a été observé mais aucun effet du BPA sur l'hyperplasie canalaire, telle que définie par les auteurs, n'a été mis en évidence.

Au jour 90 après la naissance (stade jeune adulte), une augmentation significative de l'incidence de « l'hyperplasie canalaire » est rapportée chez les femelles uniquement à la plus forte dose de 300 000 µg/kg pc/j par rapport au groupe témoin négatif « ayant reçu le véhicule ». Cependant, les experts notent que, si l'incidence de lésions canalaire n'est pas augmentée à faible dose de BPA par rapport au groupe témoin, le score de sévérité est plus élevé particulièrement à 80, 260, 2700 et 100 000 µg/kg pc/j. Ces observations pourraient être prises en considération dans l'évaluation des risques du BPA.

Chez les femelles, la présence d'un adénocarcinome à 2,5 µg BPA/kg pc/j est rapportée. Cette dernière observation est en accord avec les résultats de l'étude de Acevedo *et al.* 2013 mais nécessite, pour pouvoir être prise en compte comme pouvant résulter d'un effet du BPA, de connaître l'incidence des adénocarcinomes chez les animaux Sprague-Dawley du groupe contrôle historique dans la souche utilisée.

Dans cette étude, le traitement avec l'EE2 chez le mâle entraîne des hyperplasies mammaires, canalaire (augmentation de l'incidence et la sévérité) et alvéolaires, aux deux doses d'EE2 (comparé au groupe témoin) à 0,5 et 5 µg d'EE2/kg pc/j. De plus, les effets du BPA observés aux doses 2,5 et 840 µg BPA/kg pc/j montrent une incidence significative d'hyperplasies canalaire.

### **Conclusion de l'expertise**

L'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 avait pour objectif de caractériser les effets du BPA, en particulier à des faibles doses, sur certains paramètres morphologiques de la glande mammaire au jour 21 et au jour 90 après la naissance. Le nombre important de doses de BPA, et les dosages internes du BPA sont les points fondamentaux de cette étude.

Cependant, un certain nombre d'imprécisions d'ordre méthodologique (conduisant en particulier à limiter la sensibilité de cette étude : absence d'analyse en glande étalée, du temps de prélèvement au cinquantième jour post-natal, de micrographie....) rendent difficile l'appréciation des doses à partir desquelles le BPA induit des lésions canalaire hyperplasiques.

### **3.4. Effets sur le système reproducteur femelle**

Cette étude descriptive repose essentiellement sur l'utilisation de critères globaux morpho-histologiques. Des anomalies de l'endomètre (notamment hyperplasie, métaplasie, kystes) et des ovaires (kystes, compte folliculaire) ont été recherchées par examen histologique. Des dosages hormonaux ont également été réalisés sur un seul prélèvement sanguin au jour 80 après la naissance chez des femelles en période d'œstrus. L'âge à l'ouverture vaginale a été déterminé. Le cycle œstral a été suivi sur la base d'analyses cytologiques quotidiennes de frottis vaginaux du jour 69 après la naissance au jour 90 après la naissance et du jour 150 à 170 après la naissance (en moyenne 5 cycles/animal). Ces effets ont été systématiquement observés uniquement aux deux plus fortes doses (100 000 et 300 000 µg/kg pc/j) et sont globalement similaires à ceux observés avec l'EE2.

Toutefois, un test de tendance suggère un effet traitement statistiquement significatif pour l'ensemble des plus faibles doses (de 2,5 à 2700 µg/kg pc/j) pour les anomalies du cycle œstral notamment des prolongations du diœstrus entre le jour 69 et 90 post-natal. Ponctuellement, l'incidence de certaines pathologies est plus élevée dans des groupes isolés (par exemple une

augmentation significative de l'incidence de l'hyperplasie endométriale kystique dans le groupe traité à 8 µg/kg pc/j).

Les critères morpho-anatomiques utilisés dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 pour caractériser les anomalies de l'appareil génital femelle sont globaux et moins précis que ceux décrits dans les études sur lesquelles l'expertise de l'Anses s'est appuyée précédemment et qui pouvaient comprendre par exemple une analyse morphométrique fine confortée par l'expression de biomarqueurs d'apoptose et/ou de prolifération cellulaire.

### **Conclusion de l'expertise**

Les quelques incertitudes sur la méthodologie, un niveau de résolution des paramètres pris en compte moins fins que pour les études clés précédemment identifiées par les experts et les incertitudes liées à la présence de BPA chez les animaux non traités et/ou à l'exposition des femelles F0 reproductrices, conduisent les experts à considérer que l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 ne permet pas, en l'état actuel, de remettre en cause les conclusions des experts concernant les effets du BPA sur l'appareil reproducteur femelle (Anses 2011, 2013).

### **3.5. Effets sur le métabolisme et l'obésité**

Bien que l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 ne portait pas spécifiquement sur le métabolisme et l'obésité en tant que tels, les paramètres suivants ont été étudiés : suivi du poids des animaux exposés, dosage des hormones thyroïdiennes (au jour 15 et 90 post-natal), du cholestérol, des triglycérides sériques, de la glycémie, de l'insulinémie et de la leptinémie. L'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 conclut à une absence d'effets du BPA sur les paramètres évalués pour les doses allant de 80 µg/kg pc/j à 2 700 µg/kg pc/j, à l'exception d'une augmentation des ASAT (Aspartate Aminotransférase) chez les femelles au jour 90 après la naissance pour la dose de 2 700 µg/kg pc/j, cet effet n'étant pas retrouvé aux doses supérieures (100 000 et 300 000 µg/kg pc/j).

Deux des doses étudiées sont communes avec celle de l'étude de Miyawaki *et al.*, 2007 (260 et 2600 µg/kg pc/j) retenue comme étude clé dans l'expertise de l'Anses (2013). Mais ces deux études diffèrent sur de nombreux points méthodologiques pouvant expliquer l'absence d'effet du BPA sur le métabolisme à ces deux doses. Ces différences portent sur le modèle animal (rat dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 et souris dans l'étude de Miyawaki *et al.*, 2007), la voie d'exposition, le mode d'administration et le véhicule utilisé (gavage eau de boisson), la durée d'exposition (du jour 6 *post-coïtum* au jour 90 post-natal *versus* du jour 6 *post-coïtum* au jour 30 post-natal) (*PC pour post-coïtum*), l'âge de l'examen, (adulte *versus* stade juvénile), et le régime alimentaire (régime standard *versus* un régime hyper-gras (30% kcal)). Par ailleurs, les animaux ont été soumis à un jeûne à partir de la veille chez Miyawaki *et al.*, 2007 alors que cette précision n'est pas indiquée chez Delclos *et al.*, 2014.

Toutes ces différences ne sont pas retrouvées dans l'étude récente de Wei *et al.*, 2014. Dans cette étude (dose unique – 50 µg/kg pc/j), les auteurs utilisent le rat Wistar comme modèle, gavent les animaux et pour une partie du protocole, les animaux sont nourris avec une alimentation standard. Cependant, dans l'étude de Wei *et al.*, 2014, le gavage n'est réalisé que chez les mères (pendant la gestation et la lactation (exposition précoce) et non poursuivi jusqu'au stade adulte (jour 90 après la naissance). De plus, les animaux sont étudiés à un stade plus mature (au jour 189 post-natal et non au jour 90 post-natal).

L'étude de Wei *et al.*, 2014 conclut à un effet obésogène du BPA affectant l'homéostasie hépatique et l'insulinémie, effets qui sont exacerbés lorsque les animaux sont nourris avec un régime gras *versus* un régime standard après le sevrage.



### **Conclusion de l'expertise**

Malgré un nombre élevé d'animaux et de doses dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur les effets métaboliques des animaux exposés. L'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 ne permet pas, en l'état actuel, de remettre en cause les conclusions des experts concernant les effets du BPA sur le métabolisme et l'obésité.

### **3.6. Effets sur le cerveau et le comportement**

Aucun paramètre spécifique des effets sur le cerveau et le comportement n'a été inclus dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013.

### **3.7. Autres types d'effet**

#### **3.7.1. Effets sur le système reproducteur mâle**

La précédente expertise collective de l'Anses (2013) avait conclu que les données bibliographiques concernant l'effet du BPA sur le développement et les fonctions de la reproduction masculine étaient divergentes et l'Anses n'avait pas retenu d'effet critique en lien avec la fonction de reproduction masculine pour l'ERS.

De nouveaux éléments sont rapportés dans le rapport U.S.FDA/NCTR, 2013. Un possible impact des faibles doses de BPA est observé sur la spermatogenèse (diminution du poids relatif des testicules à 260 µg/kg pc/j, présence de cellules « géantes » dans les tubes séminifères de tous les groupes traités au BPA alors qu'aucun animal témoin négatif ne présente ce type de cellules. Ces cellules sont également observées dans le groupe traité avec 5 µg/kg pc/j d'EE2, mais pas dans le groupe traité avec 0,5 µg/kg pc/j d'EE2. Cependant, la méthodologie utilisée ne permet pas d'infirmier ou de confirmer un effet sur la spermatogenèse. La recherche d'un tel effet nécessite une analyse morphométrique précise de l'histologie testiculaire, analyse qui n'a pas été réalisée dans cette étude.

Par ailleurs, l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 n'apporte pas d'éléments nouveaux sur les effets de faibles doses de BPA sur la distance ano-génitale à la naissance et chez l'adulte, sur le poids des organes reproducteurs et les caractéristiques spermatiques.

Cette étude montre que le BPA n'a pas d'effet sur l'âge d'apparition de la puberté (évaluée par la séparation préputiale) mais elle ne permet pas de conclure sur son éventuel impact sur un retard de la descente testiculaire en raison d'un effet ponctuel à la dose de 260 µg/kg pc/j.

Bien que le rapport U.S.FDA/NCTR, 2013 conclue à une absence d'effet du BPA sur la testostéronémie de l'adulte, il est noté que le test de tendance est statistiquement significatif. Ainsi ce rapport ne contredit pas les conclusions des nombreuses études antérieures montrant un effet antiandrogénique du BPA.

### **Conclusion de l'expertise**

Les résultats présentés dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 ne permettent pas de conclure sur l'absence ou la présence d'un effet à faibles doses de BPA sur les fonctions de reproduction masculine, excepté l'absence d'effet du BPA sur l'âge à la puberté.

L'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 ne permet pas, en l'état actuel, de remettre en cause les conclusions des experts concernant les effets du BPA sur les effets sur le système reproducteur mâle.

### 3.7.2. Effets rénaux

L'EFSA dans son dernier avis (EFSA, 2015) a proposé une DJT provisoire (t-TDI pour *temporary-TDI*) de 4 µg/kg pc/j. Cette DJT provisoire s'appuie sur les résultats de l'étude de Tyl *et al.* (2002, 2008), et notamment sur les effets rénaux du BPA (augmentation du poids relatif des reins chez la souris).

Dans l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013, une augmentation de l'incidence de kystes tubulaires a été observée chez les femelles F1 à partir de 25 µg/kg pc/j au jour 90 après la naissance et à toutes les doses, sans pouvoir conclure à un effet lié au traitement aux faibles doses. Aux doses élevées, un effet dose-dépendant peut être mis en évidence, à 100 000 et 300 000 µg/kg pc (avec des incidences respectives de kystes tubulaires de 8/21 et 12/19, contre 6/20 chez les animaux témoins).

Au niveau biochimique, une tendance à l'augmentation de la créatinine aux doses les plus faibles de la gamme de BPA utilisées n'a été rapportée que chez les mâles, avec une élévation significative de la créatinine à la plus forte dose de BPA.

## 4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail reprend à son compte les observations des rapporteurs du Groupe de travail « perturbateurs endocriniens et reprotoxiques de catégorie 3 », résultant de l'analyse du rapport U.S.FDA/NCTR, 2013 sur le BPA.

L'étude U.S.FDA/NCTR, 2013, présente des caractéristiques remarquables notamment du fait de l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et de doses ainsi que du fait des efforts particuliers apportés pour définir l'exposition. Elle soulève des questions méthodologiques décrites par les experts effets par effets. La question notamment des effets observés à des doses faibles conduisant à une exposition difficilement différenciable du bruit de fond environnemental figure parmi les questions méthodologiques relevée par les experts du fait de la présence ubiquitaire du BPA.

A l'issue de l'analyse, les experts considèrent que les données rapportées dans l'étude et ses premiers résultats pour ce qui concerne les effets pris en compte dans l'expertise collective de l'Anses (Anses, 2013), ne sont pas de nature à remettre en cause les NOAELs/LOAELs sélectionnés (cf. Table 1– Annexe 1) ou les conclusions de l'agence en 2013. En l'état, il n'y a donc pas lieu, à l'issue de l'analyse faite par les experts, de changer la valeur de NOAEL de 25 µg/kg pc/j proposée en 2013 par l'Anses (à partir de l'étude de Moral *et al.*, 2008). Les résultats de l'exposition à long terme (étude à 2 ans) attendus à l'issue de l'étude U.S.FDA/NCTR, 2013 devraient apporter des informations utiles à une meilleure interprétation des résultats de cette étude, telles que la survenue (ou non) de lésions de type carcinome canalaire *in-situ* (*ductal carcinoma in situ*) et d'adénocarcinomes de la glande mammaire.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail poursuivra en conséquence une veille bibliographique active sur le BPA avec pour objectif de réactualiser le cas échéant le rapport d'expertise.

Marc Mortureux

## MOTS-CLES

Bisphénol A, évaluation des dangers, étude U.S.FDA/NCTR, 2013, Delclos et al., 2014.

## BIBLIOGRAPHIE

Acevedo N, Davis B, Schaeberle C M, Sonnenschein C, and Soto AM (2013) Perinatally Administered Bisphenol A as a Potential Mammary Gland Carcinogen in Rats *Environ Health Perspect.* 121(9): 1040–1046.

ANSES (2011). Effets sanitaires du bisphénol A – rapport d'expertise collective.

ANSES (2013). Evaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine – Tome 1 rapport d'expertise collective.

Brunner, E, S Domhof and F Langer (2002). *Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments.* John Wiley and Sons.

Churchwell MI, Camacho L, Vanlandingham MM, Twaddle NC, Sepehr E, Delclos KB, Fisher JW, Doerge DR. (2014). Comparison of life-stage-dependent internal dosimetry for bisphenol A, ethinyl estradiol, a reference estrogen, and endogenous estradiol to test an estrogenic mode of action in Sprague Dawley rats. *Toxicol Sci.* May;139(1):4-20.

Davis and Fenton (2013). Mammary gland Handbook in *Toxicologic Pathology*, 2665-2694.

Delclos KB, Camacho L, Lewis SM, Vanlandingham MM, Latendresse JR, Olson GR, Davis KJ, Patton RE, Gamboa da Costa G, Woodling KA, Bryant MS, Chidambaram M, Trbojevich R, Juliar BE, Felton RP, Thorn BT (2014). Toxicity evaluation of bisphenol A administered by gavage to Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90. *Toxicol Sci.* 2014 May;139(1):174-97. doi: 10.1093/toxsci/kfu022. Epub 2014 Feb 4.

DTU (Technical University of Denmark), 2015. [http://orbit.dtu.dk/en/publications/evaluation-of-efsas-new-scientific-opinion-on-bisphenol-a\(7ab94b1a-870d-4dcb-8f97-df2ea733db3d\).html](http://orbit.dtu.dk/en/publications/evaluation-of-efsas-new-scientific-opinion-on-bisphenol-a(7ab94b1a-870d-4dcb-8f97-df2ea733db3d).html)

Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Munoz-de-Toro M (2007). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environmental Health Perspectives* 115 (1), 80-86.

EFSA Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal* 2015;13(1):3978 doi:10.2903/j.efsa.2015.3978.

Jonckheere AR (1954). "A distribution-free k-sample test against ordered alternatives." *Biometrika* 41 133-145.

Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H (2007) Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 14, 245-252.

Moral R, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Pereira J, Russo J (2008) Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *Journal of Endocrinology* 196, 101-112.

Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reproductive Toxicology* **23**(3), 383-390.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental Health Perspectives* **109**, 675-680.

Shirley, Eryl (1977). "A non-parametric equivalent of Williams' test for contrasting increasing dose levels of a treatment." *Biometrics* **33** 386-389.

Signorile PG, Spugnini EP, et al. (2010) Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *General and Comparative Endocrinology* **168**, 318-325.

Terpstra TJ (1952). "The asymptotic normality and consistency of Kendall's test against trend when ties are present in one ranking." *Indagationes Mathematicæ* **14** 327-333.

Tyl RW, Myers CB *et al.* (2002) Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences* **68**(1), 121-146.

Tyl RW, Myers CB *et al.* (2008) Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (swiss) mice. *Toxicological Sciences* **104**(2), 362-384.

U.S.FDA/NCTR (National center for Toxicological Research –national Toxicology Program), 2013. Evaluation of the toxicity of bisphenol A (BPA) in male and female Sprague-Dawley rats exposed orally from gestation day 6 through postnatal day 90.

Wei J, Sun X, Chen Y *et al.* (2014). *J. Endocrinol.* Sep;222(3):313-25. Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet. doi: 10.1530/JOE-14-0356. PMID: 25112833.

Williams DA (1986). "A note on Shirley's nonparametric test for comparing several dose levels with a zero-dose control." *Biometrics* **42**, 183-186.

Xu XH, Zhang J, Wang YM, Ye YP, Luo QQ (2010a) Perinatal exposure to bisphenol-A impairs learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Hormones and Behavior* **58**(2), 326-333.

**ANNEXE**

*Annexe 1*

Anses • Rapport d'expertise collective

Saisines « 2009-SA-0331 » et « 2010-SA-0197 »  
 BPA : Evaluation des risques sanitaires

**Tableau 8 : NOAEL / LOAEL sélectionnés pour l'ERS du BPA**

Effets critiques	Référence étude	Population animale	Période d'exposition	Voie d'exposition	Type d'effet	LOAEL/ NOAEL	Population à prendre en compte dans l'ERS
<b>Cerveau et comportement</b>							
	Xu <i>et al.</i> , 2010a	souris ICR	GD7- PND21	Orale (gavage)	Diminution de l'expression des récepteurs NMDA en lien avec une perturbation des fonctions de mémoire spatiale et d'apprentissage	NOAEL = 50 µg/kg pc/j	Femme enceinte et sa descendance
<b>Appareil reproducteur femelle</b>							
	Signorile <i>et al.</i> , 2010	Souris Balb-C	GD1-PND7	Sous-cutanée	Augmentation de la survenue de kystes ovariens	LOAEL 100 µg/kg pc/j	Femme enceinte et sa descendance
					Hyperplasie endométriale	NOAEL 100µg/kg pc/j LOAEL 1000µg/kg pc/j	Femme enceinte et sa descendance
	Rubin <i>et al.</i> , 2001	Rat Sprague Dawley	GD6 - sevrage des petits	Orale (eau de boisson)	Perturbation des cycles ovariens	NOAEL 100µg/kg pc/j LOAEL 1,2 mg/kg pc/j	Femme enceinte et sa descendance
<b>Métabolisme et obésité</b>							
	Miyawaki <i>et al.</i> (2007)	Souris ICR gestantes	Traitement des mères de GD10 jusqu'au sevrage des petits puis traitement des petits du jour du sevrage jusqu'à PND30	Orale (eau de boisson)	Augmentation du poids corporel, augmentation de la cholestérolémie chez les femelles à partir de 0,26mg/kg pc/j	LOAEL 0,26 mg/kg pc/j	Femme enceinte et sa descendance

Table 1: Tableau récapitulatif des NOAELs / LOAELs sélectionnés à partir de l'ensemble des études identifiées comme des études clefs (extrait de l'ERS du BPA - Anses, 2013, page 92/282)