

Maisons-Alfort, le 13 mars 2014

Le directeur général

AVIS

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

**en réponse à la consultation de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
sur son projet d'avis concernant l'évaluation des risques pour la santé humaine
consécutifs à une exposition alimentaire au Bisphénol A**

1. CONTEXTE 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 3¹ (R3) (selon la directive 67/548/CE) 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 concernant les risques du bisphénol A (BPA) pour la 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).

Du 25 juillet au 15 septembre 2013, l'EFSA a publié sur son site et soumis à consultation publique un rapport provisoire relatif à l'évaluation de l'exposition au BPA. Toutes les parties prenantes intéressées étaient invitées à soumettre leurs commentaires écrits jusqu'au 15 septembre 2013.

L'Anses a contribué à cette consultation publique en analysant le rapport en ligne et en adjoignant les observations de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), plus particulièrement sur la thématique des cosmétiques.

Un tableau récapitulatif des 42 commentaires de l'Anses et de l'ANSM, soumis en ligne sur le site internet de l'EFSA est présenté en annexe du présent avis (Annexe 1).

Le 17 janvier 2014, un projet d'avis de l'EFSA sur les risques sanitaires liés à la présence de BPA dans les aliments a été mis en consultation sur le site internet de l'EFSA. Ce projet d'avis s'appuie sur une analyse des données publiées sur le BPA jusque fin 2013. Les experts concluent que le BPA ne pose pas de risques pour les consommateurs aux niveaux actuels d'exposition, *via*

¹ 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.

l'alimentation et la manipulation de tickets thermiques contenant du BPA. L'EFSA propose dans ce rapport une DJA provisoire qui s'appuie sur les résultats de Tyl *et al.* (2002, 2008).

L'Anses s'est autosaisie le 7 février 2014 pour procéder à une analyse de certains points du projet d'avis de l'EFSA.

2. METHODE D'EXPERTISE

Compte tenu des délais restreints pour répondre à la consultation, l'expertise a été réalisée par plusieurs experts rapporteurs du GT PE, ayant des compétences en toxicologie, modélisation (en particulier en matière de modèle *PB-PK* et *BMD*), analyse des incertitudes, cinétique, ainsi que des experts spécialistes des effets sur la glande mammaire, le système nerveux central, le système reproducteur femelle et les maladies métaboliques. Chaque expert a été mandaté pour expertiser une partie précise de l'avis provisoire de l'EFSA.

L'expertise s'est focalisée essentiellement sur les principaux points de divergence dans l'interprétation des données par rapport aux rapports de l'Anses publiés en 2011 et 2013. Elle a également abordé plus spécifiquement les éléments nouveaux de la démarche d'évaluation du risque proposé dans l'avis provisoire de l'EFSA.

Les résultats de l'expertise présentés ci-après reprennent les commentaires des experts. Ils portent sur des points particuliers du rapport de l'EFSA qui peuvent influencer les résultats de l'évaluation des risques: choix des publications prises en compte, sélection du ou des effets critiques, calcul de la BMD, estimation des expositions internes chez l'Homme et traitement des incertitudes. Les remarques spécifiques à certaines études ainsi que des compléments d'information apportées par l'Anses sont annexés au présent avis. Les citations du rapport de l'EFSA sont reprises en anglais, en italique et entre guillemets.

Compte tenu des délais d'instruction offerts par la consultation organisée par l'EFSA et de l'importance du travail de fond réalisé par cet organisme, les experts ont été mobilisés dans un contexte d'urgence. Cet avis n'a pas pour objet de présenter une expertise complète de la sécurité sanitaire du BPA, mais a recherché à mettre en lumière certaines interrogations majeures ou a identifié des pistes d'amélioration potentielles qui se font jour à la lecture de l'avis provisoire de l'EFSA.

3. RESULTATS DE L'EXPERTISE

3.1. Remarques générales

3.1.1. Publications prises en compte

L'analyse des études épidémiologiques ne fait pas l'objet d'un développement particulier dans cet avis étant donné que l'EFSA et l'Anses interprètent de façon similaire les résultats de ces études. Seules les données expérimentales pour lesquelles il existe des divergences d'interprétation entre les deux agences font l'objet d'observations dans le présent chapitre.

L'Anses observe que pour cette nouvelle évaluation des risques pour la santé du BPA, non seulement les études par voie orale mais aussi celles réalisées par voie sous-cutanée ont été évaluées, ce qui n'était pas le cas dans les rapports précédents de l'EFSA. La plupart des

recherches conduites pour étudier la toxicité du BPA n'ont pas été réalisées selon les lignes directrices de l'OCDE et/ou ne suivent pas les « Bonnes Pratiques de Laboratoire » (BPL). Ces études ont néanmoins été prises en compte dans l'expertise de l'EFSA, même si un poids plus important a été donné par l'EFSA aux études OCDE réalisées selon les BPL (Tyl, 2002, 2008 par exemple). De nombreuses études récentes publiées postérieurement à l'expertise de l'Anses ont également été incluses dans l'expertise, ce qui peut permettre d'apporter des compléments d'information, en particulier pour certains effets critiques comme le métabolisme pour lesquels assez peu d'informations étaient disponibles jusqu'à récemment. Pour autant, l'Anses considère qu'à ce jour, aucune de ces études ne conduit à remettre fondamentalement en cause les conclusions de son expertise sur la nature des effets du BPA sur la santé. Des commentaires spécifiques par type d'effets sont apportés dans la suite de cet avis, même si les articles non pris en compte dans le rapport de l'Anses de 2013 n'ont pas fait l'objet d'une évaluation spécifique pour cet appel à commentaires.

L'Anses relève que la plupart des publications non OCDE/BPL évaluées dans le rapport de l'EFSA font l'objet de critiques sur différents critères: nombre d'animaux et animaux contrôles, prise en compte ou non de « l'effet portée », conditions d'hébergement des animaux telles que types de cages, de régimes (dépourvu ou non en phytoœstrogènes par exemple), conditions d'exposition au BPA: voie d'exposition, nombre de doses, évaluation en aveugle, corrélation entre effets biochimiques et lésions anatomiques ou fonctionnelles, etc. Cependant, on peut regretter que ces critères ne soient pas hiérarchisés. De plus d'autres critères, pourtant essentiels, pour l'interprétation des résultats tels que la période d'exposition, la sensibilité hormonale pendant le développement ou la puberté, etc. semblent ne pas avoir été considérés avec la même importance.

3.1.2. Evaluation du poids de la preuve

L'identification des dangers du BPA proposée par l'Anses en 2011 s'appuie sur une classification des effets en effets : «avérés», «suspectés», «controversés» et «effets pour lesquels les données disponibles ne permettent pas de conclure» selon le nombre et la qualité des études disponibles.

La démarche suivie par l'EFSA est basée sur le poids de la preuve estimé par les experts en fonction de la qualité du *corpus* de données par types d'effets. Néanmoins, même si cette approche présente l'avantage de systématiser l'analyse des éléments de preuves en réponse à une question précise (« *line of evidence* »), elle peut conduire à un morcellement parfois excessif du *corpus* de données et des publications qui conduit, au final, à un manque de recul suffisant sur un faisceau d'arguments pouvant s'inscrire dans un *continuum* d'effets de même nature. Par exemple, concernant les effets du BPA sur le métabolisme, des subdivisions ont été faites en fonction des périodes d'exposition pour les expérimentations animales (exposition prénatale et exposition au stade adulte), et pour chaque période d'exposition, de nouvelles subdivisions ont été faites en fonction des paramètres étudiés (poids, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline). Toutes ces subdivisions conduisent au morcellement des informations colligées dans un même article scientifique et peuvent induire une certaine confusion pour le lecteur. Il en est de même pour d'autres effets comme les effets sur la glande mammaire ou ceux sur le cerveau. A l'inverse, le regroupement de plusieurs effets de nature différente dans l'analyse finale du poids de la preuve peut conduire à un manque de cohérence dans l'analyse des données (par exemple, pour la glande mammaire, regroupement des changements morphologiques, de la prolifération cellulaire, des lésions ducales atypiques sous une même question).

La classification des effets suivant les critères de plausibilité, « *likely* », « *as likely as not* » etc., n'est pas clairement justifiée dans le rapport, même si le jugement d'expert a pour objectif de permettre de tirer des conclusions au vu des données disponibles. Aussi, il serait souhaitable, dans un souci de transparence de l'expertise, que ces critères de jugement soient mieux retranscrits dans le rapport final. Aucun critère n'est ainsi proposé dans le rapport pour considérer que les études disponibles pour un certain élément de preuve (« *line of evidence* ») ont une robustesse (« *reliability* ») basse, moyenne ou haute. Ceci est d'autant plus étonnant que, pour certains éléments de preuve, on dispose d'études qui n'ont que des faiblesses (ex. : cf. Table 29, « *Starting*

point », page 421 et *Line 5*, page 423) alors que pour d'autres, on dispose d'études qui ont à la fois des points forts et des points faibles (ex. : cf. *Lines 1 à 4*, page 421-423). Pour autant, et pour la très grande majorité des éléments de preuve, l'EFSA attribue un niveau faible de robustesse aux données, que les éléments de preuves soient forts ou limités. Cette approche privilégie de fait les limites des études aux regards de leur niveau de preuve.

La manière dont les études dans leur ensemble sont intégrées en vue de répondre à la question posée et d'évaluer la robustesse pour conclure sur la plausibilité d'un effet (« *overall conclusion on likelihood* ») n'est pas clairement décrite (exemple du tableau 30, p.427).

Il est indiqué (page 208) que l'appréciation des classes de niveaux de preuve de la plausibilité « *very likely, likely etc* » repose complètement sur le jugement d'experts. Deux questions restent floues :

- pour chaque élément de preuve, un jugement scientifique doit être prononcé par des experts spécialistes du sujet (ECHA, 2010). Toutefois, dans le rapport de l'EFSA, on ne retrouve pas une description de cette démarche.
- Le mode de traitement des avis potentiellement divergents de membres du groupe de travail, n'est pas clairement explicité. Tous les experts du groupe ont-ils évalué ces critères (« *likely, etc.* ») de la même façon pour le même élément de preuve ? Si cela n'était pas le cas, comment les divergences ont-elles été prises en compte, ou non ?

Ce degré de subjectivité est par ailleurs attesté par l'abondance des termes comme « *acceptable* », « *convincing* », « *evidence... too weak* » utilisés sans définition.

3.1.3. Relation non monotone

Plusieurs études expérimentales en lien avec une exposition au BPA ont rapporté des relations doses-effet non monotones (Jenkins *et al.*, 2011 ; Jones *et al.*, 2011 ; Marmugi *et al.*, 2012, etc.). Ces études ont été prises en compte dans l'expertise de l'Anses et la plausibilité statistique et biologique de l'existence de relations non monotones a été évaluée et confirmée dans un certain nombre de cas. Cependant, à ce jour, il n'y a pas de consensus scientifique quant à la qualité des études et l'étendue des preuves à l'appui de l'hypothèse de relations non monotones pour ce qui concerne le BPA. Ainsi l'EFSA considère avec un niveau de preuve plus faible les études n'ayant pas montré une relation dose-effet croissante.

3.2. Caractérisation du danger : choix des effets critiques

L'Anses observe que certains des effets jugés avérés dans son expertise de 2013 sont considérés par l'EFSA comme « *as likely as not* » voire comme « *unlikely* ». Des commentaires spécifiques sur ce type d'effets sont apportés dans la suite du présent avis. Les chapitres du rapport de l'EFSA traitant des effets n'ayant pas été retenus dans l'expertise d'évaluation des risques pour la santé liés au BPA de l'Anses (Anses, 2013) ne font pas fait l'objet d'une analyse spécifique dans le présent avis.

3.2.1. Effets sur le système reproducteur femelle

Dans l'expertise de l'Anses (Anses, 2013), les effets suivants observés chez l'animal lors d'expositions pré et/ou postnatales ont été jugés suffisamment préoccupants et pertinents pour être pris en compte :

- Augmentation de la survenue de kystes ovariens;
- Augmentation de la fréquence d'apparition d'hyperplasies endométriales;

- Perturbation des cycles ovariens.

L'étude retenue au final par l'Anses pour l'ERS est l'étude de Rubin *et al.*, (2001) qui a montré une perturbation du cycle ovarien avec un allongement du cycle œstral. Cette étude conduite par voie orale conduit à un NOAEL de 100 µg/kg pc/j et un LOAEL de 1200 µg/kg/j après traitement de GD6 jusqu'au sevrage chez des rats Sprague Dawley.

Les divergences dans la portée des conclusions entre le rapport de l'Anses et celui de l'EFSA reposent sur des méthodologies différentes. Il semblerait en effet que la classification établie par le groupe d'experts de l'EFSA nécessite l'existence d'une modification biologique délétère associée aux effets mis en évidence. Or les études ne vont que très rarement jusqu'à l'exploration détaillée de la fonctionnalité d'activité gonadotrope en termes de fertilité. Il semblerait également que la position des deux groupes sur des biais méthodologiques puisse être à l'origine de certaines divergences dans la classification des études. Le groupe de travail de l'EFSA considère en effet que les « effets portée » non contrôlés constituent une limite méthodologique majeure qui impacte notamment la force de l'étude de Rubin *et al.* (2001) choisie par les experts de l'Anses comme une étude clef pour l'identification des dangers pour l'appareil reproducteur femelle.

La base méthodologique servant à classer les effets diffère entre les deux agences. Le GT PE de l'Anses a établi une classification basée sur un arbre décisionnel structuré alors que l'EFSA émet un avis global par système (cf. page 440 conclusion globale sur les effets du BPA sur le système reproducteur male et femelle) en lien avec une exposition au BPA au cours de la phase de développement, alors que l'évaluation de l'Anses est basée sur une analyse par type d'effets (effets sur le tractus génital et les ovaires, effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope, effets sur l'âge à la puberté, etc.). L'EFSA mentionne le fait que le manque de convergence entre les études est une trop grande source d'incertitude. Cette appréciation peut apparaître comme fondée si l'on considère globalement l'ensemble du système. Cependant, cette incertitude se réduit de façon notable si l'on analyse les données de la littérature effet par effet. Quant à l'analyse de l'EFSA concernant la signification fonctionnelle des effets observés, il est indéniable que ce type d'information peut constituer la clef de voute de l'évaluation des dangers. Toutefois, rejeter des effets en raison de l'absence de cette information peut conduire à ignorer des faits scientifiques avérés pour lesquels les connaissances en physiologie des fonctions laissent à penser qu'ils peuvent avoir des conséquences négatives sur l'efficacité de cette fonction.

L'analyse de la littérature scientifique entre 2011 et 2012 réalisée par le GT PE a mis en exergue un effet sur la folliculogénèse lors d'expositions développementales. Selon l'arbre décisionnel adopté par le GT PE et ayant servi à la classification des effets, ces effets pourraient être considérés comme avérés. Les experts de l'EFSA soulignent à juste titre que la signification fonctionnelle de ce type d'effet, notamment en termes d'altération de la fertilité, reste à déterminer. Il n'en demeure pas moins que les mécanismes mis en évidence au cours des différentes études menées chez différentes espèces sont souvent associés à une altération de la dynamique folliculaire et pour certains cas à une déplétion des réserves folliculaires. Une publication de bonne qualité a ainsi été recensée par le GT PE indiquant que le bisphénol A à faible dose (25 ng/kg par voie sous-cutanée), lors d'une exposition au cours de la phase de développement (GD8-PND16) pourrait accentuer le déclin de la fertilité lié au vieillissement chez la souris CD-1 (Cabaton *et al.*, 2011). Bien qu'il soit impossible, dans l'état actuel des connaissances, d'établir un lien direct de cause à effet, l'hypothèse selon laquelle un tel effet pourrait être lié à des altérations de la dynamique folliculaire, souligne l'intérêt de ne pas négliger l'impact possible du BPA sur la folliculogénèse. En outre, il semblerait que les effets du BPA sur les follicules ovariens puissent également s'exprimer lors d'une exposition à l'âge adulte. Ainsi, l'expertise de l'EFSA mentionne une étude jugée de bonne qualité montrant chez le rat qu'une exposition subchronique (90 jours) à doses faibles (1 et 100 µg/kg pc/j) par voie orale de jeunes femelles adultes (Lee *et al.*, 2013), conduit à une augmentation des phénomènes d'atrésie folliculaire et de régression des corps jaunes tout en diminuant la stéroïdogénèse ovarienne et stimulant des voies apoptotiques. Ces modifications au niveau ovarien étaient associées à une augmentation de la synthèse et de la libération de LH hypophysaire et à un allongement de la durée de l'œstrus. Selon les règles de classification des effets adoptées par le GT PE, l'absence d'autres données convergentes concernant l'effet sur le déclin de la fertilité et les effets sur les follicules ovariens chez l'adulte ne

permet pas de classer ces effets comme avérés. Toutefois, le faisceau de présomptions et la probabilité d'un impact sur la fertilité sont suffisamment significatifs pour attirer l'attention des experts sur les effets du BPA sur les follicules ovariens et leurs conséquences possibles en termes de fertilité.

3.2.2. Effets sur le système nerveux central

Parmi l'ensemble des effets observés quant à la toxicité du BPA sur le système nerveux central, l'effet critique retenu par les experts de l'Anses porte sur l'altération de la mémoire et de l'apprentissage, concomitante à une diminution de l'expression de différentes sous-unités constitutives des récepteurs NMDA (Acide N-méthyl-D-aspartique) du glutamate, récepteur particulièrement impliqué dans la plasticité synaptique et neuronale et dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Ces effets sont aussi confortés par l'action du BPA dans les systèmes neuronaux exprimant la nitrique oxyde synthase (NO synthase) avec des effets sexe et région dépendants dans l'hypothalamus et le système limbique (Martini *et al.*, 2010).

L'étude de Xu *et al.* (2010a) a été retenue par l'Anses comme étude clé. Cette étude a été conduite par voie orale (gavage) chez des souris ICR (n= 10 animaux/groupe) et comporte 4 doses d'exposition en plus du groupe contrôle : 0,05 ; 0,5 ; 5 et 50 mg/kg pc/j. Dix souris gestantes par niveau de doses ont été exposées de GD7 à PND21. Cette étude n'a pas suivi les lignes directrices OCDE, ni les BPL. Néanmoins, le protocole de l'étude est bien décrit et de nombreux effets ont été investigués, tant au niveau moléculaire (récepteurs NMDA, récepteurs β des œstrogènes) qu'au niveau physiologique. La diminution de l'expression des récepteurs NMDA observée au niveau de l'hippocampe dans cette étude a été reproduite par la même équipe chez le rat Sprague Dawley (Xu *et al.*, 2010b), dans des conditions comparables, ainsi que par d'autres équipes (Tian *et al.*, 2010).

Le choix de l'étude de Xu *et al.*, 2010a est conforté par des études dont les résultats permettent de constituer un faisceau de présomptions sur les atteintes cérébrales induites par le BPA en lien avec des effets cognitifs. L'étude de Martini *et al.* (2010) montre des altérations de l'expression de la NO synthase cérébrale (NOAEL 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) chez des souris exposées par voie orale. L'étude de Tian *et al.* (2010) met en évidence des altérations des systèmes dopaminergiques et glutamatergiques (NMDA), associées à un déficit cognitif et à une réduction de l'anxiété chez les souris exposées par voie orale (LOAEL 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$). L'étude de Xu *et al.* (2010b) montre une réduction de l'expression de certaines sous-unités constitutives des récepteurs NMDA du glutamate et des récepteurs aux œstrogènes ER β chez des rats exposés par voie orale (LOAEL 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$). Les études par voie sous-cutanée, telle que celle de Zhou *et al.* (2011) font le lien entre les altérations de la plasticité synaptique et neuronale et le comportement chez des rats avec un LOAEL de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

Dans son rapport (cf. page 303), l'EFSA identifie plusieurs faiblesses dans l'étude de Xu *et al.* (2010a):

- *"However, in the absence of a correlation with a functional adverse effect, the Panel did not consider the available data as convincing evidence of neurobehavioural toxicity of BPA."*

Commentaire de l'Anses: l'une des forces de l'étude Xu *et al.* (2010a) est justement qu'elle a mis en évidence un lien entre des modifications des mécanismes de plasticité synaptique et neuronale dans des régions cérébrales précises (hippocampe) et des troubles fonctionnels au niveau comportemental (apprentissage spatial et conditionnement). Il s'agit là d'une remarque étonnante de la part des experts de l'EFSA puisque cette étude lie justement différents aspects de la fonctionnalité cérébrale au plan moléculaire et comportemental.

- “*Study design (no wash-out period between different test procedures)*”

Commentaire de l'Anses: la période de « wash-out » entre les différents utilisés n'a jamais fait, de la part de l'EFSA, l'objet d'une attention particulière jusqu'à présent dans toutes les études considérées dans les précédents rapports. Il serait possible de considérer qu'une période de « wash-out » soit importante en cas de tests successifs portant sur le même paramètre étudié, ce qui n'est pas le cas dans l'étude clé retenue par l'ANSES. En effet, même si les tests réalisés par Xu *et al.* (2010a, 2010b) ont porté sur l'étude des capacités d'apprentissage et de mémorisation des animaux, ce sont deux types de mémoire qui ont été successivement explorés à PND 21 et PND56 chez les mêmes animaux exposés précocement au BPA : la mémoire spatiale avec le labyrinthe aquatique de Morris et la mémoire émotionnelle et contextuelle avec un test de conditionnement associant un renforcement négatif au contexte de survenue du renforcement. Le labyrinthe aquatique de Morris, qui est, avant tout, dépendant de la plasticité de l'hippocampe, région clé dans l'apprentissage spatiale, a été réalisé en 1^{er} alors que le 2^d test relève de la mémoire émotionnelle et de l'activité du réseau limbique impliquant l'amygdale, même si ce réseau interagit avec l'hippocampe. Ces considérations amènent à penser que l'enchaînement des 2 tests sur les mêmes animaux ne constitue pas un biais quant aux résultats obtenus et que l'absence de « wash-out » entre les tests ne constitue pas une faiblesse de l'étude. Par précaution, Xu *et al.* auraient pu alterner l'ordre de passage des groupes dans les 2 tests de manière à contrebalancer les effets d'éventuelles interactions entre les 2 tests. Toutefois, même si des tests différents portent sur le même type de mémoire, il n'est pas du tout impératif qu'une période de « wash-out » soit introduite entre les tests. En effet, un protocole expérimental peut être conçu de façon à enchaîner successivement différents tests portant sur le même paramètre pour voir si des événements de natures différentes peuvent moduler le même paramètre (e.g. mémoire de travail, anxiété, dépression...). Ainsi, une absence de période de « wash-out » ne constitue pas une faiblesse dans l'étude.

- “*Test performed in one sex only (only male offspring)*”

Commentaires de l'Anses: une étude portant uniquement sur les mâles ne constitue pas une faiblesse mais correspond à une focalisation sur des effets pouvant être induits dans une population particulière. De plus, les résultats obtenus par Xu *et al.*, même s'ils ne concernent que les mâles, sont suffisamment robustes pour être retenus pour l'expertise.

- “*Insufficient study reporting (reproductive outcome not shown, e.g. maternal bw, no pre-weaning body weight data shown)*”

Commentaires de l'Anses: les données de poids corporel des petits, produites à PND21 montrent une diminution significative à la plus faible dose de BPA (0,05 mg/kg pc/jour) et une augmentation significative à la plus forte (50 mg/kg pc/jour) par rapport aux témoins, les mêmes variations étant observées à PND56, bien que la variation à la plus forte dose ne soit plus significative. Il est effectivement dommage que les données relatives à la croissance des portées au cours des 3 premières semaines de vie n'aient pas été précisées par les auteurs de manière à pouvoir imputer ces variations uniquement à l'exposition au BPA, et non pas à d'autres biais, comme la variabilité du poids des portées à la naissance selon le nombre de petits, ou la variabilité du comportement des mères. Pour autant, les différences observées au niveau cérébral et comportemental dans les groupes exposés au BPA sont telles qu'elles ne peuvent être imputées à des variations de poids corporel liées à une taille de portée plus importante ou un comportement maternel insuffisamment développé. En effet, le cerveau est un organe dont la croissance est préservée lors de la phase précoce du développement dans le cas de sous-nutrition par exemple.

- “*Statistical analysis (litter effect not considered, i.e. no information about one male pup/litter)*”

Commentaires de l'Anses : bien que ne se référant pas à la ligne directrice OCDE 426, les auteurs ont inclus dans l'étude 10 souris femelles gestantes par groupe d'exposition et ont utilisé un mâle par portée pour constituer les lots expérimentaux qui ont été testés au plan comportemental. En

procédant de la sorte, Xu *et al.* (2010a) ont bien considéré la mère comme unité statistique. L'inclusion de 10 mères par groupe, chacune représentée par un petit de chaque portée, permet donc de s'affranchir de l'effet portée, ce qui n'aurait pas été le cas et aurait nécessité de le tester si tous les petits de chaque portée avaient été évalués au plan comportemental. La seule faiblesse de l'étude est le manque d'indication quant à la sélection du petit au sein de chaque portée.

- “Information about type of water bottles is missing”

Commentaires de l'Anses : dans l'étude de Xu *et al.*, (2010a), aucune indication n'est donnée sur le matériaux utilisé pour les bouteilles d'abreuvement. Cependant, l'étude avait été retenue sur la base de l'argumentaire suivant :

- L'étude associe les effets du BPA sur la mémoire à des modifications importantes de l'expression des récepteurs NMDA dans l'hippocampe, structure cérébrale impliquée la mémoire et l'apprentissage (diminution de 40% de l'expression de certaines sous-unités de ce récepteur). Un déficit en récepteurs NMDA induit des troubles cognitifs importants et, selon les cas permanents.
- Bien que les effets sur l'expression des récepteurs NMDA soient les plus sensibles, les effets sur la mémoire ont été retenus par le GT PE comme effets critiques car il est toujours difficile de savoir si une modification physiologique, cellulaire ou biochimique peut avoir des conséquences néfastes pour un individu.
- Ces effets s'inscrivent dans un *continuum* d'effets observés également dans d'autres études, sur les fonctions cognitives ou entraînant des modifications histochimiques dans différentes structures cérébrales (Adewale *et al.* 2011; Martini *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2011; Rubin *et al.*, 2006).

Enfin, l'étude a été aussi prise en compte par les experts de l'Anses, malgré l'environnement en BPA peu maîtrisé, en considérant deux cas de figures : (i) Le BPA environnemental induit des effets identiques à ceux décrits dans l'étude. Dans ce cas, le BPA apporté expérimentalement aggrave les effets induits par le BPA environnemental, ce qui aboutit à des différences d'effets entre les témoins et les individus exposés. (ii) Le BPA environnemental induit des effets inverses de ceux qui ont été observés. Dans ce cas, le BPA apporté expérimentalement annule d'abord ces effets puis induit des effets inverses, ce qui aboutit aussi à une différence entre les témoins et les individus traités.

Il est étonnant que cette étude n'ait pas été considérée dans l'analyse du poids de la preuve car d'autres études présentant ce type de faiblesse ont été retenues dans le rapport de l'EFSA (cf. 11.2 table 34).

Une étude plus récente de la même équipe (Xu *et al.*, 2013) a été évaluée par les experts de l'EFSA qui mentionnent comme faiblesse de cette étude l'absence d'ajustement des doses aux poids des animaux, alors que les doses semblent bien avoir été ajustées au poids des individus: “The body weight of each mouse was weighed every week to adjust the drug volume”. Selon les experts de l'Anses, il s'agit d'une étude bien conduite dans laquelle les auteurs ont pris beaucoup de précautions pour éviter la contamination environnementale par les phytoestrogènes et le BPA. Les résultats vont dans le sens de l'étude de Xu *et al.*, 2010 sur la souris. Les effets sur les marqueurs de fonctionnalité synaptique sont observés dès 0,4 mg/kg/j. Les effets sur les récepteurs glutamates sont observés à 0,4 et 40 mg/kg/j. Cette étude présente l'avantage de coupler des effets cognitifs à des modifications histologiques. Les experts de l'ANSES s'étonnent de cette remarque concernant l'étude de Xu *et al.* publiée en 2013 dans *Hormones and Behavior* alors que la même procédure statistique a été utilisée dans d'autres études publiées par les mêmes auteurs et mentionnées par l'EFSA sans faire ce type de remarque. Sur le fond, Xu *et al.* 2013 comme dans l'étude clé retenue par l'ANSES ont utilisé le test de Tukey pour réaliser les comparaisons *a posteriori* dans les différents modèles d'analyse de la variance utilisés. Il s'agit là d'un test qui est

conservateur et qui a été construit pour garantir la probabilité du risque α pour toutes les comparaisons possibles contrairement au test de Newman-Keuls par exemple.

D'autres études ont rapporté des effets du BPA sur l'apprentissage et la mémoire après une exposition unique (Eilam-Stock, 2012 ; Inagaki, 2012), ce qui est considéré par les experts de l'EFSA comme une faiblesse. Selon les experts de l'Anses, ce type d'exposition ne constitue pas forcément une faiblesse dans la mesure où il s'agit de considérer la toxicité induite par une exposition aiguë qui peut avoir tout son sens lorsque l'on considère que des expositions uniques peuvent induire des effets dommageables qui sont quelques fois irréversibles.

Par ailleurs, la présence de témoins positifs est considérée comme un point fort dans les études évaluées par le comité d'experts de l'EFSA. Or, l'inclusion d'un témoin positif dans une étude sous-entend que le témoin positif et la substance d'intérêt induisent des effets de même nature. Ainsi, est ainsi préjugée la nature des effets de la substance d'intérêt et tout écart par rapport aux effets induits par le témoin positif diminuerait le niveau de confiance accordé aux effets induits par la substance.

Ainsi, une absence de témoin positif est considérée comme une faiblesse dans une étude alors que sa présence constitue un point fort. Cependant, plusieurs objections limitent la portée du témoin positif :

- L'utilisation d'un témoin positif préjuge du mode d'action de la substance qui, étant loin d'être bien caractérisé, est loin d'être connu.
- Pour le bisphénol A, il apparaît clairement que des effets non liés à une action œstrogénique existent.
- Dans le cas où le témoin positif et la substance ont le même mode d'action, les niveaux de dose (donc les concentrations internes) auxquels les effets sont induits peuvent être différents selon l'affinité du témoin positif ou de la substance pour des cibles identiques.
- Une même substance peut induire des effets différents à des niveaux de doses différents car les cibles biologiques mises en jeu ne sont pas les mêmes en fonction de leur affinité pour la substance. Cela est particulièrement vrai pour les hormones et les perturbateurs endocriniens. Ainsi, il est difficile de comparer l'effet d'une substance, qui pourrait être identique à celui du témoin positif, à un niveau de dose donné et différent à un autre niveau de dose. Cela est vrai pour la substance mais aussi pour le témoin positif. A titre d'exemple, les agonistes de la LHRH induisent d'abord une augmentation de la testostérone puis, à hautes doses ou en exposition prolongée, une diminution presque totale de la testostérone plasmatique.

Plus largement, les experts de l'Anses regrettent que l'expertise de l'EFSA ne considère pas les effets du BPA en lien avec une atteinte du développement cérébral consécutive à une exposition pré ou périnatale comme des effets pertinents pour l'évaluation des risques. Alors qu'un large développement est consacré aux études rapportant ce type d'effet dans le chapitre 3.4.2.2 du rapport de l'EFSA (sous-section « *Effects on brain biochemistry, neurogenesis, neuroanatomy and gene expression* », page 96-97), ces effets ne sont pas repris dans l'approche WoE dans le chapitre 11 du rapport de l'EFSA.

D'autres remarques sur des études évaluant les effets du BPA sur la fonction cérébrale non considérées dans le rapport de l'Anses publié en 2013 sont jointes en annexe au présent avis.

3.2.3. Effets sur le métabolisme

Comme indiqué ci-dessus dans les remarques générales, l'approche retenue par l'EFSA concernant le poids de la preuve pour un effet donné conduit à séparer divers effets qui pourtant peuvent être liés et s'inscrire dans un *continuum* qu'il conviendrait d'analyser également de façon globale. Par exemple, un sous-chapitre du rapport est consacré au paramètre « prise de poids », et les experts de l'EFSA citent les différents articles rapportant ou ne rapportant pas de changement pondéral. Le point suivant « insuline » est consacré à rapporter si des modifications de la sécrétion de l'insuline ou de la tolérance au glucose ont été décrites. Les différentes études ayant suivi ce paramètre sont rapportées. Or il est évident que si un animal prend du poids après un traitement, cela pourra avoir des répercussions sur la résistance à l'insuline ou la tolérance au glucose. Il est donc important d'analyser l'ensemble des paramètres étudiés pour se faire une idée globale de l'impact métabolique du BPA. La subdivision telle que présentée dans le rapport de l'EFSA permet difficilement au lecteur de se faire une opinion sur les effets du BPA sur le métabolisme, et cela d'autant plus que les métabolismes lipidiques et glucidiques sont étroitement liés.

De surcroît, le comité d'experts de l'EFSA conclut pour chaque sous-chapitre :

- à l'absence de relation dose-réponse (cf. ligne 4763),
- à l'obtention de résultats contradictoires difficilement réconciliables entre eux (cf. ligne 4768, ligne 4797),
- à une analyse statistique non conclusive (cf. ligne 4805),
- à des effets d'amplitude faible (cf. ligne 4817),
- à un effet « portée » non pris en compte,
- qu'il est difficile de comprendre les mécanismes sous-jacents (cf ; ligne 4919).

D'autres termes utilisés mériteraient d'être précisés, par exemple : « *not clear cut* » (cf ; ligne 4847) « *unclear* » (cf.ligne 4851), « *methodological deficiencies* » (cf.ligne 4869). Finalement, le comité d'experts indique « *the assumption of non-monotonicity is not supported by the data* » (cf.ligne 4961) et « *the high fat feed intake cannot be considered as a good model for human health assessment* » (cf.ligne 4963).

Par ailleurs et concernant les études *in vitro*, l'EFSA reconnaît qu'il est fort probable que des concentrations nanomolaires de BPA peuvent modifier la sécrétion d'insuline *in vitro* (cf.ligne 5008) mais qu'en raison des limites des modèles *in vitro*, la pertinence des résultats obtenus sur l'impact du BPA sur la physiologie des cellules β du pancréas reste à préciser (« *is currently unclear* » cf. ligne 5010).

Concernant les relations non-monotones, le comité d'experts de l'EFSA rejette les études pour 2 raisons :

- les courbes en U ou en cloche ne sont pas superposables avec les différents paramètres biologiques étudiés. Or la sensibilité hormonale va dépendre du tissu étudié et du contexte hormonal (développement, puberté, adulte) et de la mise en place des rétrocontrôles dans les tissus.
- les effets observés en réponse à un régime gras ne peuvent pas être pris en compte. Les régimes alimentaires donnés aux rongeurs sont très différents même lorsqu'ils sont considérés comme standard par opposition aux régimes gras, et notamment de par leur quantité en soja ou fibres alimentaires. Ceci est un point important parce que le métabolisme des animaux dépend étroitement du régime alimentaire reçu (Zimmermann C *et al.*, 2012). Il n'y a donc aucune justification à écarter les régimes gras et à ne considérer que les régimes standards, surtout lorsque l'on veut étudier l'action obésogène du BPA. Par ailleurs, un certain nombre d'altérations métaboliques ne sont révélées qu'en réponse à un régime gras, c'est-à-dire lorsque l'on soumet l'animal à un régime déséquilibré pour voir ses capacités adaptatives à un nouvel environnement nutritif.

Au final, le comité d'experts de l'EFSA conclut à « *as likely as not* » alors que l'Anses considère que les données expérimentales disponibles sont suffisantes pour considérer que le BPA peut entraîner des effets sur le métabolisme.

Le comité d'experts de l'EFSA conclut qu'il existe des éléments de preuves raisonnables « *reasonable evidence* » en faveur d'effets du BPA sur la régulation du glucose et de l'insuline et/ou sur la morphologie et le fonctionnement du pancréas, sur la base de résultats d'études à court-terme, alors que les études à long-terme ne montrent pas d'effets (cf. ligne 5020). Pour autant, au final, le comité d'experts conclut à « *as likely as not* » pour ce qui concerne les effets du BPA sur le métabolisme. Il serait intéressant de justifier pourquoi les effets observés sur des études à court-terme ne sont pas pertinents.

3.2.4. Effets sur la glande mammaire

L'Anses a considéré dans son expertise publiée en 2011 que les effets du BPA sur la maturation de la glande mammaire étaient des effets avérés chez l'animal et qu'ils étaient pertinents à prendre en compte pour évaluer les risques pour la santé humaine. L'Anses observe que dans son rapport, l'EFSA considère également « *likely* » les effets du BPA sur le développement de la glande mammaire et que ces effets sont transposables à l'Homme. Cependant, l'Anses considère qu'il ne faut pas occulter la possibilité d'un risque accru de cancer du sein chez les descendants de femmes qui ont un taux élevé d'oestrogènes endogènes ou de xénooestrogènes lors de la grossesse et qui sont ensuite exposés à des agents initiateurs de tumeurs. Or les experts de l'EFSA ne retiennent dans leurs critères que l'analyse des effets carcinogènes directs du BPA sur l'apparition de lésions néoplasiques. Ils ne prennent pas en considération la susceptibilité augmentée après exposition pré et/ou postnatal précoce au BPA, même à faibles doses, suivie d'une exposition à un agent carcinogène (DMBA ou NMU par exemple) lors de la puberté. Cette notion déjà explicitée dans les précédents rapports (EFSA, 2006, 2010) constitue une divergence d'appréciation avec l'Anses. Les effets sur la glande mammaire sont les effets les plus sensibles retenus par l'Anses pour évaluer les risques du BPA. Des situations d'exposition à risques ont été identifiées sur la base de ces effets.

Par ailleurs, les arguments avancés dans le rapport de l'EFSA selon lesquels le modèle rongeur ne constituerait pas un bon modèle de carcinogenèse mammaire du fait qu'il développerait seulement un nombre limité de sous-types de cancers, en comparaison de la trentaine de sous-types de tumeurs humaines ne sont pas justifiés (page 139, lignes 5822-5824). D'une part, dans la nature, aucune étude n'a permis d'estimer la diversité des tumeurs chez les rongeurs exposés à un environnement complexe. D'autre part, aucun modèle animal utilisé dans des conditions particulières et peu variées, ne peut mimer la diversité des cancers mammaires chez les femmes exposées à un environnement complexe. La majorité des experts internationaux considère que le développement mammaire et la carcinogenèse sont proches chez le rongeur et l'humain (Russo et Russo, 1996; Singh *et al.*, 2000; Rudel *et al.*, 2011). De plus, les différentes souches de rongeur (rat ou souris) peuvent avoir différentes sensibilités et susceptibilités à la carcinogenèse, dont on doit tenir compte dans l'interprétation des études expérimentales.

Concernant plus spécifiquement les effets sur la maturation et les modifications architecturales au niveau de la glande mammaire, après exposition fœtale ou néonatale au BPA, les changements rapportés au niveau des terminaisons ductales (TEBs, sites d'initiation probable de la cancérogenèse) et des branchements mammaires à la puberté sont bien rapportés dans le rapport (pages 139-140). En revanche, d'autres changements de l'organisation de la glande mammaire, tels que des modifications de l'organisation épithélium-stroma, de la maturation du tissu adipeux, des changements hormonaux, voire du métabolisme, pouvant conduire à des anomalies à l'âge adulte, ne sont pas explicités dans le rapport de l'EFSA.

L'Anses note que le rapport de l'EFSA intègre les résultats préliminaires d'une étude récente de carcinogenèse chronique conduite en 2013 aux USA (US FDA/NCTR, 2013) sur des rats Sprague-Dawley. Les experts de l'Anses n'ayant pas évalué cette étude, il est difficile à ce jour de commenter l'analyse de l'EFSA sur cette étude mais l'Anses considère que cette étude doit être analysée au regard des autres publications récentes qui semblent montrer des lésions néoplasiques (Acevado and Soto, 2013). Par ailleurs d'autres publications n'ont pas été prises en compte, comme, par exemple l'étude de Lamartinière *et al.* (2011) qui montre une augmentation de la prolifération après exposition au cours de la lactation chez le rat Wistar alors que cette étude ne comporte pas les faiblesses relevées par l'EFSA pour les études issues du même groupe (Betancourt *et al.*, 2010 et Jenkins *et al.*, 2009).

On peut regretter, dans le rapport de l'EFSA, la dispersion des données sur la glande mammaire, rendant ainsi difficiles leur interprétation et leur intégration sur les effets sur la glande mammaire, organe dont l'étude est éminemment complexe et dont la spécificité doit être prise en compte. A l'inverse, le regroupement dans une même question (« *line of evidence* ») des changements morphologiques (TEBs, Abs), de la prolifération cellulaire (incluant hyperplasie ductale simple) et des lésions ductales atypiques peut nuire à l'interprétation des données.

3.3. Estimation de l'exposition

3.3.1. Toxicocinétique et métabolisme

L'analyse des données récentes ne donne pas lieu à des différences majeures d'interprétation entre l'Anses et l'EFSA sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du BPA. Les précisions ou commentaires qui suivent méritent cependant d'être apportés:

- *“Because of the high activity of the conjugation enzymes the percentage of unconjugated BPA in the blood is only a few percent of total BPA (sum of conjugated and unconjugated BPA)”.*

Commentaires de l'Anses: pour commenter le ratio libre *versus* total dans le sang, il ne faut pas se contenter de l'activité des enzymes de conjugaison, il vaudrait mieux parler de clairance et écrire "due to the relatively high BPA clearance compared to the relatively low BPA-glucuronide clearance, the percentage of unconjugated BPA in the blood is only a few percent of total BPA (sum of conjugated and unconjugated BPA)".

- *“Based on the analysis of oral versus intravenous toxicokinetic data, the oral systemic bioavailability of unconjugated BPA in rats is 2.8 %, in mice 0.2 % and in monkeys 0.9 %.”*

Commentaires de l'Anses: ce point paraît également discutable et n'est pas conforté par l'étude récente de Gayraud *et al.* (2013). Les valeurs de biodisponibilité qui figurent ici sont celles mesurées après gavage et non pas par contamination de l'aliment. Il faudrait donc en toute rigueur écrire: "Based on the analysis of oral (gavage) *versus* intravenous toxicokinetic data, the oral systemic bioavailability of unconjugated BPA in rats is 2.8 %, in mice 0.2 % and in monkeys 0.9".

D'ailleurs un article sous presse de Vom Saal (2014) chez le singe indique une biodisponibilité orale (bolus) de 5%.

Plus spécifiquement sur l'étude de Gayraud *et al.* (2013), les experts de l'Anses s'étonnent que l'EFSA ait rejeté la seule étude qui traite de l'absorption sublinguale, sous prétexte que ce scénario de passage est peu plausible lorsque l'on traite de la voie orale. Le gavage n'est pas non plus une voie d'exposition plausible et l'intérêt de cette étude est justement de montrer la possibilité d'un pic de concentration élevé en BPA libre à proximité de la sphère buccale, par exemple lorsque l'on porte en bouche un ticket de caisse ou un stylo plastique ou une cuillère en polycarbonate. Dans ce

cas, le cerveau ou la thyroïde peuvent être soumis un bref instant à des concentrations élevées, et il n'est alors pas possible d'exclure un effet direct ou indirect sur ces organes.

3.3.2. Scenarios d'exposition

Les scénarios d'exposition pris en compte dans les expertises de l'Anses et de l'EFSA diffèrent dans la mesure où l'EFSA a pris en compte uniquement un scénario « consommateur/population générale » alors que l'Anses a élégamment évalué les risques pour les personnes en milieu de travail amenées à manipuler au cours de leur activité des tickets thermiques. L'Anses a en particulier évalué les risques liés à une exposition au BPA des femmes occupant des postes de travail de caissières, soumises à des expositions bien plus élevées que la population générale.

Il existe des différences entre les scénarios d'exposition étudiés par l'Anses dans son expertise et ceux pris en compte par l'EFSA.

Dans ses travaux d'expertise, l'Anses a calculé l'exposition des enfants de plus de 3 ans (3 à 18 ans), des adultes (hommes et femmes confondus) et des femmes enceintes. Pour ces 3 catégories de population, les sources d'exposition prises en compte dans les calculs de doses d'exposition étaient les suivantes : l'alimentation, l'ingestion de poussières sédimentées, l'inhalation d'air (extérieur et intérieur). Pour ces 3 media d'exposition, une dose interne d'exposition agrégée a été calculée. Concernant la manipulation de tickets thermiques, une dose interne d'exposition a été calculée pour la femme enceinte et l'adulte, en tant que consommateurs, excluant les situations d'exposition en milieu de travail.

Des scénarios d'exposition correspondant à des personnes en milieu de travail manipulant des tickets thermiques (femmes enceintes et adultes), comme les agents de caisse par exemple, ont également été développés. Les doses internes calculées *via* le contact cutané avec les papiers thermiques n'ont pas été agrégées aux autres doses d'exposition calculées par l'Anses du fait en particulier d'un plus faible niveau de confiance associé à ces résultats.

Tous les calculs d'expositions ont été réalisés en appliquant une approche probabiliste.

In fine, l'Anses a mené une évaluation des risques uniquement pour la femme enceinte, selon 3 scénarios d'exposition : femmes enceintes exposées *via* l'alimentation, l'ingestion de poussières et l'inhalation d'air, femmes enceintes consommatrices, exposées *via* la manipulation cutanée de papiers thermique, femmes enceintes professionnelles (agent de caisse), exposées *via* la manipulation cutanée de papiers thermiques.

Dans son « *DRAFT scientific opinion on the risks to public health related to the presence of BPA in foodstuffs – Part : exposure assessment* », l'EFSA a calculé les expositions au BPA suivantes :

Tableau 1: sources d'exposition et sous-groupes de populations considérés par l'EFSA pour l'évaluation de l'exposition au BPA

	Nourrissons (0-6 mois)			Nourrissons Lait infantil 0-6 mois	Enfants (6-12 mois)	Enfants (1-3 ans)	Enfants (3-10 ans)	Adolescents (10-18 ans)	Femmes 18-45 ans	Hommes 18-45 ans	Autres adultes 45-65 ans	Personnes âgées + de 65 ans
	Lait maternel											
	1-5 jours	6j – 3 mois	4-6 mois									
Ingestion												
poussières		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
jouets		x	x	x	x	x						
alimentation	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Inhalation												
air	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Contact cutané												
papiers thermiques							x	x	x	x	x	x
cosmétiques		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Exposition totale		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
-------------------	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tous les calculs d'exposition ont été réalisés en doses externes et selon une approche déterministe.

Pour chaque exposition, sont calculés un niveau moyen et un niveau élevé.

Commentaires de l'Anses:

Tel qu'indiqué dans l'annexe VI du rapport de l'EFSA, et bien que l'ensemble des commentaires reçus sur son rapport « *Exposure assessment* » aient été examinés, l'EFSA n'a pas été en mesure de réviser cette partie spécifique à l'évaluation des expositions afin que celle-ci puisse être intégrée à son rapport relatif à l'évaluation de risque, objet du présent avis. Ce travail d'amendement est actuellement en cours à l'EFSA.

En conséquence, la prise en compte ou non de plusieurs des commentaires formulés auprès de l'EFSA par l'Anses en septembre 2013 et relatifs à des demandes de précisions, de justifications, de reformulations, de détails et références complémentaires à insérer dans le texte, ne peut être évaluée. Cependant, l'annexe VI du document indique que les experts de l'EFSA ont considéré pertinents différents commentaires reçus, pouvant conduire à une modification des calculs réalisés. Sont présentées dans cette annexe les modifications prises en compte et ayant amené à de nouvelles valeurs de doses d'exposition. Sont également présentées les justifications des experts de l'EFSA pour ne pas considérer certains commentaires comme, par exemple, le fait que l'exposition *via* les dispositifs médicaux et les amalgames dentaires, ainsi que certaines situations d'exposition professionnelle ne soient pas traités par l'EFSA.

Sont rappelés ci-après les commentaires formulés par l'Anses dont la prise en compte ou non peut être ici évaluée. Les commentaires relatifs à l'exposition par voie cutanée ne sont pas traités ici, cet item faisant l'objet d'une partie dédiée du présent avis.

Concernant l'approche globale d'estimation des expositions, l'Anses recommandait la mise en œuvre d'une approche probabiliste de calcul des expositions plutôt que l'approche déterministe telle que développée par l'EFSA. L'évaluation des risques conduite par l'EFSA reste fondée sur une approche déterministe de calcul des expositions, avec un niveau moyen et un niveau élevé.

L'EFSA ne prend en considération aucun scénario en lien avec le milieu de travail (agents de caisse manipulant des tickets thermiques), considérant que cette question ne relève pas de son domaine de compétence.

Concernant l'exposition au BPA *via* les produits cosmétiques, du fait de la présence éventuelles de BPA dans les contenants, de manière générale, les commentaires de l'Anses insistaient sur les incertitudes relatives à la présence de BPA dans les produits cosmétiques, de sorte qu'il ne semblait pas possible de calculer une exposition fiable et représentative au BPA *via* l'utilisation de ces produits (uniquement 6 produits, choix de lotions pour le corps comme une référence pour l'exposition, etc.). L'EFSA estime que les hypothèses utilisées sont les plus robustes qui peuvent être faites sur la base des données actuelles. Une évaluation de l'exposition *via* l'utilisation de produits cosmétiques est maintenue.

Concernant le volume respiratoire utilisé dans les calculs de l'EFSA, tiré de la publication Trudel *et al.*, 2008, et jugé comme surestimé et non représentatif d'un volume respiratoire journalier tel que requis dans le calcul, l'Anses recommandait de se référer à l'*Exposure Factor Handbook – édition 2011*. Ce commentaire a été pris en considération et les calculs par voie respiratoire ont été modifiés par l'EFSA (cf. Tableau 23 A et 23B de l'annexe VI).

Concernant le taux d'ingestion de poussières sédimentées utilisé dans les calculs de l'EFSA et tiré de la publication Trudel *et al.*, 2008, comme pour le volume respiratoire, l'Anses estimait les valeurs utilisées comme inadéquates et issues d'une publication inappropriée. Ce commentaire a été pris en considération. Les calculs par ingestion de poussières sédimentées ont été modifiés par l'EFSA dans son rapport (cf. Tableau 23 A et 23B de l'annexe VI).

3.3.3. Données de biosurveillance

Bien que l'évaluation de l'exposition soit généralement réalisée par le dosage du BPA dans les urines, où il se trouve en grande majorité sous forme conjuguée, un certain nombre d'études rapportent également des valeurs de concentrations sanguines en BPA, chez l'adulte ou dans le sang du cordon ombilical du nouveau-né. Dans son rapport d'expertise sur le BPA (Anses, 2013), l'Anses a consacré ainsi un paragraphe sur les dosages sanguins, et notamment sur la part des différentes formes du BPA (conjugué ou non conjugué) dans cette matrice. La toxicité du BPA étant attribuée à sa forme non conjuguée, la part de cette forme dans le sang, liée entre autre à la capacité de métabolisation de l'individu, est donc un paramètre essentiel à prendre en compte dans le processus d'évaluation des effets potentiels de l'exposition.

Dans son rapport d'expertise, l'Anses présentait des valeurs moyennes de concentrations sériques en BPA non conjugué rapportées par différentes études réalisées entre 2002 et 2012 en Asie, en Europe et aux USA, comprises entre 0,32 et 2,5 ng/mL chez l'adulte. Une étude réalisée à Taïwan sur un échantillon de 97 femmes enceintes (Chou *et al.*, 2011) rapportait une valeur maximale de 29,4 ng/mL.

Au niveau du sang du cordon ombilical, l'étude de Fénichel *et al.* (2012) citée dans le rapport de l'Anses (Anses, 2013) présentait pour une population de 152 nouveau-nés, des valeurs de concentrations sériques en BPA non conjugué allant de 0,14 à 4,76 ng/mL, avec une moyenne supérieure à 1,1 ng/mL.

Dans son rapport (chapitre 3.1.2.4. pages 42 à 44), l'EFSA conclut que les données publiées depuis 2010 confirment le fait que, suite à une exposition orale au BPA, la forme non conjuguée du BPA dans le plasma est si basse qu'elle ne peut être détectée/quantifiée qu'à l'aide de méthodes analytiques ayant une limite de détection inférieure à 0,3 ng/mL. Ces conclusions, en désaccord avec le rapport de l'Anses (Anses, 2013), sont basées sur une seule étude (Teegarden *et al.*, 2011) réalisée aux USA sur 20 sujets chez lesquels des dosages sanguins successifs sur 24h avaient montré des concentrations en BPA non conjugué inférieures à la limite de détection de 0,3 ng/mL pour la totalité des 320 échantillons de sérum analysés.

L'étude de Teegarden *et al.* (2011), également prise en compte dans l'expertise de l'Anses, était la seule des études analysées à rapporter des valeurs aussi basses. Les autres études rapportées dans le rapport de l'Anses ne sont pas prises en compte dans le rapport de l'EFSA.

Dans le paragraphe consacré au BPA dans le sang de la femme enceinte et dans le sang du cordon ombilical, le rapport de l'EFSA cite l'étude de Kosarac *et al.*, (2012), rapportant des concentrations sériques de BPA total chez 12 femmes enceintes allant de <0,026 ng/mL à 10,4 ng/mL (médiane = 0,548 ng/mL, fréquence de détection : 67%) à mi grossesse, et de <0,026 ng/mL à 3,05 ng/mL (médiane = 1,46 ng/mL, fréquence de détection : 58%) au moment de l'accouchement. Les concentrations dans le sang du cordon ombilical variaient de <0,026 ng/mL à 2,57 ng/mL (médiane = 1,82 ng/mL, fréquence de détection : 42%). L'essentiel du BPA total détecté est considéré comme étant en majorité du BPA non conjugué car le BPA conjugué n'avait été détecté que dans 2 échantillons de sérum sur 12, et à des concentrations de 0,12 ng/mL et 0,22 ng/mL respectivement (ce dernier point n'étant pas précisé dans le rapport de l'EFSA).

Les experts de l'EFSA considèrent cependant que, malgré la bonne qualité de la méthodologie analytique utilisée, les données de l'étude de Kosarac *et al.*, sont peu crédibles en raison du manque d'information sur la collecte et la manipulation des échantillons, et également en raison des

divergences avec l'étude de Teegraden *et al.* (2011), dans laquelle le BPA libre n'était jamais détecté, et le BPA total n'était détecté que chez 6 des 20 sujets suivis et qui présentaient des pics de concentration de 0,6 à 1,3 ng/mL. Dans l'annexe II du rapport de l'EFSA, le faible nombre de sujets de l'étude de Kosarac est également considéré comme une faiblesse.

D'une manière générale, les conclusions du rapport de l'EFSA relatives aux niveaux de concentrations sanguines en BPA total et en BPA libre, ainsi que le rapport entre ces deux formes ne sont basées que sur les résultats de l'étude de Teegarden *et al.* (2011). Les quelques études citées dans le rapport comme ayant présenté des concentrations élevées en BPA non conjugué dans des liquides biologiques sont considérées comme présentant toutes de nombreuses insuffisances méthodologiques. Cette prise de position est particulièrement discutable dans la mesure où l'étude de Teegarden *et al.*, apparait finalement comme une exception dans la littérature en comparaison de la grande majorité des autres études dont la plupart ne sont pas traitées dans le rapport de l'EFSA.

3.3.4. Pénétration du BPA par voie cutanée

Dans son rapport l'EFSA considère que l'alimentation (voie orale) est la principale voie d'exposition de la population générale, alors que l'exposition cutanée par les papiers thermiques a été estimée comme étant la seconde source d'exposition de la population âgée de plus de trois ans. (cf. ligne 373). Parmi les cinq publications *in vitro* portant sur le passage percutané du BPA, l'EFSA s'est appuyé sur l'article de Demierre *et al.* (2012) pour estimer la contribution de la voie cutanée à l'exposition journalière globale. Pour l'EFSA, la quantité totale absorbée en 24 h est de 10 % de la dose déposée sur la peau en se basant sur les 8,6 % absorbés en 24 h (quantité présente dans le liquide récepteur) et les 0,6% de la dose présents dans la peau (hors *stratum corneum*). Selon l'EFSA, la quantité de BPA présente dans le *stratum corneum* (39,4 % de la dose déposée) n'est pas à prendre en compte pour une absorption systémique (cf. ligne 2370).

L'étude de Demierre *et al.* (2012) est considérée comme l'étude clé pour l'EFSA qui juge cette publication de bonne qualité. De même, l'utilisation par Demierre *et al.* (2012) d'eau comme vecteur du BPA est plus comparable à un scénario d'exposition des consommateurs à du papier thermique que l'acétone (Marquet *et al.*, 2011) ou des solutions hydro-éthanoliques diluées (Mork *et al.*, 2010, Zalko *et al.*, 2011) et la quantité déposée par unité de surface de 1,83 µg/cm² est comparable à l'exposition estimée à partir de papier thermique de 1,37-5,5 µg/cm² de doigt).

Pour l'Anses, le choix de l'étude de Demierre *et al.* (2012) comme étude clé et le rejet de l'étude de Zalko *et al.* (2011), (cf. ligne 18936) est discutable. D'une part l'étude de Demierre *et al.* (2012), qui serait réalisée suivant la ligne directrice de l'OCDE TG 428, présente plusieurs points faibles (cf. annexe 5). D'autre part, la comparaison des résultats obtenus par Mork *et al.* (2010), Zalko *et al.* (2011) et Demierre *et al.* (2012), ne permet pas de privilégier une étude réalisée avec une solution aqueuse diluée de BPA (Demierre *et al.*, 2012) par rapport à des études réalisées avec des solutions hydro-éthanoliques plus ou moins concentrées en BPA (Mork *et al.*, 2010, Zalko *et al.*, 2011). En effet, la constante de perméabilité du BPA est indépendante de la nature du véhicule utilisée (aqueux ou hydro alcoolique) ou de la concentration de BPA dans la solution de BPA déposée. Ainsi, le K_p calculé à partir des données expérimentales rapportées par Zalko *et al.* (2011) est de 0,9 10⁻⁴ cm/h. Cette valeur de K_p est identique à la valeur obtenue avec Demierre *et al.* (2012) (k_p=1,1 10⁻⁴ cm/h) qui a utilisé une solution aqueuse de BPA à 194 µg/mL ou de Mork *et al.* (2010) (k_p=1,75 10⁻⁴ cm/h) qui a utilisé une solution hydro-éthanolique à 3995 µg/mL. De même, la fraction de BPA absorbée en 24 h est comparable pour Mork *et al.*, (2010) (environ 6,5 % = 13 X 24 h/48 h), Demierre *et al.* (2012) (8,6 %) et Zalko *et al.* (2011) (15,2 % = 45,6% X 24 h/72 h).

L'affirmation de l'EFSA selon laquelle l'utilisation d'eau comme vecteur du BPA est plus comparable à un scénario d'exposition à du papier thermique que l'acétone nécessiterait d'être justifiée. Marquet *et al.* (2011) ont déposé du BPA en solution dans de l'acétone. L'acétone a été immédiatement évaporée. Dans ces conditions, le BPA sous forme solide a été mis en contact

directement avec le *stratum corneum*, comme dans le cas du BPA qui est transféré du papier thermique vers le *stratum corneum* du doigt. Le flux d'absorption du BPA ($0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) déposé à raison de $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de peau (après évaporation de l'acétone) est environ 6-7 fois plus faible que le flux de BPA de $0,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ($13\%/48\text{h} \times 259 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) obtenu après le dépôt de BPA en solution hydro alcoolique à raison de $259 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cette différence de flux peut être attribuée à la nécessité d'une dissolution au préalable du BPA solide avant sa diffusion à travers la peau.

L'EFSA estime que seulement 10 % de la dose de BPA déposée sur la peau sont biodisponibles en 24 h. Cette valeur est basée sur la quantité présente dans le liquide récepteur (8,6 % de la dose) et dans la peau (0,6 % de la dose) rapportée par Demierre *et al.* (2012). Cette quantité présente dans la peau est faible comparativement aux valeurs rapportées par Kaddar *et al.* (2008) et Mork *et al.* (2010) qui sont, hors *stratum corneum* et épiderme, 8,8 % après 10 h d'exposition et 17,2 % après 48 h d'exposition, respectivement. Un effet réservoir important a également été rapporté *in vivo* chez le rat chez lequel plus de 80 % de la quantité de BPA présente dans la peau à la fin d'une exposition de 8h étaient absorbés en 68h (Marquet *et al.*, 2011). Au regard des données de la littérature, la non prise en compte d'un effet réservoir de la peau pourrait conduire à une sous-estimation de la dose quotidienne de BPA absorbée.

L'Anses dans son rapport d'expertise de 2013 avait retenu une distribution triangulaire du taux de pénétration cutanée avec comme valeur la plus probable 27%, et les valeurs extrêmes de la distribution de 10% et 60%, pondérée par la durée journalière de pénétration cutanée. La valeur de 27% a été considérée par les experts de l'Anses comme la plus probable car elle repose sur une étude chez des volontaires manipulant des tickets dans des conditions d'exposition proches des conditions réelles (Biedermann *et al.*, 2010). L'étude de Demierre *et al.* utilisée par l'EFSA a été réalisée à partir d'explants de peaux humains sur lesquels du BPA a été appliqué sous forme de solution aqueuse. Cette formulation diffère du ticket, et en cela le choix de cette étude pour cette évaluation ne suit pas les lignes directrices (OCDE 428, EHC235) qui soulignent la nécessité que ces études reflètent les conditions d'exposition réelles en termes de dose, de durée, mais aussi de formulation.

Le choix de l'étude de Demierre *et al.* comme étude clé et l'estimation du 10 % comme valeur conservatrice sont argumentés mais restent discutables au regard des méthodes et résultats rapportés dans les études d'absorption cutanée du BPA (cf. Annexe 5).

Une incertitude forte persiste sur le devenir du BPA après pénétration cutanée et le degré de métabolisation par la peau. Peu d'études ont investigué de manière appropriée le métabolisme du BPA et l'Anses approuve les recommandations de l'EFSA quant à la nécessité d'approfondir cette question (cf. ligne 6876). Aucune étude de toxicocinétique n'a mesuré la biodisponibilité du BPA par voie cutanée. Par conséquent, le niveau de preuve semble là aussi limité pour affirmer, comme il est dit dans le rapport de l'EFSA, que la valeur de 10% de pénétration cutanée est conservatrice (cf. ligne 6489; lignes 6860-6862).

A titre indicatif, l'approche de l'Anses conduit à un taux d'absorption percutanée compris entre 0,02% et 27% (approche probabiliste) sur 24h, qui peut être mis en perspective avec le taux de 10 % de l'EFSA (approche déterministe)². Au final, cette différence entre les approches EFSA et Anses influence peu la différence de résultats entre les évaluations de risque respectives, principalement attribuable au choix du repère toxicologique. L'Anses observe par ailleurs que dans l'opinion récente du SCENIHR consacrée à l'évaluation des risques du BPA dans les dispositifs médicaux, les experts ont retenu une valeur de pénétration cutanée de 25-30 % dérivée de l'étude de Demierre *et al.* en se basant sur le même *corpus* de données.

² Dans le modèle d'exposition Anses, en tenant compte de la durée de pénétration utilisée et du taux d'absorption de 27 %, le taux d'absorption sur 24h se situe environ entre 0,02% et 27% de manière équiprobable (estimation, le résultat exact nécessitant de refaire tourner le modèle avec la distribution triangulaire (mode : 27 %, Min 10 % et max 60%)).

3.4. Evaluation des risques

3.4.1. Utilisation d'une BMD

Pour modéliser la relation dose-réponse issue de l'étude de Tyl *et al.* (2008), l'EFSA a choisi d'utiliser le logiciel Proast du Rivm (www.proast.nl) dans lequel le choix du niveau de réponse (ou BMR) est défini comme un pourcentage de changement dans la réponse par rapport à la réponse observée chez les témoins. Il s'agit de choisir une valeur à partir de laquelle on considère la réponse observée comme anormale. Ce choix de la BMR doit être clairement expliqué.

Pour le calcul de la BMD (et BMDL) à partir de l'étude de Tyl *et al.* (2008), l'EFSA a choisi un BMR de 10% liée à une augmentation du poids absolu des reins. L'EFSA justifie ce choix de 10 % (page 67) en considérant qu'en dessous de 10% les effets observés ne sont pas néfastes pour la santé (« *less than 10% should not be regarded as adverse.* »), ce qui peut être effectivement justifié vue l'absence de lésion rénale histopathologiquement visible.

Cependant, selon les recommandations de l'EFSA³, un BMR de 5% par défaut est préconisé pour les données continues (cf. chapitre 5.2 «*For continuous data the BMR could be defined in various ways. The way recommended here is to define it as a percent change in the average magnitude of the response variable as compared to the predicted background response. The recommended default value is a BMR of 5%*»). Suivant le choix effectué en termes de BMR (5 ou 10%), les BMD et BMDL sont des valeurs très différentes. Un choix alternatif de BMR aurait pu être réalisé en se basant sur la limite supérieure des intervalles de confiance (à 95 ou 99%) autour des valeurs moyennes de l'augmentation de poids du rein chez les animaux témoins mâles et femelles (F0 et F1). Les calculs de BMR selon ces différents choix sont présentés en annexe (cf. annexe 6).

L'EFSA a choisi de calculer des BMD et BMDL en utilisant comme co-variables, le sexe et la génération (F0 et F1). Ceci permet de voir si l'un des deux sexes ou l'une des deux générations est plus sensible au BPA. C'est ce que montre le tableau 54 du rapport de l'EFSA, les mâles de la génération F0 sont plus sensibles au BPA, avec une BMDL arrondie à 4 mg/kg pc/jour.

Dans un souci de clarté, il aurait été utile de présenter les mêmes calculs en annexes, en modélisant les mâles F0 (les plus sensibles), puis les mâles F0 avec comme co-variable la génération mâle F1 et enfin les mâles F0 avec comme covariables les femelles F0. Cette approche permet de comparer les différents couple BMD et BMDL obtenus, et de retenir le plus robuste.

Concernant le choix des données relatives à l'effet citrique (poids absolus *versus* poids relatifs) l'étude de Tyl *et al.* (2008) fournit en supplément (tableaux 19-20) les valeurs de poids relatifs de chaque organe.

Il aurait été intéressant de réaliser les mêmes calculs en comparant poids absolus et poids relatifs.

En conclusion, la modélisation des données sur le poids du rein de Tyl *et al.* (2008) a été réalisée au moyen du logiciel Proast, en distinguant 4 sous-groupes (mâles F0 et F1, femelles F0 et F1). L'intérêt de cette approche (prise en compte de co-variables) est de mesurer l'influence du sexe (mâle ou femelle) et de la génération (F0 ou F1) sur les paramètres de l'équation (exponentielle ou Hill). L'analyse de l'EFSA montre que les mâles de la génération F0 sont plus sensibles au BPA que les femelles F0 et que les mâles F1.

Le tableau ci-dessous reporte les valeurs de BMD, BMDL recalculées par l'Anses en fonction de la prise en compte ou non de co-variables, d'un BMR de 10 ou 5% et de l'effet (poids absolu et poids relatif).

³ Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. The EFSA Journal (2009) 1150, 1-72

Les valeurs ainsi obtenues varient de plusieurs ordres de grandeur en fonction des choix effectués. Il faut noter que les rapports BMD/BMDL sont tous inférieurs à 10 lorsqu'on considère comme effet critique le poids relatif (donc des valeurs avec un niveau d'incertitudes moins élevées que si on prenait comme effet le poids absolu).

On peut noter qu'un BMR à 5% (tel que préconisé par l'EFSA dans son guide méthodologique⁴) et comme effet critique l'augmentation du poids relatif conduit à une BMD_{5%L90%} de 286 µg/kg/j, soit une valeur 10 fois plus faible que celle retenue par l'EFSA.

Tableau 2 : Synthèse des BMD et BMDL en fonction de la prise en compte de covariables (F1 et sexe), de l'effet (poids absolu versus relatif) et du niveau de réponse (BMR).

Effet	Covariable	BMR (CES)	BMD (µg/kg.pc/j)	BMDL (µg/kg.pc/j)	Ratio BMD/BMDL
Augmentation du poids <u>absolu</u> du rein (gauche) chez les males F0	Femelle, et FO/F1	10%	23600	3633	6.5
		5%	1040	43	24
	Male F1	10%	19000	2732	6.9
		5%	1050	33	31
	Femelle F0	10%	48900	9272	5.2
		5%	4520	262	17
	aucune	10%	48400	9694	5
		5%	5740	348	16
Augmentation du poids <u>relatif (% du poids total)</u> du rein (gauche) chez les males * F0	Femelle, et FO/F1	10%	35500	10000	3.5
		5%	2170	286	7.6
	Male F1	10%	36400	10520	3.4
		5%	2300	260	8.8
	Femelle F0	10%	54900	14250	3.8
		5%	5370	539	9.9
	aucune	10%	51900	16720	3
		5%	10600	1316	8

*Remarque : pour le calcul des BMD avec le poids relatif, c'est la génération F1 (males) qui est la plus sensible, mais les valeurs décrites dans le tableau sont celles de F0 (dans un souci de comparaison).

Seules les valeurs issues de l'équation exponentielle sont fournies dans ce tableau. Quel que soit le modèle utilisé (exponentielle ou Hill), on retrouve des résultats du même ordre de grandeur.

Le rapport ne retient pas les effets sur la glande mammaire (*mammary gland ductal proliferation*) considéré pour l'évaluation des risques au motif que la BMDL₁₀ obtenu avec les divers modèles varie de manière importante (plus de 10 ordres de magnitude) (cf. p. 161, p. 515). Le fait que le choix des modèles ait une influence sur les résultats de la BMD est connu (Foronda *et al.*, 2007, Sand *et al.*, 2008). Ce n'est pas une raison suffisante pour ne pas utiliser cet effet critique pour l'évaluation des risques. Pour traiter l'influence du modèle sur les valeurs de la BMD, une analyse de sensibilité aurait pu être réalisée et un intervalle de valeurs aurait pu être inclus, pour cet effet critique, dans l'évaluation du risque.

⁴ Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. The EFSA Journal (2009) 1150, 1-72

3.4.2. Extrapolation animal – homme : modélisation PBPK

L'approche utilisée par l'EFSA consiste à calculer une dose équivalente humaine à partir de la dose critique établie (BMDL) chez la souris d'après l'étude de Tyl *et al.* (2008). Pour ce faire, un facteur d'équivalence a été calculé à partir des ratios des aires sous la courbe de la concentration en BPA libre dans le sérum pour une même dose unique de 100 µg/kg poids corporel/jour.

L'Anses comme l'EFSA recommande d'utiliser par défaut un ajustement allométrique basé sur le ratio des poids corporels entre la souris et l'Homme à la puissance $\frac{1}{4}$. Cependant, si un ou des modèles PBPK (modèles pharmacocinétiques à base physiologiques) sont disponibles, ils sont préférentiellement utilisés pour établir la dose équivalente humaine. L'EFSA a ainsi utilisé les modèles PBPK de Yang *et al.* (2013) et de Fisher *et al.* (2011) (même équipe) pour calculer un facteur d'ajustement de dose (rapport des AUC animale/ AUC Homme) à partir d'une dose unique de 100 µg/kg pc/jour pour les deux espèces, ce qui suppose une linéarité de la réponse toxicocinétique en fonction de la dose qui est loin d'être acquise, en particulier du fait de la saturation possible du métabolisme. Un tableau retraçant les incertitudes et leur impact potentiel sur l'estimation du HEDF est présenté dans le rapport (cf. table 50, page 499).

Du point de vue de l'Anses, la démarche aurait consisté à convertir la dose externe d'exposition chez la souris (BMDL établie précédemment) (Tyl *et al.* 2008) en une dose interne à l'aide du modèle PBPK souris (Yang *et al.*, 2013). Cette dose interne correspond à une AUC. Chez l'Homme, on peut s'attendre à ce que cette même AUC provoque des effets similaires (ou une absence d'effet), sous réserve d'application d'un facteur d'incertitude de 2,5, relatif à la composante toxicodynamique. Un modèle PBPK humain (Yang *et al.*, 2013) peut ensuite être utilisé pour reconstruire la dose d'exposition correspondante en BPA.

D'une manière générale, ce qui est requis pour utiliser un modèle PBPK peut être résumé à travers ces « lignes directrices » issues du document de l'OMS/WHO⁵ (cf. figure 1).

Le niveau de confiance d'un modèle repose sur l'analyse de la structure globale du modèle, la simulation et validation, et enfin une évaluation de la fiabilité comprenant une analyse de sensibilité et des incertitudes (cf. figure 1).

⁵ Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment, WHO 2010.

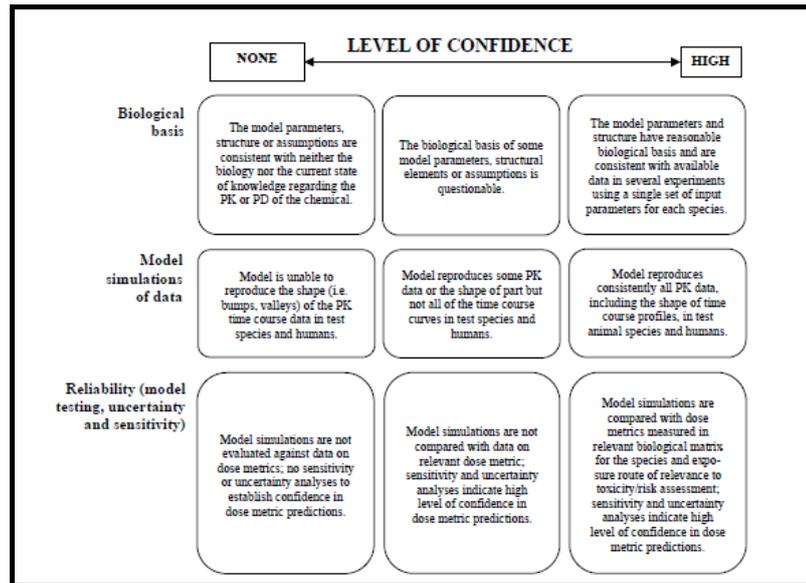


Figure 1: niveau de confiance d'un modèle PBPK – source WHO⁵, 2013

Description des modèle PBPK utilisés

Les modèles (rat et Homme), dont il est question dans le rapport de l'EFSA, sont ceux décrits dans les articles de Fisher *et al.* (2011) pour l'Homme, de Yang *et al.* (2013) pour le rat et un modèle pour l'Homme de Mielke *et al.* (2011).

Modèles du groupe de Fisher

- Description des modèles PBPK de l'équipe de Fisher

Les deux premiers modèles PBPK utilisés avaient pour objet d'identifier la dose de départ découlant des travaux du groupe de Fisher. Ce groupe a produit un modèle PBPK d'abord chez le singe et l'a extrapolé à l'Homme, puis chez le rat exposé au BPA.

Le modèle développé pour le singe et l'Homme a une structure comprenant 7 compartiments, dont le compartiment sanguin (sérum), l'appareil reproducteur (gonade), le cerveau, les tissus gras, les tissus richement perfusés, les tissus peu perfusés et le foie. Ce modèle se compose aussi de 3 pseudo-compartiments dont l'intestin grêle, l'estomac et un compartiment que les auteurs nomment volume de distribution (Vd). Ce dernier pseudo-compartiment représente la fraction métabolisée de BPA en BPA-c (Fisher *et al.*, 2011). Cependant, il ne tient pas compte du cycle entéro-hépatique (Fisher *et al.* 2011).

Le modèle PBPK rongeur, publié par Yang *et al.* (2013), est identique à celui de Fisher *et al.* (2011). Pour le métabolite (BPA-c), les auteurs ont décrit 3 compartiments comprenant le plasma, le « corps » et le foie et un pseudo-compartiment nommé appareil digestif. À noter que le compartiment plasma et foie sont les mêmes compartiments que ceux énumérés pour le produit mère (BPA libre), mais que le compartiment nommé « corps » correspond à l'agglomération des autres compartiments. Le modèle contient dans cette version une description d'un cycle entéro-hépatique (Yang *et al.*, 2013). De plus, chacun des compartiments est décrit comme étant à perfusion limitée « *well stirred model* », c'est à dire que la quantité de BPA se distribuant dans les tissus est en relation avec la capacité de perfusion de l'organe ce qui implique et suppose une distribution uniforme et instantanée du BPA entrant dans les compartiments.

Les paramètres physiologiques sont ceux qui sont retrouvés classiquement dans la littérature. Les paramètres métaboliques utilisés pour le rongeur (V_{max} et K_m) sont issus d'une revue de la littérature ou sont optimisés à partir de données cinétiques publiées. Les paramètres physicochimiques (coefficient de partage) utilisés pour les deux modèles sont issus de deux publications précédentes de ces mêmes auteurs (Doerge *et al.* 2011; Fisher *et al.* 2011). Les équations sont décrites dans un document en annexe (pour Yang *et al.* 2013) et ne semblent pas comprendre d'erreurs de syntaxes : on y retrouve les équations de base des modèles PBPK.

En conclusion, la base physiologique des deux modèles semble acceptable. Cependant, nous n'avons procédé à aucune analyse ou audit des équations et paramètre des dits modèles. Sur la base de la Figure 1 en référence au document de l'OMS, le niveau de confiance pour la base physiologique des modèles serait « moyen » (WHO/IPCS, 2010).

- **Calibration, évaluation et prédictibilité des modèles**

Le modèle PBPK chez le rongeur et chez l'Homme permet d'estimer la concentration interne dans le plasma (C_b) en BPA et sa surface sous la courbe (AUC) suivant différents scénarios d'expositions. Les modèles ont été calibrés à partir d'une dose unique de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/jour chez le rat et le singe (Doerge *et al.*, 2010a; Doerge *et al.*, 2010b). Cependant, une calibration ne constitue pas une capacité prédictive du modèle et il y a nécessité de confronter des données mesurées avec celles calculées par le modèle. Le modèle de Fisher a été calibré par inspection visuelle pour plusieurs paramètres et, en conséquence, sa calibration reste discutable. Une optimisation au moyen du logiciel utilisé (ACSLX) est possible et aurait permis de gagner en confiance.

L'examen visuel des figures 7, 8 et 9 du modèle de Fisher *et al.* (2011) est satisfaisant⁶ pour des expositions à des concentrations diverses de 10 mg/kg pc/j, de 400 mg/kg pc/j ou encore de 5 mg total. On remarque une bonne adéquation entre ce qui est mesuré et ce qui est modélisé. L'examen visuel des figures 7, 8 et 10 pour le modèle de Yang est satisfaisant⁴ : pour des expositions à des concentrations diverses (1 mg/kg pc/j, 10 mg/kg pc/j), il y a une bonne adéquation entre ce qui est mesuré et ce qui est calculé.

En conclusion, sur la base de la figure 1 (document OMS-IPCS, 2010), le niveau de confiance pour la partie « Simulation et validation » des modèles serait « moyen-faible ».

- **Analyse de la fiabilité incluant une étude de sensibilité et des incertitudes.**

Les facteurs d'incertitudes suivants sont discutés dans le rapport de l'EFSA :

- *Incertitude sur la mesure des concentrations chez l'animal.*

La précision analytique est de 20% pour la méthode utilisée pour toutes les études. En outre, la méthode utilisée protège des risques de contamination extérieure au cours du dosage.

- *Incertitude sur le calcul des AUC*

Cette incertitude provient de la variabilité entre les animaux et de la méthode de calcul qui induit des imprécisions, en particulier pour le calcul jusqu'à l'infini. Les auteurs considèrent que la prise en compte de l'écart type rend compte de ces deux aspects, ce que l'on peut admettre. Une autre source d'incertitude provient du traitement des valeurs manquantes (sous le seuil de détection) qui sous-estime la valeur de l'AUC.

La procédure d'absorption orale semble cohérente entre les études expérimentales chez les animaux et le modèle PBPK humain, ce qui n'engendre pas d'incertitude supplémentaire.

⁶ Il est recommandé que le rapport WHO-IPCS entre valeur prédite et valeur mesurée soit inférieure à deux. L'Anses n'a pas accès aux données brutes pour établir ce rapport.

S'agissant du modèle humain, seul l'impact de la variabilité inter-individuelle est évalué. Manquent donc plusieurs évaluations de l'incertitude, notamment concernant le modèle PBPK chez l'Homme.

S'agissant, en amont, de la légitimité du calcul du facteur d'équivalence à la concentration de 100 µg/kg/j, cela suppose une linéarité de la réponse toxicocinétique en fonction de la dose qui est loin d'être acquise, en particulier du fait de la saturation possible du métabolisme. La concentration de départ pour la caractérisation du danger est supérieure à 3500 µg/kg/j (Tyl *et al.*, 2008). L'utilisation de modèles PBPK pour chaque espèce (souris et Homme), valides sur une gamme comprenant cette concentration de départ pour l'extrapolation, aurait permis de supprimer ce facteur d'incertitudes qui est ici ignoré.

- *Incertitude sur la modélisation PBPK.*

L'analyse de Monte Carlo est l'approche probabiliste la plus utilisée avec les modèles PBPK car elle permet d'incorporer la variabilité dans ces modèles. L'objectif est de cette analyse de Monte Carlo est de caractériser qualitativement et quantitativement la variabilité et l'incertitude dans les estimations. Il est possible de mesurer l'incertitude, en faisant varier un paramètre physiologique, un coefficient de partage (physicochimique) ou bien un paramètre biochimique dans des valeurs réalistes. Il est ensuite possible de regarder de manière théorique en quoi ces variations influent sur les résultats de sortie. Dans ce cas, on n'obtient plus une concentration unique, mais une distribution de probabilité, avec une médiane et un 95^{ème} percentile.

Selon un rapport de l'OMS sur la modélisation PBPK, il suffit de faire le ratio entre le 95^{ème} percentile et la médiane pour mesurer cette incertitude : élevé, moyenne ou faible⁷ (WHO/IPCS 2010). Cependant, ce ratio ne figure pas dans le rapport de l'EFSA.

L'analyse de sensibilité permet de déterminer les paramètres qui influencent le plus l'indicateur mesuré (p. ex. C_b, AUC). L'approche consiste à faire varier un paramètre à la fois (peut être un paramètre physiologique, physicochimique ou encore biochimique) et regarder comment cette variation influence l'indicateur mesuré. Ainsi, plus la valeur est proche de 1 en valeur absolue, plus le paramètre a de l'influence sur l'indicateur mesuré. Selon les critères de l'OMS, il est possible de classer cette sensibilité en élevé, moyenne ou faible⁸ (WHO/IPCS 2010). Les auteurs des articles originaux ont effectué une étude de sensibilité pour chacune de modèle rat (Yang *et al.* 2013) et Homme (Fisher *et al.* 2011).

Pour le modèle rat et le modèle Homme du groupe de Fisher

CRITERES	NIVEAU DE CONFIANCE
BASE PHYSIOLOGIQUE	Moyenne à forte
SIMULATION ET VALIDATION	Moyen-faible
FIABILITE (ANALYSE DES INCERTITUDES ET SENSIBILITE)	moyenne

⁷ Uncertainty analysis results are summarized as high uncertainty (value could be a factor of 2 or higher), medium uncertainty (value could be a factor between 0.3 and 2) or low uncertainty (value could be a factor of 0.3 or lower)

⁸ high (absolute value greater than or equal to 0.5), medium (absolute value greater than or equal to 0.2 but less than 0.5) or low (absolute value greater than or equal to 0.1 but less than 0.2)

Modèle de Mielke *et al.* 2011

- **Description du modèle PBPK de Mielke *et al.* 2011**

Pour le modèle Homme (lequel fut utilisé pour l'exposition cutanée (Mielke *et al.* 2011)) comprend 8 compartiments notamment les compartiments muscle, peau, tissus adipeux, squelette, cerveau, reins, foie et un compartiment « autres organes ». Deux voies d'exposition sont décrites dont la voie orale et cutanée. Tous les compartiments sont limités par la perfusion. Le métabolisme a lieu seulement au niveau hépatique.

- **Analyse de la fiabilité incluant une étude de sensibilité et des incertitudes.**

Les auteurs de la publication 2011 indiquent qu'une analyse de sensibilité a été effectuée dans la publication de 2009 (Mielke and Gundert-Remy, 2009). Cependant, une analyse de l'article ne montre pas d'analyse de sensibilité. Ceci constitue une limite pour utiliser ce modèle dans une évaluation des risques et ne reflète pas une stratégie standardisée de l'OMS. Le modèle de Mielke *et al.* (2011) est intéressant pour générer des hypothèses, mais représente une incertitude importante que l'EFSA n'a pas explicité.

Au final, le niveau de confiance qu'on peut avoir dans un modèle est la combinaison entre l'analyse de la sensibilité et de l'incertitude, avec une échelle de faible à élevé en fonction des critères établis par l'OMS. En conclusion, en se basant sur les recommandations de l'OMS, il est possible d'attribuer les niveaux de confiance suivants :

Pour le modèle de Mielke	
CRITERES	NIVEAU DE CONFIANCE
BASE PHYSIOLOGIQUE	moyenne
SIMULATION ET VALIDATION	faible
FIABILITE (ANALYSE DES INCERTITUDES ET SENSIBILITE)	Très faible absence de preuve que cela ait été fait

Conclusion

Les deux modèles de l'équipe de Fisher *et al.* (2011 et 2013) présentent une bonne description physiologique, et une prédictibilité pour le sang seulement. Ce modèle n'est pas prédictif pour les autres compartiments. Ceci pose un problème de confiance vis-à-vis du modèle. Cette limite est due en partie au manque de données de la littérature et possiblement à une limite méthodologique. L'utilisation de pseudo-compartiments diminue aussi la confiance accordée au modèle. Cependant, les auteurs ont tout de même une bonne prédictibilité pour le compartiment sanguin (sérum ou plasma).

Concernant le modèle de Mielke (2010), c'est-à-dire le modèle PBPK chez l'Homme qui permet de reconstruire l'exposition globale (orale et cutanée), il aurait été plus simple d'utiliser un même modèle (avec la même base physiologique) pour réaliser cette exposition agrégée, en y intégrant, par exemple, l'exposition cutanée au modèle de Fisher pour lequel une évaluation de prédictibilité et une étude de sensibilité ont été faites.

Le modèle de Mielke semble moins fiable que le modèle de Fisher pour les raisons suivantes :

- le modèle de Fisher a été confronté avec des données expérimentales, ce qui permet de tester le modèle
- la prédictibilité du modèle de Mielke est démontrée par la comparaison d'un point mesuré issu d'une donnée de Volkell. De plus, aucune étude de sensibilité ne semble avoir été faite sur le modèle de Mielke ce qui ne permet pas d'augmenter le niveau de confiance du modèle.

3.4.3. Application d'un facteur d'incertitude supplémentaire

L'Anses, dans son rapport d'expertise publié en mars 2013 a choisi d'appliquer un facteur d'incertitude supplémentaire de 3 pour tenir compte de l'ensemble des incertitudes en lien avec les effets du BPA observés à des doses plus faibles que celles retenues pour l'ERS, l'existence de relations dose-réponse non monotones, l'existence de données *in vitro* et *ex vivo* en faveur d'une sensibilité largement supérieure (au-delà d'un facteur 10 déjà considéré dans le facteur de variabilité inter-espèce) de tissus d'origine humaine vis-à-vis du BPA, comparativement à des tissus d'origine animale. Au final un facteur d'incertitude global de 300 a donc été appliqué dans l'expertise de l'Anses.

Dans le rapport de l'EFSA, l'incertitude concernant les effets est mise en évidence à plusieurs reprises sur un mode narratif dans le rapport. C'est le cas pour les effets sur la reproduction et le développement (p. 5), les effets neurotoxiques (p. 6), les effets sur l'immunité (p. 6), les effets cardiovasculaires (p. 6), les effets sur le métabolisme (p. 7) et l'effet cancérigène (p. 7). On aurait pu s'attendre à ce que cette incertitude soit considérée au niveau de l'évaluation du risque, par exemple par un facteur d'incertitude spécifique pour tenir compte de l'état des connaissances. Ce n'est pas le cas, sur la base de l'argument que le calcul de la dose équivalente humaine (HEDF) en rendrait compte en raison de son caractère conservateur. Le rapport spécifie que le facteur HEDF de 0,03 utilisé est conservateur. Or cet argument est discutable car ce n'est pas parce que l'HEDF développé pour un effet (augmentation du poids des reins) est conservateur qu'il l'est pour tous les autres effets.

3.4.4. Prise en compte globale de l'incertitude

En dépit de ce qui est dit (cf. p. 9), l'incertitude n'a été que partiellement évaluée dans le rapport de l'EFSA. Il aurait été utile que le terme « incertitude » soit défini et que la méthode concernant le choix des incertitudes retenues soit mieux décrite. Les raisons pour lesquelles certaines incertitudes sont mises en avant et pas d'autres n'apparaissent pas clairement à la lecture du rapport.

L'objectif de toute évaluation du risque est de tirer des conclusions lorsqu'une information « parfaite » et donc « certaine » n'est pas disponible. Autrement dit, toute évaluation du risque sert à produire une conclusion en situation d'incertitude. Il est donc discutable de refuser de considérer la connaissance disponible sous prétexte qu'elle est incertaine. Pourtant, dans le rapport de l'EFSA, l'incertitude est souvent utilisée comme argument pour considérer qu'un effet n'est pas probable (les effets pour la reproduction et le développement, p. 5) ou même pour exclure de l'évaluation du risque un effet qui est considéré probable (l'effet sur l'hyperplasie mammaire, p. 8). En outre, si l'incertitude sur l'effet est importante (cf. p. 5), sur quels arguments les experts ont-ils estimé que les effets sont improbables ?

4. CONCLUSIONS DE L'EXPERTISE

L'Anses reprend à son compte les observations des rapporteurs du Groupe de travail « perturbateurs endocriniens et reprotoxiques de catégorie 3 », résultant de l'analyse, dans un délai contraint sur un sujet complexe, du projet de rapport sur les risques sanitaires liés au BPA soumis à consultation publique par l'EFSA le 17 janvier 2014.

Cette analyse a porté sur la démarche d'évaluation développée par l'EFSA, la caractérisation des dangers, des expositions, les données de biocinétiques et l'évaluation des risques. Cette analyse s'est concentrée sur des aspects particuliers du rapport de l'EFSA qui peuvent influencer les résultats de l'évaluation des risques : choix des publications prises en compte, sélection du ou des effets critiques, calcul de la BMD, estimation des expositions internes chez l'Homme et traitement des incertitudes. Les remarques spécifiques à certaines études ainsi que des compléments d'information apportées par l'Anses sont annexés au présent avis.

Concernant la caractérisation des effets, l'Anses reconnaît le caractère systématique de l'approche retenue par l'EFSA visant à caractériser étude par étude les niveaux de preuves associés aux effets du BPA. Néanmoins, l'approche mise en œuvre présente un certain nombre de limites, telles que par exemple, le morcellement parfois excessif de l'analyse des données, qui rend difficile une caractérisation cohérente des effets par organes ou systèmes (système reproducteur, glande mammaire...). De plus, les manifestations biochimiques et/ou histologiques pouvant conduire à des altérations biologiques précurseurs d'effets néfastes pour la santé ne sont pas considérées par l'EFSA comme suffisamment probantes pour être retenues pour l'évaluation des risques. L'Anses, pour sa part, considère que certains de ces effets (effets sur le système nerveux central, effets sur la glande mammaire par exemple) sont à prendre en compte pour l'évaluation des risques du BPA. Les effets sur la glande mammaire sont les effets les plus sensibles retenus par l'Anses pour évaluer les risques du BPA. Des situations d'exposition à risques ont été identifiées sur la base de ces effets. De même, il est fait état, à de nombreuses reprises dans le rapport de l'EFSA, des incertitudes sur les effets du BPA en lien avec la qualité des études évaluées. Dans ce contexte d'incertitudes, il serait utile que les choix que les experts de l'EFSA ont été amenés à faire tout au long de l'expertise soient mieux décrits, documentés et justifiés. Dans le rapport de l'EFSA, l'incertitude est souvent utilisée comme argument pour considérer qu'un effet n'est pas probable ou même pour exclure de l'évaluation du risque un effet qui est considéré probable.

L'Anses observe que, pour cette nouvelle évaluation des risques pour la santé du BPA, non seulement les études par voie orale mais aussi celles réalisées par voie sous-cutanée ont été évaluées, ce qui n'était pas le cas dans les avis précédents de l'EFSA. La plupart des recherches réalisées pour étudier la toxicité du BPA n'ont pas été réalisées selon les lignes directrices de l'OCDE et ne suivent pas systématiquement les « Bonnes Pratiques de Laboratoire » (BPL); ces études ont néanmoins été prises en compte dans l'expertise de l'EFSA, même si un poids plus important a été donné aux études suivant les recommandations de l'OCDE et/ou réalisées selon les BPL (Tyl, 2002, 2008 par exemple). De nombreuses études ont été publiées depuis juin 2012, date limite des publications prises en compte par l'Anses dans son rapport d'expertise sur l'évaluation des risques sanitaires liés au BPA publié en mars 2013. Ces études récentes incluses dans l'expertise de l'EFSA, ont permis d'apporter des compléments d'information, en particulier pour certains effets critiques, comme le métabolisme pour lesquels assez peu d'informations étaient disponibles jusque récemment.

Sous réserve de l'évaluation de ces nouvelles publications, qui n'ont pas fait l'objet d'une analyse dans le présent avis par les experts du groupe de travail, l'Anses considère que les conclusions de son évaluation publiées en mars 2013 restent, à ce jour, valides. L'Anses prend néanmoins acte du nombre de publications postérieures au rapport sur les effets sanitaires du BPA (Anses, 2011), qui justifie de poursuivre une veille active permettant l'actualisation des données sur cette substance.

Enfin, l'Anses considère nécessaire de définir des critères objectifs permettant de qualifier les études investiguant les effets de substances potentiellement PE, étant donné les divergences

d'interprétation relevées par les experts concernant notamment les limites méthodologiques des études de toxicité sur le BPA, comme le nombre de doses, d'animaux nécessaires, l'absence de témoin positif ou, l'absence de relations dose-réponse croissantes. Ces critères devraient faire l'objet d'une harmonisation entre l'EFSA et les agences nationales de sécurité sanitaire.

Le directeur général

Marc MORTUREUX



MOTS-CLES**Bisphénol A, Evaluation des risques, Avis EFSA****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

Bai Y, Chang F, Zhou R, Jin PP, Matsumoto H, Sokabe M, Chen L (2011) Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge system in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. Endocrinology 152(4), 1562-1571.

Benoit B, Plaisancié P, Awada M, Géoën A, Estienne M, Capel F, Malpuech-Brugère C, Debard C, Pesenti S, Morio B, Vidal H, Rieusset J, Michalski MC. (2013) High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. Nutr Res. 33(11):952-60.

Betancourt AM, Eltoum IA, Desmond RA, Russo J, Lamartiniere CA (2010) *In utero* exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. Environmental Health Perspectives 118(11), 1614-1619.

Biedermann S, Tschudin P, Grob K (2010) Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. Analytical and Bioanalytical Chemistry 398(1), 571-576.

Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, Gadbois JL, Tharp AP, Whitt GS, Sonnenschein C, Soto AM (2011) Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. Environ Health Perspect. 119(4): 547-52.

Chou WC1, Chen JL, Lin CF, Chen YC, Shih FC, Chuang CY (2011) Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. Environ Health.;10:94.

Demierre A-L, Peter R, Oberli A, Bourqui-Pittet M (2012) Dermal penetration of bisphenol A in human skin contributes marginally to total exposure. Toxicology Letters 213(3), 305-308.

Doerge, DR., Twaddle, NC, Vanlandingham, M, Brown, RP, and Fisher, JW (2011). Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. Toxicol Appl. Pharmacol 255(3), 261-270.

Doerge, DR, Twaddle, NC, Vanlandingham, M, and Fisher, JW (2010a) Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. Toxicol Appl. Pharmacol 247(2), 158-165.

Doerge, DR, Twaddle, NC, Woodling, KA, and Fisher, JW (2010b) Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology* 248(1), 1-11.

ECHA (2010). Practical guide 2: How to report weight of evidence. URL : https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_weight_of_evidence_en.pdf

Eilam-Stock T, Serrano P, Frankfurt M, Luine V (2012) Bisphenol-A impairs memory and reduces dendritic spine density in adult male rats. *Behav Neurosci*. 126(1):175-85.

Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, Wagner-Mahler K, Pugeat M, Brucker-Davis F (2012) Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod* 27(4), 983-90

Fisher, JW, Twaddle, NC, Vanlandingham, M, and Doerge, DR. (2011). Pharmacokinetic modeling: Prediction and evaluation of route dependent dosimetry of bisphenol A in monkeys with extrapolation to humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*(0).

Foronda NM, Fowles J, Smith N, Taylor M, Temple W (2007). A benchmark dose analysis for sodium monofluoroacetate (1080) using dichotomous toxicity data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 7(1):84-9.

Gayrard V, Lacroix MZ, Collet SH, Viguié C, Bousquet-Melou A, Toutain PL, Picard-Hagen N (2013) High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect*. 121(8):951-6.

Heather B. Adewale, Karina L. Todd, Jillian A. Mickens, Heather B. Patisaul HB. (2011) The impact of neonatal bisphenol-A exposure on sexually dimorphic hypothalamic nuclei in the female rat *NeuroToxicology* 32, 38-49

Inagaki T, Frankfurt M, Luine V. (2012) Estrogen-induced memory enhancements are blocked by acute bisphenol A in adult female rats: role of dendritic spines. *Endocrinology*. 153(7):3357-67.

Jenkins S, Raghuraman N, Eltoum I, Carpenter M, Russo J, Lamartiniere CA (2009) Oral Exposure to Bisphenol A Increases Dimethylbenzanthracene-Induced Mammary Cancer in Rats. *Environmental Health Perspectives* 117, 910-915.

Jenkins S, Wang J, Eltoum I, Desmond R, Lamartiniere CA (2011) Chronic oral exposure to Bisphenol a results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in mmtv-erbB2 mice. *Environmental Health Perspectives* 119(11), 1604-1609.

Jones BA, Shimell JJ, Watson NV (2011) Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Hormones and Behavior* 59(2), 246-251.

Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W (2012) A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 898:90-4.

Lamartiniere CA, Jenkins S, Betancourt AM, Wang J, Russo J (2011) Exposure to the Endocrine Disruptor Bisphenol A Alters Susceptibility for Mammary Cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig* 1;5(2):45-52.

Lee SG, Kim JY, Chung JY, Kim YJ, Park JE, Oh S, Yoon YD, Yoo KS, Yoo YH, Kim JM (2013). Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17 β -estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary. *Environ Health Perspect*. 121(6):663-9.

- Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L (2012) Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology*. 55(2), 395-407.
- Marquet F, Payan JP, Beydon D, Wathier L, Grandclaude MC, Ferrari E (2011) In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [¹⁴C]-bisphenol A in rats: A possible extrapolation to human absorption? *Archives of Toxicology* 85(9), 1035-1043.
- Martini M, Miceli D, Gotti S, Viglietti-Panzica C, Fissore E, Palanza P, Panzica G (2010) Effects of perinatal administration of Bisphenol A on the neuronal nitric oxide synthase expressing system in the hypothalamus and limbic system of CD1 mice. *Journal of Neuroendocrinology* 22(9), 1004-1012.
- Mielke, H., and Gundert-Remy, U. (2009) Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol. Lett.* 190(1), 32-40.
- Mielke, H., Partosch, F., and Gundert-Remy, U. (2011). The contribution of dermal exposure to the internal exposure of bisphenol A in man. *Toxicology letters* 204(2-3), 190-198.
- Mok-Lin E, Ehrlich S, Williams PL, Petrozza J, Wright DL, Calafat AM, Ye X, Hauser R (2010) Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *International Journal of Andrology* 33(2), 385-393.
- 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.
- Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM (2006) Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147(8), 3681-3691.
- Rudel RA, Fenton SE, Ackerman JM, Euling SY, Makris SL (2011) Environmental exposures and mammary gland development: State of the science, public health implications, and research recommendations. *Environmental Health Perspectives* 119(8), 1053-1061.
- Russo IH, Russo J (1996) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives* 104(9), 938-967.
- Sand S, Victorin K, Filipsson AF (2008) The current state of knowledge on the use of the benchmark dose concept in risk assessment. *J Appl Toxicol.* 28(4):405-21. Review.
- Singh M, McGinley JN, Thompson HJ (2000) A comparison of the histopathology of premalignant and malignant mammary gland lesions induced in sexually immature rats with those occurring in the human. *Laboratory Investigation* 80(2), 221-231.
- Teeguarden JG, Calafat AM, Ye X, Doerge D, Churchwell MI, Gunawan R, Graham MK (2011) Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol A during high-dietary exposure. *Toxicological Sciences* 123, 48-57.
- Tian YH, Baek JH, Lee SY, Jang CG (2010) Prenatal and postnatal exposure to bisphenol A induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse* 64(6), 432-439.
- 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.

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.

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.

Vom Saal FS, VandeVoort CA, Taylor JA, Welshons WV, Toutain PL, f, Hunt PA (2014). Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure *via* silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reprod Toxicol* , in press

WHO/IPCS. Characterization and Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. WHO. No. 9, 1-97. 2010. IPCS harmonization project document.

Ref Type: Report

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.

Xu XH, Wang YM, Zhang J, Luo QQ, Ye YP, Ruan Q (2010b) Perinatal exposure to bisphenol-A changes N-methyl-D-aspartate receptor expression in the hippocampus of male rat offspring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(1), 176-181.

Xu X, Liu X, Zhang Q, Zhang G, Lu Y, Ruan Q, Dong F and Yang Y. (2013a) Sex-specific effects of bisphenol-A on memory and synaptic structural modification in hippocampus of adult mice. *Hormones and Behavior*, 63, 766-775

Yang, X., Doerge, D. R., and Fisher, J. W. (2013) Prediction and evaluation of route dependent dosimetry of BPA in rats at different life stages using a physiologically based pharmacokinetic model. *Toxicol Appl. Pharmacol.*

Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E (2011) Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82(3), 424-430.

Zhou R, Bai Y, Yang R, Zhu Y, Chi X, Li L, Chen L, Sokabe M (2011) Abnormal synaptic plasticity in basolateral amygdala may account for hyperactivity and attention-deficit in male rat exposed perinatally to low-dose bisphenol-A. *Neuropharmacology* 60(5), 789-798.

Zimmermann C, Cederroth CR, Bourgoin L, Foti M, Nef S (2012) Prevention of diabetes in db/db mice by dietary soy is independent of isoflavone levels. *Endocrinology*. 153(11):5200-11.

ANNEXE 1 – REMARQUES FAITES A L'EFSA VIA LE SITE INTERNET EN SEPTEMBRE 2013

Tableau des commentaires de l'Anses transmis à l'Efsa sur le rapport « DRAFT Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs – Part : Exposure Assessment »

CHAPTER OR CONCERNED PARAGRAPH (n° and title)	Line numbers of the text on wich the comment is	ANSES COMMENTS
SUMMARY - General approach taken for the assessment	66	<p>The approaches used are different between the two institutes. EFSA used a deterministic approach while Anses used a probabilistic approach.</p> <p>The average exposure assessment conducted by EFSA is classic, combining the average values of each exposure parameters and calculating the total exposure adding the average exposure of each sources investigated. However, the high exposure assessment is less conventional. Some parameters are taken at a high percentile and others at their average. Moreover, the total exposure is calculated adding high levels of some exposures and average levels of the others. This method doesn't permit to take into account some possible correlations between parameters. Further, a parameter involved in the calculation of the exposure of each source, as the body weight, is not taken at the same values according the level of the exposure.</p> <p>The aggregation of the exposure via the media and some products (toys, thermal papers) can generate some difficulties about the risk management. Moreover, the total exposure thus calculated is subject to more uncertainties.</p>
SUMMARY - Dietary exposure	157	Could you precise the term "PC filters" : jug water filters, filters in drinking water plants or filters withing buildings
ASSESSMENT		

2 Physical and chemical characterisation	566 to 570	Could you add that in common chlorinated drinking water, the half-life of BPA would be less than 3 h. Some studies show that the chlorinated BPA are not detected in the drinking water networks (Dupuis, 2012). A. Dupuis, V. Migeot, A. Cariot, M. Albouy-Llaty, B. Legube, S. Rabouan (2012). Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. <i>Environmental Science and Pollution Research</i> , 19(9), pp. 4193-4205.
3 Potential sources of exposure - 3.1 Polycarbonate plastics	595 & 596	The use of pipes in PC plastic in public water distribution networks doesn't exist in France. Could you specify the countries where this practice exists.
3 Potential sources of exposure - 3.1 Epoxy resins	631 & 632	Could you specify the frequency and conditions of use of epoxy resins in drinking water pipes and tanks and mention the differences between countries.
3 Potential sources of exposure - 3.1 Polysulfone resins	706	Could you specify if pumps, valves and pipes mentioned are for drinking water. In France, PSU is used in the fittings or in the membranes but not in the pipes for public water distribution networks.
3.1. Materials and uses	729	In Cacho study (2013), <u>thirty</u> cosmetic products have been collected from "local supermarket". We question whether such data could be considered as a realistic sample for a European safety assessment. <i>Cacho, J.I., Campillo, N., Viñas, P., and Hernández-Córdoba, M. (2013). Stir bar sorptive extraction with EG-Silicone coating for bisphenols determination in personal care products by GC-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 78-79, 255-260.</i>
3 Potential sources of exposure - 3.1 Other uses	737	Could you specify if tanks and piping mentioned are for drinking water.
4.3.4. Data on occurrence in and migration from food contact materials into food simulants	874	It is specified that "Consumers tend to be loyal to the type of water they consume", is there any reference about it?

Table 3	1145	Typing error for legumes, nuts & oil seeds: Mean is 121 whereas max is 103.
4 Exposure assessment -4.3 Occurrence data - 4.3.5 Occurrence data in food Table 3: Summary of average BPA concentrations (g/kg) from the literature and EFSA's call for data	1145 - 1146	As mentioned in appendix III, lines 5162 to 5165, 10 results for samples of canned drinking water come from "Efsa's call for data".
4 Exposure assessment -4.3 Occurrence data - 4.3.5 Occurrence data in food Table 3: Summary of average BPA concentrations (g/kg) from the literature and EFSA's call for data	1145 - 1146	Taking into account the differences between BPA concentrations in drinking water from distribution networks, PET bottles or PC coolers, it would be interesting to consider them separately.
4.3.6. Occurrence, migration and transfer data from non-dietary sources Indoor air sub-chapter	1233-1234	The choice of the French data is based on the argument of the only study available in Europe but not based on quality criteria as mentioned in the first paragraph. Only the average level is taken into account without explanation for the exposure calculation.

<p>4.3.6. Occurrence, migration and transfer data from non-dietary sources Dust sub-chapter</p>	<p>1235-1257</p>	<p>Some references are lacking in the description of available data in the scientific literature (cf Rudel et al. 2003, Wilson et al. 2007 referenced in the Anses report), Efsa quotes the result from Völkel et al. (2008) although the author indicates in his publication that they had problems of samples contamination. Otherwise, this reference provides no information on the measurement method, The choice of Geens et al. (2009a) data is based on the comparison with the other average median concentrations but not based on quality criteria as mentioned in the first paragraph. Indeed, the argument mentioned to support this choice is that the author reported the average median concentrations among the recent dust studies available for Europe. However, as described in lines 1253-1254, the French Agency ANSES recently reported average and median concentrations of 5,8 and 4,7 mg/kg respectively (ANSES, 2013). The final choice of the data used does not appear to be based on an analysis of interest criteria such as the description of the methods of sampling and measurement, Such descriptions and criteria are essential but are not always presented in the publications, Only the median level is taken into account without explanation for the exposure calculation. For indoor air, the average level was retained while median level is available from the French study. This point should be explained.</p>
<p>4.3.6. Occurrence, migration and transfer data from non-dietary sources Children's toys and articles intended to be mouthed sub-chapter</p>	<p>1328-1332</p>	<p>The choice of KEMI (2012) data for rattle and Lassen et al. (2011) for pacifiers is not explained. Only the average middle bound level is taken into account without explanation for the exposure calculation.</p>

<p>4.3.6. Occurrence, migration and transfer data from non-dietary sources</p> <p>“The concentration of 31 µg/kg found in facial lotion by Cacho et al. (2013) was chosen for exposure calculation from e.g. the use of body lotion.”</p>	<p>1351-1353</p>	<p>We wonder about the selection of the body lotion (as a reference for the exposure) because there is no BPA concentrations data for body products in this publication (Cacho et al., 2013). Moreover, SCCS's notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation, 8th revision (2012) proposed to calculate a global daily exposure value for all cosmetic products (in the specific case of preservatives) that one person may daily apply on the skin [SCCNFP/0321/00]. Taking into account the latest exposure values and considering the worst-case scenario in which the consumer would use a set of cosmetic products containing the same preservative, an aggregate value of 17.4 g/day or 269 mg/kg bw/day will have to be used in the calculation of the MoS.</p>
<p>4.3.6 Occurrence, migration and transfer data from non-dietary sources</p>	<p>1396</p>	<p>The origin of the 22 volunteers in the Kang et al(2011) study is not mentioned. This information could be useful to assess the reliability of the study to the European market.</p>
<p>4.3.6. Occurrence, migration and transfer data from non-dietary sources</p> <p>Table 4: Overview of BPA concentrations and sources considered for the present exposure assessment</p>	<p>1407</p>	<p>We wonder about the selected BPA concentration for cosmetic products which is 31µg/kg. Which criteria has been chosen to select the lowest value as an exposure value? Indeed, Cacho's publication concluded that “The analyzed personal care samples contained BPA at concentration levels ranging from 30.9 to 88.3 ng g⁻¹”.</p>
<p>4.5.2. Dermal absorption</p>	<p>1438-1439</p>	<p>The study of Demierre (2012) has been conducted over 8h and 24 h. So "8h" should be added in the brackets line 1439.</p>

<p>4.5.2. Dermal absorption</p>	<p>1439-1441 ; 1466-1468</p>	<p>In the study of Zalko et al (2011), only <3% of the applied dose remain on the skin surface after a 72h incubation period (which is over the 24h recommended to preserve the integrity of skin explants according to the OECD guideline 428). In the study of Marquet et al (2011), the dose applied on skin can be considered as a saturating concentration (200 µg.cm⁻²) and the study provides maximal absorption flows (µg.cm⁻².h⁻¹). So, arguing that in vitro studies fail to provide a reliable upper boundary for dermal absorption (dermal exposure assessment) because no study was conducted over a large enough time span to reach the maximum absorption, seems poorly supported. This comment is not contrary to the use of the 30% absorption fraction (Biedermann et al, 2010) for dermal exposure from thermal paper specifically (line 1468).</p>
<p>4.5.2 Dermal Absorption</p>	<p>1466-1470</p>	<p>With regard to the risk assessment on the general population relating to cutaneous contact with thermic papers containing BPA, the estimate of the percutaneous absorption flow (expressed in % absorbed by the dose transferred onto the skin, and not in the quantity absorbed by surface unit of skin and time) corresponds to values of the least probable rate of a minimum of 10 % and a maximum of 60 %, encompassing a most probable value of 27 %. The rate of 27 % was used in an experimental study (Biedermann et al., 2010). The data from this study cannot be considered as representative on a population scale. However, the experimental protocol is considered to be similar to the conditions of exposure for a person handling cashier's tickets on an occasional basis during the day, different to cashiers. This rate was estimated from the quantity of BPA transferred to the skin of the finger after a single contact of 5 seconds with a ticket, and the quantity of BPA which was no longer removable from the skin by soap and water 2 hours after this contact. The maximum rate of 60 % corresponds to the rate estimated by Biedermann et al. (2010) 2 hours after immersion of the finger in a solution of BPA in acetone; while the minimum level of 10 % corresponds to a (default) recommended value by the European Commission when a substance has a molecular weight over to 500 g.mol⁻¹ and an octanol-water distribution coefficient lower than -1 or higher than 4 (EC, 2004). Therefore, with the absorption rates being estimated by Biedermann et al. (2010) for a period of exposure to the skin to BPA of 2 hours, they must be weighted by an adapted</p>

		period of exposure for the general population in the handling of BPA-based thermic papers.
4.6.1. General assumptions for calculation	1476	It could be precised that a deterministic calculation is done for each scenario that explained the choice of one value of each parameter which are taken into account in the calculation.
4.6. Exposure assessment	1471	As a general comment, EFSA used the deterministic approach to calculate exposures. This approach has the advantage to determine the main contributors to the exposure and to identify specify consumption habits. However, EFSA did not take advantage of this aspect. A probabilistic approach would have been preferable with this respect as discussed in further comments.
4.6.1. General assumptions for calculation	1476	To a certain extent, two scenarios were developed for average exposure and for high exposure, to account for the variability and/or uncertainty of exposure . Considering the available data, a probabilistic approach seems possible, especially for dietary exposure, and more relevant, why this approach has not been implemented?
4.6.2. Exposure estimation from dietary sources Dietary exposure from water coolers with PC reservoirs, PC water filters and old waterpipes repaired with epoxy resins	1575 to 1581	As concentrations of BPA in water from PC coolers are included in general concentration of BPA in drinking water, is not it redundant to consider a specific scenario for PC coolers users ?

4.6.2 Exposure estimation from dietary sources	1670-1671	Dietary exposure in toddlers was used to estimate dietary exposure in infants aged 6 to 12 months. However the consumption of these 2 populations are quite different and the type of food consumed also. There is a part of the population who consumed only infant meals. Why no calculation has been made for 6-12 months children ? Is there any data on contamination of infant foods except for infant formulae ? Anyway, this point should appear in the list of sources of uncertainty.
4.6.2 Exposure estimation from dietary sources	1687	The objective of this work is to perform risk assessment at the European level. In the present work, the national median of the average exposures were used to determine these exposures. The risk is assessed using mean contamination in combination with high consumptions. This implies that food, environmental (air quality, drinking water etc.) are homogeneous over Europe which is clearly not the reality (considering local food production for instance).
4.6.3. Exposure from non-dietary sources	1761	In the Table 15, ingestion exposure to dust for newborns should be mentioned with exclusion of infants (cf. line 1782-1783)
	1764-1773	Other possible pathways exposures to BPA from non-food sources should be mentioned in this paragraf as well those mentioned and not used then. The following exposure pathways are lacking : dermal exposure to dust; dermal exposure to air (recent publication has been dealing with this pathways (Weschler and Nazaroff, 2012).

	1779-1792	<p>Data for dust ingestion rate are derived from Trudel et al 2008. This publication does not appear to be an adapted reference for parameter such as dust ingestion rate. For example, dust ingestion rates for infants and toddlers (9,0 and 106 mg/d respectively for average and high scenarios) are taken from Calabrese et al 1989, But these values correspond to soil ingestion rates (Yttrium tracer element used) and not dust ingestion rates. For teenagers and adults, there seems to be errors in the publication of Trudel because the values reported as weighted dust ingestion rates are actually ingestion rate of soil directly from a publication of Davis et al, 2006 (see original publication). In any event, it would be fair and appropriate to rely on the Exposure Factors handbook- 2011 edition of US-EPA which provides a detailed analysis of a range of publications including the source publications Calabrese and Davis cited by Trudel. EPA recommends the following means dust ingestion rate: 60 mg/day for individuals 1-21 years old and 30 mg/day for adults, and a general population upper percentile of 100 mg/day.</p>
	1868-1880	<p>As for dust ingestion rate, values for air intakes are taken from Trudel et al. 2008. This publication does not appear to be an adapted reference for parameter such as air intakes. Daily respiratory volumes used by EFSA are quite unusual and surprising, and seem to be very elevated for a whole day. We also do not get to find them since the cited source (Trudel et al, 2008). As for dust rate ingestion, the Exposure Factors Handbook - 2011 edition of US- EPA provides a detailed analysis of a range of publications concerning air intakes. This parameter should be considered with caution. A daily inhalation rate has to be a long-term inhalation rate. The inhalation rates used by Efsa seem to correspond more to a characterisation of a short-term exposure to a median to high level of activity. Moreover, this parameter is correlated with body weight and this must be taken into account in the calculation as much as possible.</p>
4.6.3. Exposure from non-dietary sources - <i>Thermal paper: transfer to food</i>	1847-1867	<p>The exposure estimate is based on numerous assumptions without supporting data, so that the development of this scenario is questionable. It seems useful to further investigate the various modes of BPA food contamination, including food contamination from thermal papers.</p>

4.6.3. Exposure from non-dietary sources	1751	Brand loyalty was considered for some food items (infant formulae for instance). However, one could also consider “brand loyalty” in the context of cosmetic uses, or environmental conditions (The air quality in one city is probably very constant). Here again, a probabilistic approach would have been of great use.
4.6.3. Exposure from non-dietary sources - <i>Dermal - Thermal paper</i>	1882-1904	No exposure scenario were developped for cashiers, a population expected to be more exposed than the general population. The exposure estimate for children is based on assumptions without supporting data for the parameter "number of handling events", so that the development of this scenario is questionable. The dermal absorption fraction of 30% is supported by the Biedermann experiment resulting in a 27% after a 2h absorption duration. So, the exposure equation (line 1898) could overestimate exposure because of the combination of the 30% dermal absorption fraction with the number of handling events.
4.6.3. Exposure from non-dietary sources	1909	For adults, exposure data usually used for safety evaluation of cosmetic are given by the SCCS's notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation, 8th revision (2012).
4.7 Total exposure	1953-1954	Why total high exposure was calculated by adding up high levels of exposure from the two highest sources and not from all sources ? Is there any reason ?
4.7 Total exposure	1946	To calculate the highest exposures, the only 2 main contributors were considered, and the mean exposure for all other routes. This appears surprising since it implies that one can not be highly exposed to more than 2 routes. A probabilistic approach would have solved this issue.
4 Exposure assessment - 4.7. Total exposure	1973 to 1976	Could you specify if your have any information on the frequency of such cases

4.8.1 General introduction	1984	Efsa's document did not take into account the higher bioavailability that could occur via the sublingual route compared to the pure oral route. This was shown in a recent publication « High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. V Gayrard et al Environ Health Perspect 2013; 121 :951-956 ».
4.8.1 General introduction "In addition, it has been shown that generally less than 1% of total serum BPA in in the unconjugated form after oral administration	2007-2008	Anses has considered for the risk assessment of BPA that 3% of BPA would be available as a free form after oral exposure. On the basis of the available data, only the studies by Doerge <i>et al.</i> (2010) carried out on the Sprague Dawley rat and the Rhesus monkey for an administered dose of BPA of 100 µg/kg and Farbos (2012) carried out on several species (ewe, pig, dog, Wistar rat, CD1 mouse) for an administered dose of BPA of 100 mg/kg enable the determination of an absolute bioavailability of unconjugated BPA for the oral route. These two studies report an absolute bioavailability in unconjugated BPA in rats of the same size, specifically: 2.8% ± 3.1% (Doerge <i>et al.</i> (2010)) and 3.03% (Farbos, 2012) . It should be noted that a study carried out recently on gestating rhesus monkeys (Patterson <i>et al.</i> , 2012) reported an absolute oral bioavailability in unconjugated BPA of 0.48 % (on average), and could therefore support the arguments in favour of a lower bioavailability factor than that used. Furthermore, other authors (Mielke and Gundert-Remy, 2012, Gundert-Remy and Mielke, 2013) note a value of 10% of oral bioavailability of free BPA for humans, based on a PB-PK model. In anticipation of being able to use the PB-PK model currently being developed at the request of Anses, the working group considered that the value of 3% was, in view of current knowledge, the most robust one.
APPENDIX III: FOOD CATEGORIES	5483 to 5489	Pool all the results and use the values of the PC reservoirs for drinking water contamination is not representative of the population exposition because only some people consume DW from PC reservoirs.
APPENDIX III: FOOD CATEGORIES	5566 to 5580	It would be interesting to comment the difference of results between France and Sweden : public network or network inside building (surface-to-volume ratio and residence time of the water differents), chlorinated or not chlorinated drinking water, existence or not of an hygienic authorization of materials and products in contact with drinking water (PDWs),

<p>APPENDIX VIII: EVALUATION OF UNCERTAINTIES IN THE EXPOSURE ASSESSMENT THROUGH 5770 EXPERT JUDGEMENT</p>	<p>5770-5820</p>	<p>In general, the results of the uncertainty analysis are fairly well detailed. In contrast, the method used is too briefly described, which could affect the correct interpretation of results. In particular, it seems necessary to specify how the principles suggested by EFSA 3163 (EFSA, 2006b) were adapted to the needs of the present assessment. It is also necessary to explain how the explanation of experts was conducted. Finally, the method of evaluation of the combined impact of all the uncertainties is described nowhere in the report.</p>
<p>APPENDIX VIII: 4. Uncertainties in the assessment of (average and high) non-dietary exposure Table 58</p>	<p>5879</p>	<p>There are too many uncertainties affecting the assessment, so that it seems not possible to calculate a reliable exposure to BPA in cosmetic products (6 products, choice of body lotion as a reference for exposure, ...)</p>

ANNEXE 2 EFFETS SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

STUDIES EXAMINING EFFECTS OF BPA ON ANXIETY-LIKE BEHAVIOUR

Diaz Weinstein S, Villafane JJ, Juliano N and Bowman RE, 2013. Adolescent exposure to Bisphenol-A increases anxiety and sucrose preference but impairs spatial memory in rats independent of sex. Brain Research, 1529, 56-65.

Weaknesses of the study :

“Information about sexual maturation is lacking”

Commentaire : Les rats exposés journalièrement à 40 µg/kg BPA sont âgés de 7 semaines. L'exposition est répétée durant 12 jours. L'âge des rats étant connu, la maturité sexuelle l'est donc aussi.

Fujimoto T, Kubo K, Nishikawa Y, Aou S, 2013. Postnatal exposure to low-dose bisphenol A influences various emotional conditions. The Journal of Toxicological Sciences, 38(45), 539-546.

Weaknesses

“Drinking water consumption (containing BPA) not measured”

Commentaire : Au début de la section Results, il est indiqué : *“In this study, mother rats were administered BPA (0.1 ppm in drinking water) during 7 days soon after the delivery. The average intake of BPA for mother rats was 23.8 ± 0.86 µg/kg/day (mean ± S.E.M.) which was calculated from mother's weight and drinking water volume”*.

Gioiosa L, Parmigiani S, Vom Saal FS, Palanza P, 2013. The effects of bisphenol A on emotional behavior depend upon the timing of exposure, age and gender in mice. Hormones and Behavior, 63, 598-605.

The Panel also noted that these findings are not consistent with those of Ferguson et al. (2012; who used twice the dose (25 µg/kg bw per day) during GD6-21 without finding any effects of BPA).

Commentaire : Une étude peut ne pas avoir mis en évidence un effet qui pourrait être observé dans une autre étude dans d'autre condition. De plus, des effets observés à une dose n'impliquent pas forcément qu'ils soient aussi observés à dose plus forte. Cela est particulièrement vrai quand les relations dose-effet ne sont pas monotones. Enfin, les études de Gioiosa 2013 et Ferguson 2012 diffèrent par les protocoles qui pourraient expliquer, entre autre, les différences de résultats :

- Ferguson 2012 : Rat Sprague-Dawley, doses de 2.5 et 25 µg/kg/j, exposition des F1 via les mères par gavage avec le BPA solubilisé dans une solution de carboxyméthylcellulose à 0.3% (p/v) de GD6-21, et ensuite exposition orale des F1 de PND1-21 à la même dose que les mères.
- Gioiosa 2013 : Souris CD-1, dose de 10 µg/kg/j, exposition orale sans contrainte des mères par le BPA dans de l'huile de maïs de GD11 à PND8.

Jasarevic E, Williams SA, Vanda GM, Ellersieck MR, Liao C, Kannan K, Roberts RM, Geary DC, Rosenfeld CS, 2013. Sex and dose-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A on anxiety and spatial learning in deer mice (peromyscus maniculatus bairdii) offspring. Hormones and Behavior, 63, 180-189.

“It is also noted that the authors reported that free BPA in serum at the highest dose was similar to that found in pregnant women, without taking into account that serum BPA is not the optimal biomarker of exposure due to BPA toxicokinetics”.

Commentaire : Il est vrai que, compte tenu de son métabolisme rapide, le BPA sérique ne constitue pas le meilleur marqueur d'exposition au BPA, surtout lorsque la concentration en BPA < LOD. Cependant, compte tenu aussi du métabolisme rapide, une forte teneur en BPA sérique signe

une forte exposition. Aussi, même si dans l'absolu les concentrations en BPA observées dans la souris dans cette étude ne peuvent pas être directement comparées à celle observées chez les femmes enceintes, elles apportent des renseignements importants sur les expositions susceptibles d'induire des concentrations sériques de cet ordre.

Jones BA and Watson NV, 2012. Perinatal BPA exposure demasculinizes males in measures of affect but has no effect on water maze learning in adulthood. *Hormones and Behavior*, 61, 605-610

Strengths

“Use of non-PC cages and of BPA-free water sacks”

Commentaire : Le polysulfone résulte de la condensation du sel di-sodique de bisphénol A et du bis(4chlorophényl)sulfone (ou bis(4fluorophényl)sulfone). Chacun de des deux composés a des actions similaires à celles du bisphénol A et peuvent se retrouver sous forme de monomères libres dans les plastiques. Ainsi, ce type de matériaux ne garantit pas un meilleur contrôle des sources de composés à action estrogénique.

Patisaul HB, Sullivan AW, Radford ME, Walker DM, Adewale HB, Winnik B, Coughlin JL, Buckley B and Gore AC, 2012. Anxiogenic effects of developmental bisphenol A exposure are associated with gene expression changes in the juvenile rat amygdala and mitigated by soy. *PLoS One*, 7, e438

Weaknesses

Lack of constant levels of exposure in time (lactational exposure is much lower than the gestational or juvenile exposure).

An important limitation was the lack of constant levels of exposure in time (lactational exposure is much lower than the gestational or juvenile exposure). The exposure to BPA was estimated based on water intake and not normalized to body weight for calculation of internal exposure

Commentaire : L'exposition non constante n'est pas un problème car elle a été mesurée. De plus, l'exposition durant la lactation n'est pas inférieure mais supérieure à celle durant la gestation ou chez les petits. La différence d'exposition journalière n'est pas considérable car pour le BPA, par exemple, elle est de 71.8 µg durant la lactation, 35.2 durant la gestation et 22.4 µg chez les petits.

Viberg H, Fredriksson A, Buratovic S and Eriksson P, 2011. Dose-dependent behavioral disturbances after a single neonatal bisphenol A dose. *Toxicology*, 290, 187-194.

The selection of behavioural tests is appropriate, however given the peculiar profile of BPA exposed mice at either 2 and 5 months is somewhat surprising that no motor activity impairments are present in either the Elevated plus maze and the Morris water maze test (testing performed at different ages). The deficit shown by BPA-treated male mice is specific to the exploration of a novel environment, but the authors did not provide any mechanistic explanation.

Commentaire : Il n'est pas toujours possible de donner une explication plausible à tous les effets spécifiques observés car l'état actuel des connaissances ne permet pas toujours de la faire. Aussi, une absence d'explication ne signifie en rien que l'effet n'existe pas. Les mécanismes d'action ne sont pas connus pour une grande majorité des médicaments sans que ne soit remise en cause leur action thérapeutique. Cependant, les différents tests utilisés dans cette étude n'explorent pas les mêmes fonctions cognitives et les mêmes structures du cerveau, et il n'est pas anormal que le BPA n'induisse pas des effets avec tous les tests. L'exploration d'un nouvel environnement met en jeu des mécanismes de mémoire, d'apprentissage et d'habituation. Ce test implique des structures cérébrales comme l'hippocampe, le bulbe olfactif ou le cortex périrhinal. Il permet d'explorer la capacité d'intégration d'informations sensorielles nouvelles. La piscine de Morris est configurée pour explorer principalement les processus de mémoire et d'apprentissage liés à la mémoire spatiale et met en jeu, sans être exhaustif, des structures cérébrales comme l'hippocampe, le striatum, le cervelet, le cerveau antérieur et le cortex cérébrale et cérébelleux. Enfin, la labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze) explore les mécanismes d'anxiété et met en jeu des

structures cérébrales comme l'amygdale ou le cortex préfrontal droit. Ainsi, selon le contexte, les impacts sur l'activité motrice n'ont pas les mêmes causes, n'impliquent pas les mêmes mécanismes cognitifs et les mêmes structures cérébrales.

Xu X, Hong X, Xie L, Li T, Yang Y, Zhang Q, Zhang G, Liu X, 2012. Gestational and Lactational Exposure to Bisphenol-A Affects Anxiety- and Depression-like Behaviors in Mice, Hormones and Behavior, 62, 480-490.

Commentaire : Accord avec les commentaires de l'EFSA. Les résultats sont en accord avec ceux d'histochimie montrant des modifications de l'expression des récepteurs glutamates AMPA et NMDA dans l'hippocampe et l'amygdale.

En ce qui concerne la disparité des résultats avec les différents tests, voir les remarques ci-dessus, même si la plupart des tests sont configurés pour investiguer principalement l'anxiété et la dépression.

D'une manière générale, l'étude est assez complètes mais souffre des faiblesses rapportées par l'EFSA et l'environnement pro-générateur de BPA n'est pas considéré, comme dans l'étude de Xu de 2010.

STUDIES EXAMINING THE EFFECTS OF BPA ON SOCIAL BEHAVIOUR

Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SR, Gatewood JD, Taylor JA, Rissman EF, Connelly JJ, 2012. Gestational exposure to bisphenol A produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. Endocrinology, 153, 3828-3838.

Weaknesses

Animal age and body weight not given

For each test, and for each generation (F1-F4), the age the animals is indicated: PND20 for juvenile social interactions, PND22 for elevated plus maze, PND24 for the social preference test, GD18.5 for microarray analysis and quantitative real-time PCR.

The results on social behaviour throughout the generations were inconsistent (social interaction decreased in the F0 generation but increased in the F2 and F4 generations), whereas the effects on gene expression from F1 to F4 appeared per.

Dans ce commentaire, il est postulé que les effets doivent être identiques ou du même ordre entre les générations. Cependant, (i) les effets peuvent s'atténuer ou s'amplifier entre les générations et (ii) la génération F1 provient de mère exposées et a donc ainsi été exposée directement. La génération F2 n'a pas été exposée mais proviennent d'animaux exposés alors que les F3 et F4 n'ont pas été exposées et ne proviennent pas d'animaux exposés. Ainsi, selon la nature de la perturbation physiologique, il est tout à fait concevable que de certains effets perdurent de générations en générations alors que d'autres disparaissent ou, éventuellement apparaissent. Dans ce cas, les effets induits chez les individus d'une génération peuvent avoir des impacts différents chez les individus de la génération suivante.

ANNEXE 3 EFFETS SUR LE SYSTEME REPRODUCTEUR FEMELLE

Tableau comparatif point à point de l'analyse des études publiées après 2010

Reference	ANSES	EFSA	*Species * Route and dose *Period	Observed Significant effect	ANSES opinion	EFSA opinion
Ferguson <i>et al.</i> 2011	No	Yes		Lower preweaning bodyweight		
S FDA/NTCR subchronic toxicity study 2013	No	Yes	SD rats	None for doses lower than equivalent current NOAEL		
Xiao <i>et al.</i> 2011	Yes	Yes	C57Bl6 mice sc 0.025-0.5-10 40-100 mg/kg HD0.5 to GD3.5	None for doses lower than equivalent current NOAEL	Effect were observed on pre implantory embryony loss but only for very HIGH doses	
Kobayashi <i>et al.</i> 2012	Yes	Yes	Sprague Dawley rats 0.02-0.17-1.65 mg/kg/d in diet GD6 to PND21	Decreased Anogenital distance and ovary weight at 5 weeks at 0.17 and 1.65 mg/kg/d reversed at 3 months		No clear biological significance
Veiga-Lopez <i>et al.</i> 2013	No	Yes	Sufolk ewes Sc 0.5 mg/kg/d	Alteration of enzymes expression (CYP19A1 and SRD5A1) and miRNA patterns in fetal ovaries at GD65 but not GD90		No clear biological significance
Nah <i>et al.</i> 2012	yes	Yes	ICR mice Sc 0.1-1-10-100 mg/kg/d a single injection at PND8	Decreased ovary weight and age at puberty for all doses Earlier vaginal opening No other significant effect for doses lower than current NOAEL	Consistent with an effect of postnatal exposure to BPA on puberty processes	
Christiansen <i>et al.</i> 2013	No	Yes	Wistar rats Oral gavage 0.025- 0.25 5-50 mg/kg/d	9% Decrease of anogenital distance in female pups		Indicative of an effect of BPA on the development of female reproductive system BUT No clear biological significance
Cao <i>et al.</i> 2012	Yes	No	Long Evans rats SC 50 µg-50 mg/kg/d PND0 to	Decreased expression of Er α and ER β at PND10 in the preoptic area	Indicative of a possible effect of BPA on the gonatropic hypothalamo-pituitary axis	

			PND2			
Losa-Ward <i>et al.</i> 2012	Yes	No	Rat SC 50 µg-50 mg/kg/d PND0 to PND3	Reduced age at vaginal opening decreased density of RFRP3 neurons within the hypothalamus	Indicative of a possible effect of BPA on the development of the gonatropic hypothalamo-pituitary axis	
Aldad <i>et al.</i> 2011	Yes	No	Green Monkeys ovariectomized SC infusion 50µg/kg/d	BPA antagonizes the effect of E2 on the expression of the PR (progesterone receptor) in the uterus		
Mendoza-Rodriguez <i>et al.</i> ; 2011	Yes	No	Wistar rats Oral drinking water (10 mg/L ~1.2 mg/kg/d) GD6-PND21	Decreased frequency of oestrus cycle decreased of apoptotic processes in the uterin wall during oestrus and decreased expression of Er α	Effects consistent with endometrial hyperplasia and disruption of oestrus cyclicity .	
Varayoud <i>et al.</i> 2011	Yes	No	Wistar rats SC 50 µg and 20 mg/kg/d PND1,3,5 and 7	Decreased expression of Er α and PR in the uterus during the preimplantatory period in adults	No clear biological significance	
Chao <i>et al.</i> 2011	Yes	No	CD-1 mice SC 20 -40 µg/kg/d Daily PND7-PND14 or evry 5 days PND5-PND20	Modification of methylation of imprinted genes in oocytes, increased expression of Er α , alteration of prophase 1 of meiosis resulting in increased transition from primordial to primary follicles	Effect on follicular dynamic in juvenile animals possibly resulting in depletion of follicular stocks	
Rivera <i>et al.</i> 2011	Yes	No	Ovine SC 50µg/kg/d PND1-PND14	Increased transition from primordial to primary follicles Increased frequency of multioocytes follicles	Relevance of the animal model Effect leading possibly to a precocious depletion of follicular stocks	
Zhang <i>et al.</i> ; 2012 References as 2011 in the ANSES report	Yes	Yes	CD1 mice Oral 20-40-80 µg/kg	Dose dependent increase in the number of retention of oocytes in nests and reduced number of primordial follicle in female offsprings Alteration of the meiotic process	Indicative of an effect of BPA on meiosis	
Hunt <i>et al.</i> 2012	No	Yes	Rhesus macaque Oral diet: 400µg/kg/d Sc implants to provide plasma	Oral BPA: increased multi-oocyte follicles SC BPA : alterations of meiotic processes		No clear biological relevance in terms of fertility

			concentration ~2 -3 ng/ml			
Signorile <i>et al.</i> , 2012	Yes	Yes	Balb-C mices sc 100 and 1000 µg/kg/d GD1 to PND10	Decreased number of primordial follicle and increased number of atretic follicle	Confirmation of the effect of BPA on ovarian development possibly linked to endometriosis phenotypes	

Le tableau ci-dessus regroupant les avis émis par les experts des deux agences sur les études récentes (janvier 2011 à juin 2012 pour l'ANSES et janvier 2011 à Décembre 2013 pour l'EFSA) concernant les effets du BPA sur l'appareil reproducteur femelle souligne que seules 4 études ont été revues par les deux groupes d'experts. Ceci s'explique en partie par le fait que les périodes couvertes pour le recensement de la littérature ne sont pas exactement les mêmes.

Si on suit la démarche validée par le groupe d'expert de l'ANSES concernant la classification des effets, il apparait que les effets sur la méiose et sur le développement de l'axe hypothalamo-phypophysaire gonadotrope peuvent être considérés comme « avérés » chez l'animal sur la base de plusieurs études de bonne qualité (sans limite méthodologique majeure) donnant à des résultats convergants.

ANNEXE 4 SCENARIO D'EXPOSITION

En complément des commentaires précédemment formulés et relatifs aux calculs d'exposition ayant in fine servi à l'évaluation de risque conduite par l'Efsa, les 2 tableaux suivants présente les niveaux d'exposition externe calculés par l'Efsa et met en regard les niveaux d'exposition externe calculés par l'Anses dans son évaluation de risque publiée en avril 2013, elle basée sur le calcul de niveaux d'exposition interne.

L'exercice de mise en regard est réalisé pour les sous-groupes de population considérés par chacun des 2 organismes et pouvant être « rapprochés ». Par ailleurs, les doses externes d'exposition présentées relatives aux travaux de l'Anses correspondent à des valeurs recalculées à partir des moyennes et 95ème percentiles des distributions de doses internes d'exposition calculées par l'Anses qui a travaillé selon une approche probabiliste.

Tableau des estimations moyennes des expositions externes (ng / kg PC / j)

	Nourrissons nourris au lait maternel			Nourrisson nourri au lait maternisé	Nourrissons	Jeunes enfants	Autres enfants	Adolescents	Femmes	Hommes	Autres adultes	Personnes âgées	
	1-5 jours	6j – 3 mois	4-6 mois	0-6 mois	6-12 mois	1-3 ans	3-10 ans	10-18 ans	18-45 ans	18-45 ans	45-65 ans	+ de 65 ans	
EFSA (2014)	Ingestion :												
	poussières		8,8	8,8	8,8	8,8	7,3	2,9	2,0	0,6	0,6	0,6	0,6
	jouets		0,3	0,3	0,3	0,3	0,02						
	alimentation	225	180	158	30	375	375	290	159	132	126	126	116
	Σ de toutes les sources par ingestion	225	189	168	39	384	382	293	161	132	127	127	117
	Inhalation :												
	air	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
	Contact cutané :												
	papiers thermiques							69	94	59	59	59	59
	cosmétiques		4,8	4,8	4,8	4,8	2,8	2,2	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0
Σ de toutes les sources par contact cutané		4,8	4,8	4,8	4,8	2,8	71	96	61	61	61	61	
ANSES (2013)								Enfants (3-17 ans)	Femmes enceintes	Adultes			
	Ingestion :												
	poussières							11,6	2,7	2,7			
	alimentation							55	56	39			
	Inhalation :												
	air							0,4	0,2	0,2			
	Contact cutané :												
Papiers thermiques (scénario consommateurs)									133*	200*			

*calculs de doses externes cutanées (DE) à partir des doses internes (DI) calculées pour un scénario « consommateur » corrigées d'un taux d'absorption moyen de 30% (Tabs) pondéré par une durée d'absorption moyenne de 1h (Dabs), selon l'équation (modèle b, page 190 du rapport Anses, 2013) : $DE = \frac{DI \times Tabs}{Dabs}$

Ex : application aux femmes enceintes : $DE = 20 / (0,3 * 1/2) = 133 \text{ ng/kg PC/j}$

Tableau des estimations « hautes » des expositions externes (ng / kg PC / j)

	Nourrissons nourris au lait maternel			Nourrisson nourri au lait maternisé	Nourrissons	Jeunes enfants	Autres enfants	Adolescents	Femmes	Hommes	Autres adultes	Personnes âgées	
	1-5 jours	6j – 3 mois	4-6 mois	0-6 mois	6-12 mois	1-3 ans	3-10 ans	10-18 ans	18-45 ans	18-45 ans	45-65 ans	+ de 65 ans	
EFSA (2014)	Ingestion :												
	poussières		14,6	14,6	14,6	14,6	12,2	4,9	3,3	1,0	1,0	1,0	1,0
	jouets		1,2	1,2	1,2	1,2	0,5						
	alimentation	435	345	304	80	857	857	813	381	388	335	341	375
	Σ de toutes les sources par ingestion	435	361	319	96	873	870	818	384	389	336	342	376
	Inhalation :												
	air	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,1	0,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3
	Contact cutané :												
	papiers thermiques							550	863	542	542	542	542
	cosmétiques							4,2	4,8	4,0	4,0	4,0	4,0
Σ de toutes les sources par contact cutané							554	868	546	546	546	546	
ANSES (2013)								Enfants (3-17 ans)	Femmes enceintes	Adultes			
	Ingestion :												
	poussières							32	7	7,3			
	alimentation							130	123	82			
	Inhalation :												
	air							1,2	0,7	0,6			
	Contact cutané :												
Papiers thermiques (scénario consommateur)									533*	600*			

*calculs de doses externes cutanées (DE) à partir des doses internes (DI) calculées pour un scénario « consommateur » corrigées d'un taux d'absorption moyen de 30% (Tabs) pondéré par une durée d'absorption moyenne de 1h (Dabs), selon l'équation (modèle b, page 190 du rapport Anses, 2013) : $DE_{\text{cutané}} = \frac{DI_{\text{cutané}} \times 0,3 \times 1}{1}$

Ex : application aux femmes enceintes : $DE = 80 / (0,3 * 1/2) = 533 \text{ ng/kg PC/j}$

ANNEXE 5 PENETRATION CUTANEE

Pour conduire l'évaluation des risques liés à la manipulation de tickets thermiques contenant du BPA, l'EFSA a retenu une valeur de 10% d'absorption percutanée sur 24h basée sur l'étude de Demierre *et al.* (2012). Les autres études *in vitro* montrent des taux également proches ou inférieurs à 10% dans le compartiment receveur des cellules de Frantz, alors que la fraction dans les couches de la peau se situe entre 12 % et 35 %. Pourtant cette publication présente plusieurs points faibles qui sont:

- 1- le nombre restreint de donneurs (n=2)
- 2- l'absence d'information sur les donneurs (âge, sexe, race).
- 3- l'utilisation de peau congelée alors qu'un métabolisme cutané a été rapportée par Zalko *et al.* 2011 et Marquet *et al.* 2011.
- 4- la vérification de l'épaisseur des peaux dermatomées n'est pas indiquée ; le réglage du dermatome ne donne qu'une valeur indicatrice de l'épaisseur finale de l'échantillon de peau
- 5- l'intégrité des échantillons de peau et l'absorption du BPA ont été déterminées en mesurant la radioactivité de l'eau tritiée et du [¹⁴C] du BPA ; aucune précision n'est fournie pour expliquer les mesures prises pour réduire la radio-contamination croisée.
- 6- les deux échantillons de peau donnent des résultats très comparables, ce qui ne traduit pas la forte variation inter-donneurs observée par Marquet *et al.* avec le BPA ou rapportée *ex vivo* avec de la peau humaine avec d'autres molécules (Van de Sandt *et al.*, 2004)
- 7- l'utilisation d'une solution aqueuse de BPA ne correspond pas aux conditions d'exposition liées au dépôt de BPA sur les doigts à partir de tickets de caisses
- 8- aucune précision n'est fournie quant aux conditions de dépôt de 10 µL/cm² d'une solution aqueuse contenant du BPA pour assurer un dépôt homogène sur l'ensemble de la surface de l'échantillon. Un volume de 10 µL par cm² de peau d'une solution aqueuse n'assure par une répartition homogène par simple étalement
- 9- contrairement à l'étude de Zalko *et al.* (2011) une seule concentration a été testée (193 µg/mL)
- 10 -les auteurs estiment que seulement 9.3% de la dose appliquée est bio-disponible après 24 h d'exposition. Cette estimation est basée sur le pourcentage de la dose déposée qui est présente dans le liquide récepteur (8.6%) et dans la peau (0.6% hors *stratum corneum*). La quantité présente dans le *stratum corneum* (considérée comme non biodisponible par les auteurs et non prise en compte par l'EFSA) représente 34.9 % de la dose déposée. Pour Kaddard *et al.* (2008), étude réalisée avec de la peau de porc, 10 h d'exposition, 0.7 µg, 10 µg/mL, solution aqueuse et Morck *et al.* (2010) (avec de la peau humaine, 259 µg/cm², 4000 µg/ml, solution hydro alcoolique), la proportion de BPA présente dans le derme (8.8% et 17.2 %, respectivement) est supérieure à celle présente dans l'épiderme (5.4% et 7.4 %, respectivement).
- 11 - on peut noter que le Kp calculé à partir du flux rapporté par les auteurs de 0,022 µg/cm²/h et pour une concentration de BPA en solution aqueuse de 193,6 µg/mL est de 1,1 10⁻⁴ cm/h. Cette valeur de Kp est similaire à celle déduite des données de Zalko *et al.* (2011) de 0.9 10⁻⁴ cm/h ou de Morck *et al.* (2010) avec des solutions hydroalcooliques.

Le rapport de l'EFSA fait état de différences majeures entre Marquet *et al.* (2011) (3% de métabolisation) et Zalko *et al.* 2010 (73% pour le porc et 27% pour l'humain). Cependant, plusieurs raisons peuvent justifier ces différences. Les modèles sont différents et, Zalko *et al.* ont travaillé avec

5 concentrations et ont établi une courbe de saturation en fonction de la dose de BPA, pour le modèle porcin. Sur cette courbe, la vitesse de formation du glucuronide atteint un plateau aux alentours de 8 nmoles de BPA-glucuronide formé par heure, pour la plus forte concentration (qui est équivalente à 44 µg de BPA /cm²). Or, pour Marquet *et al.*, chez le rat, c'est une concentration de 200 µg/cm² de BPA qui est utilisée. On peut donc estimer être (largement) à un plateau de formation du BPA glucuronide. Pour Zalko *et al.*, on a, pour 800 nmole déposées sur l'explant, environ 8 nmole * 24 (heures) de métabolite formé, soit 20-25% de la dose environ. Pour Marquet *et al.*, la dose déposée sur l'explant est de 1543 nmole de BPA. Dans ces conditions, 3% de métabolite représenterait environ 46 nmole de glucuronide, soit presque 2 nmoles formées par heure. Il ne s'agit donc pas d'un rapport de 3 à 72, mais d'un rapport de 2 à 8, qui est tout à fait possible compte tenu (1) de la différence d'espèce et (2) de la taille de l'explant (2,3 fois plus grand pour Zalko *et al.*).

Au sujet des critiques émises sur l'étude de Zalko *et al.* (2010):

Page 231 :

- Une seule concentration est citée (9568) : 5 on été utilisées, et c'est justement pour cela que de l'EtOH a été mis dans le véhicule.
- L'étude n'est pas une étude de passage, mais une étude de métabolisme. C'est pour cette raison qu'un système permettant d'aller au-delà de 24 heures a été évalué, le point 24 heures ayant été lui-même détaillé pour ce qui est du passage.
- Il est exact que la présence d'éthanol ait pu affecter la pénétration du BPA. En revanche, il est évident que le ratio élevé de conversion en métabolites est à prendre en considération, car si la présence d'EtOH avait joué un rôle, cela aurait été par la dénaturation des protéines, dont les enzymes de métabolisation (transférases). Ce ratio de conversion, en dehors des éléments de pénétration de la molécule à travers la peau, est donc plus vraisemblablement sous-estimé que surestimé.
- Ligne 9575 (« *percentages are unclear* ») : les données chiffrées figurent dans la publication (nmoles), et les % peuvent donc en être facilement calculés.
- Lignes 9576-9579 : le texte se base sur les guidelines concernant l'absorption, mais les cellules de Franz classiquement utilisées pour les études de passage ne permettent pas la survie de la peau, car un écrasement de la peau se produit et donc une nécrose en bien moins de 24h ; d'où l'utilisation d'inserts. Concernant l'intégrité de la peau, celle-ci est évaluée par mesure de la PIE (perte insensible en eau) (TEWL = transepidermal water loss, en anglais) or cela nécessite une cellule étanche (genre cellules de Franz). Dans l'étude de Zalko *et al.*, cela n'était donc pas possible. A noter que cette étude fait partie d'un travail de thèse (Jacques *et al.*) ayant fait l'objet, pour le même système, d'autres publications. En particulier, dans Jacques *et al.*, Toxicol in vitro, 2010, des données détaillées démontrent l'intégrité des explants de peau utilisés avec exactement le même protocole, et ce avec des méthodes bien plus poussées que pour Demierre *et al.* Enfin, le test d'intégrité n'est réglementairement requis que dans le cas de la peau morte (OECD 428 "Although viable skin is preferred, non-viable skin can also be used provided that the integrity of the skin can be demonstrated").
- Ligne 9580 : l'étude cible le métabolisme, et donc aucune tentative d'extrapolation quantitative à l'homme n'a été faite.
- Lignes 9581-9588 : le paragraphe est confus et peu justifié. Le calcul des conditions SINK avait été fait et était, dans l'étude de Zalko *et al.* correct. Il ne faut pas oublier que ce n'est pas de l'eau qui est dans le compartiment récepteur, mais un milieu de culture, qui dissout mieux le BPA. Concernant les systèmes statiques ou dynamiques, il n'y a aucune publication qui montre à ce jour des différences significatives entre les deux types de systèmes, qui sont d'ailleurs tout deux acceptés par les guidelines sur l'absorption percutanée. Il y a un paragraphe sur ce sujet dans le *Dermal absorption du WHO*. " *static and flow-through diffusion cells are both acceptable*. " extrait de l'OECD 428. Extrait du guideline SCCS : "The choice of static or flow-through conditions in the receptor cell should be made on a compound-by-compound basis, depending on its theoretical absorption properties and the objective of the

study". L'hypothèse de "re-uptake" du BPA (LL 9586-9587) n'est pas basé sur des arguments tangibles scientifiquement démontrés.

Page 495 :

- Le texte reprend en partie les éléments de la page 231, avec les mêmes réponses.
- L18917 : plusieurs concentrations ont été utilisées dans l'étude (bis)
- L18922 : cf réponses précédentes également (bis)
- L18923 (non-conformité / OCDE 428) : il s'agit d'un guideline concernant l'étude du passage cutanée uniquement, il n'y a pas de guideline pour le métabolisme cutané à ce jour. Il est donc injustifié de conclure à des biais méthodologiques (LL18934-35) sur la base de guidelines ne concernant pas l'étude.

Ligne 9425

Kaddar N, Harthe C, Dechaud H, Mappus E and Pugeat M. 2008. Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues. 71. 471-473.

"The Panel consider that the study reporting is insufficient due to the omission of several methodical details including the applied surface density ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and the skin thickness. "

Les autres omissions méthodologiques sont

- 1- Le nombre d'animaux utilisés n'est pas donné
- 2- Les échantillons de peau sont congelés
- 3- Pas de vérification de l'intégrité des échantillons de peaux
- 4- Le BPA est déposé en solution aqueuse, ce qui ne correspond pas aux conditions d'exposition aux tickets de caisse
- 5- Pas de précision sur la méthode de dosage du BPA contenu dans les échantillons de peau et le rendement d'extraction du BPA
- 6- Pas de mesure de la radioactivité présente dans les échantillons de peau après exposition (mais uniquement le BPA inchangé dosé par CLHP), ce qui aurait permis d'expliquer la décroissance du taux de récupération de la dose déposée en fonction du temps d'exposition (98,2 à 84,3%).

L'hypothèse des auteurs que la décroissance du taux de récupération de la dose déposée soit due à une dégradation du BPA en solution aqueuse est peu probable. On ne peut donc exclure que le taux de pénétration reportée par les auteurs soit sous estimée

L i g n e 9 4 4 1 " As for data interpretation, the percutaneous penetration value of 4.1% is in line with the value of 8.6% reported by the high quality study of Demierre et al. (2012).

La valeur de 4.1 % n'est pas mentionnée dans l'article dans la section *Results*, il est écrit « *the proportion found in the receptor fluid varied from 0 to 5 % over time (0-24 h) (figure 1)* »

Cette valeur de 4.1% ou 5% correspond à la quantité tel que rapportée par l'EFSA « *percutaneous absorption* »

Ligne 9441 As for data interpretation, the percutaneous penetration value of 4.1% is in line with the value of 8.6% reported by the high quality study of Demierre et al. (2012).

Malgré les insuffisances de report méthodologiques soulignées par le Panel ce dernier retient la valeur de 4.1 % pour la comparer favorablement au taux d'absorption en 24 h de 8.6 % rapportée par Demierre *et al.* 2012. En revanche, la différence de répartition de la quantité de BPA dans le derme et l'épiderme entre les deux auteurs n'est pas commentée. Ainsi, Demierre *et al.* indiquent que 34.9 % de la dose de BPA est présent au niveau du *stratum corneum* et 0.6 % de la dose de BPA au niveau

du reste de la peau. En revanche pour Kaddar *et al.* 2010, quelque soit le temps d'exposition la quantité présente dans le derme est supérieure à la quantité présente dans l'épiderme. Demierre *et al.* et Kaddar *et al.* ont utilisé tous les deux des solutions aqueuses de BPA (193,6 µg/mL et de 10 µg/mL, respectivement), des quantités déposées qui semblent du même ordre de grandeur, de 1.83 µg/cm² et de 0.7µg/cm²), des échantillons de peau congelée (humain et porc, respectivement).

Ligne 9443

Marquet F, Payan JP, Beydon D, Wathier L, Grandclaude MC and Ferrari E, 2011. In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [14C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? Archives of Toxicology, 85, 1035-1043.

Ligne 9456 "experiments with 15 non-viable human skin sections".

En raison de la forte variation entre les peaux des différents donneurs il est plus important d'inquer le nombre de donneurs (n=6) que le nombre de sections utilisées (n=15). Dans cette étude des peaux provenant de 6 donneurs ont été utilisées, chaque peau ayant fourni 2 à 3 sections différentes. L'utilisation d'un grand nombre de donneurs différents (par rapport aux publications de Demierre *et al.* (n=2) et Zalko *et al.* (n=3) a permis de mettre en évidence une forte variation des flux d'absorption du BPA entre les donneurs.

Ligne 9457 "The quotient of maximum percutaneous flux and vehicle concentration yielded a permeability coefficient of 3.0×10^{-5} cm/h which was 3.7-fold lower than in Demierre et al. (2012) but still comparable given the differences in vehicle type, surface density, and diffusion-cell design"

Le calcul de Kp à partir de la concentration de BPA dans l'acétone a peu de sens. L'expérimentation a été réalisée en mode non occlusif. L'acétone (50 µL/cm²) a été évaporée immédiatement après le dépôt. Durant toute la durée de l'exposition, les échantillons de peau sont en contact avec du BPA solide et/ou du BPA dissous dans le film lipidique du *stratum corneum*. Une valeur de Kp ne peut être calculée que si la concentration de BPA dissoute par le sébum au niveau du *stratum corneum* est connue.

Ligne 9467 "In addition, inter- and intra-individual variability of up to tenfold was observed in humans".

L'utilisation d'un plus grand nombre de peaux de donneurs différents (n=6) par rapport à Zalko *et al.* (n=3 ?) et Demierre *et al.* (n=2) a permis de mettre en évidence une forte variation du flux d'absorption inter-individu. Cette variation étaye l'utilisation d'un facteur de sécurité de 10, retenu par l'EFSA, pour tenir compte de la forte variation des paramètres toxicocinétiques inter individus.

Ligne 9468 "The skin clearance rate following exposure was estimated at 0.4 µg/cm²/h."

C'est le seul résultat expérimental qui montre clairement que la peau constitue un réservoir pour le BPA. Près de 80 % du BPA présent dans la peau après la fin d'une exposition, la fraction non absorbée de BPA avec de l'éthanol (31 µg/cm²) est susceptible de diffuser dans le liquide récepteur.

Ligne 9517

Mørck TJ, Sorda G, Bechi N, Rasmussen BS, Nielsen JB, Ietta F, Rytting E, Mathiesen L, Paulesu L and Knudsen LE, 2010. Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. Reprod Toxicol, 30, 131-137.

Ligne 9517 "Mørck et al. (2010) used a static Franz diffusion cell and analyzed non-viable human skin from breast- surgery patients according to the OECD TG 428. Full thickness skin (800–1000 µm) was used, and the skin integrity was checked by capacitance measurements. A diluted ethanol solution was used as vehicle, and ¹⁴C-BPA was applied in a high concentration of 4000 mg/l, resulting in a surface density of 259 µg/cm²."

La plupart des informations méthodologiques présentées par l'EFSA ne sont pas mentionnées dans le texte de la publication de Mørck *et al.*, 2010. L'EFSA aurait utilisé les informations provenant d'une

publication antérieure (Nielsen *et al.* 2009.) Seul est indiqué dans l'article: " *the skin was exposed to 17,5 mM BPA for 48 h in the donor chamber*". Aussi, dans son rapport le SCENIHR (2014) indique que "17,5 mM corresponding to 3,99 g/L, inconsistent with BPA solubility of 120-300 mg/L water at 25 °C (EFSA 2010)". Alors que l'information « *a diluted ethanol solution* » rapportée par l'EFSA explique la concentration élevée de BPA utilisée

Les autres omissions méthodologiques non mentionnées par l'EFSA sont : le nombre de donneurs, les caractéristiques des donneurs.

D'après les précisions méthodologiques fournies, par l'EFSA, on peut estimer une valeur de Kp égale à $1.75 \cdot 10^{-4}$ cm/h (13% dans le liquide récepteur en 48 h / $48 \cdot 259 \mu\text{g}/\text{cm}^2/4000 \mu\text{g}/\text{mL}$). Cette valeur est très comparable à celles obtenues par Demierre *et al.* ($1.1 \cdot 10^{-4}$ cm/h) et Zalko *et al.* ($0.9 \cdot 10^{-4}$ cm/h).

La quantité dans le derme est 3 fois supérieure à l'épiderme contrairement à Demierre *et al.*, 2012.

Ligne 9526 "Percutaneous penetration was 13.0%." C'est l'absorption qui est de 13 %, quantité dans le liquide récepteur. La quantité pénétrée est de $13+17,2 = 30,2$ % en excluant la fraction présente dans l'épiderme.

Ligne 9560

Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S and Perdu E, 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*, 82, 424-430.

Ligne 9576 "The Panel noted several methodical flaws in the first experimental phase, e.g., use of cell culture inserts as diffusion cells, missing skin integrity check, exposure times largely exceeding 24 h, 33% ethanol solution as vehicle, which negatively impact the reliability of these estimates for in vitro skin absorption."

L'ensemble des remarques faites par le Panel ne semblent pas avoir eu d'impact sur la détermination du flux d'absorption du BPA. Le Kp calculé à partir des données expérimentales rapportées par Zalko *et al.* (2011) est de $0.9 \cdot 10^{-4}$ cm/h (peau humaine, fraîche, 45.4 % de la dose dans le liquide récepteur, absorption qui croît linéairement avec la dose cf. figure 3), $2.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ déposée sous forme d'une solution hydro-alcoolique à 33 % ayant une concentration de 50 nmole de BPA pour 60 μL : $190 \mu\text{g}/\text{mL}$). Cette valeur de Kp est identique à la valeur obtenue avec Demierre *et al.* 2012 qui ont utilisé une solution aqueuse de BPA ($1.1 \cdot 10^{-4}$ cm/h) ou de Morck *et al.* (2010) qui ont utilisé également une solution hydro-alcoolique ($1.75 \cdot 10^{-4}$ cm/h).

Ainsi, la remarque de l'EFSA concernant l'utilisation d'une solution hydroalcoolique "33% ethanol solution as vehicle, which negatively impact the reliability of these estimates for in vitro skin absorption." ne semble pas être fondée dans le cas du BPA

Un résultat important, non mentionné par l'EFSA, a été rapporté par Zalko *et al.* Pour 5 solutions hydroalcooliques de BPA, l'absorption percutanée ainsi que la quantité présente dans la peau de porc à la fin de l'expérimentation est proportionnelle à la dose déposée ($2.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ à $44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). La similitude de comportement d'une solution de BPA à $190 \mu\text{g}/\text{mL}$ avec de la peau de porc et de la peau humaine plaide en faveur d'une transposition des résultats entre ces deux espèces.

ANNEXE 6 MODELISATION BMD

Tableau 2 : Exemple de choix du niveau de réponse (BMR) en fonction du calcul des intervalles de confiance.

Parameter	Male F0	Male F1	Female F0	Female F1
Mean	0.380200	0.361100	0.306300	0.321700
SD	0.041158	0.052655	0.047893	0.038564
SEM	0.005500	0.007100	0.006400	0.005200
N	56	55	56	55
90% CI	0.370998 to 0.389402	0.349218 to 0.372982	0.295593 to 0.317007	0.312997 to 0.330403
95% CI	0.369178 to 0.391222	0.346865 to 0.375335	0.293474 to 0.319126	0.311275 to 0.332125
99% CI	0.365525 to 0.394875	0.342143 to 0.380057	0.289223 to 0.323377	0.307816 to 0.335584
BMR correspondant (IC99%- mean)/mean	3.8%	5%	5.5%	4.6%

Mean, moyenne arithmétique du poids du rein gauche en g de l'étude de Tyl et al 2008 chez les animaux témoins

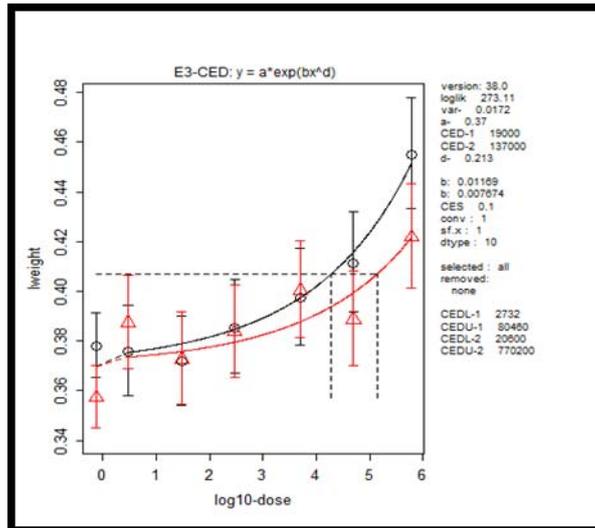
SD, écart type ; SEM, erreur standard à la moyenné

N, nombre d'animaux

CI, Intervalle de confiance

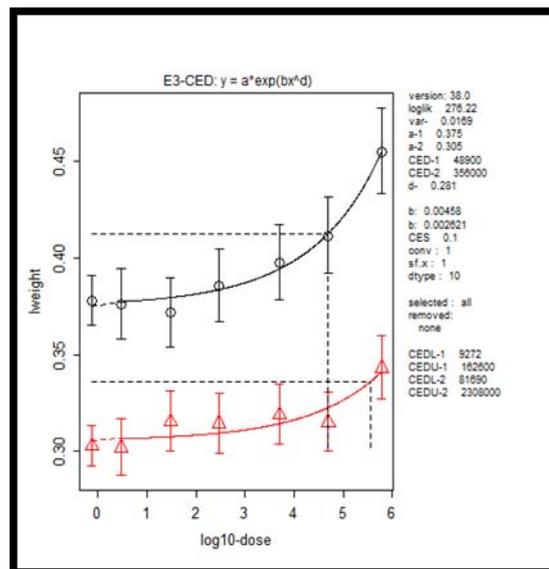
Le même calcul de BMR en prenant l'IC 95 % aboutit à des BMR < à 5%. Un BMR de 5% tel que préconisé par l'EFSA se justifie donc, si l'on considère comme niveau de réponse jugé comme anormale, toute valeur de poids dépassant la limite supérieure de l'intervalle de confiance du groupe témoins.

Exemple : comparaison des couples BMD et BMDL en fonction de la covariable (femelle F0 ou male F1)



Détermination de la BMD (CED) et BMDL(CEDL) pour un BMR de 10% avec comme covariable les males F1 : en noir F0, en rouge F1

La BMDL est de 2732 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$, la BMD est de 19000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$. Soit des résultats comparables à ceux réalisés par l'EFSA et avec un ratio BMD/BMDL <7.



Détermination de la BMD (CED) et BMDL(CEDL) pour un BMR de 10% avec comme covariable les femelles F0 : en noir male, en rouge femelle

La BMDL est de 9272 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$, la BMD est de 48900 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$, soit des résultats comparables à ceux rapportés par l'EFSA et avec un ratio BMD/BMDL <6.