

ANNÉE 2018

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE IPR
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 26 octobre 2018 à POITIERS
par Monsieur ROUILLON Steeve

Développement et validation de méthodes pour le biomonitoring
de perturbateurs endocriniens chez la femme enceinte

Composition du jury :

Président : Madame Sylvie RABOUAN, Professeur, Université de Poitiers

Membres : - Monsieur Nicolas ARLICOT, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier,
Université de Tours
- Monsieur Nicolas VENISSE, Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier
Universitaire de Poitiers

Directeur de thèse : Monsieur Antoine DUPUIS, Professeur et Praticien Hospitalier,
Université de Poitiers

Co-directeur de thèse : Monsieur Guillaume BINSON, Assistant Hospitalo-Universitaire,
Université de Poitiers

ANNÉE 2018

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE IPR
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 26 octobre 2018 à POITIERS
par Monsieur ROUILLON Steeve

Développement et validation de méthodes pour le biomonitoring
de perturbateurs endocriniens chez la femme enceinte

Composition du jury :

Président : Madame Sylvie RABOUAN, Professeur, Université de Poitiers

Membres : - Monsieur Nicolas ARLICOT, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier,
Université de Tours
- Monsieur Nicolas VENISSE, Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier
Universitaire de Poitiers

Directeur de thèse : Monsieur Antoine DUPUIS, Professeur et Praticien Hospitalier,
Université de Poitiers

Co-directeur de thèse : Monsieur Guillaume BINSON, Assistant Hospitalo-Universitaire,
Université de Poitiers



Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année universitaire 2017-2018

PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

- BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- SIMMONDS Kévin

Poste d'ATER

- JUIN Camille

Poste de Doctorant

- BERNARD Clément
- DOUMAS Manon



Le Doyen,

Année universitaire 2017 - 2018

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (**surnombre jusqu'en 12/2017**)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne (**émérite à/c du 25/11/2017**)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maitres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (**en détachement**)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- COUDROY Rémy, réanimation
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FEIGERLOVA Eva, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie (**mission 09/2017 à 03/2018**)
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Maitre de conférences des universités de médecine générale

- BOUSSAGEON Rémy (**disponibilité de 10/2017 à 01/2018**)

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry

Maitres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- SIMMONDS Kevin, maître de langue étrangère

Professeurs émérites

- DORE Bertrand, urologie (08/2020)
- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2019)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (**émérite à/c du 25/11/2017 – jusque 11/2020**)
- POURRAT Olivier, médecine interne (08/2018)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2018)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2018)

Professeurs et Maitres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

REMERCIEMENTS

À Madame le Professeur Sylvie RABOUAN

Je suis très honoré que vous ayez accepté de présider cette thèse. Votre gentillesse et nos discussions ont été des plus agréables durant toutes ces années.

À Monsieur le Docteur Nicolas ARLICOT,

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de ma sincère et respectueuse considération.

À Monsieur le Docteur Nicolas VENISSE,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Votre pédagogie et votre humour m'ont permis de rester motivé même dans les moments les plus difficiles.

À Monsieur le Professeur Antoine DUPUIS,

Je te suis très reconnaissant d'avoir accepté, une nouvelle fois, d'être mon directeur. Tes qualités pédagogiques ainsi que nos discussions scientifiques et professionnelles m'ont permis de mener à bien ce travail.

À Monsieur le Docteur Guillaume BINSON,

Cher co-interne depuis les premiers instants. Finies les soirées internat, terminé le « Alerte à MaliCHU », maintenant place au sérieux car tu es passé du côté des Grands. Merci d'avoir codirigé cette thèse.

Je tiens à remercier tous les membres de l'axe HEDEX du CIC 1402 Inserm : Marion ALBOUY-LLATY, Laurence BARRIER, Pascal CARATO, Antoine DUPUIS, Anne-Sophie GOURGUES, Sabrina INGRAND, Virginie MIGEOT, Pascale PIERRE-EUGENE, Sylvie RABOUAN, Sarah THEVENOT et Nicolas VENISSE. Merci à tous pour votre bonne humeur, votre gentillesse et pour m'avoir fait découvrir l'interdisciplinarité de la recherche en santé environnementale. Je remercie tout particulièrement le Professeur Virginie MIGEOT pour nous avoir tous réunis autour de la thématique de la santé environnementale depuis toutes ces années.

Je remercie aussi très chaleureusement le « Jean-Michel à peu près » et la « Bichette » du service de toxicologie et de pharmacocinétique, Ysé et Jerémy, qui ont été tout le long mes compagnons de fortune (et d'infortune). Merci d'avoir fait les beaux jours de la Team 89.

Merci à mes nombreux co-internes qui se sont succédés durant toutes ces années, et qui ont su me changer les idées à chaque fois que j'en ai ressenti le besoin. Un grand merci également aux doctorants et aux internes de l'axe HEDEX : Manon, Houria, Chloé, Jeremy, Guillaume B. et Guillaume C. : je vous souhaite plein de réussite à venir.

Merci à tous les externes et étudiants de Licence et de Master que j'ai eu l'occasion d'encadrer pendant cet internat, pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Merci aux préparateurs et aux pharmaciens de la pharmacie, aux secrétaires, techniciens et biologistes du service de toxicologie et de pharmacocinétique, ainsi qu'aux médecins du service de santé publique du CHU de Poitiers pour m'avoir accueilli et formé lors de mes stages, dans la joie et la bonne humeur.

Enfin je souhaite remercier mes parents, mes beaux-parents, mes grands-parents et mes sœurs pour avoir cru en moi depuis le début, ainsi qu'Inoa, pour avoir égayé toutes mes soirées de ses miaulements.

Et merci à toi, Estel, pour ta présence et ton soutien tout au long de mon internat, mais aussi depuis toutes ces années.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	6
LISTE DES ACRONYMES ET ABBRÉVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX	13
INTRODUCTION	15
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
CHAPITRE I : LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	17
A. Généralités	17
1. Concept, définition et classification	17
2. Sources et voies d'exposition	17
3. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens.....	17
B. Molécules exerçant un effet perturbateur endocrinien	22
B.1. Le Bisphénol-A.....	23
1. Structure et propriétés physico-chimiques.....	23
2. Toxicocinétique	23
3. Mécanisme d'action perturbateur endocrinien du bisphénol-A.....	27
4. Utilisations et présence dans l'environnement.....	27
5. Exposition des populations.....	30
B.2. Les dérivés chlorés du bisphénol-A.....	31
1. Structure et propriétés physico-chimiques.....	31
2. Toxicocinétique	32
3. Mécanisme d'action perturbateur endocrinien des dérivés chlorés du bisphénol-A.....	32
4. Utilisations, présence dans l'environnement et réglementation.....	32
5. Exposition des populations.....	33
B.3. Les parabènes.....	33
1. Structure et propriétés physico-chimiques.....	33
2. Toxicocinétique	35
3. Mécanisme d'action perturbateur endocrinien des parabènes	38
4. Utilisation et présence dans l'environnement	40
5. Exposition des populations.....	43
CHAPITRE II : ESTIMATION DE L'EXPOSITION.....	44
A. L'expologie	44
1. Mesure de biomarqueurs ou Biomonitoring.....	44
2. Questionnaires	47
3. Monitoring individuel	47
4. Monitoring de l'environnement.....	47

B. Validation d'une méthode de dosage dans une matrice biologique	48
1. Critères de validation d'une méthode de dosage de micropolluants environnementaux dans des matrices biologiques.....	48
2. Validation d'une méthode de dosage de micropolluants environnementaux : recours à des matrices synthétiques	49
PARTIE II : TRAVAUX PERSONNELS.....	51
Description	52
A. DEVELOPPEMENT DE MÉTHODES DE DOSAGE ULTRASENSIBLES PERMETTANT LA QUANTIFICATION DES PARABÈNES DANS LES URINES ET LE COLOSTRUM	52
1. Matériels et méthodes	52
2. Résultats	58
B. MÉTHODES POUR LE DOSAGE DU BISPHÉNOL-A ET DE SES DÉRIVÉS CHLORÉS DANS LES URINES ET LE COLOSTRUM.....	67
1.1. Produits chimiques et réactifs.....	67
1.2. Préparation des réactifs et des solutions standard.....	67
1.3. Préparation des échantillons.....	68
2. Validation des analyses	68
C. VALIDATION DES MÉTHODES SUR UN ÉCHANTILLON DE LA COHORTE EDDS (ENDOCRINE DISRUPTOR DEUX-SEVRES).....	69
1. Description de la cohorte EDDS et méthodologie employée.....	69
2. Résultats des dosages dans les matrices biologiques des participantes.....	71
PARTIE III : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	76
A. Méthodes de dosage des parabènes	77
B. Méthodes de dosage du bisphénol-A et de ses dérivés chlorés	79
C. Validation sur des prélèvements de la cohorte EDDS.....	81
1. Urines	81
2. Colostrum	84
D. Mesure analytique de l'exposition aux perturbateurs endocriniens chez la femme enceinte	87
1. Recherche de méthodes de plus en plus sensibles et sophistiquées.....	87
2. Choix de la matrice.....	87
3. Choix d'un « bon » biomarqueur.....	87
4. Validation d'une méthode destinée au dosage de micropolluants environnementaux dans les matrices biologiques	89
E. CONCLUSION	91
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	92
RÉSUMÉ.....	108
SERMENT DE GALIEN.....	109

LISTE DES ACRONYMES ET ABBRÉVIATIONS

AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ANSM	Agence nationale de la sécurité du médicament
BPA	Bisphénol-A
BuPB	Butylparabène
CBPA	Monochlorobisphénol-A
Clx-BPA	Dérivés chlorés du bisphénol-A
CV	Coefficient de variation
DCBPA	Dichlorobisphénol-A
DES	Diéthylstilbestrol
DJA	Dose journalière admissible
ECHA	European Chemicals Agency
EDDS	Endocrine Disruptor Deux-Sèvres
EFSA	European Food and Safety Agency
EI	Étalon interne
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbentAssay
EM	Effet de matrice
EMA	European medicines agency
EPA	Environmental Protection Agency
EPS	Éducation pour la santé
EtPB	Ethylparabène
FDA	Food and drug administration
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse simple
GC-MS/MS	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem
IATDMCT	International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology
ICH	International conference of harmonisation
INERIS	Institut national de l'environnement industriel et des risques
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem

LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MePB	Méthylparabène
NORMAN	Network of references laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants
OMS	Organisation mondiale de la santé
PB	Parabène
PE	Perturbateur endocrinien
PrPB	Propylparabène
RIA	Radio ImmunoAssay
TCBPA	Trichlorobisphénol-A
TTCBPA	Tétrachlorobisphénol-A

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation du système endocrinien. (Adapté de (21))	18
Figure 2 : Exemples de courbe dose-réponse non monotone des perturbateurs endocriniens. A : courbe en forme U, B : courbe en forme de U inversé, C : courbe multiphasique (23).	19
Figure 3 : Structure chimique du BPA	23
Figure 4 : Voies proposées de biotransformation du bisphénol-A chez les mammifères (études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>) (65)	25
Figure 5 : Voies métaboliques majeures du bisphénol-A chez les mammifères (58)	26
Figure 6 : Evolution des réglementations mises en place visant à réduire l'utilisation du bisphénol-A (BPA).	29
Figure 7 : Schéma métabolique indicatif des parabènes, données sur animaux de laboratoire (d'après (22))....	38
Figure 8 : Cibles moléculaires relatives à l'effet perturbateur endocrinien des parabènes (adapté de (173)). AR : récepteurs aux androgènes ; ER : récepteurs aux œstrogènes ; SULTs : enzymes sulfotransférases.	39
Figure 9 : Les approches pour l'évaluation de l'exposition humaine (expologie).....	44
Figure 10 : Chromatogramme obtenu à la LOQ des quatre parabènes (0,025 ng/mL)	59
Figure 11 : Chromatogramme d'un blanc urine synthétique.....	59
Figure 12 : Chromatogramme obtenu à la LOQ de l'éthylparabène et du propylparabène (0,025 ng/mL)	63
Figure 13 : Chromatogramme obtenu à la LOQ du méthylparabène et du butylparabène (0,050 ng/mL)	63
Figure 14 : Chromatogramme d'un blanc lait maternel.....	63
Figure 15 : Résultats des infusions en post-colonne (A) avec un gradient non optimisé ; (B) avec le gradient optimisé retenu. RT : temps de rétention	66
Figure 16 : Déroulement de l'étude EDDS	70
Figure 17 : Nombre de composés détectés dans chaque prélèvement urinaire du deuxième trimestre (bisphénol-A, dérivés chlorés du bisphénol-A et parabènes).....	75
Figure 18 : Nombre de composés détectés dans chaque prélèvement urinaire du troisième trimestre (bisphénol-A, dérivés chlorés du bisphénol-A et parabènes).....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Structures chimiques des dérivés chlorés du bisphénol-A	31
Tableau 2 : Structure chimique des principaux parabènes	34
Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques du méthyle, de l'éthyle, du propyle et du butylparabène. Adapté de (171).....	34
Tableau 4 : Composition de l'urine synthétique utilisée (227)	53
Tableau 5 : Paramètres spectrométriques des parabènes dans l'urine synthétique	55
Tableau 6 : Paramètres spectrométriques des parabènes dans le lait maternel	56
Tableau 7 : Valeurs moyennes obtenues pour la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2 des courbes de calibration des parabènes dans l'urine synthétique (n=6)	60
Tableau 8 : Fidélité pour les quatre parabènes dans l'urine synthétique, exprimée par le coefficient de variation (CV), et justesse, exprimée par le biais (n=5).	61
Tableau 9 : Fidélité pour les quatre parabènes dans l'urine humaine, exprimée par le coefficient de variation (CV), et justesse, exprimée par le biais (n=3, fidélité intermédiaire).	62
Tableau 10 : Rendements, effets de matrice et recouvrement de l'extraction des parabènes et de leurs étalons internes dans l'urine synthétique (exprimés en pourcentage de l'aire du pic corrigée et de la réponse corrigée)	62
Tableau 11 : Valeurs moyennes obtenues pour la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2 des courbes de calibration des parabènes dans le lait maternel (n=6)	64
Tableau 12 : Fidélité pour les quatre parabènes dans le lait de femme, exprimée par le coefficient de variation (CV), et justesse, exprimée par le biais (n=5)	65
Tableau 13 : Rendements, effets de matrice et recouvrement de l'extraction des parabènes dans le lait maternel (exprimés en pourcentage de l'aire du pic corrigée et de la réponse corrigée)	67
Tableau 14 : Statistiques des concentrations retrouvées en bisphénol-A, en ses dérivés chlorés et en parabènes dans le colostrum	71
Tableau 15 : Statistiques des concentrations urinaires retrouvées en bisphénol-A, en ses dérivés chlorés et en parabènes au deuxième trimestre de la grossesse	71
Tableau 16 : Statistiques des concentrations urinaires retrouvées en bisphénol-A, en ses dérivés chlorés et en parabènes au troisième trimestre de la grossesse.....	72
Tableau 17 : t-test apparié entre U1 et U2	73
Tableau 18 : Tests de corrélation respectifs entre les concentrations urinaires en parabènes retrouvées (n=100)	73
Tableau 19 : Tests de corrélation respectifs entre les concentrations urinaires en bisphénol-A et ses dérivés chlorés.....	74
Tableau 20 : Comparaison de nos limites de quantification des parabènes dans l'urine avec celles de la littérature	77
Tableau 21 : Comparaison de nos limites de quantification des parabènes dans le colostrum avec celles de la littérature	78
Tableau 22 : Comparaison de nos limites de quantification du bisphénol-A dans les urines avec celles de la littérature	79
Tableau 23 : Comparaison de nos limites de quantification du bisphénol-A dans le colostrum avec celles de la littérature (lait maternel et colostrum)	80
Tableau 24 : Comparaison de nos limites de quantification des dérivés chlorés du bisphénol-A dans les urines avec celles de la littérature	80
Tableau 25 : Comparaison de nos limites de quantification des dérivés chlorés du bisphénol-A dans le colostrum avec celles de la littérature (lait maternel et colostrum)	81
Tableau 26 : Comparaison des taux de détection urinaires de parabènes pendant la grossesse avec la littérature	82
Tableau 27 : Comparaison des taux de détection urinaires de bisphénol-A pendant la grossesse avec la littérature	83
Tableau 28 : Comparaison des taux de détection urinaires des dérivés chlorés du bisphénol-A pendant la grossesse avec la littérature.....	83

Tableau 29 : Comparaison des taux de détection des parabènes dans le colostrum ou le lait maternel avec la littérature	85
Tableau 30 : Comparaison des taux de détection du bisphénol-A dans le colostrum ou le lait maternel avec la littérature	85
Tableau 31 : Comparaison des taux de détection des dérivés chlorés dans le colostrum ou le lait maternel avec la littérature	86

INTRODUCTION

L'exposition à des facteurs environnementaux pendant la grossesse est susceptible d'avoir des conséquences non seulement sur le développement fœtal, mais aussi sur sa santé future et ce jusqu'à l'âge adulte (1).

Certaines molécules chimiques, comme les perturbateurs endocriniens (PE), font partie de ces facteurs environnementaux et l'une de leurs particularités est d'agir à de très faibles doses. Ils sont présents dans notre vie quotidienne, comme c'est le cas pour le Bisphénol-A (BPA), ses dérivés chlorés (Clx-BPA) et les parabènes (PB).

Les femmes enceintes sont exposées au BPA et aux Clx-BPA à la fois par la voie cutanée, par le biais de l'eau utilisée pour les douches par exemple et par la voie orale à travers la consommation d'eau de boisson, qui est principalement de l'eau du robinet (2). De plus, les femmes utilisent davantage de cosmétiques et de produits de soins personnels que les hommes (3) et seulement une faible proportion des femmes a l'intention de changer ses habitudes de consommation pendant la grossesse (4), restant potentiellement exposée à des niveaux importants de PB.

C'est pour cela que le biomonitoring de PE en mélanges reste essentiel, particulièrement depuis qu'une récente étude *ex-vivo* a suggéré qu'une exposition à des mélanges de PE pouvait exercer des effets synergiques néfastes sur des testicules fœtaux humains pour des doses plus faibles que celles auxquelles ces effets surviennent habituellement lors d'une exposition à chaque molécule du mélange prise séparément (5). Plusieurs études récentes ont évalué l'exposition de femmes enceintes à des mélanges de PE, via l'analyse d'urines (6–9) et de colostrum (10). Cependant, à l'exception d'une étude ayant porté sur un échantillon de 10 femmes enceintes (11), il n'existe à notre connaissance aucune autre étude qui n'ait étudié les Clx-BPA sur un grand nombre d'urines de femmes enceintes. La présence de Clx-BPA dans le lait maternel ou le colostrum a été évaluée au cours de 4 études (12–15), mais une seule a porté sur le mélange BPA, Clx-BPA et PB dans le lait maternel (13). À notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'exposition conjointe au BPA, aux Clx-BPA et aux PB dans le colostrum.

Considérant tous ces éléments, nos travaux avaient pour but de développer et de valider des méthodes de dosage rendant compte de l'exposition de femmes enceintes à ces phénols environnementaux, *via* la quantification de leurs formes non conjuguées dans les urines et le colostrum, à l'aide de méthodes analytiques ultrasensibles.

Dans une première partie, nous définirons les PE en insistant sur le BPA, les Clx-BPA et les PB. Puis nous traiterons des moyens d'estimer l'exposition des femmes enceintes à ces PE. Enfin nous détaillerons et discuterons nos travaux.

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

A. Généralités

1. Concept, définition et classification

Le concept de perturbateurs endocriniens fut défini pour la première fois par la communauté scientifique lors de la conférence de Wingspread, qui s'est tenue dans le Wisconsin du 26 au 28 juillet 1991 (16). Un groupe d'experts multidisciplinaire avait alors affirmé que « *de nombreux composés introduits dans l'environnement par les activités humaines sont capables de perturber le système endocrinien des animaux, y compris les poissons, de la faune et des humains* ». Les conséquences pouvaient alors être profondes à cause du rôle crucial que jouaient les hormones dans le contrôle du développement des êtres vivants.

La définition du perturbateur endocrinien s'est précisée avec le temps. En 2002, l'OMS propose la définition suivante : « *Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants* » (17). Bien qu'aucun consensus sur cette définition n'ait émergé au sein de la communauté scientifique, elle reste celle qui est la plus communément admise.

Les produits chimiques peuvent être classés selon leur activité PE en trois catégories, allant de la catégorie 1 : « substances pour lesquelles une activité PE a été documentée dans au moins une étude sur un organisme vivant » à la catégorie 3 (3a et 3b) : « substances pour lesquelles il n'y a pas d'indication de propriété PE ou qui ne peuvent être évaluées par manque de données ». Ainsi, 432 substances ont été classées par l'Union Européenne, dont 194 substances dans la catégorie 1 (18). En 2018, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a publié un guide méthodologique pour l'identification des PE et la caractérisation de leur activité (19).

2. Sources et voies d'exposition

Les sources d'exposition aux PE sont nombreuses (17) : air, eau, sols, alimentation, poussières, produits du quotidien (produits de soins personnels, produits ménagers, jouets, produits électriques, matériaux de construction, papiers, vêtements, produits de jardinage).

L'exposition se produit par la voie cutanée, par inhalation et par ingestion. La part de l'exposition imputable à chaque source est variable selon le PE considéré, et la voie d'absorption principale dépend de ses caractéristiques physico-chimiques (20).

3. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens exercent une action sur les principales fonctions de l'organisme notamment sur le métabolisme, la fonction reproductrice, la croissance, le développement ainsi que l'homéostasie (17). Le système endocrinien est présenté à la figure 1.

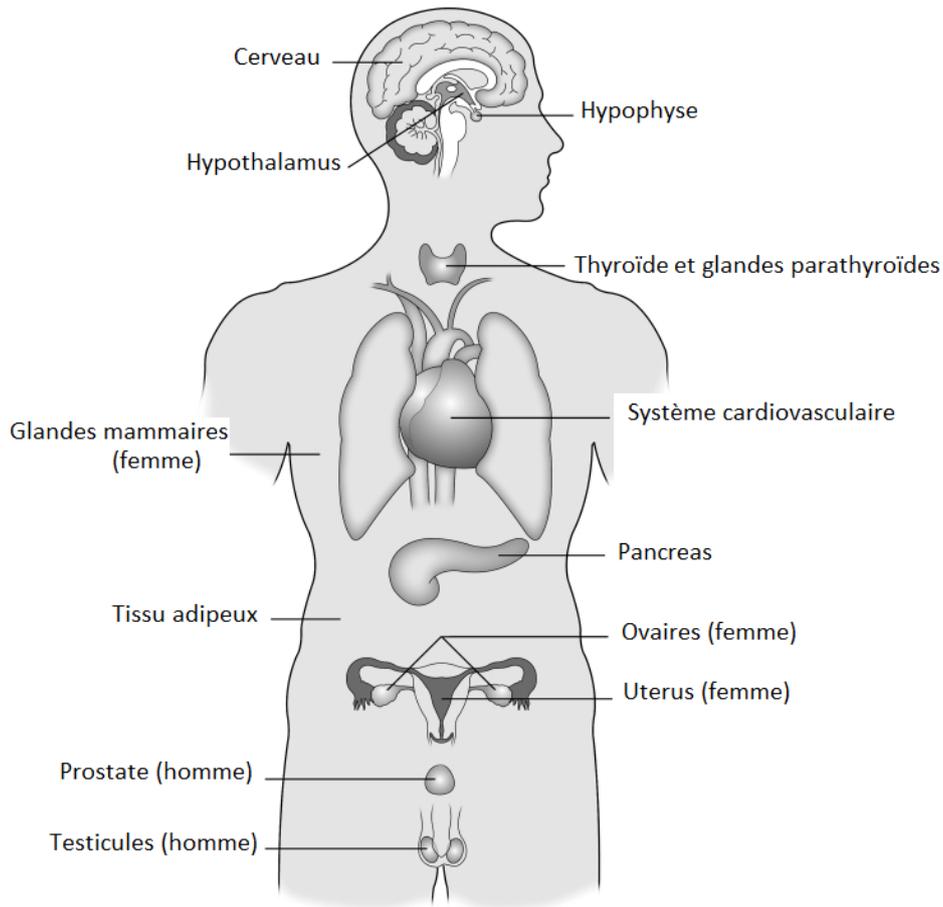


Figure 1 : Représentation du système endocrinien. (Adapté de (21))

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir sur différentes catégories de récepteurs, qui peuvent être classés en deux grands types :

- les récepteurs des xénobiotiques (par exemple, le récepteur intranucléaire au pregnane PXR pouvant se lier aux médicaments et aux pesticides) qui ont pour fonction principale l'adaptation de l'organisme à l'afflux de ces derniers. Ceux-ci sont responsables de l'induction de systèmes enzymatiques et de leur élimination.
- les récepteurs de ligands endogènes comme les récepteurs hormonaux, pouvant être modulés par ces xénobiotiques (par exemple les récepteurs aux oestrogènes ER α et β , les récepteurs AR, TR et GR), leur activation illégitime conduisant ainsi à une perturbation endocrinienne ou métabolique (22).

Les perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets :

- génomiques par action directe sur des récepteurs nucléaires, perturbant alors l'expression de gènes spécifiques en imitant l'action d'une hormone naturelle (effet agoniste) ou en empêchant l'émission d'un signal (effet antagoniste). Ce mécanisme est le plus fréquent.

- non génomiques : par action sur le transport des protéines, sur la production et la régulation des hormones ou de leurs récepteurs, conduisant ainsi à la modification des concentrations d'hormones naturellement présentes dans l'organisme (17).

3.1. Relations dose-réponse non monotones des perturbateurs endocriniens

Ces relations sont aujourd'hui reconnues comme non monotones (courbe en forme de U, courbe en forme de U inversée, courbe multiphasique) (Figure 2) (23).

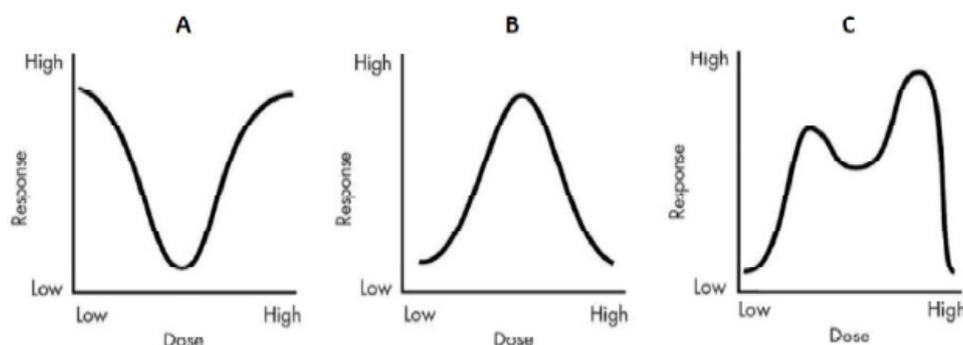


Figure 2 : Exemples de courbe dose-réponse non monotone des perturbateurs endocriniens. A : courbe en forme U, B : courbe en forme de U inversé, C : courbe multiphasique (23).

Ainsi, une stimulation apparaît à de faibles doses tandis qu'une inhibition apparaît à des doses plus fortes (24). Les micropolluants aux effets PE étant retrouvés à de très faibles concentrations et les relations dose-effet non monotones dont ils font l'objet contraignent à reconsidérer le paradigme toxicologique de ces molécules (23). Le principe selon lequel plus la dose augmente, plus la toxicité du produit chimique est forte, ne peut donc pas s'appliquer aux PE (25). Il paraît donc intéressant d'étudier l'évolution des effets des PE selon la dose.

3.2. Effets d'une exposition-in-utero à des perturbateurs endocriniens

En raison de leur passage transplacentaire, les PE sont des facteurs environnementaux actuellement soupçonnés d'impacter le développement des fœtus et des jeunes enfants suite à une exposition pendant la période *in utero*, avec des conséquences à long-terme sur leur vie future (1). Cela rejoint l'hypothèse développementale des origines de la santé et des maladies (Developmental Origin of Health and Disease ou DOHaD Hypothesis). Plusieurs études sont venues appuyer cette hypothèse. Ainsi, certaines ont mis en évidence le lien entre un petit poids de naissance et la mortalité par les maladies chroniques à l'âge adulte qui ne pouvaient s'expliquer uniquement par le style de vie ou le niveau socio-économique (26,27). L'une d'entre elles portait sur les femmes enceintes pendant la période de grande famine qu'ont connus les Pays-Bas durant la seconde guerre mondiale (1945-1946). Plus de 2400 enfants nés entre 1943 et 1947 ont été inclus dans cette étude (leur mère n'ayant donc pas toutes été touchées par la famine) et ont été examinés entre 50 et 57 ans. Ceux

dont la mère avait ingéré moins de protéines et de calories pendant leur grossesse avaient un petit poids à la naissance, et présentaient, entre autres, une pression artérielle plus élevée, une fonction rénale qui déclinait plus rapidement, un risque plus élevé d'athérosclérose et de maladies coronariennes. Les femmes avaient un risque multiplié par cinq de développer un cancer du sein et étaient davantage touchées par l'obésité (28). Une autre étude s'est intéressée à l'incidence de l'obésité chez les descendants de mères diabétiques. Dans ce cas, c'était un poids de naissance élevé qui était impliqué dans la survenue de l'obésité durant l'enfance (29).

Aujourd'hui, un nombre conséquent de pathologies et de troubles sont considérés comme ayant un lien avec une exposition prénatale à des PE.

C'est le cas des troubles du développement fœtal associés à un petit poids de naissance pour le BPA (30,31) et de la prématurité. Une étude américaine menée sur 72 femmes enceintes a mis en relation l'élévation des concentrations urinaires en mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phtalate (MEHHP) et en bisphénol-A (BPA) avec une diminution respective de la durée de la grossesse de 4,2 et 1,1 jours (32). Ce lien entre élévation du taux urinaire des phtalates et prématurité a été observé dans une autre étude : les concentrations urinaires en métabolites du di-2-ethylhexyl phtalate (DEHP) étaient associées à un risque plus élevé d'accouchement avant la 37^{ème} semaine de grossesse (OR = 1,33, IC95% [1,04, 1,70]) (33).

Une exposition *in utero* au BPA et aux phtalates est susceptible d'entraîner de l'asthme et des allergies chez les enfants, comme montré dans une étude espagnole portant sur des enfants jusqu'à l'âge de 7 ans (34).

Une exposition *in utero* au BPA est susceptible d'entraîner des malformations congénitales (35), ainsi qu'un retard de la puberté : une étude menée chez des fils de huit à 14 ans de mères exposées au BPA et aux phtalates a montré une association entre exposition prénatale et forte diminution des signes de la puberté (OR de 0,12 à 0,65) (36). De plus, une exposition à des pesticides organochlorés et organophosphorés constitue un facteur de risque d'hypospadias (37).

Des polluants environnementaux dont le BPA, les phtalates et les retardateurs de flammes de type polybromodiphényléther (PBDE) sont impliquées dans l'apparition de troubles autistiques, comme les troubles obsessionnels compulsifs (38,39). Ainsi, dans une récente étude longitudinale menée sur une cohorte mère-enfant, les concentrations urinaires de femmes enceintes en BPA étaient associées à des troubles neurocomportementaux dits « externalisants » chez leurs filles de deux à huit ans, quand les concentrations dans le sérum en PBDE-47 étaient associées aux mêmes troubles chez les garçons du même âge, ainsi qu'à un quotient intellectuel inférieur à la norme entre 5 et 8 ans (40). Une exposition à des pesticides organophosphorés pendant la grossesse entraînerait également des troubles neurocomportementaux mesurables chez les filles de 6 et 11 ans (41).

Les cancers seraient aussi des conséquences possibles d'une exposition à des PE *in utero*. Une étude américaine nichée dans la cohorte prospective « Child Health and Development Studies » a été menée sur des femmes ayant eu des grossesses entre 1959 et 1967, durant lesquelles plusieurs échantillons de sang avaient été recueillis. Les résultats montrent que leurs filles avaient quatre fois

plus de risque de développer un cancer du sein quand les niveaux en dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) dans les prélèvements sanguins étaient les plus élevés (42).

3.3. Effets transgénérationnels

L'un des exemples d'effets transgénérationnels d'une exposition à des perturbateurs endocriniens concerne l'utilisation du diéthylstilbestrol (DES) ou Distilbène®. Ce médicament qui était prescrit jusqu'en 1976 pour limiter les risques de fausses couches et d'accouchements prématurés, est connu pour avoir provoqué des adénocarcinomes vaginaux à cellules claires chez les filles ayant été exposées *in utero* (43–45) ainsi qu'un risque trois fois plus élevé de développer un cancer du sein (46). Le DES est aussi associé à un trouble lié au développement fœtal : le syndrome de dysgénésie testiculaire, qui désigne un ensemble de quatre pathologies associant cryptorchidie, hypospadias, hypospermie et cancer testiculaire. Ainsi, une étude française menée sur 209 fils d'hommes exposés *in utero* a montré que cette exposition augmentait le risque de développer une cryptorchidie (OR = 5,72 ; IC 95% [1,51- 21,71]) et un hypospadias (OR = 22,92 ; IC 95% [3,81-137,90]) (47). Dans une étude américaine menée sur 529 familles, les cas d'anomalies génitales ont été recensés sur 180 grossesses non exposées et 1000 grossesses exposées au DES. Aucun des enfants nés de grossesses non exposées n'avait développé d'anomalies génitales tandis que 3,5% des fils de mères exposées étaient atteints d'hypospadias et 28,4% des filles exposées avaient développé des anomalies mulleriennes. Huit virgule deux pourcents des petits-fils nés des filles de mères exposées étaient atteints d'hypospadias, alors qu'aucun des petits enfants nés de filles de mères non exposées au DES n'était touché (48). Les auteurs de l'étude n'avaient pas identifié de facteur génétique et d'autres facteurs environnementaux. Ainsi, comme le suggère une autre étude menée chez la souris, le mode de transmission de ces effets transgénérationnels serait épigénétique (49). En agissant sur le taux de méthylation de l'ADN ou l'enroulement des histones, les PE peuvent ainsi modifier l'expression de l'ADN à des étapes clé du développement, sans modifier le génome (17).

3.4. Effets cocktails

Pour évaluer la toxicité des produits chimiques, les études portent habituellement sur des composés isolés dans le but d'estimer les effets toxiques qui leurs sont propres. Mais cette façon de procéder ne reflète pas de façon réaliste les effets d'une exposition chronique et simultanée à plusieurs composés. Or, les effets d'une exposition à un mélange de composés peuvent s'avérer antagonistes, additifs voire synergiques, par rapport aux effets observables lors d'expositions isolées à chacun des composés du même mélange : c'est ce que l'on appelle l'effet mélange ou effet cocktail (50).

Ainsi, dès 2007, une revue de la littérature a mis en avant les fortes présomptions d'effet cocktails pour des mélanges de perturbateurs endocriniens à des doses inférieures aux NOAELs (No Observable Adverse Effect Levels) individuelles de chacun des composés (51). Les essais décrits portaient principalement sur des mélanges de xenoestrogènes *in vitro*, chez le rat et le poisson (*Pimephales promelas*) et des mélanges de perturbateurs de la fonction thyroïdienne ou

d'antagonistes androgéniques chez le rat et les effets décrits étaient le plus souvent additifs. L'auteur souligne néanmoins le fait que les études expérimentales de toxicité des produits chimiques utilisés en mélange doivent être réalisées dans des conditions expérimentales (i) les plus proches possibles de la réalité des expositions environnementales (composition du mélange, pertinence du niveau d'exposition évalué) et (ii) identiques aux conditions expérimentales que celles réalisées pour les composés pris isolément.

Concernant les mécanismes pouvant être à l'origine de l'effet cocktail, une autre étude plus récente, menée sur des lignées cellulaires exprimant le récepteur intranucléaire au pregnane PXR, a démontré que le 17 α -éthinyloestradiol (un contraceptif oral) et le trans-nonachlor (un pesticide organochloré) pouvaient se lier de façon coopérative à ce récepteur PXR, c'est-à-dire que la liaison du premier composé au récepteur favoriserait la liaison du second composé à ce même récepteur. Faiblement actifs lorsqu'ils ne sont pas en mélanges, leur association entraînent la formation d'un ligand supramoléculaire, avec pour conséquence une activation synergique du récepteur et des effets pour des doses plus faibles que lorsque ces composés sont isolés (52).

Du fait du mécanisme d'action propre aux perturbateurs endocriniens et des conséquences possibles au long cours ou à distance d'une exposition à des moments clés du développement, l'effet cocktail est difficile à démontrer chez l'Homme. Cependant, une étude menée sur les données épidémiologiques de 1992 à 1998 chez les enfants de 0 à 17 ans du Maryland (États-Unis) a révélé un risque plus élevé de développer l'un des quatre types de cancers étudiés (osseux, cérébraux, lymphomes non Hodgkinien et leucémies) avec un OR de 7,56 (IC95% : 4,16–13,73) dans le cas d'une exposition au mélange nitrates/atrazine/metolachlor versus 1,49 (IC95% : 1,22–2,83), 1,10 (IC95% : 0,78–1,56) et 1,54 (IC95% : 1,14–2,07) pour une exposition seule aux nitrates, à l'atrazine ou au metolachlor respectivement.

En 2017, une autre étude s'est intéressée à l'effet de mélanges de molécules possédant des effets anti-androgéniques sur la production de testostérone du tissu testiculaire fœtal *ex vivo* (5). Les résultats ont montré une diminution de la production de testostérone allant jusqu'à 53% pour des doses de composés mélangés (BPA, clomifène, kétoconazole, acide valproïque, bisphénol-S, chlordécone, imazalil et théophylline) deux à trois fois inférieures aux doses requises de chaque composé seul pour inhiber 20% de la production de testostérone. Dans le cas emblématique du BPA, la dose contenue dans le mélange décrit était 10 fois inférieure à celle requise en BPA seul pour inhiber 50% de la production de testostérone.

La description et la pertinence de l'étude des effets cocktails dépendent donc du nombre, du type et de la concentration en molécules ainsi que de la probabilité que les individus soient exposés au mélange.

B. Molécules exerçant un effet perturbateur endocrinien

Dans cette partie, nous détaillerons les molécules qui ont fait l'objet de nos travaux : le BPA, les Clx-BPA et les PB.

B.1. Le Bisphénol-A

1. Structure et propriétés physico-chimiques

Le BPA (BPA ou 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane) (N°CAS 80-05-7) a été synthétisé pour la première fois en 1891 par Alexandre Dianin. Sa masse molaire est de 228,29 g/mol. De par sa structure, représentée en figure 3, il appartient à la famille des diphénylalcane hydroxylés ou bisphénols (53). A température ambiante, il se présente sous la forme de cristaux, d'écailles ou d'une poudre blanchâtre non volatile et dégage une faible odeur phénolique. Son coefficient de partage n-octanol/eau (log Kow) de 3,32 renseigne une faible solubilité dans l'eau (0,12 à 0,30 g/l à 25 °C) (54), en faveur d'une affinité pour les lipides.

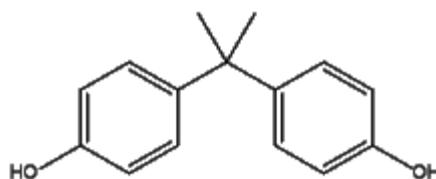


Figure 3 : Structure chimique du BPA

Sa synthèse consiste en la condensation d'un équivalent acétone et de deux équivalents phénols entraînant la perte d'une molécule d'eau. Elle peut-être catalysée par un alcalin, une résine de polystyrène ou un acide fort et se produit à 75°C (54). Ce mode de production simple et peu coûteux a participé à son succès auprès des industriels.

2. Toxicocinétique

2.1. Absorption

2.1.1. Voie orale

Les études menées chez l'Homme à des doses allant jusqu'à 5 mg montrent que le BPA est rapidement absorbé en totalité par voie digestive (55,56). La commission européenne considère que l'absorption par voie orale est de 100% (57).

Après ingestion d'une dose unique de 5mg de BPA deutéré (BPA-d16) le pic plasmatique est atteint après environ 80 minutes (55). Chez l'Homme, les données existantes font état d'un effet de premier passage hépatique important (glucurono- et sulfo-conjugaison). Le métabolite majoritairement retrouvé dans la circulation plasmatique est la forme glucuronide (92-99% de la dose ingérée) (22,58,59).

La biodisponibilité du BPA par voie orale est très faible. Dans une étude menée sur six hommes et huit femmes ayant ingéré 100 µg de BPA deutéré (BPA-d16) par kg de poids corporel, moins de 1% de la dose ingérée était retrouvée dans le sérum sous forme non-conjuguée (60).

2.1.2. Voie cutanée

Il n'existe actuellement pas d'études d'absorption cutanée *in vivo* chez l'Homme.

La commission européenne se base sur les données *in vitro* (61) et considère que l'absorption par voie cutanée est de 10% de la dose appliquée (57).

Les flux de pénétration cutanée rapportés sont de 0,022 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ pour une exposition de 0,093 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de BPA (136) à 0,12 \pm 0,09 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ pour une exposition à 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (62). Une étude décrit un pourcentage de métabolites de 39,3 \pm 7,9% après une exposition à 50 mmol de BPA, alors qu'une autre fait état de la présence de 97% de BPA non conjugué après une exposition de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, le BPA-glucuronide n'étant alors pas détecté (61,62).

2.1.3. Voie respiratoire

Il n'existe pas de données sur la toxicocinétique du BPA après une exposition par voie respiratoire. Cependant, la commission européenne considère que la biodisponibilité par voie respiratoire est de 100% (57).

2.2. Distribution

Après absorption, le BPA est rapidement distribué dans l'ensemble des tissus de l'organisme (58) : 90 à 95 % du BPA circulant est lié aux protéines plasmatiques sous sa forme non-conjuguée et la forme libre représente environ 5 à 10 % du total (53,63). Le BPA étant une molécule lipophile, la fraction libre du BPA est distribuée à l'ensemble des tissus. Après administration orale de BPA radiomarqué chez les rongeurs, les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans le foie et les reins.

Une étude a montré que le BPA pouvait s'accumuler dans la graisse chez le rat (64) : après des administrations répétées de BPA de 4 ou 5 mg/j pendant 15 j, le BPA a été détecté dans les échantillons de tissus riches en lipides prélevés sur les animaux traités (cerveau, tissu adipeux blanc, tissu adipeux brun), préférentiellement dans le tissu adipeux brun (64). Il n'existe pas d'études portant sur la distribution du BPA après une administration par voie cutanée et/ou sous-cutanée (57). Chez les rongeurs, la gestation a peu d'effet sur la distribution tissulaire du BPA et de ses métabolites (58).

2.3. Métabolisme

Les études *in vitro* et *in vivo* ayant porté sur des mammifères ont montré que le BPA était transformé par des réactions de phase I et de phase II (Figure 4).

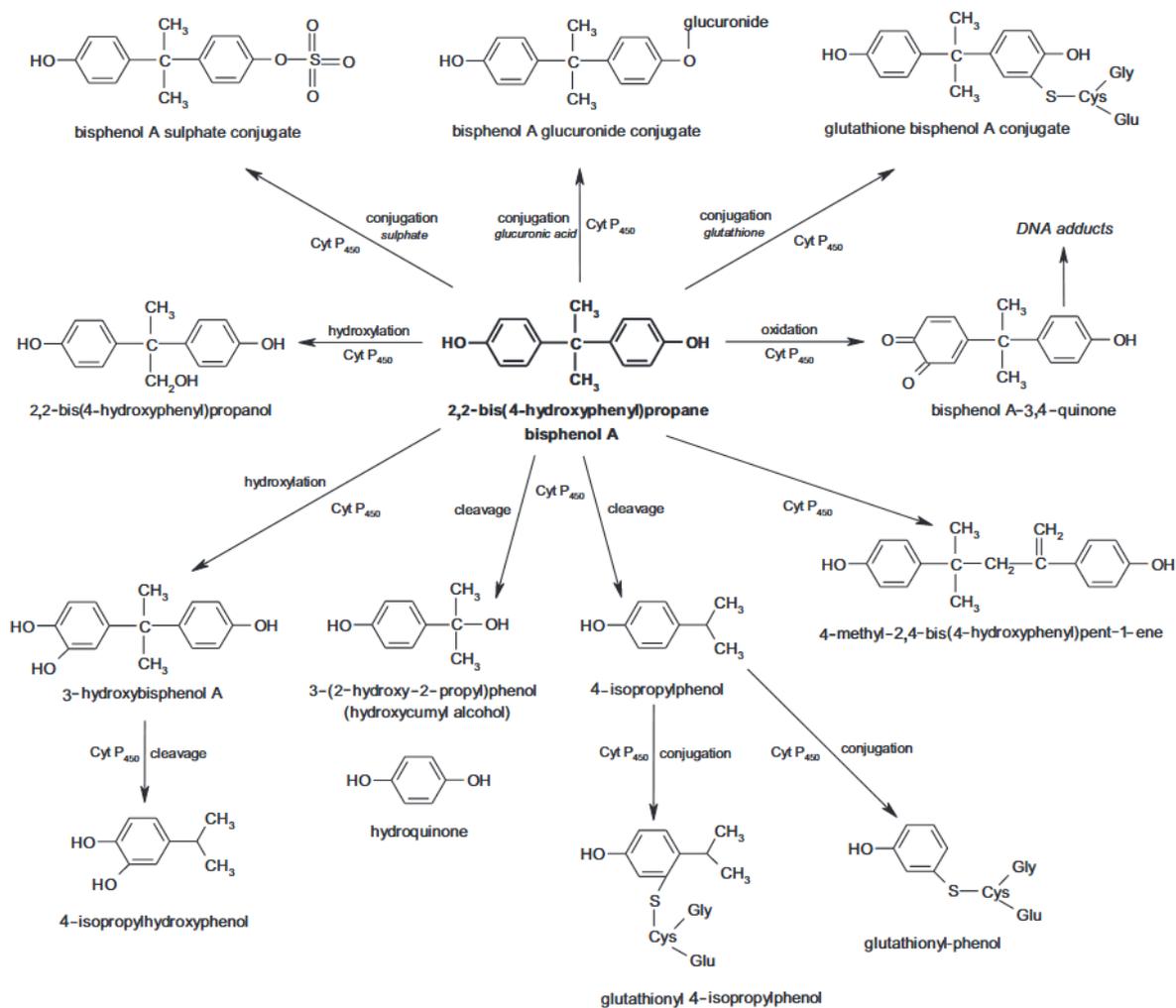


Figure 4 : Voies proposées de biotransformation du bisphénol-A chez les mammifères (études *in vitro* et *in vivo*) (65)

Les réactions de phase I impliquées dans la métabolisation du BPA chez les mammifères regroupent les réactions d'oxydation, y compris d'hydroxylation, catalysées par les enzymes microsomaux (les mono-oxygénases), en présence du cytochrome P450 (66). Chez le rat, le métabolite hydroxylé du BPA est le 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propanol (67). Chez la souris, ce sont 9 métabolites, dont le 3-hydroxy-BPA, le 4-isopropylhydroxyphénol et des dimères du BPA, qui ont été identifiés (68). Il a été démontré *in vivo* chez le rat que des métabolites du BPA formaient des liaisons covalentes avec l'ADN et que le BPA non métabolisé ne pouvait former de telles liaisons (69). Chez l'Homme les réactions de phase I sont minoritaires, même si le BPA-catéchol a déjà été identifié *in vitro* et *in vivo* dans les urines (70).

Les réactions de phase II surviennent après les réactions de phase I. Elles consistent en des processus de conjugaison, par l'ajout d'un ou plusieurs groupements (i) sulfate (sulfoconjugaison), (ii) glucuronide (glucuroconjugaison) ou (iii) glutathion. Les réactions de phase II majeures chez les mammifères sont présentées à la figure 5.

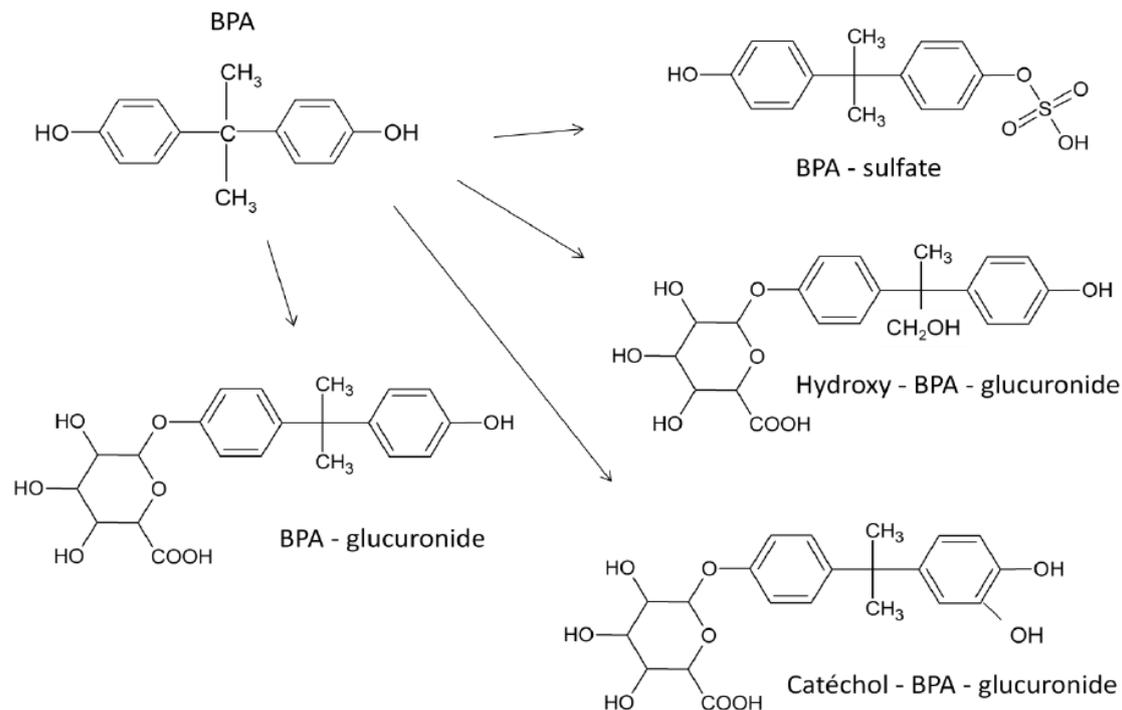


Figure 5 : Voies métaboliques majeures du bisphénol-A chez les mammifères (58)

Chez l'Homme, le BPA est majoritairement conjugué à l'acide glucuronique pour former le BPA-glucuronide. La conjugaison est catalysée par les isoformes UGT2B7 et UGT2B15, principalement dans le foie et dans une moindre mesure dans l'intestin (71). L'isoforme UGT2B15 présente un polymorphisme génétique qui pourrait être à l'origine de différences interindividuelles dans la capacité à métaboliser le BPA (58,72,73).

Les métabolites mono et di sulfoconjugués du BPA sont plus rarement identifiés et quantifiés (58). Quant aux métabolites conjugués au glutathion, ils ont été identifiés *in vitro* chez la souris (68).

Les métabolites conjugués du BPA n'exercent pas d'activité sur les récepteurs aux oestrogènes, contrairement au BPA (74–77). Pour cette raison, le mécanisme de conjugaison est considéré comme une voie de détoxification du BPA. La déconjugaison de ces métabolites peut être causée par des enzymes présentes dans les tissus de mammifères, la β -glucuronidase (78,79), restaurant alors l'activité oestrogénique du BPA (80). Chez l'Homme, la β -glucuronidase est présente au niveau intestinal mais aussi au niveau du placenta et du foie foetal (81,82).

Il est à noter que chez les rongeurs, le BPA-glucuronide est majoritairement éliminé dans la bile (83), et subit une recirculation entérohépatique (84), tandis qu'il est majoritairement éliminé par voie urinaire chez l'Homme (85).

2.4. Élimination

Chez l'Homme, le BPA est en majorité éliminé sous-forme de BPA-glucuronide par voie urinaire. Le BPA non conjugué et le BPA-sulfate sont retrouvés dans les urines à des concentrations moins importantes (56,84,86–93). Dans une étude datant de 2002, les auteurs avaient rapporté la demi-vie

terminale d'élimination du BPA-glucuronide à 5,3 h (55). Dernièrement, une autre étude a rapporté des demi-vies de 5,5 h pour le BPA-non conjugué, de 7,3 h pour le BPA-glucuronide, de 5,0 h pour le BPA-sulfate et de 7,8 h pour le BPA total (94). Une dernière étude a estimé à 5,6h, 5,5h, 4,4h et 6,4h les demi-vies respectives du BPA non conjugué, du BPA-glucuronide, du BPA-sulfate et du BPA total (60). Plusieurs études ont montré une excrétion du BPA dans le lait maternel (12,14,95).

3. Mécanisme d'action perturbateur endocrinien du bisphénol-A

À ce jour, l'ensemble des mécanismes d'action du BPA n'est pas encore connu.

Le BPA a un mécanisme d'action oestrogénique reconnu. Il serait dû à l'action combinée de la fonction hydroxy de ses groupements phénols et du groupement propane hydrophobe (53). Le BPA exerce ainsi une action agoniste faible sur les récepteurs aux oestrogènes ER α et ER β (96) et se lie au récepteur γ apparenté aux récepteurs aux oestrogènes ERR γ (97).

Des effets sur d'autres récepteurs ont cependant été observés (58) : liaison au récepteur nucléaire PPAR γ impliqué dans la prolifération des peroxyosomes (98), au récepteur cellulaire aux androgènes, au récepteur transmembranaire des oestrogènes, au récepteur des hydrocarbures aromatiques, aux récepteurs des hormones thyroïdiennes et au récepteur GPR30 impliqué dans la prolifération cellulaire (53,99,100).

Ainsi, suite à une exposition au BPA, plusieurs mécanismes sont susceptibles d'être impliqués, ce qui pourrait expliquer l'observation d'effets pour de faibles doses et les relations dose-réponse non monotones (58).

4. Utilisations et présence dans l'environnement

4.1. Utilisations

L'intérêt croissant de l'industrie pour le BPA débute dès 1936, quand ses propriétés oestrogéniques ont suscité un intérêt pharmaceutique et sa mise en concurrence avec le diéthylstilbestrol (le principe actif du Distilbène[®]) pour la mise sur le marché. Ce dernier présentant des propriétés plus intéressantes pour l'époque, l'usage du BPA en tant qu'oestrogène synthétique sera finalement abandonné.

Dès 1953, la synthèse de polymères de BPA introduit la production de plastiques de type polycarbonates dans notre vie quotidienne. Le BPA y est retrouvé seul ou en association à d'autres substances chimiques. L'utilisation de résines époxy à base de BPA en tant que revêtement intérieur de boîtes de conserve débutera ensuite dès 1970.

Les polycarbonates forment des plastiques rigides, transparents mais colorables, légers, très peu coûteux et de haute performance physique. Ces propriétés sont à l'origine de leur omniprésence dans notre quotidien, dans plus de 60 secteurs différents (58).

Le BPA est une substance utilisée dans la fabrication de plastiques de type polycarbonates (afin de les rendre plus durs et transparents). Il est aussi utilisé dans la fabrication de nombreux produits ayant de multiples usages, tant dans le domaine domestique qu'industriel.

Le BPA est présent en tant que monomère dans (59) :

- Les polycarbonates (l'emballage alimentaire, les gourdes, la vaisselle, les récipients de conservation, les pare-chocs automobiles, les verres de lunettes, les CD, les papiers à impression thermique (101)...) ;
- Les polyesters carbonates, synthétisés par ajout de monomères (automobile, transports, portes de micro-onde, sèche-cheveux, fers à repasser, emballages médicaux) ;
- Les résines époxydes et polyacrylates (cannettes et boîtes de conserve), encres, réseaux de distribution d'eau potable, peintures, ciment dentaire (101)). Ces résines constituent la deuxième utilisation du BPA avec 191 520 tonnes de BPA utilisées par an (58) ;
- Les polysulfones retrouvés dans le domaine médical (humidificateurs, membrane de filtration pour eau potable, membranes pour hémodialyse, plateaux chirurgicaux), dans l'électroménager (cuisinières, cafetières, sèche-cheveux) et en plomberie ;
- Les polyéthérimides qui entrent dans la composition de pompes de distributeur de boisson ;
- Les plastiques recyclés (vinyle, polychlorure de vinyle, polystyrène, polycarbonate)

La production mondiale annuelle du BPA en 2006 était estimée à 3,8 millions de tonnes (102). Selon l'INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques), en 2007, aucune entreprise française ne produisait de BPA en France.

4.2. Présence dans l'environnement

Le BPA est ubiquitaire dans l'environnement. Il a été retrouvé dans les milieux hydriques (eaux souterraines et superficielles, eaux minérale et du robinet), les sols et les poussières des habitations.

Dans les milieux hydriques, la contamination par le BPA s'effectue majoritairement par les eaux brutes municipales et industrielles des stations de traitements des eaux usées (103,104). Dans les effluents des stations d'épuration, les plus fortes concentrations, jusqu'à 370 µg.L⁻¹, ont été retrouvées dans les effluents des usines de recyclage de papier (105). Dans les eaux superficielles les concentrations varient selon la période de l'année (106). Les eaux souterraines sont peu affectées par la contamination en BPA, la concentration maximale retrouvée ayant été de 1.9 µg.L⁻¹ (104). Les technologies de traitement actuellement utilisées de par le monde ne permettent pas d'éliminer totalement le BPA. En effet, il est retrouvé en sortie des usines de traitement et jusque dans l'eau du robinet à des concentrations comprises variables, pouvant aller jusqu'à 317,0 ng.L⁻¹ (107–110).

Le BPA est également présent dans l'eau embouteillée dès lors que la bouteille est en polycarbonates (108). La contribution de l'eau à l'exposition totale de l'Homme au BPA serait de 2,8% (20,111). Pour

cette raison, l’OMS ne considère pas l’eau potable comme un contributeur majeur de l’exposition au BPA (77).

Dans les sols, la contamination par le BPA se fait *via* l’épandage des boues d’épuration, les concentrations en BPA retrouvées dans ces boues pouvant atteindre $3,2.10^7 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Dans les rivières, le BPA a tendance à se concentrer dans les sédiments (104).

Dans les habitations, une étude a rapporté des concentrations moyennes en BPA de 707 ng.g⁻¹ dans les poussières du domicile (112).

4.3. Réglementation

Depuis juin 2010 en Europe, à la suite d’une initiative française, le BPA est interdit dans les biberons, ainsi que dans les contenants alimentaires destinés aux enfants en bas âge depuis janvier 2013 (113,114). Ensuite, au 1er janvier 2015, l’interdiction du BPA s’est étendue à tous les matériaux au contact alimentaire (115). Cette interdiction stipulait l’interdiction d’importer et d’utiliser du BPA en France.

La figure 6 présente l’évolution des réglementations visant à réduire l’utilisation du BPA.

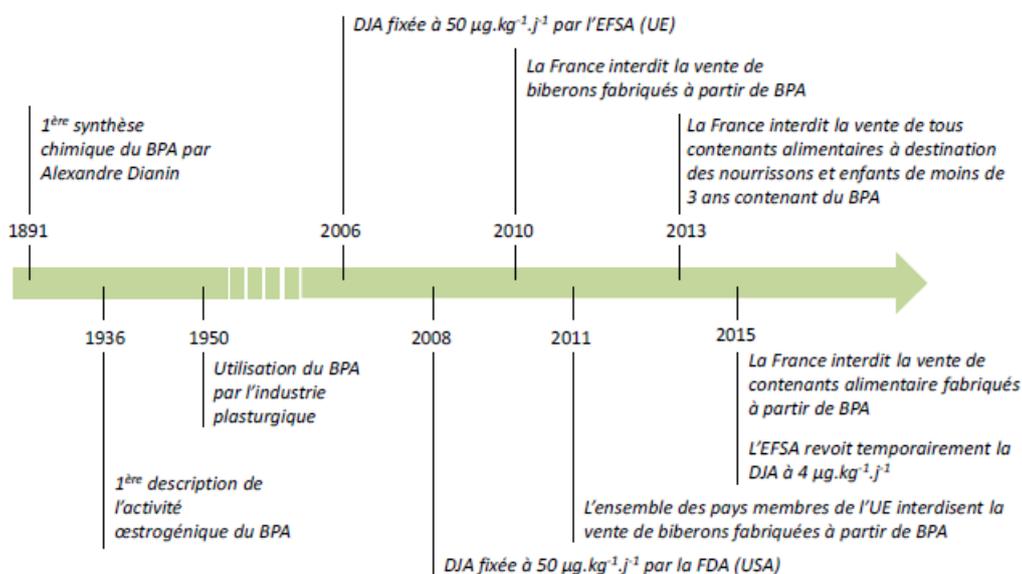


Figure 6 : Evolution des réglementations mises en place visant à réduire l’utilisation du bisphénol-A (BPA).

DJA : Dose Journalière Acceptable ; EFSA : European Food Safety Administration

Le 16 juin 2017, les propriétés PE du BPA ont été reconnues par l’European Chemicals Agency (ECHA) qui l’a considéré comme étant une substance « très préoccupante » (116).

Le 1er février 2018, une proposition de refonte de la directive européenne 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation introduit pour la première fois une notion de valeurs limites pour le BPA. Ainsi, les concentrations en BPA ne devront pas excéder 0,01 $\mu\text{g/L}$, dans ces eaux (117).

5. Exposition des populations

5.1. Exposition par l'alimentation

L'alimentation est considérée comme la principale voie d'exposition de la population au BPA, via l'ingestion d'aliments ou de boissons contaminés par du BPA.

Lors de chauffage de contenants alimentaires à base de polycarbonates ou de résine époxyde, des monomères résiduels de BPA sont relargués dans l'alimentation et les boissons par hydrolyse. Ce relargage est particulièrement observé avec les contenants usagés ou si le contenu est à un pH alcalin (118,119), à l'origine de concentrations élevées dans les aliments.

Au Japon, du BPA a été retrouvé dans les conserves à une concentration de 842 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (120). Aussi, au Canada, du BPA a été retrouvé à des concentrations atteignant jusqu'à 4,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans des cannettes contenant des boissons (121).

5.2. Exposition par les composites dentaires

Des dérivés du BPA (BPA glycidyl dimethacrylate et BPA diglycidylether) entrent dans la composition d'agents de scellement ou dans des résines composites utilisés en dentisterie (122,123). Sous l'action des estérases salivaires, du BPA est libéré de la résine vers la salive et peut-être détecté dans les trois heures qui suivent leur utilisation (124).

5.3. Exposition par la voie inhalée

La voie inhalée constitue une voie d'exposition mineure au BPA. Du fait de la courte demi-vie atmosphérique du BPA (0,2 jours) et de la taille des particules de poussières retrouvées dans les habitations, il est peu probable que le BPA soit absorbé au niveau pulmonaire (112). Les particules inhalées, piégées par le système muco-ciliaire, sont susceptibles d'être ingérées, contribuant à l'exposition par voie orale (119).

5.4. Exposition cutanée

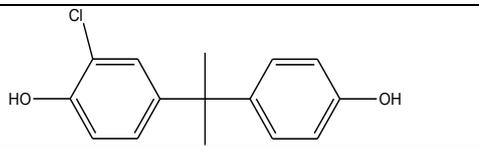
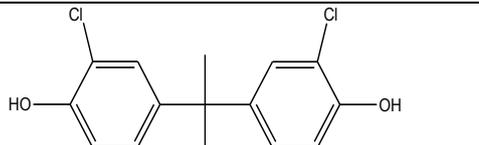
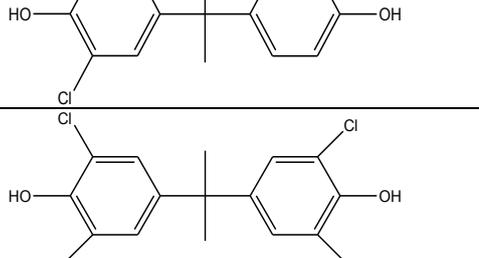
Le BPA entrant dans la fabrication de nombreux produits de consommation courante (CD et DVD, emballages alimentaires, papiers thermiques, lunettes), et compte-tenu du passage transcutané du BPA, la voie cutanée est une voie d'exposition au BPA qu'il est nécessaire de prendre en considération.

B.2. Les dérivés chlorés du bisphénol-A

1. Structure et propriétés physico-chimiques

Les Clx-BPA sont des sous-produits de la chloration du BPA. Leur production est due à la forte réactivité du BPA avec le chlore (essentiellement les radicaux hypochlorite et chloré), entraînant des substitutions sur ses groupements phénoliques par substitution électrophile en position ortho (125–127). Il existe cinq Clx-BPA (128) : Le monochlorobisphénol-A (CBPA), de masse molaire $262,73 \text{ g.mol}^{-1}$, le dichlorobisphénol-A de masse molaire $297,18 \text{ g.mol}^{-1}$ (qui se présente sous deux formes isomériques : le 2,2'-dichlorobisphénol-A (2,2'-DCBPA) et le 2,6-dichlorobisphénol-A (2,6-DCBPA)), le trichlorobisphénol-A (TCBPA) de masse molaire $331,62 \text{ g.mol}^{-1}$ et le tétrachlorobisphénol-A (TTCBPA) de masse molaire $366,07 \text{ g.mol}^{-1}$. Leur structure chimique est représentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Structures chimiques des dérivés chlorés du bisphénol-A

Monochlorobisphénol-A (CBPA)	2-chloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	
2,2'-dichlorobisphénol-A (2,2'-DCBPA)	2-chloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	
2,6-dichlorobisphénol-A (2,6-DCBPA)	2,6-Dichloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	
Trichlorobisphénol-A (TCBPA)	2,6-Dichloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	
Tétrachlorobisphénol-A (TTCBPA)	2,6-Dichloro-4-[1-(3,5-dichloro-4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	

Les Clx-BPA, à l'exception du TTCBPA ont une origine exclusivement hydrique et trouvent leur origine dans les mécanismes de potabilisation à base de chlore de l'eau du robinet, mais aussi dans tout procédé utilisant du chlore comme c'est le cas pour le blanchiment du papier dans les usines de recyclage (105,129). Les Clx-BPA peuvent aussi se former dans l'eau de mer sous l'action du rayonnement solaire (130). Le TTCBPA est également produit par les industriels en tant que retardateur de flamme et dans une moindre mesure comme additif dans des polymères (ABS), des résines époxy et polycarbonates, certains polystyrènes et adhésifs (58,131).

2. Toxicocinétique

Il n'existe aucune donnée de toxicocinétique *in vivo* pour les Clx-BPA.

Une seule étude a rapporté des essais *in vitro* sur la biotransformation des Clx-BPA (132). Le métabolisme avait été suivi sur des fractions sub-cellulaires hépatiques humaines et de rats, au moyen de Clx-BPA radiomarqués au carbone 14. Une oxydation par le cytochrome P450 avait alors été rapportée. Cependant les mécanismes d'absorption, distribution, métabolisme et d'élimination des Clx-BPA restent incertains (128).

3. Mécanisme d'action perturbateur endocrinien des dérivés chlorés du bisphénol-A

Les études disponibles sont limitées aux modèles animaux et cellulaires. Elles font état d'effets oestrogéniques (133,134) ainsi que d'actions sur le métabolisme énergétique (134–137).

Concernant les effets oestrogéniques, des études menées sur des levures génétiquement modifiées pour exprimer le récepteur ER α ont rapporté des effets agonistes des Clx-BPA jusqu'à 100 fois plus élevés que celle du BPA (129,138,139). Dans l'une des études, les activités observées étaient 8, 8, 38, 20 et 3 fois plus importantes que l'activité agoniste oestrogénique du BPA, pour le CBPA, le 2,6-DCBPA, le 2,2'-DCBPA, le TCBPA et le TTCBPA respectivement (129). Dans une autre étude, CBPA, le 2,2'-DCBPA, et le TCBPA présentaient des activités oestrogéniques 12, 105, et 35 fois plus importantes que celle du BPA (138). Dans ces deux études, le 2,2'-DCBPA présentait la plus forte activité oestrogénique.

Une autre étude a montré une affinité du CBPA sur ER α 4 fois supérieure à celle du BPA. L'activité du DCBPA était quant à elle 10 fois supérieure. Les affinités du CBPA et du DCBPA étaient en revanche similaires à celles du BPA pour le récepteur ER β (140).

4. Utilisations, présence dans l'environnement et réglementation

Les Clx-BPA ont été mis en évidence essentiellement dans les milieux hydriques : les eaux des stations d'épuration (141,142), les effluents d'usines de recyclage du papier (105,129) et les rivières (142), les sédiments (143–146), les boues d'épuration (147,148), les canalisations de distribution de l'eau potable (149) et l'eau du robinet (141,150–152). Des organismes aquatiques sont capables d'assimiler Les Clx-BPA, comme c'est le cas pour les palourdes (143).

Les Clx-BPA étaient plus souvent détectés et pour de plus fortes concentrations dans les eaux du robinet que dans les autres sources d'eau potable (150).

Le TTCBPA est le dérivé chloré du BPA dont la présence dans l'environnement est la plus étudiée de la littérature (143,144,146,148,153,154). Compte-tenu de la faible production mondiale de TTCBPA comparée au BPA, il est probable que les Clx-BPA dans l'environnement soient formés à partir de la chloration du BPA plutôt que de la déchloration du TTCBPA.

À ce jour, il n'existe aucune réglementation concernant l'usage des Clx-BPA et leur surveillance dans l'environnement.

5. Exposition des populations

Les Clx-BPA sont présents dans nos produits de consommation courante et dans notre environnement quotidien. Ainsi, dans des papiers blanchis à usage alimentaire, comme les filtres à café (155), les concentrations en Clx-BPA (CBPA et DCBPA) étaient supérieures à celles retrouvées dans les filtres à café en papier non blanchis, ce qui est cohérent avec le mécanisme de leur formation en présence de chlore dans les milieux aqueux. La voie orale, par ingestion d'eau potable ou d'aliments ayant été au contact avec de l'eau (fruits et légumes lavés) ou en ayant consommé (*viande* provenant d'animaux ayant bu de l'eau), est donc une voie d'exposition aux Clx-BPA.

Du fait de la présence de BPA dans des produits de soins personnels et des produits d'entretien à des concentrations pouvant atteindre 100 µg/g (156), le chlore contenu dans certains de ces produits (produits ménagers à base d'eau de Javel (157), lessives avec agents de blanchiment (158), nettoyants pour lave-vaisselle (159)) ainsi que leur contact avec l'eau du robinet pourrait être à l'origine de la formation de Clx-BPA (128). Les vêtements et tissus ayant subi un blanchiment sont aussi susceptibles de relarguer des Clx-BPA (160).

De par la présence d'atomes de chlore dans leur structure, les Clx-BPA présentent une lipophilie supérieure à celle du BPA, augmentant avec le nombre d'atomes de chlore sur la molécule (161). Une absorption par la peau et les muqueuses respiratoires supérieure à celle du BPA est ainsi attendue (128). L'accumulation dans les tissus adipeux pourrait aussi être envisagée, mais peu d'éléments sont disponibles (128).

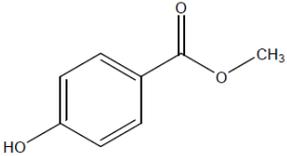
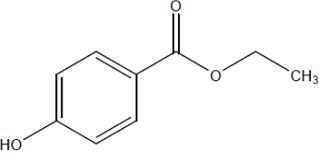
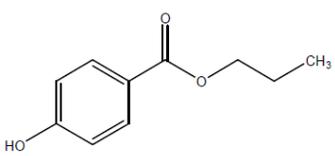
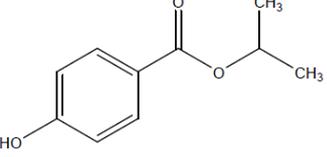
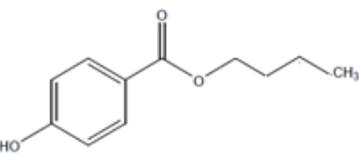
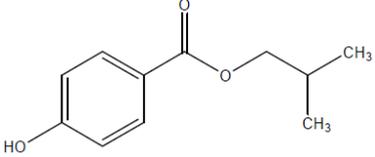
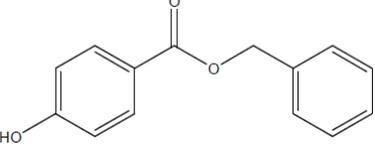
Les Clx-BPA ont ainsi été retrouvés dans des matrices biologiques humaines, comme l'urine (162), le tissu adipeux (163), le placenta (164–166), le lait maternel (13–15), le colostrum (12), le plasma (167), le sérum (86) et les urines (11,86,162,168–170). Dans une étude menée sur 226 chypriotes, les concentrations urinaires en CBPA étaient accrues chez les individus utilisant des produits à base de chlore de façon répétée (170).

B.3. Les parabènes

1. Structure et propriétés physico-chimiques

Les PB sont des composés estérifiés dérivés de l'acide para-hydroxybenzoïque (ou acide 4-hydroxybenzoïque). Ils sont produits par condensation de cet acide avec un alcool en présence d'un catalyseur, le PB obtenu dépendant de la chaîne carbonée de l'alcool utilisé pour la synthèse. Leur structure chimique est représentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Structure chimique des principaux parabènes

		
4-hydroxybenzoate de méthyle (N°CAS 99-76-3)	4-hydroxybenzoate d'éthyle (N°CAS 120-47-8)	4-hydroxybenzoate de propyle (N°CAS 94-13-3)
		
4-hydroxybenzoate d'isopropyle (N°CAS 4191-73-3)	4-hydroxybenzoate de butyle (N°CAS 94-26-8)	4-hydroxybenzoate d'isobutyle (N°CAS 4247-02-03)
		
	4-hydroxybenzoate de benzyle (N°CAS 94-18-8)	

Parmi ces PB, méthyle, éthyle, propyle et butylparabène sont les plus utilisés. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques du méthyle, de l'éthyle, du propyle et du butylparabène.
Adapté de (171)**

Nom/synonymes	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	Coefficient de partage n-octanol/eau (Log Kow)	pKa	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)
Méthyl parabène/4-hydroxybenzoate de méthyle/para-hydroxybenzoate de méthyle	152,15	2500	1,96	8,17	131	275
Éthyl parabène/4-hydroxybenzoate d'éthyle/para-hydroxybenzoate d'éthyle	254,38	885	2,47	8,22	117	297,5
Propyl parabène/4-hydroxybenzoate de propyle/para-hydroxybenzoate de propyle	180,21	500	3,04	8,35	97	285,14
Butyl parabène/4-hydroxybenzoate de butyle/para-hydroxybenzoate de butyle	194,23	207	3,57	8,37	68,5	300,26

À température ambiante, méthyle, éthyle, propyle et butylparabène se présentent sous la forme cristaux incolores ou blancs, ou d'une poudre blanche. Les formes physiques de l'isopropyl, de l'isobutyl et du benzylparabène ne sont pas documentées. Méthyle et éthylparabène sont dits « à chaîne courte », tandis que propyle et butylparabène sont dits « à chaîne longue ». Plus la chaîne alkyle du PB est longue, plus sa solubilité dans l'eau est faible, passant de 2500 mg/L pour le méthylparabène à 207 mg/L pour le butylparabène. À l'inverse, son Log Kow augmente de 1,96 à 3,57 pour le méthylparabène et le butylparabène respectivement.

2. Toxicocinétique

À ce jour, la toxicocinétique des PB reste mal connue chez l'Homme. Des données animales existent mais l'extrapolation des données animales vers l'Homme n'est pas recommandée et appelle toujours à la prudence. C'est pour cela que nous nous concentrerons sur les données existantes chez l'Homme à chaque fois que ces données existent.

2.1. Absorption et distribution

2.1.1 Voie orale

Lors d'une administration par voie orale, les PB sont rapidement et totalement absorbés par le tractus gastro-intestinal (172–174). La co-administration d'alcool faciliterait l'absorption en inhibant l'activité des estérases intestinales, dont l'affinité avec les PB est d'autant plus importante que la chaîne aliphatique de l'ester est courte (175).

Une étude menée chez le rat, dans laquelle méthyle, propyle et butylparabène marqués au carbone 14 ont été administrés *per os* (100 mg/kg), a rapporté que la biodisponibilité des PB était importante, suivant l'ordre méthylparabène>propylparabène>butylparabène sans en préciser la valeur (176). La littérature ne fait pas état de la biodisponibilité des PB *per os* chez l'Homme, les rapports d'experts se basant sur des extrapolations de données animales (22,76).

Suite à une administration orale, l'éthyle et le butylparabène ont été retrouvés dans le liquide amniotique à des concentrations jusqu'à 10 fois supérieures aux concentrations plasmatiques chez la rate gestante (177).

2.1.2 Voie cutanée

Les PB sont facilement absorbés par la peau, mais partiellement hydrolysés en acide para-hydroxybenzoïque par des estérases cutanées, les carboxyestérases hCE1 et hCE2 (173). Ils sont rapidement absorbés (178), leur passage cutané étant d'autant plus important que la chaîne carbonée qui compose l'ester est courte. Lors d'une application cutanée, $85 \pm 15\%$ du méthylparabène et $81 \pm 11\%$ du butylparabène sont absorbés et respectivement 35 % et 33 % sont métabolisés en acide para-hydroxybenzoïque avant de passer dans la circulation générale. Dans le

tissu adipeux sous-cutané, hCE1 est la carboxyestérase la plus représentée, avec une activité préférentielle sur le méthylparabène, cette activité diminuant avec l'allongement de la chaîne carbonée qui compose l'ester (méthyle > éthyle > propyle > butyle). A l'inverse, l'activité de hCE2 augmente quand cette chaîne s'allonge (butyle > propyle > éthyle > méthyle) (76).

Une heure après une application cutanée, le butylparabène est détecté dans le sérum. Un pic urinaire est observé entre 8 et 12h après l'application, majoritairement sous forme glucuroconjugué (22).

Les PB peuvent s'accumuler au niveau du *stratum corneum* dans le cas d'applications quotidiennes, comme cela a été démontré dans le cas du méthylparabène sur des volontaires sains ayant reçu deux applications par jour pendant 4 semaines d'une formulation contenant du méthylparabène à 0,15 %. Douze heures après la première application, la concentration était de 10 pmol.cm^{-2} ; elle était de 120 pmol.cm^{-2} au bout de 4 semaines (179). De plus, lorsque plusieurs PB sont associés, le passage cutané est réduit, ce qui facilite leur accumulation dans l'épiderme ou le derme (22).

L'utilisation conjointe d'alcool dans les formulations de produits contenant des PB facilite leur pénétration cutanée et donne lieu à des réactions de transestérification, à l'origine de la formation d'autres PB (175).

Dans une étude publiée en 2007 menée sur 26 hommes volontaires sains ayant reçu quotidiennement une application de crème contenant du butylparabène à 2% (m/m) (en moyenne 800mg par jour), le butylparabène était détecté dans le sérum dès 1 heure suivant l'application. Le pic plasmatique était atteint au bout de 3 heures (concentration moyenne : $135 \mu\text{g/L}$). Le pic de concentrations urinaires était atteint en 8 à 12 heures et 2,6 mg étaient en moyenne recueillis au bout de 24 heures. La majorité du butylparabène recueilli dans les urines était présent sous sa forme glucuroconjugué et seulement 2,1 % étaient sous forme non-conjugué (178). Après une application cutanée de PB, seule une faible fraction se retrouve donc sous forme non conjugué dans les urines.

2.2. Métabolisme

Chez l'Homme, le métabolisme des PB est mal connu et beaucoup d'études sont anciennes. Des données animales existent. Le métabolisme des PB est différent suivant la voie d'exposition (orale *versus* cutanée) du fait de la présence des estérases cutanées (76,180). La métabolisation des PB est rapide et presque totale par voie orale.

Dans des conditions *in vivo*, l'hydrolyse des PB en acide para-hydroxybenzoïque (PHBA) a été observée en quelques minutes sous l'action des carboxyestérases hépatiques (180). L'acide para-hydroxybenzoïque est un métabolite commun à tous les PB (173,174,180,181).

Dans les études chez l'animal (rat, chien, chat et lapin), la formation de PHBA est toujours observée (22). Le PHBA peut ensuite se retrouver conjugué avec la glycine pour former l'acide hydroxyhippurique (PHHA). Le PHBA peut aussi se conjuguer à l'acide glucuronique ou au sulfate pour former des métabolites glucuro et sulfo conjugués (22).

Ces mécanismes seraient aussi retrouvés chez l'Homme, sans qu'il soit possible de déterminer les proportions de chacun des métabolites produits (22).

Des études menées chez l'Homme et apportant des précisions supplémentaires sont présentées dans la partie suivante (2.3. Elimination).

2.3. Elimination

Il n'y a pas d'élimination fécale des PB (172). Les PB seraient éliminés majoritairement sous forme glucuro et sulfo conjuguée dans les urines (173,174). Le composé parent non-conjugué a été retrouvé dans les urines à hauteur de 2,1% de la dose ingérée (173). Cependant la fraction des PB éliminée dans l'urine sous leur forme estérifiée (non conjuguée ou conjuguée) par rapport à la fraction éliminée sous forme d'acide para-hydroxybenzoïque (PHBA) reste mal connue (174).

Dans une étude ancienne (182), après une prise per os de 1g/Kg de PB, 21% de la dose avait été excrétée sous forme PHBA et 33% des PB étaient glucuroconjugués. La présence de sulfoconjugués et l'association du PBBA avec la glycine avait aussi été observée.

Dans une autre étude de la même époque (183), chez un patient ayant reçu 2g de propylparabène pendant 5 jours, les auteurs avaient pu constater que 17,4% de la dose ingérée avaient été excrétés dans les urines sous forme d'acide para-hydroxybenzoïque (PHBA), dont 3,7% étaient associés à la glycine pour former l'acide para-hydroxyhippurique (PHHA). 55% de la dose était retrouvée sous forme sulfoconjuguée et le propylparabène non conjugué n'avait pas été retrouvé dans les urines. Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse d'une ouverture du cycle phénolique du PB durant les processus de métabolisation. Cette hypothèse n'a pas été validée lors d'études ultérieures, mais d'autres métabolites des PB ont été identifiés par la suite.

Ainsi, dans le but d'améliorer les connaissances du métabolisme et de l'élimination des PB chez l'Homme, un essai allemand a été mené (184). Trois volontaires sains, deux hommes et une femme, ont ingéré séparément des composés deutérés (méthylparabène-d4, iso-butylparabène-d4 et butylparabène-d4). Le choix des composés deutérés permettait de les distinguer des PB endogènes potentiellement déjà présents dans les organismes des participants. Après recueil de multiples spots urinaires sur 48h, les auteurs ont pu récupérer, tous métabolites confondus, 84,4%, 86,0% et 80,8% des doses ingérées pour le méthyle, l'iso-butyle et le butylparabène respectivement.

Le métabolite principal était l'acide para-hydroxyhippurique (de 57,2 à 63,8% de la dose ingérée), métabolite commun à tous les PB étudiés. L'autre métabolite commun, l'acide para-hydroxybenzoïque, était minoritaire (de 3,0 à 7,2% de la dose ingérée).

Dix-sept pour cent de la dose ingérée en méthylparabène-d4 était excrétée dans les urines sous formes non-conjuguée et conjuguées, dont 30,4% et 63,4% étaient respectivement sous forme glucuroconjuguée et sulfoconjuguée. L'iso-butylparabène était excrété sous formes non-conjuguée et conjuguées à hauteur de 6,8% de la dose ingérée (dont 89,2% et 12,2% sous forme glucuroconjuguée et sulfoconjuguée respectivement) et le butylparabène à 5,6% (87,2% et 13,5% de glucuroconjugués et sulfoconjugués respectivement). D'autres métabolites spécifiques ont été

identifiés, dont le 2-hydroxy-iso-butylparabène pour l'iso-butylparabène et le 3-hydroxy-iso-butylparabène pour le butylparabène. Moins de 1% des métabolites étaient des métabolites hydroxylés sur le cycle aromatique.

Cette étude, bien que réalisée sur un très petit échantillon (n = 3, 1 femme et 2 hommes), avait pu mettre en lumière la complexité du métabolisme de certains PB chez l'Homme, ainsi que la diversité des métabolites générés et excrétés, dont la majorité en terme d'abondance sont des métabolites non-spécifiques, car communs à plusieurs PB. En raison du faible nombre de sujets dans cette étude, d'autres études devront être menées pour confirmer ces observations.

Un schéma métabolique indicatif des PB chez l'animal est présenté à la figure 7.

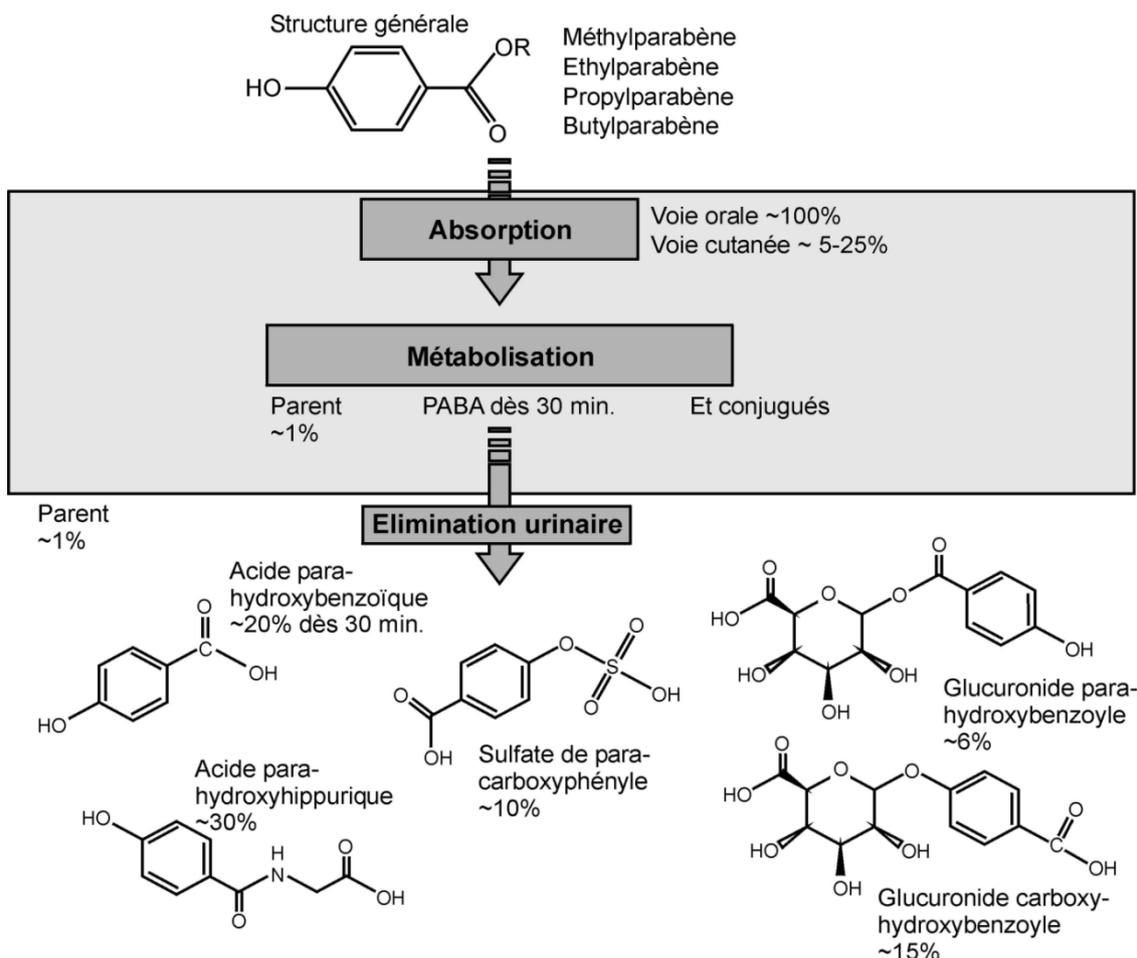


Figure 7 : Schéma métabolique indicatif des parabènes, données sur animaux de laboratoire (d'après (22))

3. Mécanisme d'action perturbateur endocrinien des parabènes

Le mécanisme d'action principal des PB est oestrogénique. Leur action sur l'expression du génome implique une liaison sur les récepteurs intranucléaires aux œstrogènes ER α et ER β ; cette capacité des PB à se lier à ces récepteurs a été démontrée dans des études *in vitro* sur cultures de levures et de lignées cellulaires humaines MCF-7 (185–187). La capacité respective du méthyle, éthyle, propyle et butylparabène à se lier aux récepteurs ER α et ER β par rapport au 17 β -œstradiol, leur ligand naturel, a

été évaluée comme étant 2500000, 150000, 30000 et 10000 inférieure, l'activité oestrogénique des PB augmentant avec l'allongement de la chaîne aliphatique de l'ester (22,185). Cette activité en deçà de celle du 17 β -œstradiol est à l'origine de l'appellation d'« œstrogènes faibles » dont les PB font état dans la littérature.

Dans une étude menée sur des cellules utérines de rats, les auteurs ont mis en évidence que la liaison du butylparabène aux récepteurs oestrogéniques était compétitive. Cependant, les concentrations requises pour obtenir 50% de compétition avec de l'oestradiol radiomarqué étaient environ entre 100 et 10000 fois supérieures comparativement à d'autres xénobiotiques comme le 4-nonylphénol et le diéthylstilbestrol (Distilbène®) respectivement (185).

Le méthyle, l'éthyle, le propyle et le butylparabène ont aussi montré une très faible activité anti-androgénique *in vitro* (22).

Dans les études *in vivo* les effets oestrogéniques des PB ont été observés *via* leur pouvoir utérotrophique. La majorité des études ont observé qu'ils augmentaient le poids de l'utérus chez l'animal (173), avec un effet plus marqué chez le rat et la souris immature par rapport aux animaux ayant subi une ovariectomie (188).

En complément des actions oestrogéniques directes rapportées dans la littérature, une étude a observé que les sulfotransférases des kératinocytes humains et des hépatocytes étaient inhibées par les PB, la capacité d'inhibition s'accroissant avec l'allongement de la chaîne aliphatique. Cette inhibition avait pour conséquence une augmentation de la disponibilité de l'oestradiol. Cette observation est en accord avec une action oestrogénique indirecte des PB (189).

Les cibles moléculaires relatives à l'effet perturbateur endocrinien des PB sont présentées à la figure 8.

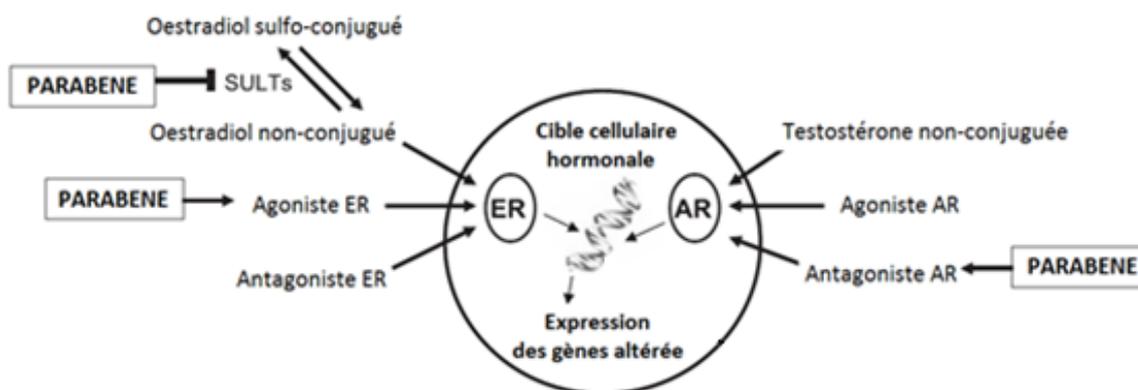


Figure 8 : Cibles moléculaires relatives à l'effet perturbateur endocrinien des parabènes (adapté de (173)).
 AR : récepteurs aux androgènes ; ER : récepteurs aux œstrogènes ; SULTs : enzymes sulfotransférases.

4. Utilisation et présence dans l'environnement

4.1. Utilisation

Les PB présentent des propriétés antifongiques et antibactériennes, avec pour conséquence une très large utilisation en tant que conservateurs dans les produits cosmétiques, les médicaments et les aliments depuis les années 1920.

Les activités antifongiques et antibactériennes sont augmentées en fonction de l'allongement de la chaîne aliphatique carbonée, l'activité la plus faible étant celle du méthylparabène et la plus élevée celle du butylparabène (185). Leur association a pour conséquence une synergie de leurs effets antifongiques et antibactériens (190).

Cette puissante activité antimicrobienne à large spectre est associée à d'autres propriétés qui en font un additif de choix pour les industriels (172) : des propriétés organoleptiques satisfaisantes (pas de goût, ni d'odeur), un faible coût de production, une grande stabilité thermique et sur une gamme de pH comprise entre 4,5 et 7,5, une solubilité compatible avec leurs utilisations et une toxicité réputée faible.

4.1.1. Dans l'alimentation

A l'état naturel certains PB comme le méthylparabène sont susceptibles d'être retrouvés pour de faibles concentrations dans des fruits (mûre, fraise, cassis, vanille (191)), des légumes (carotte, oignon), des céréales (orge) et la gelée royale (22).

Lorsqu'ils sont utilisés en tant qu'additifs alimentaires, ils sont identifiables sur les emballages par la dénomination suivante, conformément à la directive européenne 95/2/CE du 20 février 1955 :

- Méthylparabène ou 4-hydroxybenzoate de méthyle : E 218 et son sel sodique : E219 ;
- Éthylparabène ou 4-hydroxybenzoate d'éthyle : E214 et son sel de sodique : E 215 ;
- n-Propylparabène ou 4-hydroxybenzoate de propyle : E216 et son sel sodique : E217.

Les PB les plus utilisés dans l'alimentation sont le méthyle et l'éthylparabène (192).

4.1.2. Dans les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle

Les cosmétiques constituent le principal secteur d'utilisation des PB à l'échelle mondiale. Ils sont retrouvés dans les formes liquides et semi-liquides comme le maquillage, les démaquillants, les crèmes et lotions, les shampooings, les après-shampooings, les déodorants, les crèmes solaires (172).

Ainsi en 2009, sur 215 cosmétiques testés en Espagne, les PB étaient présents dans 99% des crèmes et des lotions et 77% des démaquillants (193). Aux États-Unis, en 2013, sur 170 produits testés, 52% contenaient du méthyle et du propylparabène et 25% de l'éthyle et du butylparabène (194).

Concernant la France, dans un rapport de l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS) publié en 2014 dans le cadre de la sélection des substances pertinentes à surveiller dans les milieux aquatiques pour le second cycle de la DCE, les PB étaient estimés présents dans plus de 80% des produits d'hygiène et de soins corporels en France (shampoings, gels nettoyants, crèmes hydratantes, mousses à raser). Le méthylparabène et le propylparabène sont les PB les plus utilisés dans les cosmétiques (195).

D'une manière générale, l'utilisation des PB dans les cosmétiques tend à diminuer en France du fait des récentes investigations sur leur potentiel de perturbateur endocrinien (196).

4.1.3. Dans les produits pharmaceutiques

Les PB sont utilisés en tant que conservateurs dans une large gamme de médicaments, seuls, en mélanges ou en association avec d'autres conservateurs dans le but d'éviter la prolifération microbienne potentiellement responsable d'une dégradation des principes actifs (180). Les produits pharmaceutiques à risque de développement microbien sont des formes liquide ou semi-liquides contenant des phases aqueuses : solutions, suspensions, émulsions prises par voie orale, solutions pour usage externe (crèmes), les préparations à usage répété (collyres en flacons multidoses). Les concentrations efficaces utilisées dans les formes orales sont comprises entre 0,01 et 0,1 % en fonction du type de PB (22).

En 2011, L'ex-agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), aujourd'hui agence nationale de la sécurité du médicament (ANSM), a identifié 400 médicaments contenant des PB, dont 306 contenaient du propylparabène, mais n'a pas publié de liste des spécialités pharmaceutiques concernées (197).

4.1.4. Autres secteurs d'utilisation

En plus des trois principaux secteurs d'activité précédemment cités, les PB sont aussi utilisés dans certains vernis, adhésifs, cirages et colles, dans le tabac (en tant que conservateurs), dans certaines lessives (198) et dans l'alimentation animale.

4.2. Présence dans l'environnement

Dans une revue internationale de la littérature, il est apparu que le méthyle et propylparabène ont été les plus abondamment retrouvés dans les eaux usées brutes, à des concentrations pouvant aller respectivement jusqu'à 30000 ng/L et 20000 ng/L. Les autres PB (éthyle, iso-propyle, butyle, iso-butyle et benzylparabène) ont été retrouvés pour des concentrations allant de quelques ng/L à quelques centaines de ng/L (171).

En 2012, méthyle, éthyle et propylparabène ont été retrouvés dans près de 100% des eaux de surface analysées en France métropolitaine et dans les DOM (199).

La contamination des milieux aquatiques tiendrait essentiellement son origine dans les rejets environnementaux humains *via* les eaux usées provenant du rinçage cutané des cosmétiques et produits d'hygiène corporelle contenant des PB et par contact direct avec l'eau d'une peau imprégnée de produits dits « sans rinçage » (200), et ce malgré l'efficacité des traitements des stations d'épuration généralement supérieure à 90%. Les rejets urinaires humains et l'emploi de produits d'entretien qui se retrouvent par la suite dans les eaux usées contribuent à cette contamination des milieux aquatiques (201).

Concernant les eaux de boissons, il existe peu d'études sur le sujet, les quelques études existantes portant sur de petits échantillons. Néanmoins, dans une étude menée en 2012 en Espagne, sur 11 échantillons d'eau minérale et 8 échantillons d'eau du robinet, les quatre PB avaient été retrouvés dans l'eau minérale et seul l'éthylparabène n'avait pas été retrouvé dans l'eau du robinet (202). Les concentrations moyennes retrouvées dans l'eau minérale étaient supérieures à celles retrouvées dans l'eau du robinet, à savoir respectivement 40 ng/L et 12 ng/L pour le méthylparabène, 2 ng/L et non détecté pour l'éthylparabène, 23 ng/L et 9 ng/L pour le propylparabène et 36 ng/L et 28 ng/L pour le butylparabène. Méthyle et propylparabène étaient les plus détectés, dans 100% des eaux minérales analysées et respectivement 75% et 63% des eaux du robinet. D'autres études, menées en Allemagne et en Espagne sur l'eau du robinet n'ont quantifié que le méthylparabène (moyenne : 17 et 40 ng/L) (203,204), tandis qu'une étude menée en Californie en 2001-2002 n'en avait pas retrouvé (205).

4.3. Réglementation

Conformément au règlement 1907/2006 relatif à la directive REACH, le méthyle, l'éthyle et le propylparabène ne figurent pas sur la liste des substances extrêmement préoccupantes, ni sur la liste des substances nécessitant une autorisation, ni sur la liste des restrictions.

L'utilisation des PB demeure donc autorisée dans l'Union Européenne, la concentration en méthylparabène ou éthylparabène dans les produits cosmétiques ne devant alors pas excéder 0,4% (m/m) par PB et 0,8% (m/m) pour la totalité des PB présents dans un même produit (Directive 76/768/EEC concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques).

Depuis le 16 avril 2015, cette concentration totale tolérée est abaissée à 0,18% dès lors que le mélange contient du propylparabène ou du butylparabène. Ces derniers sont d'ailleurs interdits dans les produits dits « sans rinçage » destinés à être utilisés sur les enfants de moins de 3 ans. Isopropyle, isobutyle et phénylparabène sont interdits dans les cosmétiques depuis le 9 avril 2014.

Concernant leur utilisation en tant qu'additifs alimentaires, seuls le méthyle, l'éthylparabène et leurs sels sodiques (respectivement E218, E214, E219 et E215) sont autorisés en Union Européenne, le propylparabène et son sel sodique (respectivement E216 et E217) étant interdits depuis 2006 en raison de données animales peu concluantes.

Dans un usage pharmaceutique, les PB restent utilisables à ce jour avec mention de leur présence dans les données réglementaires et sur le produit car ils demeurent des excipients à effets notoires du fait de leur potentiel allergène. Cependant, depuis 2013, l'Académie nationale de Pharmacie recommande de favoriser la présentation de médicaments pédiatriques liquides sous forme unidose, stériles et prêtes à l'emploi et d'évaluer la balance bénéfique/risque de l'utilisation de PB chez les femmes enceintes au cas par cas (206).

D'un point de vue environnemental, bien qu'il n'existe à l'heure actuelle ni norme de qualité environnementale, ni valeur guide environnementale, méthyle, éthyle et propylparabène font désormais partie des substances à surveiller dans l'ensemble des eaux de surface de France (plans d'eau, cours d'eau et eaux littorales) depuis le 7 août 2015 (192).

5. Exposition des populations

L'exposition aux PB provient principalement des cosmétiques qui représentent les deux tiers de l'exposition d'un individu, tandis que le dernier tiers provient des produits pharmaceutiques, les apports par l'alimentation étant estimés à 1% (180).

La population est ainsi largement exposée, ce qui fait des PB des micropolluants ubiquitaires. En effet, dans une étude menée en Allemagne sur 660 prélèvements d'urines de 24 heures recueillies entre 1995 et 2012 (207), le méthyle, l'éthyle et le propylparabène étaient détectés respectivement dans 99%, 79% et 81% des prélèvements, hommes et femmes confondus. Suivait le butylparabène, détecté dans 40% des prélèvements et enfin l'iso-butyle, l'iso-propyle, et le benzylparabène, respectivement détectés à hauteur de 24%, 4% et 1% des cas. Les auteurs avaient pu observer que l'ensemble de ces niveaux d'imprégnation de la population aux PB était demeuré stable sur la période de l'étude, à l'exception du méthylparabène, dont l'augmentation avait été significative entre 1995 et 2012.

Dans cette étude, les femmes avaient des concentrations urinaires supérieures à celles des hommes, et les concentrations en méthylparabène et propylparabène, de même qu'en iso-butyle et butylparabène, étaient significativement corrélées (respectivement $r = 0,795$ et $r = 0,758$).

Dans une autre étude datant en 2011 et menée sur 60 danois en bonne santé de 18 à 26 ans la présence de méthyle, éthyle, propyle, butyle et benzylparabène a été constatée dans respectivement 98, 80, 98, 83 et 7% des urines collectées. Les PB les plus présents dans le sérum et le liquide séminal étaient le méthyle et le propylparabène avec des valeurs médianes de 1,53 et 0,32 ng/mL pour le sérum et 0,99 et 0,68 ng/mL dans le liquide séminal (208).

CHAPITRE II : ESTIMATION DE L'EXPOSITION

A. L'expologie

L'étude de l'exposition (exposure assessment ou exposure science en anglais) est appelée expologie. Il s'agit d'une science centrée sur l'optimisation des méthodes d'estimation de l'exposition ayant pour but de permettre la détection de risques sanitaires qui découlent des expositions à des facteurs environnementaux, ces derniers pouvant être de nature physique, chimique et biologique (209). Pour cela, l'expologie mobilise des méthodes d'évaluation de l'exposition pouvant être directes (mesure de biomarqueurs à l'échelle d'une population (biomonitoring) et monitoring individuel) et indirectes (monitoring de l'environnement et questionnaires), détaillées dans la figure 9.

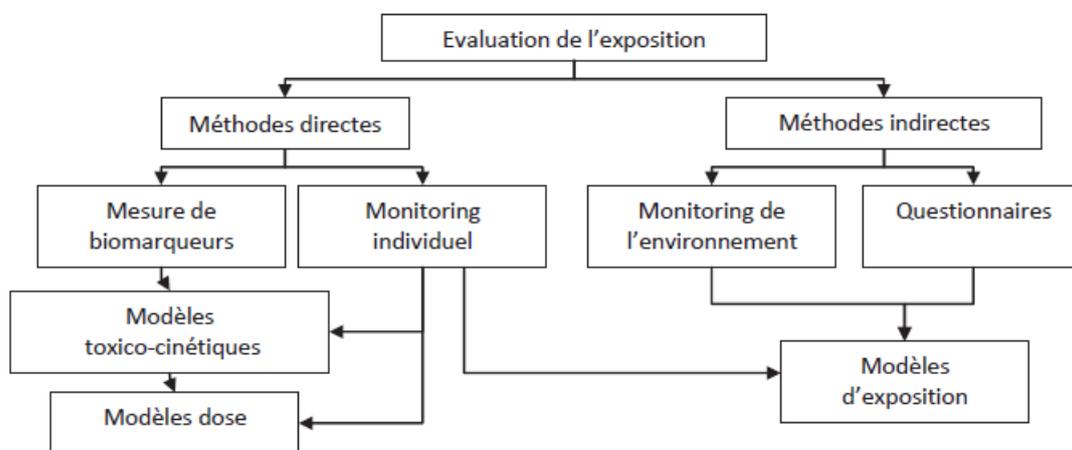


Figure 9 : Les approches pour l'évaluation de l'exposition humaine (expologie)

Dans la pratique, l'expologie rend généralement compte de l'exposition ponctuelle d'une population à quelques substances.

1. Mesure de biomarqueurs ou Biomonitoring

Le biomonitoring est la mesure analytique de biomarqueurs (ex : produits chimiques environnementaux ou leur métabolites) dans un fluide ou un tissu biologique humain facilement accessible (ex : urine, sang, cheveu) (210). Lorsqu'il est axé sur la mesure totale de l'exposition résultant de toutes les sources et voies d'absorption pertinentes, il autorise une évaluation de l'exposition quand les sources d'exposition sont inconnues ou ambiguës (211). C'est particulièrement le cas pour les produits chimiques présents dans l'alimentation ou utilisés dans une large gamme de produits du quotidien, incluant les emballages alimentaires, et responsables d'une exposition humaine généralisée. Le terme de biomonitoring est employé lorsque la mesure de biomarqueurs s'étend à l'échelle d'une population.

Les critères d'un biomonitoring humain de qualité et utilisable sont (212) :

- l'emploi de matrices biologiques appropriées ;
- le choix de biomarqueurs adaptés ;
- l'emploi de méthodes analytiques validées et appropriées ;
- l'existence de valeurs de référence permettant l'interprétation des résultats.

1.1. Choix des matrices biologiques

La matrice devra être choisie en fonction des propriétés toxicocinétiques de l'analyte à doser (ex : élimination urinaire, courte demi-vie plasmatique), de la voie d'exposition et de la population étudiée. Elle doit être facilement accessible en routine ; son prélèvement ne doit pas provoquer d'inconfort inacceptable ou présenter un risque pour la santé de l'individu ; récupérée en quantité suffisante (plus le volume est important, plus la sensibilité des analyses pourra être élevée) (212–214).

Le sang et l'urine sont les matrices biologiques les plus utilisées. Le sang serait la matrice de choix pour mesurer l'exposition à des polluants organiques persistants. Les polluants organiques non persistants, retrouvés pour de faibles concentrations dans le sang car fortement métabolisés, sont davantage quantifiés dans les urines (cas du BPA). Dans les urines, la mesure conjointe des métabolites et du composé parent (non métabolisé) est essentielle, car certains métabolites sont communs à plusieurs composés parents (cas des PB et de l'acide para-hydroxybenzoïque) (213,215).

Les échantillons biologiques doivent être prélevés, acheminés au laboratoire et stockés avec pour objectif d'éviter toute contamination par le milieu extérieur et éviter la dégradation ou le métabolisme *in vitro* des biomarqueurs (213).

1.2. Biomarqueurs

D'après l'OMS, un biomarqueur est défini comme étant « toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré dans le corps humain, ou les matrices biologiques, susceptible d'influencer ou de prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie » (216).

Trois types de biomarqueurs ont été définis :

- le biomarqueur d'exposition. Il s'agit d'une substance exogène, d'un métabolite primaire ou de la réponse à une interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou cellule-cible mesurée dans un compartiment de l'organisme. Il permet d'affiner l'estimation de l'exposition par la mesure de composés chimiques environnementaux dans les liquides biologiques humains.
- le biomarqueur d'effet. Il est défini par une altération biochimique, physiologique, comportementale ou autre, mesurable dans un organisme qui, selon son ampleur, peut être reconnue comme associée à une atteinte, de l'état de santé (confirmée ou possible), ou à une maladie.

- le biomarqueur de sensibilité. C'est un indicateur de la capacité innée ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à un composé xénobiotique spécifique.

1.3. Méthodes analytiques

Le biomonitoring est une méthode d'expologie chronique reconnue, dont les résultats peuvent entraîner la mise en place de mesures à l'échelle individuelle ou d'une population. Les résultats analytiques doivent donc être fiables.

Une méthode d'analyse est composée de 3 phases : pré-analytique (prélèvement et préparation de l'échantillon), analytique (analyse instrumentale de l'échantillon préparé) et post-analytique (évaluation et interprétation des résultats) (212). L'emploi de procédures standardisées est fortement recommandé pour minimiser l'incertitude et l'imprécision des résultats.

La qualité de la phase pré-analytique est garantie par de bonnes conditions de prélèvement et d'acheminement au laboratoire. La qualité de la phase analytique est évaluée par des contrôles de qualité internes (surveillance de la fidélité et de l'exactitude des analyses, préparé au laboratoire ou acheté et de concentration connue) et externe (comparaison entre laboratoires, de concentration inconnue).

La sensibilité analytique dépend des techniques d'analyse utilisées : LC-MS/MS (Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse en tandem), GC-MS et GC-MS/MS (Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse simple ou en tandem), techniques immuno-enzymatiques (ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbentAssay) ou immunologiques (RIA : Radio ImmunoAssay). Le recours à la détection par spectrométrie de masse (LC-MS/MS, GC-MS et GC-MS/MS) donne lieu à des méthodes analytiques plus sensibles et plus spécifiques.

1.4. Valeurs de référence

Les outils pour aider à l'interprétation des données de biomonitoring dans un contexte de risque pour la santé sont peu nombreux. Les valeurs de références peuvent aider à déterminer la marge de toxicité d'un xénobiotique, et à choisir d'évaluer ou d'intervenir sur un xénobiotique plutôt qu'un autre. Elles se fondent sur les données rapportées relatives à la toxicité potentielle chez l'Homme et les concentrations en xénobiotiques, dans l'environnement ou les matrices biologiques, en lien avec ces effets.

1.5. Utilisations et limites du biomonitoring

Comme nous venons de le voir, en santé environnementale, les utilisations du biomonitoring sont multiples. Ainsi, les résultats peuvent servir à estimer l'exposition ou à rechercher un lien entre exposition aux PE (comme variable explicative) et effets sur la santé (comme variable à expliquer) ou

entre exposition à une intervention visant la réduction de l'exposition (comme variable explicative) et exposition aux PE (comme variable à expliquer).

Cependant cette méthode d'expologie présente des limites (213,217) :

- les tranches d'âges extrêmes de la population sont peu impliquées ;
- le faible volume de certains prélèvements, comme le sang. Un faible volume pourra entraîner une augmentation de la limite de détection et donc des taux de détection plus faibles ;
- concernant les polluants organiques non persistants, les données obtenues ne sont pas le reflet d'une exposition chronique car ces composés ont une demi-vie plasmatique courte. L'utilisation conjointe de questionnaires s'avèrera alors utile pour rapporter l'heure du prélèvement, l'heure du dernier repas et l'heure de la miction précédente (dans le cas d'un prélèvement urinaire).

2. Questionnaires

Les questionnaires sont complémentaires d'autres méthodes d'expologie que sont le monitoring de l'environnement et la mesure de biomarqueurs. Ils sont aussi utilisés seuls quand aucune autre donnée n'est disponible. Ce sont des outils qui apportent de précieuses informations relatives à l'exposition : présence, durée, fréquence, sources d'exposition. Les informations qu'ils apportent sur les modes de consommation et les caractéristiques sociodémographique sont autant d'éléments utiles à la compréhension et à l'interprétation des données d'exposition obtenues par les méthodes d'expologie directe. Basés sur des méthodes déclaratives, des biais de mémorisation ou d'information ne sont pas à exclure lors de l'utilisation de questionnaires.

3. Monitoring individuel

Le monitoring (ou monitoring) individuel consiste à mesurer l'exposition à l'aide de capteurs individuels. Cette méthode est particulièrement utilisée dans le domaine de la santé au travail. Elle est plus précise que le monitoring de l'environnement, mais aussi plus complexe à mettre en œuvre et plus coûteuse.

4. Monitoring de l'environnement

Le monitoring (ou monitoring) de l'environnement mesure indirectement l'exposition des individus par l'analyse chimique, physique et biologique des milieux. Il est très utilisé dans la gestion des risques liés à la ressource en eau (captages, stations de traitement et de stockage des eaux, réseau de distribution, eau potable) (209).

B. Validation d'une méthode de dosage dans une matrice biologique

D'après la norme NF ISO 17025, valider une méthode de dosage, c'est être en mesure de confirmer « par examen et apport de preuves objectives, que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue et déterminée de la méthode soient remplies ».

L'objectif principal d'une méthode de validation est donc de démontrer la fiabilité de la méthode employée à déterminer la concentration d'un analyte dans une matrice biologique spécifique (sang, sérum, plasma, urine, salive, liquide céphalo-rachidien...). Dans le cas d'une méthode destinée à rechercher plusieurs analytes simultanément, cet objectif implique de valider la méthode pour chaque analyte dans la matrice concernée.

Il n'existe pas de recommandation unique faisant foi pour valider une méthode de dosage dans une matrice biologique. Valider une méthode implique de tenir compte du niveau de qualité souhaité pour les résultats qui seront produits en sélectionnant des critères de validation compatibles avec le but à atteindre. Parmi les recommandations internationales existantes, les mieux adaptées au niveau de qualité et au but de notre travail, sont : le guide NORMAN (network of references laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants) (218) ; les recommandations de l'ICH (International Conference of Harmonisation) (219) ; le guide de la FDA (Food and Drug administration) (220) et les recommandations de l'EMA (European Medicines Agency) (221).

1. Critères de validation d'une méthode de dosage de micropolluants environnementaux dans des matrices biologiques

De nombreux critères de validation sont proposés par chacun des guides et recommandations précédemment cités et certains critères doivent impérativement être explorés pour la validation de méthodes de dosage de micropolluants environnementaux dans des matrices biologiques :

- La limite de détection (en anglais : limit of detection ou LOD) : c'est la plus faible concentration en analyte pouvant être différenciée du bruit de fond analytique par la méthode. Elle permet d'attester de la présence ou de l'absence du composé recherché dans une matrice biologique déterminée.
- La limite de quantification (en anglais : limit of quantification ou LOQ) : elle est définie comme étant la plus faible quantité d'analyte possible quantifiable dans un échantillon avec une fidélité et une justesse acceptable.
- La linéarité (en anglais : linearity) : une méthode est dite linéaire quand elle produit des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon, sur un intervalle délimité par les valeurs minimales et maximales de concentration explorées par la gamme de calibration.
- La justesse (en anglais : trueness) : elle définit comme le degré de proximité de la concentration observée avec la valeur attendue théorique par la méthode analytique employée. Elle définit l'erreur systématique.

- La fidélité (en anglais : precision) : aussi appelée degré d'accord ou degré de dispersion. C'est l'étroitesse de l'accord entre des valeurs obtenues sur une série de mesures d'un même échantillon. Elle définit l'erreur aléatoire et est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais obtenus selon certaines conditions :

- Fidélité intra-journalière ou répétabilité (en anglais : repeatability) : c'est la fidélité obtenue sur plusieurs essais par la même méthode et dans des conditions identiques : même laboratoire, même opérateur, même équipement et sur une courte période de temps.

- Fidélité inter-journalière ou fidélité intermédiaire (en anglais : intermediate precision) : c'est la fidélité obtenue sur plusieurs essais par la même méthode au sein d'un même laboratoire en modifiant l'une des conditions : jour d'analyse, opérateur, équipement. Dans la pratique, c'est le jour d'analyse qui varie.

- Reproductibilité (en anglais : reproducibility) : c'est la fidélité obtenue sur plusieurs essais par la même méthode dans différents laboratoires.

- L'effet de matrice (en anglais : matrix effect) : ce terme regroupe les interférences délétères causées par des composés contenus dans l'échantillon sur la réponse obtenue.

- La contamination inter-échantillons (en anglais : carryover effect) : cette contamination se manifeste par l'apparition d'un signal dans un blanc après avoir analysé des échantillons contenant de fortes concentrations en analytes.

- Le rendement d'extraction (en anglais : extraction efficiency ou recovery) : ce critère est exprimé en pourcentage de la quantité en analyte extraite d'un échantillon de concentration connue. En spectrométrie de masse, un rendement moyen ou faible est accepté du moment que la sensibilité requise est atteinte.

- L'efficacité globale ou recouvrement (en anglais : process efficiency) : c'est un critère qui prend en considération à la fois le rendement d'extraction et les effets de matrice. Il est exprimé en pourcentage de l'aire d'un standard non extrait.

Ces différents guides de validation sont complémentaires. En effet, l'ICH et NORMAN ne donnent pas de recommandations pour la détermination de l'effet de matrice, quand l'EMA et la FDA ne donnent pas d'indication pour définir la limite de détection et la robustesse.

2. Validation d'une méthode de dosage de micropolluants environnementaux : recours à des matrices synthétiques

Valider une méthode destinée à doser des composés dans une matrice humaine (par exemple l'urine) implique de développer la méthode dans la même matrice (à titre d'exemple, des dosages de xénobiotiques dans des échantillons urinaires de patients doivent être réalisés à l'aide d'une méthode qui a été elle-même développée dans de l'urine humaine).

Dans le cas du dosage de micropolluants appliqué à la santé environnementale, les méthodes exigent d'atteindre des LOQ très basses. De plus, le caractère ubiquitaire de ces molécules peut parfois

conduire à ne pas avoir de matrice biologique humaine dépourvue de ces composés à disposition pour développer les méthodes souhaitées, comme c'est le cas pour la recherche de PB, en particulier le méthyle et le propylparabène (174,222). Dans de tels cas, le recours à des matrices synthétiques a été rapporté dans la littérature (162,174,222–224). L'EMA recommande dans ce cas de réaliser des contrôles internes de qualité dans la matrice humaine correspondante et d'en évaluer la justesse afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'effets de matrice différents entre la matrice humaine et la matrice synthétique utilisée pour valider la méthode de dosage (221). Cette approche a été reprise dans la littérature (225). Dans le cas de dosages dans de l'urine, l'utilisation conjointe de réplicats de contrôles dans l'urine humaine et l'urine synthétique a pu servir à la validation d'une méthode développée dans de l'urine synthétique. La déviation de la fidélité et de la justesse ne dépassait alors pas 20% (226). Le recours à des matrices synthétiques peut aussi se justifier dès lors que la matrice dans laquelle le dosage est réalisé est rare, comme c'est le cas pour le liquide céphalo-rachidien (221).

Une autre manière de s'affranchir des contaminations endogènes délétères à la validation d'une méthode consiste en l'utilisation d'analytes isotopiques marqués (au carbone 13 ou au deutérium par exemple) dans la matrice humaine souhaitée, à condition de s'assurer qu'aucun biais analytique n'est introduit par la différence de masse apportée par les isotopes et que ces derniers sont purs, de façon à ce qu'aucune impureté ne perturbe leur ionisation dans le système analytique (225). Cette approche est très coûteuse et bien que les auteurs de cette recommandation suggèrent qu'elle doit être privilégiée par rapport à l'utilisation de matrices synthétiques, il est rappelé que la meilleure approche doit être évaluée au cas par cas dans le cas de contaminations endogènes dans les matrices biologiques lorsque l'on souhaite valider une méthode de dosage.

PARTIE II : TRAVAUX PERSONNELS

Description

Cette partie détaille les méthodes de dosage du BPA, des Clx-BPA et des PB dans les urines et le colostrum de femmes enceintes, requises pour nos travaux. Nous commencerons par rapporter le développement de deux méthodes de dosage ultrasensibles des quatre principaux PB par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS), l'une adaptée aux urines et l'autre au colostrum. Les méthodes employées et maîtrisées par notre équipe pour le dosage du BPA et de ses dérivés chlorés dans l'urine et le colostrum seront ensuite décrites (84,160). Enfin, nous validerons l'utilisation de ces méthodes sur un échantillon d'une cohorte de femmes enceintes, l'étude EDDS (Endocrine Disruptor Deux-Sèvres).

A. DEVELOPPEMENT DE MÉTHODES DE DOSAGE ULTRASENSIBLES PERMETTANT LA QUANTIFICATION DES PARABÈNES DANS LES URINES ET LE COLOSTRUM

1. Matériels et méthodes

1.1. Produits chimiques et réactifs

Le méthylparabène (CAS 99-76-3), l'éthylparabène (CAS 120-47-8), le propylparabène (CAS 94-13-3) et le butylparabène (CAS 94-26-8) ont été commandés chez Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, USA). Le méthylparabène-d4 (MePB-d4, CAS 362049-51-2), l'éthylparabène-d5 (EtPB-d5, CAS 126070-21-1), le propylparabène-d7 (PrPB-d7, CAS 1249820-92-7) et le butylparabène-d9 (BuPB-d9, CAS 1216904-65-2) ont été obtenus auprès de LGC Standards (Molsheim, France). Ces composés avaient une pureté de 99%.

Le méthanol, l'acétonitrile et l'eau utilisés pour les analyses étaient de qualité UHPLC-MS et obtenus auprès de Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'acétate d'éthyle Picograde® était de qualité adaptée à l'analyse de résidus et fourni par LGC Standards (Molsheim, France). Le formiate d'ammonium et la solution d'acide formique avaient des puretés respectives supérieures à 99.995% et de 99% et ont été respectivement obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'ammoniaque concentrée à 32% a été commandée chez Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Tous les solvants et réactifs ont été testés à la recherche d'une contamination potentielle par les composés à doser.

1.2. Préparation des réactifs et des solutions standard

Une solution de formiate d'ammonium à 1 M et une solution d'ammoniaque diluée au 1/40 ont été préparées extemporanément.

Les solutions de stockage de chaque PB (MePB, EtPB, PrPB et BuPB) et de leurs étalons internes deutérés (MePB-d4, EtPB-d5, PrPB-d7 et BuPB-d9) ont été préparées par dissolution de poudres dans du méthanol à la concentration de 1000 µg/mL. Toutes les solutions étaient stockées à -20°C.

Les solutions standard ont été obtenues par dilution des solutions de stockage dans le méthanol de façon à obtenir des concentrations de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 et 32 ng/mL en PB et de 16 ng/mL en étalons internes deutérés. Les solutions standard ont été préparées extemporanément.

1.3. Préparation des échantillons

1.3.1. Méthode de dosage urinaire

Du fait d'une contamination basale importante de l'urine humaine par au moins l'un des quatre PB étudiés, nous avons eu recours à de l'urine synthétique pour la préparation des blancs, des points de la gamme de calibration et des contrôles internes de qualité. L'urine synthétique utilisée a été préparée conformément à la littérature (227), dont la formule est détaillée au tableau 4.

Tableau 4 : Composition de l'urine synthétique utilisée (227)

Composant	Concentration (mmol/L)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	3,2
NaCl	78,7
Na ₂ SO ₄	16,2
Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇)·2H ₂ O	2,6
KCl	21,5
C ₄ H ₇ N ₃ O	9,7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,4
KH ₂ PO ₄	30,9
NH ₄ Cl	18,7
(NH ₂) ₂ CO	417
Na ₂ (COO) ₂	0,15
C ₆ H ₈ O ₆	0,57

Deux-cents microlitres d'urine synthétique (ou d'urine de femme enceinte) ont été surchargés par 20 µL de solution standard (ou de méthanol pour les blancs et les urines des femmes enceintes) et 20 µL de solution d'étalons internes. Cent-vingt microlitres de solution de formiate d'ammonium 1 M ont été ajoutés pour maintenir des conditions de pH favorables et les échantillons ont été vortexés.

Une extraction liquide/liquide a ensuite été effectuée par l'ajout de 1,2 mL d'acétate d'éthyle. Après 5 minutes d'agitation au vortex suivies de 10 minutes de centrifugation, le surnageant a été récupéré et évaporé sous un léger flux d'azote à 37°C.

Les extraits secs obtenus ont été resolubilisés dans 200 µL d'un mélange acétonitrile/eau (10:90, v:v) et 20 µL ont été injectés dans le système UHPLC-MS/MS.

Les points de la gamme de calibration s'étendaient de 0,025 à 3,2 ng/mL (0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 et 3,2 ng/mL).

1.3.2. Méthode de dosage dans le colostrum

Le colostrum est une matrice rare, excrétée uniquement pendant les 3 à 4 premiers jours suivant l'accouchement. La mise au point de méthode requérant d'importantes quantités de matrices, nous avons eu recours au lait maternel pour les étapes de développement.

Cinq-cents microlitres de lait maternel (ou de colostrum) ont été surchargés par 50 µL de solution standard (ou de méthanol pour les blancs et les colostrums) et 50 µL de solution d'étalons internes puis vortexés. Vingt microlitres de la solution d'ammoniaque diluée ont été ajoutés afin d'atteindre des conditions de pH optimales pour l'extraction des PB. Après une nouvelle agitation au vortex, 2 mL d'eau ont été ajoutés à chaque échantillon afin de les diluer en vue de faciliter l'extraction solide/liquide. Cette extraction a été menée au moyen de cartouches Oasis MAX[®] 3cc comportant 60 mg de phase solide (Waters, Milford, USA). Les cartouches ont été conditionnées par 2 mL de méthanol suivis de 2 mL d'eau. L'échantillon a ensuite été déposé. Les cartouches ont été lavées par 2 mL d'un mélange eau/ammoniaque à 2% (v/v) puis par 1 mL de méthanol. Après une étape de séchage de 15 min, les PB ont été élués par 1 mL d'un mélange méthanol/acide formique à 2% (v/v) et l'éluat a été évaporé sous un léger flux d'azote à 37°C.

Les extraits secs obtenus ont été resolubilisés dans 100 µL d'un mélange acétonitrile/eau (10:90, v:v) et 10 µL ont été injectés dans le système UHPLC-MS/MS.

Les points de la gamme de calibration s'étendaient de 0,025 à 3,2 ng/mL (0,025, 0,05, 0,1, 0,4, 1,6 et 3,2 ng/mL).

1.4. Analyse par UHPLC-MS/MS

1.4.1. Système UHPLC-MS/MS employé

Le système UHPLC-MS/MS était constitué par un module chromatographique UPLC Acquity[®] H Class (Waters, Milford, USA), couplé à un spectromètre de masse triple quadrupôle Xevo[®] TQ-S (Waters, Milford, USA).

1.4.2. Séparation chromatographique des composés

1.4.2.1. Méthode de dosage urinaire

La séparation chromatographique des PB a été effectuée sur colonne chromatographique Acquity[®] BEH C18 (1.7 µm de diamètre de particule, 2.1 × 100 mm, Waters, Milford, USA). La colonne était maintenue à 40°C et parcourue par un gradient binaire de phase mobile à un débit de 0,35 mL/min.

La phase mobile consistait en un mélange acétonitrile/eau (10:90, v:v) (A) et d'acétonitrile (B). Le gradient était le suivant : 100% de A de 0,0 à 1,0 min ; ensuite la proportion de B augmentait de façon linéaire pour atteindre 20% à 4,0 min et réaugmentait une nouvelle fois de façon linéaire jusqu'à atteindre un plateau à 98,6% de B à 7,0 min, maintenu jusqu'à 8,0 min, pour revenir aux conditions initiales à 8,1 min jusqu'à 10,5 min.

1.4.2.2. Méthode de dosage dans le colostrum

Tout comme pour le développement du dosage des PB dans l'urine synthétique, la séparation chromatographique des PB dans le lait de femme a été effectuée sur colonne chromatographique Acquity® BEH C18 (1.7 µm de diamètre de particule, 2.1 × 100 mm, Waters, Milford, USA). La colonne était maintenue à 40°C et parcourue par un gradient binaire de phase mobile à un débit de 0,35 mL/min.

La phase mobile était identique à celle utilisée pour le développement du dosage des PB dans l'urine synthétique, et consistait en un mélange acétonitrile/eau (10:90, v:v) (A) et d'acétonitrile (B). Le gradient, différent, était le suivant : 100% de A de 0,0 à 1,0 min ; ensuite la proportion de B augmentait de façon linéaire pour atteindre 20% à 4,0 min et réaugmentait une nouvelle fois de façon linéaire pour atteindre 55% à 7,5 min puis 95% à 8,0 min, jusqu'à atteindre un plateau à 98,6% de B à 9,0 min, maintenu jusqu'à 9,5 min, pour revenir aux conditions initiales à 9,6 min jusqu'à 10,5 min.

1.4.3. Détection des composés par spectrométrie de masse en tandem

Le détecteur MS/MS était couplé à une source d'ionisation electrospray (ElectroSpray Ionisation interface, ESI) en mode d'ionisation négative. Pour toutes les analyses, les paramètres optimisés de la source étaient : température de la source à 150°C, température de désolvatation à 550°C, débit de gaz du cône à 150 L/h, débit du gaz de désolvatation (azote) à 800 L/h, potentiel du capillaire à -2,5 kV. Les composés à analyser étaient quantifiés en mode Multiple Réaction Monitoring (MRM). Les transitions spécifiques des précurseurs et les paramètres spectrométriques retenus sont présentés dans le tableau 5 pour l'urine synthétique et dans le tableau 6 pour le lait maternel. La quantification des composés était basée sur la première transition et la seconde transition servait à confirmer que le composé détecté était bien celui recherché.

Tableau 5 : Paramètres spectrométriques des parabènes dans l'urine synthétique

Composé	Temps de rétention (min)	Transition MRM (m/z)	Tension de cône (V)	Énergie de collision (V)
MePB	5,73	151,0 -91,9	40	18
		151,0-136,0	40	14
MePB-d4	5,70	155,0-96,0	42	20
		155,0-140,0	42	20
EtPB	6,53	165,0-92,0	36	18
		165,0-136,8	36	14
EtPB-d5	6,51	170,0-91,9	8	20
		170,0-135,6	8	16
PrPB	6,98	179,1-92,0	48	24
		179,1-136,8	48	14
PrPB-d7	6,96	186,1-91,9	10	20
		186,1-136,0	10	16
BuPB	7,32	193,1-92,0	14	26
		193,1-136,3	14	16
BuPB-d9	7,30	202,2-91,9	6	24
		202,2-136,0	6	18

Tableau 6 : Paramètres spectrométriques des parabènes dans le lait maternel

Composé	Temps de rétention (min)	Transition MRM (m/z)	Tension de cône (V)	Énergie de collision (V)
MePB	5,48	151,0 -91,9	40	18
		151,0-136,0	40	14
MePB-d4	5,44	155,0-96,0	42	20
		155,0-140,0	42	20
EtPB	6,77	165,0-92,0	36	18
		165,0-136,8	36	14
EtPB-d5	6,72	170,0-91,9	8	20
		170,0-135,6	8	16
PrPB	7,75	179,1-92,0	48	24
		179,1-136,8	48	14
PrPB-d7	7,70	186,1-91,9	10	20
		186,1-136,0	10	16
BuPB	8,54	193,1-92,0	14	26
		193,1-136,3	14	16
BuPB-d9	8,50	202,2-91,9	6	24
		202,2-136,0	6	18

1.5. Validation des méthodes

La validation des critères que nous avons retenus dans les matrices urine synthétique et lait maternel a été menée conformément aux recommandations internationales de l'EMA (221), de la FDA (220), de l'ICH (219), de NORMAN (218) et de la littérature (228,229).

1.5.1. Définition de la limite de détection

La limite de détection (LOD) a été définie comme correspondant à 3 fois l'écart-type de la valeur des aires brutes obtenues lors de l'analyse de 5 blancs urine synthétique et de 5 blancs lait maternel (218).

1.5.2. Définition de la limite de quantification (LOQ)

La limite de quantification (LOQ) a été définie comme étant le plus bas point de la gamme de calibration pour lequel l'erreur sur la fidélité, exprimée par le coefficient de variation (CV) était inférieure à 20%. Ce point devait avoir une justesse, exprimée par le biais, dont l'erreur était comprise entre -20% et 20%.

1.5.3. Courbes de calibration

Des courbes de calibration ont été étudiées sur 6 jours pour chaque PB étudié et comportaient 8 points de calibration préparés dans de l'urine synthétique. Dans le lait maternel, 6 points de calibration pour le dosage de l'EtPB et du PrPB et 5 pour le MePB et le BuPB ont été utilisés, conformément aux recommandations de l'ICH (219). Cinq blancs matrice étaient analysés à chaque

séquence d'analyse. La pente de la courbe, l'ordonnée à l'origine et les coefficients de détermination ont été rapportés, conformément aux recommandations de l'EMA (221).

1.5.4. Justesse et fidélité : répétabilité (intra-journalière) et fidélité intermédiaire (inter-journalière)

La justesse et la fidélité ont été évaluées par des contrôles de qualité internes, par surcharge de matrice (urine et urine synthétique) à des concentrations correspondant à des niveaux bas, moyens et hauts de la gamme de calibration. Les contrôles de qualité ont été réalisés à partir de solutions standard différentes de celles préparées pour la gamme de calibration.

Quatre niveaux de concentration ont été retenus à 0,025, 0,05, 0,2, et 1,6 ng/mL pour la méthode urinaire et à 0,025, 0,05, 0,4, et 3,2 ng/mL pour la méthode dans le colostrum. La concentration du contrôle bas correspondait à celle de la LOQ. La méthode a été validée en évaluant la justesse et la fidélité (i) par répétition de 5 contrôles identiques au cours d'une même journée (répétabilité) et (ii) par analyse de contrôles de 5 séquences sur 5 jours (fidélité intermédiaire). Les erreurs absolues de justesse et de fidélité ne doivent pas excéder 20% pour le contrôle bas et 15% pour les autres niveaux de contrôle (221).

1.5.5. Optimisation des méthodes

1.5.5.1. Méthode urinaire

L'urine est sujette à des effets de matrice, et l'amplitude de ces effets peut varier en raison des variations dans les proportions des composés qui la compose (protéines, sels, sucres, lipides) d'un individu à l'autre (230). Notre méthode étant développée dans de l'urine synthétique, des contrôles de qualité internes ont été réalisés dans de l'urine humaine sur trois jours à la manière d'une fidélité intermédiaire, conjointement aux gammes de calibration et aux contrôles de qualité internes réalisés dans l'urine synthétique, dans le but de démontrer que les effets de matrice étaient comparables d'une matrice à l'autre et que notre méthode était adaptée au dosage des PB dans les urines humaines (225,226). Ces effets ont été évalués par la fidélité et la justesse de ces contrôles dans l'urine humaine aux concentrations 0,2 et 1,6 ng/mL.

1.5.5.2. Méthode dans le colostrum

Le lait maternel étant une matrice complexe, des composés interférents sont susceptibles d'éteindre le signal des PB, contribuant alors fortement à un effet de matrice délétère. Les conséquences observables sont alors (i) une augmentation, (ii) une diminution, voire (iii) une extinction totale du signal, rendant alors impossible toute quantification. L'optimisation du gradient analytique est une solution permettant de limiter ces effets de matrice délétères en faisant varier les temps de rétention des composés d'intérêt par rapport aux composés interférents. Les variations d'effets de matrice ont été observées par infusion post-colonne des composés (229) : de la matrice a été

injectée dans le système analytique et une solution contenant des PB et leurs étalons internes a été infusée simultanément en aval de la colonne analytique. Le signal obtenu reflétait le signal pour chaque PB tout le long de l'injection. Des variations dans l'intensité de ce signal étaient observées en fonction de l'élution des composés interférents contenus dans la matrice et comparées au temps de rétention attendu pour chaque PB.

1.5.6. Rendement d'extraction, effets de matrice et efficacité globale

Ces 3 paramètres ont été évalués simultanément (228). Une première série (A) consistait à surcharger en analytes des échantillons d'urine synthétique à des concentrations correspondant à celles des contrôles de qualité interne et à les extraire. Une seconde série (B) consistait à extraire des blancs urine synthétique puis à les surcharger en analytes. Enfin une troisième série (C) consistait à analyser des standards dans le solvant. Le signal obtenu pour cette dernière série représentait une référence avec un rendement théorique de 100% et aucun effet de matrice. Une fois les aires des signaux mesurés pour chaque série il a été possible de calculer (en pourcentage) : le rendement d'extraction : $A/B \times 100$, le signal restant après application de l'effet de matrice : $B/C \times 100$ et l'efficacité globale (ou recouvrement) : $A/C \times 100$. L'étude de ces paramètres a été effectuée sur les 2 plus hauts niveaux de contrôle choisis pour les gammes de calibration (0,2, et 1,6 ng/mL).

L'étude de ces paramètres a été effectuée sur les 2 plus hauts niveaux de contrôle choisis pour les gammes de calibration (0,2, et 1,6 ng/mL pour l'urine synthétique et 0,4, et 3,2 ng/mL pour le lait maternel).

Lorsque le lait maternel utilisé présentait des contaminations, les aires obtenues pour les séries (A) et (B) ont été corrigées par la moyenne de l'aire obtenue pour 5 blancs laits maternels. À la condition que les rendements, effets de matrice et efficacité globale soient comparables pour chaque PB et leur étalon interne deutéré correspondant, les résultats seront présentés en pourcentage de réponse corrigée par les blancs.

2. Résultats

2.1. Méthode urinaire

2.1.1. Limite de quantification (LOQ)

La LOQ a été validée à 0,025 ng/mL pour chacun des PB analysés. Justesse et fidélité sont présentées dans le tableau 8.

Un exemple de chromatogramme obtenu à la LOQ est présenté à la figure 10.

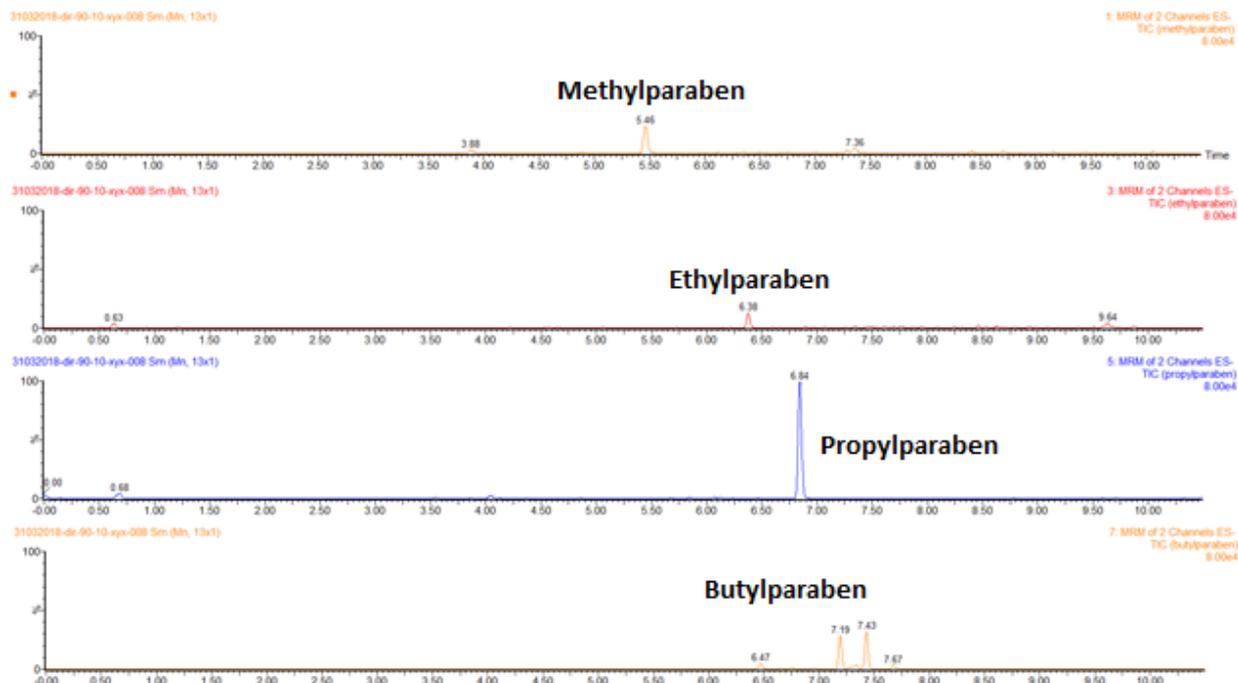


Figure 10 : Chromatogramme obtenu à la LOQ des quatre parabènes (0,025 ng/mL)

Le chromatogramme d'un blanc urine synthétique est présenté à la figure 11.

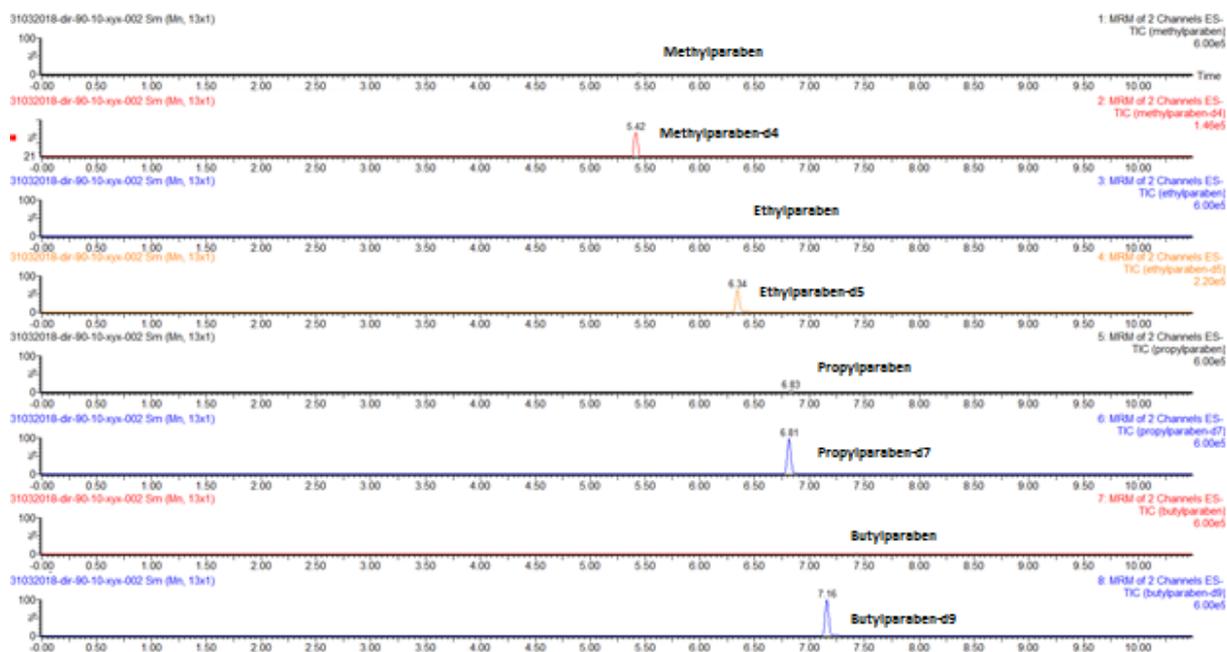


Figure 11 : Chromatogramme d'un blanc urine synthétique

2.1.2. Courbes de calibration

Les valeurs moyennes pour la pente, l'ordonnée à l'origine et les coefficients de détermination r^2 pour les courbes de calibration sont présentées dans le tableau 7. Chaque gamme de calibration était linéaire, avec des coefficients de détermination r^2 supérieurs à 0,9936.

Tableau 7 : Valeurs moyennes obtenues pour la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2 des courbes de calibration des parabènes dans l'urine synthétique (n=6)

Composé	MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Pente	0,7476	0,7044	0,7364	0,8846
écart-type	0,1398	0,1009	0,1118	0,0727
ordonnée à l'origine	0,0365	0,0192	0,0250	0,0172
écart-type	0,0140	0,0024	0,0070	0,0067
r^2	0,9938	0,9968	0,9941	0,9936
écart-type	0,0042	0,0014	0,0030	0,0032

2.1.3. Justesse et fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire

Les résultats de justesse et de fidélité de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Fidélité pour les quatre parabènes dans l'urine synthétique, exprimée par le coefficient de variation (CV), et justesse, exprimée par le biais (n=5).

Composé		Contrôle bas (0,025 ng/mL)				Contrôle moyen 1 (0,050 ng/mL)				Contrôle moyen 2 (0,200 ng/mL)				Contrôle haut (1,600 ng/mL)			
		MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Répétabilité	Moyenne (ng/mL)	0,027	0,023	0,024	0,021	0,051	0,043	0,051	0,055	0,204	0,192	0,185	0,200	1,595	1,541	1,477	1,592
	CV (%)	4,2	15,6	8,8	14,3	8,1	9,0	9,1	6,3	8,7	3,2	3,3	4,5	5,3	5,3	1,5	6,8
	Biais (%)	9,6	-6,4	-5,6	-15,2	2,4	-13,2	2,8	9,2	1,9	-4,1	-7,4	-0,1	-0,3	-3,7	-7,7	-0,5
Fidélité intermédiaire	Moyenne (ng/mL)	0,022	0,021	0,025	0,025	0,052	0,048	0,053	0,052	0,212	0,194	0,202	0,206	1,515	1,612	1,539	1,617
	CV (%)	8,7	14,3	15,7	7,8	9,7	12,1	5,0	6,3	5,8	14,1	4,6	8,6	8,0	7,4	9,0	2,2
	Biais (%)	-11,2	-14,4	-1,6	-0,8	4,0	-3,2	6,0	3,6	6,0	-3,1	0,8	2,8	-5,3	0,8	-3,8	1,1

2.1.4. Comparaison des effets de matrice dans l'urine humaine et l'urine synthétique

La justesse et la fidélité pour les contrôles réalisés dans l'urine humaine sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Fidélité pour les quatre parabènes dans l'urine humaine, exprimée par le coefficient de variation (CV), et justesse, exprimée par le biais (n=3, fidélité intermédiaire).

Composé	Contrôle moyen 2 (0,200 ng/mL)				Contrôle haut (1,6 ng/mL)			
	MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Moyenne (ng/mL)	0,23	0,22	0,21	0,20	1,74	1,68	1,59	1,52
CV (%)	5,7	10,6	1,8	14,8	4,8	6,4	3,6	9,3
biais (%)	15,0	11,3	2,5	0,8	8,6	5,0	-0,9	-5,0

2.1.5. Rendement d'extraction, effets de matrice et recouvrement

Les estimations des rendements, de l'effet de matrice et du recouvrement sont présentées dans le tableau 10. Les rendements étaient bons et les effets de matrice correctement compensés par les étalons internes.

Tableau 10 : Rendements, effets de matrice et recouvrement de l'extraction des parabènes et de leurs étalons internes dans l'urine synthétique (exprimés en pourcentage de l'aire du pic corrigée et de la réponse corrigée)

Composé	Concentration (ng/mL)											
	0,200			1,600			0,200			1,600		
	Pourcentage de l'aire du pic corrigée						Pourcentage de la réponse corrigée					
	Rdt	EM	Eff	Rdt	EM	Eff	Rdt	EM	Eff	Rdt	EM	Eff
MePB	96,5	66,9	64,6	64,0	75,5	48,3	132,7	99,0	131,1	98,8	94,3	93,2
EtPB	86,5	85,2	73,7	79,5	84,8	67,4	112,8	114,1	128,7	108,7	104,8	113,9
PrPB	101,3	80,0	81,0	72,6	106,6	77,3	109,3	92,0	100,5	88,5	117,1	103,7
BuPB	87,0	103,8	90,2	83,2	100,7	83,7	104,3	114,1	119,1	100,8	99,2	100,0

Rdt : rendement de l'extraction ; EM : effet de matrice ; Eff : recouvrement

2.2. Méthode dans le colostrum

2.2.1. Limite de quantification (LOQ)

La LOQ a été validée à 0,025 ng/mL pour l'EtPB et le PrPB et à 0,050 ng/mL pour le MePB et le BuPB. Les résultats de justesse et de fidélité sont présentés dans le tableau 12.

Des exemples de chromatogrammes obtenus à la LOQ sont présentés aux figures 12 et 13.

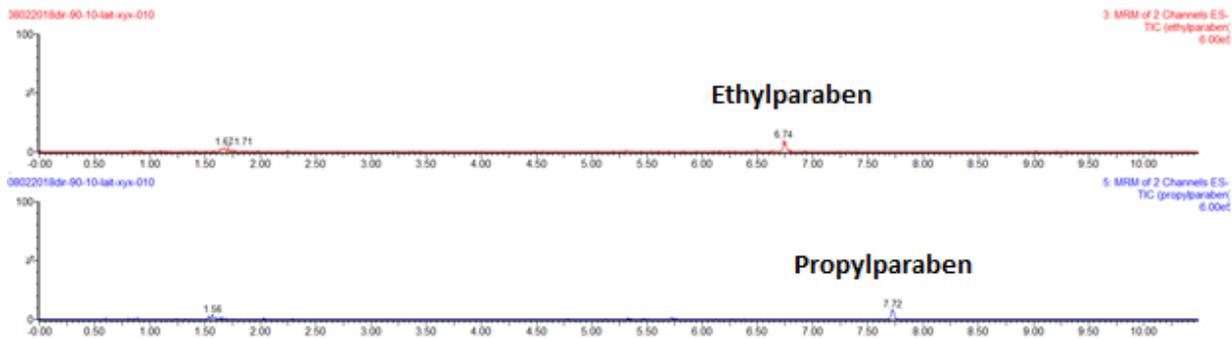


Figure 12 : Chromatogramme obtenu à la LOQ de l'éthylparabène et du propylparabène (0,025 ng/mL)

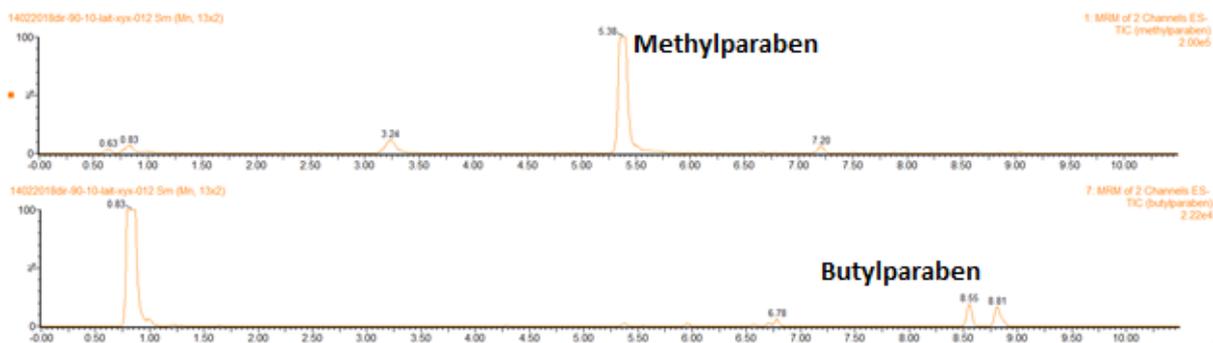


Figure 13 : Chromatogramme obtenu à la LOQ du méthylparabène et du butylparabène (0,050 ng/mL)

Un exemple de chromatogramme d'un blanc lait maternel est présenté à la figure 14.

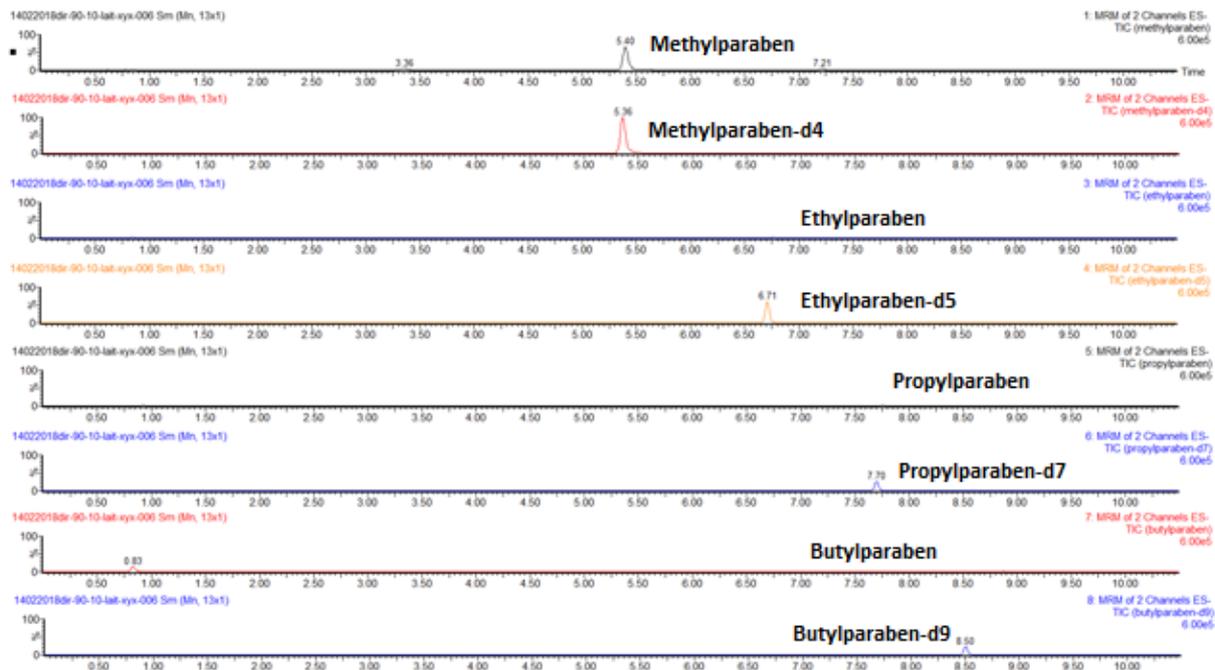


Figure 14 : Chromatogramme d'un blanc lait maternel

2.2.2. Courbes de calibration

Les valeurs moyennes pour la pente, l'ordonnée à l'origine et les coefficients de détermination r^2 pour les courbes de calibration sont présentées dans le tableau 11. Les gammes de calibration se sont révélées être linéaires, avec des coefficients de détermination r^2 supérieurs à 0.9923. La présence notable d'une contamination en MePB est à signaler (ordonnée à l'origine = 0.1263 et écart-type correspondant = 0.2022).

Tableau 11 : Valeurs moyennes obtenues pour la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2 des courbes de calibration des parabènes dans le lait maternel (n=6)

Composé	MePB	EtPB	PrPB	BuPB
pente	0,6466	0,5654	0,7664	0,8843
écart-type	0,0486	0,1953	0,2300	0,2338
ordonnée à l'origine	0,1263	0,0091	0,0742	0,0079
écart-type	0,2022	0,0091	0,0869	0,0060
r^2	0,9968	0,9969	0,9923	0,9963
écart-type	0,0030	0,0017	0,0116	0,0031

2.2.3. Justesse et fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire

Les résultats de justesse et de fidélité de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Fidélité pour les quatre parabènes dans le lait de femme, exprimée par le coefficient de variation (CV), et justesse, exprimée par le biais (n=5)

Composé		Contrôle bas (0,025 ng/mL)				Contrôle moyen 1 (0,050 ng/mL)				Contrôle moyen 2 (0,400 ng/mL)				Contrôle haut (3,200 ng/mL)			
		MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Répétabilité	Moyenne (ng/mL)	N/A	0,025	0,025	N/A	0,054	0,046	0,052	0,054	0,436	0,401	0,361	0,419	3,240	3,251	2,908	3,155
	CV (%)	N/A	11,9	19,0	N/A	9,0	13,3	11,9	14,9	3,4	5,9	13,5	6,4	1,3	5,0	4,1	3,9
	Biais (%)	N/A	-0,8	0,0	N/A	7,6	-7,2	3,6	8,4	9,0	0,4	-9,9	4,7	1,2	1,6	-9,1	-1,4
Fidélité intermédiaire	Moyenne (ng/mL)	N/A	0,023	0,024	N/A	0,055	0,047	0,052	0,048	0,413	0,410	0,426	0,405	3,177	3,349	3,193	3,251
	CV (%)	N/A	11,7	12,5	N/A	8,6	14,4	5,7	9,7	5,8	9,8	5,9	4,1	3,8	7,1	5,3	3,4
	Biais (%)	N/A	-7,5	-5,1	N/A	9,5	-5,3	3,5	-4,8	3,2	2,4	6,5	1,3	-0,7	4,7	-0,2	1,6

N/A: Non applicable

2.2.4. Optimisation du gradient

Les résultats des infusions en post-colonne sont présentés à la figure 15. La méthode initialement développée n'était pas optimisée pour l'EtPB et était à l'origine d'un effet de matrice hautement délétère avec une extinction complète du signal (A). Le gradient chromatographique a été optimisé pour réduire l'effet de matrice au temps de rétention de l'EtPB, sans affecter de manière significative le signal des autres PB (B).

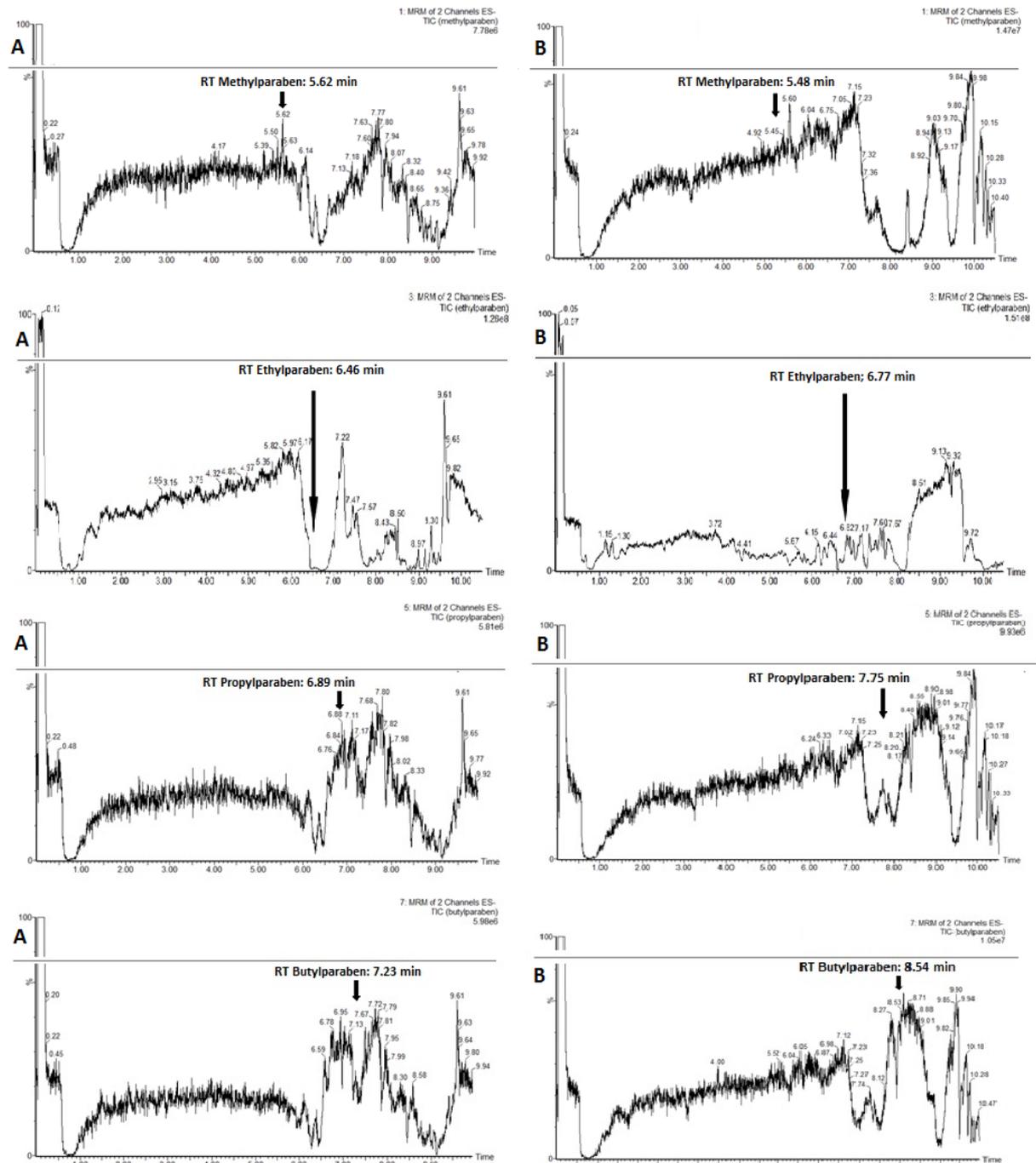


Figure 15 : Résultats des infusions en post-colonne (A) avec un gradient non optimisé ; (B) avec le gradient optimisé retenu. RT : temps de rétention

2.2.5. Rendement d'extraction, effets de matrice et recouvrement

Les estimations des rendements, de l'effet de matrice et du recouvrement sont présentées dans le tableau 13. Les rendements d'extraction étaient corrects à l'exception du PrPB. L'effet de matrice était présent mais correctement corrigé par l'étalon interne après soustraction des contaminations (soit par la réponse corrigée).

Tableau 13 : Rendements, effets de matrice et recouvrement de l'extraction des parabènes dans le lait maternel (exprimés en pourcentage de l'aire du pic corrigée et de la réponse corrigée)

Composé	Concentration (ng/mL)											
	0,400			3,200			0,400			3,200		
	Pourcentage de l'aire du pic corrigée						Pourcentage de la réponse corrigée					
	Rdt	EM	Eff	Rdt	EM	Eff	Rdt	EM	Eff	Rdt	EM	Eff
MePB	98,7	330,3	326,3	85,1	220,0	187,1	132,1	84,7	111,9	121,1	97,2	117,7
EtPB	61,2	238,4	145,8	63,1	149,1	94,0	102,2	90,1	92,2	106,1	93,6	99,3
PrPB	20,0	74,4	14,9	21,4	64,1	13,7	71,4	110,9	79,1	174,8	86,6	151,5
BuPB	68,1	103,5	70,5	53,0	68,4	36,3	111,7	101,0	112,8	108,9	95,2	103,7

Rdt : rendement de l'extraction ; EM : effet de matrice ; Eff : recouvrement

B. MÉTHODES POUR LE DOSAGE DU BISPHÉNOL-A ET DE SES DÉRIVÉS CHLORÉS DANS LES URINES ET LE COLOSTRUM

Les méthodes analytiques employées pour le dosage du BPA et des Clx-BPA dans les urines de femmes enceintes et le colostrum ont été développées, validées et publiées par notre équipe (11,12).

1.1. Produits chimiques et réactifs

Le BPA (CAS 80-05-7) et son étalon interne deutéré, le BPA-d16 (CAS 96210-87-6) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, USA). Les Clx-BPA et l'étalon interne correspondant, le 2,2'-DCBPA-d12, ont été synthétisés par @rtMolecule (Poitiers, France). Les Clx-BPA (CBPA, 2,6-DCBPA, 2,2'-DCBPA, TCBPA and TTCBPA) ont été obtenus à partir du bisphénol A ou d'un précurseur dont la fonction phénol était protégée, par chloration directe par le chlorure de sulfuryle (14). La pureté obtenue pour ces composés était de 98%.

1.2. Préparation des réactifs et des solutions standard

Les solutions de stockage de chaque composé (BPA, CBPA, DCBPA, TCBPA et TTCBPA) et de leurs étalons internes deutérés (BPA-d16 pour le BPA et 2,2'-DCBPA-d12 pour les Clx-BPA) étaient

préparées par dissolution de poudres dans du méthanol et à la concentration de 200 µg/mL. Toutes les solutions étaient stockées à -20°C.

Les solutions standard ont été obtenues par dilution des solutions de stockage dans le méthanol de façon à obtenir des concentrations de 2,5 5, 10, 20, 40, 80 et 160 ng/mL en BPA et dix fois inférieures en Clx-BPA, de 80 ng/mL en BPA-d16 et dix fois inférieure en 2,2'-DCBPA-d12. Les solutions standard ont été préparées extemporanément.

1.3. Préparation des échantillons

1.3.1. Urines

Les échantillons d'urines ont été préparés selon la méthode « dilute and shoot » décrite dans Grignon et al, 2016 (11). Brièvement, 300 µL d'urine humaine était surchargés par 30 µL de solution standard (ou de méthanol pour les blancs et les urines des femmes enceintes participantes) et 30 µL de solution d'étalon interne. Les échantillons ont été ensuite vortexés et 20 µL ont été analysés par SPE online-UHPLC-MS/MS (UHPLC-MS/MS couplées à une extraction en phase solide en ligne). Les points de gamme allaient de 0,25 à 16 ng/mL pour le BPA et 0,025 à 1,6 ng/mL pour les Clx-BPA (0,25/0,025, 0,5/0,05, 1/0,1, 2/0,2, 4/0,4, 8/0,8, 16/1,6 ng/mL).

1.3.2. Colostrum

Les échantillons de colostrum ont été préparés suivant la méthode décrite dans Migeot et al, 2013 (12). Brièvement, 500 µL de colostrum ont été surchargés par 50 µL de solution standard (ou de méthanol pour les blancs et le colostrum des femmes participantes) et 50 µL de solution d'étalon interne. Quatre millilitres d'acétonitrile ont été ajoutés et les échantillons ont été vortexés, passés aux ultrasons et centrifugés. Le surnageant a été récupéré et évaporé sous un léger flux d'azote à 60°C. Les extraits secs ont été resolubilisés dans 1 mL d'un mélange méthanol/eau (30/70, v/v) et 20µL ont été analysés par SPE online-UHPLC-MS/MS. Les points des gammes de calibration étaient 0,4/0,04, 0,8/0,08, 1,6/0,16, 3,2/0,32, 6,4/0,64 12,8/1,28 ng/mL, pour le BPA et les Clx-BPA respectivement.

2. Validation des analyses

Pour chaque séquence d'analyse, des contrôles de qualité internes ont été réalisés à des niveaux bas (au niveau de la LOQ), médians et haut. Les pourcentages de déviation devaient être compris entre -20% et +20% pour la LOQ et -15% et +15% pour les autres niveaux de contrôle interne.

Les LOQ retenues étaient :

- 0,250 ng/mL pour le BPA dans les urines ;
- 0,025 ng/mL pour les Clx-BPA dans les urines ;

- 0,400 ng/mL pour le BPA dans le colostrum ;
- 0,080 ng/mL pour les Clx-BPA dans le colostrum.

C. VALIDATION DES MÉTHODES SUR UN ÉCHANTILLON DE LA COHORTE EDDS (ENDOCRINE DISRUPTOR DEUX-SEVRES)

1. Description de la cohorte EDDS et méthodologie employée

1.1. Présentation et objectifs

L'étude EDDS est une cohorte prospective de femmes enceintes qui s'est déroulée de 2011 à 2014, dont l'objectif principal de l'étude était de comparer trois méthodes validées et non invasives d'estimation hydrique de l'exposition au BPA et aux Clx-BPA afin d'identifier la plus précise pour en estimer les apports réels : (i) mesure de biomarqueurs d'exposition (dosage dans les urines et le colostrum), (ii) administration d'un questionnaire sociodémographique de consommation couplé au monitoring de l'environnement (dosage en sortie d'usine de traitement de l'eau), (iii) administration d'un questionnaire sociodémographique de consommation couplé au monitoring individuel (dosage de l'eau du robinet du domicile). Les objectifs secondaires étaient (i) d'évaluer la relation entre exposition aux PE et issues de grossesse, comme le petit poids de naissance, et (ii) d'étudier la corrélation entre les concentrations en PE urinaires et dans le lait maternel.

1.2. Déroulement de l'étude

Le recrutement s'est déroulé dans 87 municipalités du Nord des Deux-Sèvres dont l'eau du robinet provenait d'unités de distribution approvisionnées par des stations de traitement de l'eau potable (STEP) captant uniquement des eaux superficielles. Les critères d'inclusion étaient : être majeure, résider dans l'une des 87 municipalités participantes depuis au moins un an avant le début de la grossesse, avoir déclaré sa grossesse, avoir l'intention d'allaiter son enfant, avoir l'intention d'accoucher dans l'une des maternités participantes, avoir signé un formulaire de consentement éclairé. Les femmes enceintes ne pouvaient pas participer à l'étude si elles répondaient à au moins un des critères d'exclusion suivants : avoir l'intention de déménager au cours de l'année d'étude, nécessiter une protection : personnes privées de libertés par décision administrative ou judiciaire, hospitalisées sans consentement, admises dans un établissement sanitaire ou social, sous protection légale ou ne pouvant exprimer leur consentement, avoir une grossesse multiple, ne pas pouvoir s'exprimer en français, ne pas être affiliée à un régime de sécurité sociale, ne pas souhaiter accoucher dans l'une des maternités participantes. Au cours de l'étude, les femmes enceintes recevaient deux visites à domicile par un enquêteur. La première visite avait lieu durant le deuxième trimestre de la grossesse et la seconde durant le troisième. Au cours de chaque visite deux prélèvements d'eau du robinet de la cuisine et de la salle de bain étaient effectués, un prélèvement d'urine était recueilli et un questionnaire sociodémographique de consommations était administré

par l'enquêteur. À la naissance de l'enfant un prélèvement de colostrum était récupéré à la maternité dans les 72 heures suivant l'accouchement. Le déroulement de l'étude EDDS est détaillé à la figure 16.

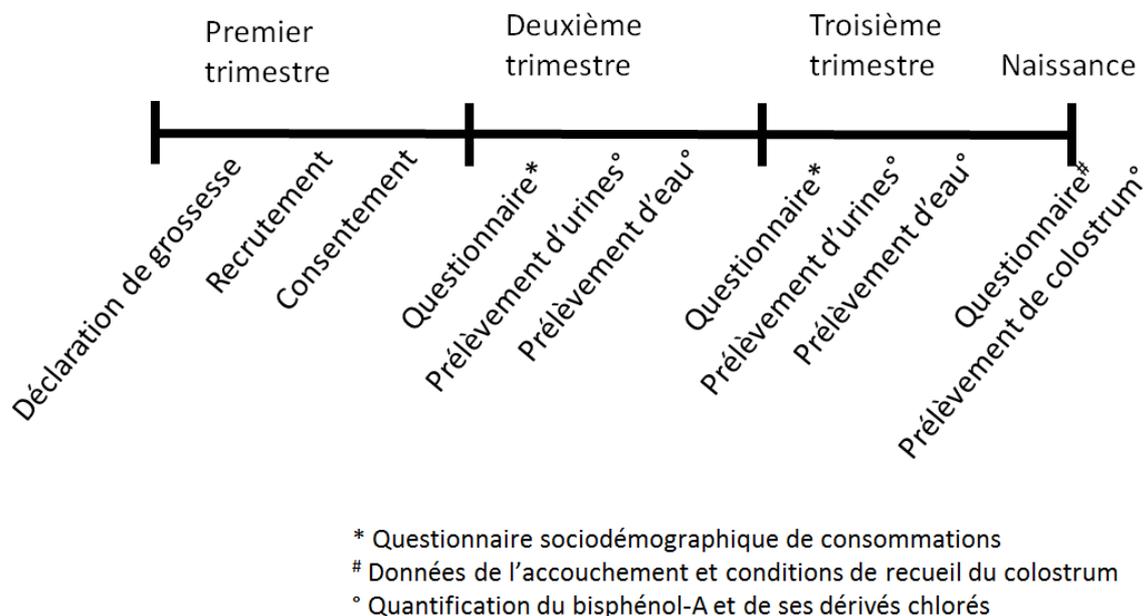


Figure 16 : Déroulement de l'étude EDDS

1.3. Prélèvements analysés dans le cadre de nos travaux

Les faibles quantités de colostrum restantes après dosage du BPA et des Clx-BPA nous ont permis de rechercher les PB dans 30 échantillons de colostrum de cette cohorte. Pour cette raison, les résultats de dosage du mélange BPA, Clx-BPA et PB sont présentés dans le colostrum des 30 participantes correspondantes et dans les urines de 100 participantes arrivées au terme de l'étude.

1.4. Analyse statistique

Nos données sont présentées en moyenne, écart-type, taux de détection (en pourcentage), valeur minimum, premier et troisième quartiles, médiane et valeur maximum. Les analyses ont été menées avec le logiciel SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Une substitution par la valeur 0 (zéro) a été utilisée lorsque le composé recherché n'était pas détecté (ND). Lorsque le composé était détecté mais en trop faible quantité pour être quantifié de manière fiable (<LOQ), une valeur de concentration égale à $LOQ/\sqrt{2}$ a été attribuée.

Nos travaux ayant pour but de tester des applications des dosages de PE dans les matrices biologiques chez la femme enceinte, des tests statistiques ont été effectués sur les urines. Ainsi, des t-tests appariés entre les urines du deuxième trimestre (U1) et du troisième trimestre (U2) ont été menés. Des tests de corrélation de Spearman ont été employés pour comparer les concentrations

retrouvées en PB, en BPA et en Clx-BPA dans les urines du deuxième et du troisième trimestre. Le degré de signification retenu était de 5%.

2. Résultats des dosages dans les matrices biologiques des participantes

2.1. Colostrums

Les PE retrouvés dans le colostrum des participantes sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Statistiques des concentrations retrouvées en bisphénol-A, en ses dérivés chlorés et en parabènes dans le colostrum

Composé (ng/mL)	n	Moyenne	Ecart-type	Déecté (%)	Minimum	Q1	Médiane	Q3	Maximum
MePB	30	1,771	2,183	27 (90)	ND	0,235	0,888	2,220	8,853
EtPB	30	0,070	0,167	15 (50)	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0,684
PrPB	30	0,312	1,530	9 (30)	ND	ND	ND	<LOQ	8,396
BuPB	30	<LOQ	N/A	8 (27)	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ
ΣPB (ng/mL)	30	2,162	3,386	N/A	ND	0,238	1,257	2,424	17,337
BPA	30	0,485	0,637	17 (57)	ND	ND	<LOQ	0,855	2,571
CBPA	30	<LOQ	N/A	6 (20)	ND	ND	ND	ND	0,224
DCBPA	30	<LOQ	N/A	10 (33)	ND	ND	ND	<LOQ	0,850
TCBPA	30	0,080	0,310	10 (33)	ND	ND	ND	<LOQ	1,710
TTCBPA	30	<LOQ	N/A	2 (7)	ND	ND	ND	ND	0,222
ΣClx-BPA (ng/mL)	30	0,186	0,409	N/A	ND	ND	ND	0,113	1,987

Q1 : premier quartile ; Q3 : troisième quartile ; ND : non détecté ; <LOQ : valeur inférieure à la limite de quantification ; N/A : non applicable

Le MePB est le PB le plus fréquemment détecté et présente les concentrations moyennes les plus élevées. Plus de la moitié des femmes présentaient du BPA dans leur colostrum. Le TTCBPA est le Clx-BPA le moins fréquemment détecté.

2.2. Urines

Les PE retrouvés dans les urines au deuxième et troisième trimestre sont présentés dans les tableaux 15 et 16 respectivement.

Tableau 15 : Statistiques des concentrations urinaires retrouvées en bisphénol-A, en ses dérivés chlorés et en parabènes au deuxième trimestre de la grossesse

Composé (ng/mL)	n	Moyenne	Ecart-type	Déecté (%)	Minimum	Q1	Médiane	Q3	Maximum
MePB	100	3,844	8,648	97 (97)	ND	0,219	0,616	2,206	57,840
EtPB	100	0,205	0,545	77 (77)	ND	<LOQ	<LOQ	0,113	2,781
PrPB	100	0,410	1,498	84 (84)	ND	<LOQ	<LOQ	0,165	13,680
BuPB	100	<LOQ	N/A	64 (64)	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0,243
ΣPB (ng/mL)	100	4,474	9,667	-	ND	0,269	0,745	3,102	58,983
BPA*	98	0,503	1,753	49 (50)	ND	ND	<LOQ	0,394	16,885
CBPA	100	<LOQ	N/A	34 (34)	ND	ND	ND	<LOQ	0,355
DCBPA	100	0,251	2,333	34 (34)	ND	ND	ND	<LOQ	23,343
TCBPA	100	<LOQ	N/A	35 (35)	ND	ND	ND	<LOQ	0,154
TTCBPA	100	<LOQ	N/A	18 (18)	ND	ND	ND	ND	0,853
ΣClx-BPA (ng/mL)	100	0,299	2,431	-	ND	ND	<LOQ	0,071	24,350

Q1 : premier quartile ; Q3 : troisième quartile ; ND : non détecté ; <LOQ : valeur inférieure à la limite de quantification ; N/A : non applicable ; * : données manquantes.

Tableau 16 : Statistiques des concentrations urinaires retrouvées en bisphénol-A, en ses dérivés chlorés et en parabènes au troisième trimestre de la grossesse

Composé (ng/mL)	n	Moyenne	Ecart-type	Détecté (%)	Minimum	Q1	Médiane	Q3	Maximum
MePB	100	51,043	291,898	98 (98)	ND	0,159	0,647	4,022	2813,000
EtPB	100	0,510	2,530	68 (68)	ND	ND	<LOQ	0,124	24,510
PrPB	100	0,697	2,392	81 (81)	ND	<LOQ	0,036	0,119	18,000
BuPB	100	<LOQ	N/A	60 (60)	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0,408
ΣPB (ng/mL)	100	52,274	293,946	-	0,018	0,256	0,690	4,238	2831,130
BPA*	98	0,482	1,116	45 (46)	ND	ND	ND	0,352	7,332
CBPA	100	<LOQ	N/A	26 (26)	ND	ND	ND	<LOQ	0,126
DCBPA	100	<LOQ	N/A	32 (32)	ND	ND	ND	<LOQ	0,276
TCBPA	100	<LOQ	N/A	29 (29)	ND	ND	ND	<LOQ	0,830
TTCBPA	100	<LOQ	N/A	11 (11)	ND	ND	ND	ND	0,122
ΣClx-BPA (ng/mL)	100	0,048	0,137	-	ND	ND	<LOQ	0,053	1,228

Q1 : premier quartile ; Q3 : troisième quartile ; ND : non détecté ; <LOQ : valeur inférieure à la limite de quantification ; N/A : non applicable ; * : données manquantes.

Les concentrations moyennes en MePB dans les urines des 100 participantes sont supérieures à celles des trois autres PB réunis (de l'ordre de 6 et 42 fois pour le deuxième et le troisième trimestre respectivement).

Le MePB est détecté dans plus de 97% des urines analysées. Viennent ensuite le PrPB, l'EtPB et le BuPB.

Le BPA est détecté dans la moitié des échantillons analysés (de 46 à 50%). Concernant les Clx-BPA, le TTCBPA est le moins souvent détecté.

2.3. Analyses statistiques sur les urines de 100 participantes

2.3.1. T-test apparié

Les résultats du t-test apparié sur U1 et U2 sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : t-test apparié entre U1 et U2

Composés testés	Résultat du t-test apparié
U1MePB*U2MePB	-1,62 0,11
U1EtPB*U2EtPB	-1,18 0,24
U1PrPB*U2PrPB	-1,06 0,29
U1BuPB*U2BuPB	-1,44 0,15
U1BPA*U2BPA	0,08 0,93
U1CBPA*U2CBPA	2,07 0,04
U1DCBPA*U2DCBPA	1,01 0,32
U1TCBPA*U2TCBPA	-0,69 0,49
U1TTCBPA*U2TTCBPA	1,16 0,25

U1 : urines du deuxième trimestre ; U2 : urines du troisième trimestre

Pour chaque test, la valeur du test est présentée à la première ligne et le degré de signification est présenté à la deuxième ligne.

2.3.2. Test de corrélation

Les résultats des tests de corrélation de Spearman entre les concentrations urinaires retrouvées sont présentés dans les tableaux 18 et 19.

Tableau 18 : Tests de corrélation respectifs entre les concentrations urinaires en parabènes retrouvées (n=100)

		Urine du deuxième trimestre (U1)				Urine du troisième trimestre (U2)			
Composé		MePB	EtPB	PrPB	BuPB	MePB	EtPB	PrPB	BuPB
U1	MePB		-	-	-	-	-	-	-
	EtPB	0,7028 <,0001		-	-	-	-	-	-
	PrPB	0,5852 <,0001	0,5064 <,0001		-	-	-	-	-
	BuPB	0,1717 0,09	0,2050 0,04	0,2463 0,01		-	-	-	-
U2	MePB	0,2610 0,01	0,1375 0,17	0,3475 0,0004	0,0778 0,44		-	-	-
	EtPB	0,1934 0,05	0,3153 0,001	0,2513 0,01	0,0085 0,93	0,5435 <,0001		-	-
	PrPB	0,3072 0,002	0,2143 0,03	0,4765 <,0001	0,1167 0,25	0,6185 <,0001	0,3822 <,0001		-
	BuPB	0,0781 0,44	0,0660 0,51	0,3116 0,002	0,2195 0,03	0,2944 0,003	0,2909 0,003	0,4582 <,0001	

Pour chaque couple de composé analysé, le coefficient de corrélation de Spearman est présenté sur la première ligne et le degré de signification correspondant est présenté sur la deuxième ligne.

Tableau 19 : Tests de corrélation respectifs entre les concentrations urinaires en bisphénol-A et ses dérivés chlorés

Composé	Urine du deuxième trimestre (U1)					Urine du troisième trimestre (U2)					
	BPA	CBPA	DCBPA	TCBPA	TTCBPA	BPA	CBPA	DCBPA	TCBPA	TTCBPA	
U1	BPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CBPA	0,3548	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0,0003	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCBPA	0,0228	0,4223	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0,82	<,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	
	98	100	-	-	-	-	-	-	-	-	
TCBPA	0,1038	0,3600	0,6088	-	-	-	-	-	-	-	
	0,31	0,0002	<,0001	-	-	-	-	-	-	-	
	98	100	100	-	-	-	-	-	-	-	
TTCBPA	0,0663	0,4347	0,5363	0,5351	-	-	-	-	-	-	
	0,52	<,0001	<,0001	<,0001	-	-	-	-	-	-	
	98	100	100	100	-	-	-	-	-	-	
U2	BPA	0,0096	0,0717	0,0249	0,0466	0,0126	-	-	-	-	
		0,93	0,48	0,81	0,65	0,90	-	-	-	-	
		96	98	98	98	98	-	-	-	-	
	CBPA	-0,0525	0,0885	0,1442	-0,0310	0,0340	0,3327	-	-	-	
		0,61	0,38	0,15	0,76	0,74	0,0008	-	-	-	
		98	100	100	100	100	98	-	-	-	
DCBPA	-0,1875	-0,0726	0,1723	0,0054	0,0754	0,1499	0,3432	-	-		
	0,06	0,47	0,09	0,96	0,46	0,14	0,0005	-	-		
	98	100	100	100	100	98	100	-	-		
TCBPA	-0,0071	0,0130	0,1242	0,2080	0,1097	0,4341	0,2518	0,4545	-		
	0,94	0,90	0,22	0,04	0,28	<,0001	0,01	<,0001	-		
	98	100	100	100	100	98	100	100	-		
TTCBPA	0,1099	0,0880	0,2164	0,0900	0,1251	0,2666	0,2913	0,4486	0,5701		
	0,28	0,38	0,03	0,37	0,22	0,01	0,003	<,0001	<,0001		
	98	100	100	100	100	98	100	100	100		

Pour chaque couple de composé analysé, le coefficient de corrélation de Spearman est présenté sur la première ligne, le degré de signification correspondant est présenté sur la deuxième ligne et le nombre d'échantillons inclus dans chaque analyse est indiqué sur la troisième ligne.

La fréquence de détection cumulée des composés recherchés par prélèvement d'urine au deuxième trimestre est présentée à la figure 17.

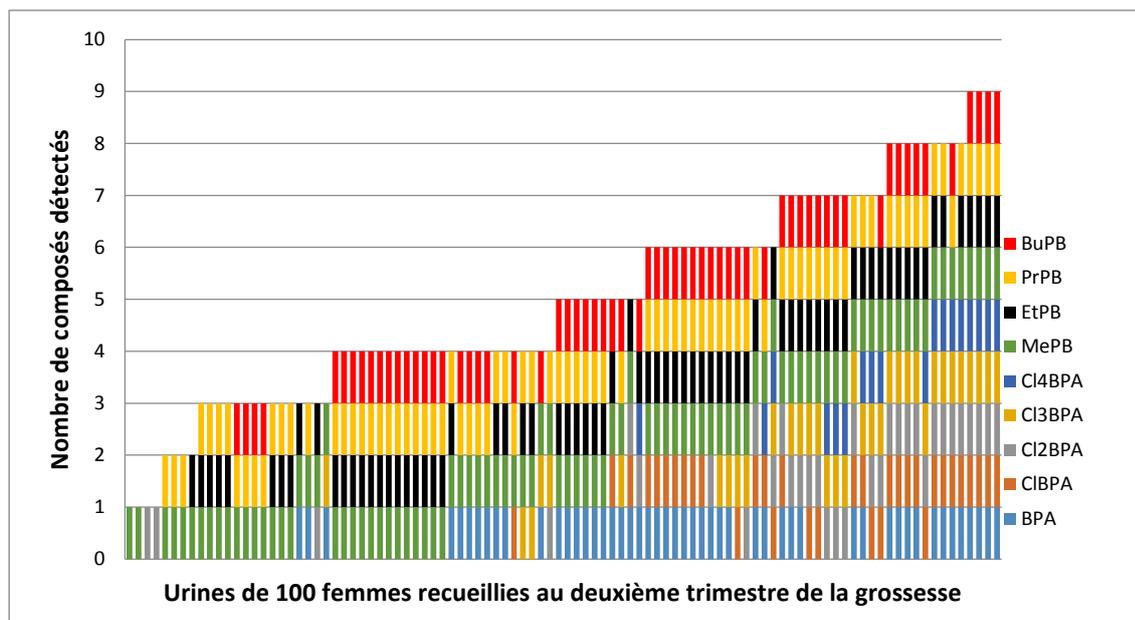


Figure 17 : Nombre de composés détectés dans chaque prélèvement urinaire du deuxième trimestre (bisphénol-A, dérivés chlorés du bisphénol-A et parabènes)

La fréquence de détection cumulée des composés recherchés par prélèvement d'urine au troisième trimestre est présentée à la figure 18.

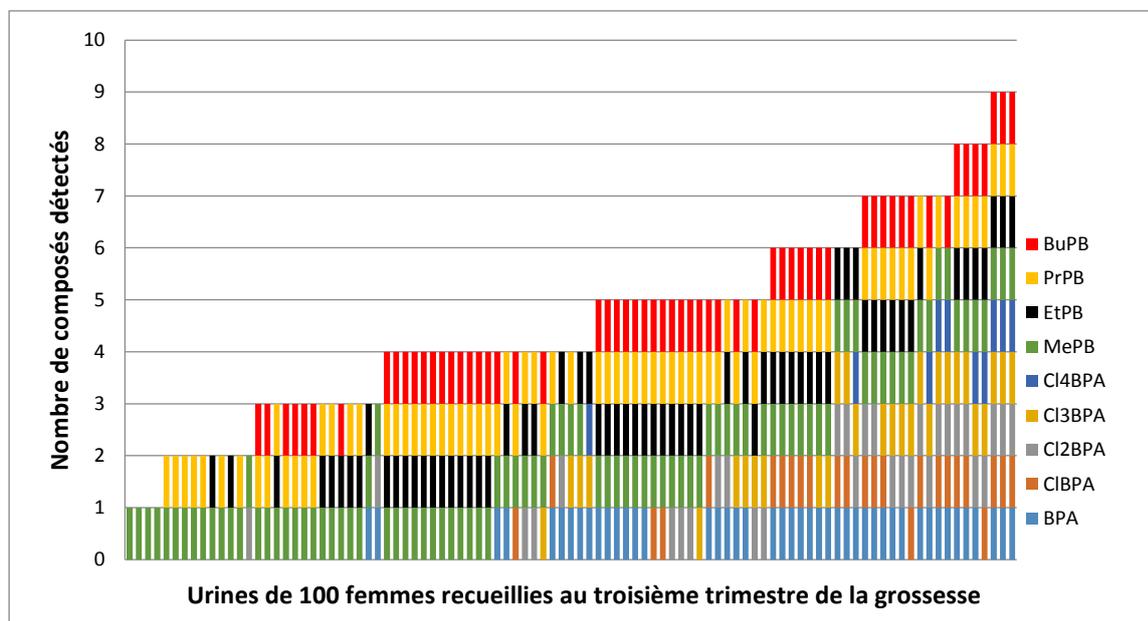


Figure 18 : Nombre de composés détectés dans chaque prélèvement urinaire du troisième trimestre (bisphénol-A, dérivés chlorés du bisphénol-A et parabènes)

PARTIE III : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

A. Méthodes de dosage des parabènes

Notre méthode de dosage des PB dans l'urine présente les limites de quantification (LOQ) les plus basses de la littérature (Tableau 20).

Tableau 20 : Comparaison de nos limites de quantification des parabènes dans l'urine avec celles de la littérature

Étude	Pays	Population étudiée	LOQ (ng/mL)			
			MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Notre étude	France	Femmes enceintes	0,025	0,025	0,025	0,025
Medina et al, 2018 (231)	Espagne	-	1,3*	0,8*	0,2*	0,3*
Nakiwala et al, 2018 (232)	France	Femmes enceintes	1,0*	1,0*	0,2*	0,2*
Fisher et al, 2017 (233)	Canada	Femmes enceintes	0,26*	0,20*	0,18*	0,07*
Wu et al, 2017 (234)	Chine	Femmes enceintes	0,03*	0,02*	0,06*	0,06*
Azzouz et al, 2016 (235)	Espagne	-	1,6*	1,7*	1,7*	1,8*
Nishihama et al, 2016 (236)	Japon	Femmes en âge de procréer	0,54*	0,25*	0,15*	0,064*
Jimenez-Diaz et al, 2016 (237)	Tunisie	Femmes	0,5	0,5	0,5	0,5
Hines et al, 2015 (238)	Canada	Enfants	1,0	1,0	0,2	0,2
Gavin et al, 2014 (239)	États-Unis	-	0,5*	0,5*	0,5*	0,2*
Moos et al, 2014 (240)	Allemagne	Enfants et adultes	0,5	0,5	0,5	0,5
Philippat et al, 2014 (241)	France	Femmes enceintes	1,0*	1,0*	0,2*	0,2*
Vela-Soria et al, 2014 (162)#	Espagne	Population générale	0,4	0,3	0,3	0,3
Asimakopoulos et al, 2014 (242)	Grèce	Hommes et femmes	1,0	0,5	0,5	0,5
Meeker et al, 2014 (243)	Porto-Rico	Femmes enceintes	NR	NR	NR	NR
Lee et al, 2013 (223)#	Corée	-	1,0	0,5	0,2	0,5
Shirai et al, 2013 (244)	Japon	Femmes enceintes	0,57*	0,47*	0,48*	0,46*
Kang et al, 2013 (245)#	Corée	Femmes enceintes	0,7*	0,2*	0,3*	0,5*
Frederiksen et al, 2013 (246)	Danemark	Femmes enceintes	0,26*	0,40*	0,18*	0,07*
Smith et al, 2012 (247)	États-Unis	Femmes enceintes	1,0*	-	0,2*	0,2*
Philippat et al, 2012 (8)	France	Femmes enceintes	1,0*	1,0*	0,2*	0,2*
Casas et al, 2011 (248)	Espagne	Femmes enceintes	1,0*	1,0*	0,2*	0,2*
Calafat et al, 2010 (174)#	États-Unis	Population âgée de 6 ans et plus	1,0*	1,0*	0,2*	0,2*
Ye et al, 2006 (222)#	États-Unis	Adultes (n=22)	0,13*	0,10*	0,18*	0,10*

LOQ : limite de quantification ; * : utilisation de la limite de détection (LOD), en l'absence de LOQ ; # : développement de méthode au moyen d'urine synthétique.

Un grand nombre d'études ont recours à la limite de détection (LOD) pour quantifier les perturbateurs endocriniens (Tableau 20). Or, la limite de détection permet d'attester de la présence ou de l'absence d'un composé dans un échantillon mais ne permet pas, contrairement à la LOQ, de quantifier de façon fiable les composés détectés. Notre méthode présente ainsi l'avantage de pouvoir rigoureusement quantifier de faibles quantités de PB dans les urines. Les méthodes employées pour déterminer la LOD dans la littérature étaient (i) trois fois l'écart type d'un standard de très faible concentration dans la matrice et (ii) trois fois le rapport signal sur bruit de fond. Ces

deux méthodes font parties de recommandations internationales (218,219). Quelques études ne font pas mention de la méthode employée pour caractériser la LOD et aucune des études n'a eu recours à la méthode que nous avons retenue (trois fois l'écart-type de l'aire obtenue lors de l'analyse de 5 blancs), alors qu'elle présente le double intérêt (i) de prendre en considération une éventuelle présence endogène de composé(s) dans les matrices dans la caractérisation de la LOD, ainsi que (ii) d'être réalisée à chaque séquence d'analyse et donc d'obtenir une LOD adaptée pour chaque séquence.

La mise au point de notre méthode de dosage des PB dans les urines s'est effectuée dans de l'urine synthétique. En effet, nous avons observé la présence d'au moins l'un des 4 PB dans les urines humaines utilisées initialement pour préparer les blancs, les points de calibration et les contrôles de qualité interne. Cette présence, en particulier du méthyle et du propylparabène dans les urines humaines a été rapportée dans la littérature (162,174,249). Ce cas de figure a justifié le recours à des matrices synthétiques pour limiter les contaminations par les PB, néfastes au développement de la méthode (162,174,222,223). L'urine synthétique que nous avons utilisée est de composition connue et publiée dans la littérature (227).

Dans le colostrum, notre méthode de dosage des PB présente également les limites de quantifications les plus basses de la littérature (Tableau 21).

Tableau 21 : Comparaison de nos limites de quantification des parabènes dans le colostrum avec celles de la littérature

Étude	Pays	LOQ (ng/mL)			
		MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Notre étude	France	0,05	0,025	0,025	0,05
Vela-Soria et al, 2018 (250)	Espagne	0,4	0,3	0,4	0,5
Fisher et al, 2017 (233)	Canada	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*
Azzouz et al, 2016 (235)	Espagne	8.0*	8.3*	8.4*	9.0*
Souza et al, 2016 (251)	Brésil	10,0	10,0	10,0	3,0
Vela-Soria et al, 2016 (10)	Espagne	0,5	0,5	0,5	0,5
Hines et al, 2015 (238)	États-Unis	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*
Rodríguez-Gómez et al, 2014 (13)	Espagne	0,09	0,09	0,09	0,10
Ye et al, 2008 (252)	États-Unis	0,13*	0,10*	0,18*	0,10*

LOQ : limite de quantification ; * : utilisation de la limite de détection (LOD), en l'absence de LOQ

Comme vu précédemment dans les urines, notre méthode dans le colostrum permet aussi de quantifier avec une fiabilité rigoureuse de faibles quantités de PB dans le colostrum.

Les micropolluants étant très fréquemment retrouvés à l'état de traces, ces deux méthodes de dosage, par leur sensibilité, confèrent également un avantage majeur dans le traitement des statistiques. En effet, les méthodes mathématiques employées pour attribuer des valeurs numériques aux échantillons non quantifiés sont susceptibles d'apporter des biais dans le traitement des données et ce biais augmente avec le nombre d'échantillons non quantifiés (253,254). De plus

elles requièrent un faible volume d'échantillon, ce qui est majeur dans le cas d'analyses dans une matrice rare comme le colostrum.

B. Méthodes de dosage du bisphénol-A et de ses dérivés chlorés

Nos méthodes de dosages du BPA dans les urines et le colostrum présentent des limites de quantifications similaires à celles de la littérature (Tableaux 22 et 23).

Tableau 22 : Comparaison de nos limites de quantification du bisphénol-A dans les urines avec celles de la littérature

Étude	Pays	Population étudiée	LOQ (ng/mL)
Notre étude	France	Femmes enceintes	0,25
Lee et al, 2018 (255)	Corée	Femmes enceintes	0,4*
Philips et al, 2018 (256)	Pays-Bas	Femmes enceintes	0,3
Nakiwala et al, 2018 (232)	France	Femmes enceintes	0,4*
Azzouz et al, 2016 (235)	Espagne	-	0.2*
Dereumeaux et al, 2016 (257)	France	Femmes enceintes	0,3*
Grignon et al, 2016 ^a (11)	France	Femmes enceintes	0,25
Philippat et al, 2014 (241)	France	Femmes enceintes	0,4*
Arbuckle et al, 2015 (87)	Canada	Femmes enceintes	0.012 [#]
Arbuckle et al, 2014 (258)	Canada	Femmes enceintes	0,02 [#]
Quirós-Alcalá et al, 2014 (259)	États-Unis	Femmes enceintes	0,3*
Venisse et al, 2014 (168)	France	Hommes et femmes	0,5
Frederiksen et al, 2013 (246)	Danemark	Femmes enceintes	0,12*
Casas et al, 2013 (260)	Espagne	Femmes enceintes	0,1*
Liao et Kannan, 2012 (86)	États-Unis	Hommes et femmes	0,05
Philippat et al, 2012 (8)	France	Femmes enceintes	0,4*
Casas et al, 2011 (248)	Espagne	Femmes enceintes	0,4*
Woodruff et al, 2011 (261)	États-Unis	Femmes enceintes	0,4*
Ye et al, 2009 (262)	Norvège	Femmes enceintes	0,26*
Ye et al, 2008 (263)	Pays-bas	Femmes enceintes	0,26*

LOQ : limite de quantification ; ^a : échantillon de la cohorte EDDS ; * : utilisation de la limite de détection (LOD), en l'absence de LOQ ; [#] : étape de dansylation.

Tableau 23 : Comparaison de nos limites de quantification du bisphénol-A dans le colostrum avec celles de la littérature (lait maternel et colostrum)

Étude	Pays	LOQ (ng/mL)
Notre étude	France	0,4
Lee et al, 2018 (255)	Corée	0,3°
Niu et al, 2017 (15)	Chine	0,05*
Azzouz et al, 2016 (235)	Espagne	1.0°
Deceuninck et al, 2015 (264)	France	0,01
Hines et al, 2015 (238)	États-Unis	0,28°
Nakao et al, 2015 (265)	Japon	0,002 [#]
Cao et al, 2014 (266)	Canada	0,21 ^{o#}
Mendonca et al, 2014 (267)	États-Unis	0,9
Rodríguez-Gómez et al, 2014 (13)	Espagne	0,15
Samanidou et al, 2014 (268)	Grèce	9500 (15,9#)
Zimmers et al, 2014 (269)	États-Unis	Non précisé
Migeot et al, 2013 ^a (12)	France	0,4
Cariot et al, 2012 (14)	France	0,4
Yi et al, 2010 (270)	Corée	Non précisé
Ye et al, 2008 (252)	États-Unis	Non précisé
Kuruto-Niwa et al, 2007 ^a (271)	Japon	0,3°
Ye et al, 2006 (272)	Japon	Non précisé
Sun et al, 2004 (273)	Japon	0,11°
Otaka et al, 2003 (274)	Japon	0,21 [#]

LOQ : limite de quantification ; ° : utilisation de la limite de détection (LOD), en l'absence de LOQ ; * étape de dansylation ; ^a colostrum ; # en ng/g de lipides.

Notre méthode de dosage des Clx-BPA dans les urines est la plus sensible de la littérature (Tableau 24).

Tableau 24 : Comparaison de nos limites de quantification des dérivés chlorés du bisphénol-A dans les urines avec celles de la littérature

Étude	Pays	Population étudiée	LOQ (ng/mL)			
			CBPA	DCBPA	TCBPA	TTCBPA
Notre étude	France	Femmes enceintes	0,025	0,025	0,025	0,025
Grignon et al, 2016 (11)	France	Femmes enceintes*	0,025	0,025	0,025	0,025
Vela-Soria et al, 2014 (162)	Espagne	Hommes et femmes	0,1	0,1	0,1	0,1
Venisse et al, 2014 (168)	France	Hommes et femmes	0,05	0,05	0,05	0,05
Liao et Kannan, 2012 (86)	États-Unis	Hommes et femmes	0,05	0,05	0,05	-

LOQ : limite de quantification ; * échantillon de la cohorte EDDS.

Concernant les Clx-BPA dans le colostrum, une seule méthode est plus sensible que la nôtre (15) (Tableau 25).

Tableau 25 : Comparaison de nos limites de quantification des dérivés chlorés du bisphénol-A dans le colostrum avec celles de la littérature (lait maternel et colostrum)

Étude	Pays	LOQ (ng/mL)			
		CBPA	DCBPA	TCBPA	TTCBPA
Notre étude ^a	France	0,08	0,08	0,08	0,08
Niu et al, 2017 (15)	Chine	0,003*	0,005*	0,005*	0,005*
Rodríguez-Gómez et al, 2014 (13)	Espagne	0,12	0,12	0,14	0,13
Migeot et al, 2013 ^a (12)	France	0,4	0,4	0,4	0,4
Cariot et al, 2012 (14)	France	0,4	0,4	0,4	0,4

LOQ : limite de quantification ; ^a colostrum ; * étape de dansylation.

Comme dans les PB précédemment décrit, la majorité des études publiées considèrent la LOD comme une LOQ et seules six études rapportent des limites de quantification inférieures à la nôtre pour le BPA dans les urines (86,87,258) et le lait (13,15,264), dont trois ont recours à une étape de dansylation (15,87,258). La dansylation consiste à greffer deux groupements dansyle sur le BPA, faisant passer son mode d'ionisation de négatif (ESI-) à positif (ESI+). Cette modification permet l'obtention d'une plus grande sensibilité, cependant la perte des groupements dansyle lors de la génération des transitions d'ions fils est à l'origine d'une perte de spécificité. Une seule étude rapporte une LOQ inférieure à la nôtre dans le cas de la méthode de dosage des Clx-BPA dans le colostrum, mais elle a recours à la dansylation (15).

C. Validation sur des prélèvements de la cohorte EDDS

La majorité des études de la littérature se concentrent sur la détection indirecte des métabolites conjugués des PE, en ayant recours à la déconjugaison enzymatique. Elles obtiennent la plupart du temps des valeurs de concentration dites « totales », correspondant à la somme de la fraction non-conjuguée et de la fraction des métabolites conjugués. Dans nos travaux, nous avons choisi de rechercher les formes non conjuguées du BPA, des Clx-BPA et des PB dans les urines et le colostrum.

1. Urines

Les concentrations moyennes en MePB dans les urines des 100 participantes à l'étude EDDS sont supérieures à celles des trois autres PB réunis (de l'ordre de 6 et 42 fois pour le deuxième et le troisième trimestre respectivement).

Le MePB est détecté dans plus de 97% des prélèvements urinaires analysés. Viennent ensuite le PrPB, l'EtPB et le BuPB, ce qui est en accord avec la fréquence d'utilisation de chacun des PB dans les cosmétiques par les industriels (195). Les taux de détection moyens des PB retrouvés dans la littérature sont présentés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Comparaison des taux de détection urinaires de parabènes pendant la grossesse avec la littérature

Étude	Pays	n	Taux de détection (%)			
			MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Non conjugué						
Notre étude (moyenne U1 et U2)	France	100	97,5	72,0	80,5	60,5
Shirai et al, 2013 (244)	Japon	111	88,0	49,0	46,0	0,0
Casas et al, 2011 (248)	Espagne	120	100,0	87,6	98,3	90,1
Étape de déconjugaison						
Nakiwala et al, 2018 (232)	France	452	100,0	73,0	99,0	86,0
Fisher et al, 2017 (233)	Canada	542	100,0	90,0	96,0	72,0
Jimenez-Diaz et al, 2016 (237)	Tunisie	34	94,1	67,6	70,6	38,2
Philippat et al, 2014 (241)	France	520	100,0	73,0	99,0	84,0
Meecker et al, 2014 (243)	Porto Rico	105	100,0	-	99,3	58,4
Shirai et al, 2013 (244)	Japon	111	94,0	81,0	89,0	54,0
Kang et al, 2013 (245)#	Corée	46	97,8	100,0	97,8	28,3
Frederiksen et al, 2013 (246)	Danemark	145	90,0	66,0	83,0	39,0
Smith et al, 2012 (247)	États-Unis	337	100,0	-	99,0	79,0
Philippat et al, 2012 (8)	France	191	100,0	67,7	96,9	79,5

Les taux de détection des quatre PB non-conjugués obtenus dans le cadre de ces travaux sont supérieurs à ceux retrouvés dans l'étude de Shirai et al (244) et inférieurs à et ceux retrouvés dans l'étude de Casas et al (248). Dans l'étude de Shirai et al, les taux de détection après déconjugaison (non-conjugués + conjugués) sont supérieurs aux taux de détection des PB non-conjugués seuls.

Le MePB est le plus souvent détecté dans la littérature avec des taux de détection compris entre 88% et 100% des échantillons, toutes méthodes confondues. Dans certaines études, les taux de MePB et de PrPB détectés sont très proches, ce qui peut s'expliquer par le fait que ces deux PB sont très fréquemment associés au sein d'un même produit pour amplifier leur pouvoir antimicrobien (190).

Dans notre étude, le BPA est détecté dans la moitié des échantillons urinaires analysés (de 46 à 50%). Les taux de détection moyens du BPA retrouvés dans la littérature sont présentés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Comparaison des taux de détection urinaires de bisphénol-A pendant la grossesse avec la littérature

Étude	Pays	n	Taux de détection (%)
Non conjugué			
Notre étude (moyenne U1 et U2)	France	100	48,0
Dereumeaux et al, 2016 (257)	France	1764	33,0
Grignon et al, 2016* (11)	France	10	60,0
Arbuckle et al, 2015 (87)	Canada	1882	43,2
Total (étape de déconjugaison)			
Lee et al, 2018 (255)	Corée	127	90,2
Philips et al, 2018 (256)	Pays-Bas	1396	79,2
Nakiwala et al, 2018 (232)	France	452	99,6
Dereumeaux et al, 2016 (257)	France	1764	73,8
Arbuckle et al, 2015 (87)	Canada	1882	95,0%
Arbuckle et al, 2014 (258)	Canada	1788	87,7
Philippat et al, 2014 (241)	France	520	99,0
Quirós-Alcalá et al, 2014 (259)	États-Unis	491	>79,0
Meeker et al, 2014 (243)	Porto Rico	105	97,9
Frederiksen et al, 2013 (246)	Danemark	145	97,0
Casas et al, 2013 (260)	Espagne	479	99,8
Philippat et al, 2012 (8)	France	191	98,5
Casas et al, 2011 (248)	Espagne	120	91,0
Woodruff et al, 2011 (261)	États-Unis	84	94,0
Ye et al, 2009 (262)	Norvège	110	100,0
Ye et al, 2008 (263)	Pays-Bas	100	82,0

* échantillon de la cohorte EDDS.

Le taux de détection moyen de BPA non conjugué de notre étude (48%) est proche de celui de l'étude d'Arbuckle et al (43,2%) (87) et supérieur à celui de Dereumeaux et al (33,0%) (257). Pour cette dernière étude, le taux de détection du BPA total passe à 73,8%. Les autres études ne dosent que le BPA urinaire total.

Concernant les Clx-BPA, le TTCBPA est le moins souvent détecté dans nos travaux. Les taux de détection moyens des Clx-BPA retrouvés dans la littérature sont présentés dans le tableau 28.

Tableau 28 : Comparaison des taux de détection urinaires des dérivés chlorés du bisphénol-A pendant la grossesse avec la littérature

Étude	Pays	Population étudiée	n	Taux de détection (%)			
				CBPA	DCBPA	TCBPA	TTCBPA
Non conjugué							
Notre étude (moyenne U1 et U2)	France	Femmes enceintes	100	30,0	33,0	32,0	14,5
Grignon et al, 2016 (11)	France	Femmes enceintes*	10	70,0	70,0	70,0	40,0

* échantillon de la cohorte EDDS.

Une seule étude existe concernant les Clx-BPA chez la femme enceinte. Comme dans nos travaux, le TTCBPA reste le dérivé chloré le moins détecté, et CBPA, DCBPA et TCBPA sont les plus souvent présents dans les urines avec des taux de détection très proches. L'étude de Grignon et al portait sur 10 échantillons de la cohorte EDDS. À notre connaissance, il n'existe aucune autre étude explorant les concentrations urinaires de Clx-BPA chez la femme enceinte.

Les concentrations urinaires en MePB, EtPB, PrPB et BuPB étaient positivement corrélées entre les prélèvements U1 et U2, ce qui n'était pas le cas pour les concentrations urinaires en BPA et en Clx-BPA, à l'exception du TCBPA. Au sein d'un même prélèvement, les concentrations urinaires en MePB et PrPB étaient positivement corrélées que ce soit pour U1 ($r^2 = 0,5852$) ou U2 ($r^2 = 0,3072$). Ceci est en accord avec l'association fréquente de ces deux PB retrouvée dans les cosmétiques et les médicaments (195). Concernant le BPA, les concentrations urinaires étaient corrélées avec celles du CBPA en U1 et avec celles des CBPA, TCBPA et TTCBPA en U2. Ces observations sont à mettre en perspective avec le fait que BPA et Clx-BPA sont tous deux retrouvés dans l'eau du robinet, mais qu'il existe d'autres sources d'exposition au BPA, alors que l'exposition hydrique est la seule connue pour 3 des 4 Clx-BPA existants (CBPA, DCBPA et TCBPA). Ainsi, la part de consommation d'eau du robinet est susceptible de varier chez chaque femme enceinte.

Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives de concentrations urinaires entre le deuxième et le troisième trimestre de la grossesse chez les participantes de l'étude EDDS, le t-test s'étant révélé non significatif. Ces résultats indiquent donc que les concentrations urinaires varient peu entre deux prélèvements, ce qui est à rapprocher avec certaines études qui soulignent que les concentrations urinaires en PB varient peu chez l'adulte (275) et au cours de chaque trimestre de la grossesse (247), mais à considérer avec précaution concernant le BPA car la littérature fait état de données contradictoires (276,277) et ne mentionne à aucun moment le cas des Clx-BPA.

L'étude EDDS était une étude descriptive ne comportant pas d'intervention contrôlée visant à réduire l'exposition aux PE chez les femmes enceintes. De plus, des études soulignent que quelques prélèvements ponctuels tels que réalisés dans l'étude EDDS peuvent suffire à rendre compte de l'exposition au BPA et aux PB pendant la grossesse (247,275,276).

Nous avons donc validé dans ces travaux des méthodes de dosages urinaires ultrasensibles adaptées au biomonitoring d'un mélange de PE dans les matrices biologiques de femmes enceintes.

2. Colostrum

Dans les colostrums de l'étude EDDS, le MePB est le plus souvent détecté (90%), viennent ensuite l'EtPB (50%), le PrPB (30%) et le BuPB (27%). Les taux de détection moyens des PB dans la littérature sont présentés dans le tableau 29.

Tableau 29 : Comparaison des taux de détection des parabènes dans le colostrum ou le lait maternel avec la littérature

Étude	Pays	N	Taux de détection (%)			
			MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Non conjugué						
Notre étude*	France	30	90,0	50,0	30,0	26,0
Souza et al, 2016 (251)	Brésil	16	100,0	100,0	100,0	25,0
Rodríguez-Gómez et al, 2014 (13)	Espagne	10	90,0	90,0	90,0	90,0
Ye et al, 2008 (252)*	États-Unis	4	50,0	-	25,0	-
Étape de déconjugaison						
Vela-Soria et al, 2018 (250)	Espagne	15	100,0	47,0	87,0	0,0
Fisher et al, 2017 (233)	Canada	56	82,0	57,0	66,0	0,0
Vela-Soria et al, 2016 (10)	Espagne	15	73,0	33,0	40,0	7,0
Hines et al, 2015 (238)	États-Unis	10	100,0	50,0	100,0	0,0
Ye et al, 2008 (252)*	États-Unis	4	100,0	-	25,0	-

*colostrum.

Comme dans le cas des urines analysées dans le cadre de ces travaux, le MePB est le plus largement détecté. En revanche, l'EtPB est plus souvent détecté que le PrPB. Le BuPB est le moins souvent présent. Nos taux de détection de l'EtPB et de PrPB sont inférieurs à ceux des autres études qui ont dosé les fractions non-conjuguées des PB, excepté pour une étude qui n'a retrouvé le PrPB que dans 25% des échantillons analysés (n=4) (252). C'est la seule étude de la littérature qui porte sur le colostrum, les autres portaient sur le lait maternel.

Le BPA est détecté dans 56,7% des colostrums analysés. Ce taux de détection du BPA non-conjugué est similaire aux études américaine de Zimmers et al (269) et japonaise de Ye et al. (272). Cependant, il apparaît que les taux de détection de BPA non-conjugué varient fortement d'une étude à l'autre (de 16,5% à 100,0%). Les taux de détection moyens du BPA dans la littérature sont présentés dans le tableau 30.

Tableau 30 : Comparaison des taux de détection du bisphénol-A dans le colostrum ou le lait maternel avec la littérature

Étude	Pays	n	Taux de détection (%)
Non conjugué			
Notre étude	France	30	56,7
Nakao et al, 2015 (265)	Japon	19	100,0
Cao et al, 2014 (266)	Canada	278	16,5
Mendonca et al, 2014 (267)	États-Unis	23	20,0
Rodríguez-Gómez et al, 2014 (13)	Espagne	10	60,0
Samanidou et al, 2014 (268)	Grèce	-	-
Zimmers et al, 2014 (269)	États-Unis	21	62,0
Migeot et al, 2013* (12)	France	21	90,5

Cariot et al, 2012 (14)	France	3	100,0
Yi et al, 2010 (270)	Corée	100	100,0
Ye et al, 2008 (252)	États-Unis	4	100,0
Ye et al, 2006 (272)	Japon	20	60,0
Sun et al, 2004 (273)	Japon	23	100,0
Total (étape de déconjugaison)			
Lee et al, 2018 (255)	Corée	127	79,5
Niu et al, 2017 (15)	Chine	20	85,0
Deceuninck et al, 2015 (264)	France	30	100,0
Hines et al, 2015 (238)	États-Unis	10	89,0
Cao et al, 2014 (266)	Canada	278	25,9
Mendonca et al, 2014 (267)	États-Unis	23	75,0
Yi et al, 2010 (270)	Corée	100	100,0
Ye et al, 2008 (252)	États-Unis	4	100,0
Kuruto-Niwa et al, 2007* (271)	Japon	101	100,0
Ye et al, 2006 (272)	Japon	20	90,0
Otaka et al, 2003 (274)	Japon	3	66,0

* colostrum.

Concernant les Clx-BPA, le TTCBPA est le plus faiblement détecté (2 échantillons sur les 30 analysés). Les taux de détection moyens du BPA dans la littérature sont présentés dans le tableau 31.

Tableau 31 : Comparaison des taux de détection des dérivés chlorés dans le colostrum ou le lait maternel avec la littérature

Étude	Pays	n	Taux de détection (%)			
			CBPA	DCBPA	TCBPA	TTCBPA
Non conjugué						
Notre étude*	France	30	18,0	23,0	17,0	2,0
Rodríguez-Gómez et al, 2014 (13)	Espagne	10	0,0	20,0	0,0	0,0
Migeot et al, 2013 (12)*	France	21	0,0	2,2'-DCBPA : 52,4 2,6-DCBPA : 100,0	19,0	-
Cariot et al, 2012 (14)	France	3	0,0	100,0	33,0	-
Total (étape de déconjugaison)						
Niu et al, 2017 (15)	Chine	20	0,0	0	0	0,0

*colostrum.

Les Clx-BPA les moins retrouvés dans la littérature sont le CBPA et le TTCBPA. Ces composés sont fortement lipophiles et il était attendu que ces dérivés chlorés s'accumulent davantage dans le lait maternel et surtout dans le colostrum, qui se forme pendant la grossesse. Cependant, les quelques études ayant recherché les Clx-BPA dans le colostrum et le lait maternel portaient sur un faible nombre d'échantillons (< 30). Notre étude est la seule ayant porté sur un grand nombre d'échantillons, et c'est aussi la seule à avoir mis en évidence du CBPA et du TTCBPA dans le colostrum.

D. Mesure analytique de l'exposition aux perturbateurs endocriniens chez la femme enceinte

1. Recherche de méthodes de plus en plus sensibles et sophistiquées

Les études faisant appel à la mesure analytique de biomarqueurs sont très nombreuses dans le cas de la mesure de l'exposition des populations à des PE. La mesure analytique constitue une méthode à part entière de l'expologie.

Nos travaux soulignent que les 100 femmes enceintes de la cohorte EDDS sont exposées à au moins l'un des PE étudiés. La totalité des 9 PE a été retrouvé dans les urines de certaines d'entre elles que ce soit au deuxième ou au troisième trimestre de la grossesse (cf figures 17 et 18), ce qui conforte la démarche de ne pas étudier un seul PE, mais d'explorer les expositions à des mélanges de PE.

Compte-tenu des expositions simultanées à plusieurs PE et de l'effet délétère de ces PE en mélange à faibles doses, des méthodes de dosage toujours plus élaborées doivent être développées pour atteindre des exigences de sensibilité analytique pour des concentrations de plus en plus faibles. Des méthodes offrant la possibilité de quantifier simultanément un grand nombre de biomarqueurs sont également attendues.

Une des difficultés pouvant résulter de la quantification d'un grand nombre simultanément de biomarqueurs est une perte de sensibilité analytique par rapport aux méthodes permettant leur quantification séparément. Ainsi, l'optimisation des méthodes se traduirait non pas par l'obtention des meilleures performances analytiques pour tous les composés, mais par leur quantification au moyen des limites « acceptables », ce qui aurait pour conséquence une perte d'intérêt dans le cas de l'analyse des PE et des relations dose-effet non monotones que nous pourrions observer.

2. Choix de la matrice

La matrice biologique doit répondre à différents critères. Ainsi, son recueil doit être le moins invasif possible et des volumes suffisants doivent pouvoir être prélevés en vue de l'analyser dans de bonnes conditions. Nos méthodes analytiques ne requièrent qu'un faible volume d'urines (de 200 à 300 µL). Compte-tenu de l'élimination essentiellement urinaire du BPA et des PB, et de la courte demi-vie plasmatique du BPA, la matrice urinaire semble la plus adaptée. Les données concernant l'élimination et la demi-vie plasmatique des Clx-BPA demeurent inconnues à ce jour.

3. Choix d'un « bon » biomarqueur

Une autre difficulté analytique réside dans le choix du biomarqueur à étudier. Ce choix dépend des objectifs de l'étude : cherche-t-on à évaluer seulement l'exposition ou bien le lien entre exposition et issues de santé ?

La majorité des études se concentrent sur la détection indirecte des métabolites conjugués des PE, en ayant recours à la déconjugaison enzymatique. Dans le cas d'une étude de mesure d'exposition

globale, ce choix de rechercher ces concentrations dites « totales » peut se justifier, sous plusieurs conditions :

- si le métabolisme de la molécule à doser est connu, le choix du biomarqueur d'exposition sera facilité. Dans le cas du BPA, le métabolisme fait quasi-exclusivement appel à des phénomènes de glucuro et sulfoconjugaison et l'élimination du BPA et de ses métabolites est urinaire. La mesure du BPA « total » apparaît alors être un bon biomarqueur, bien que ce choix reste discuté (215,278,279).

- si la mesure du biomarqueur est indirecte, il convient de s'assurer que la méthode quantifie de façon fiable le biomarqueur. Ainsi, dans le cadre d'une méthode de dosage faisant appel à une étape de déconjugaison enzymatique, un critère de qualité doit permettre de s'assurer que le procédé de déconjugaison a bien été total, comme c'est le cas de l'utilisation de la 4-méthylumbelliférol dans le contrôle des procédés de déconjugaison enzymatique des métabolites du BPA (280).

Afin de limiter ce biais analytique, la mesure directe de la somme des métabolites et de la fraction non métabolisée du composé permettra l'obtention d'un meilleur biomarqueur d'exposition. Ceci implique en revanche de disposer de standards analytiques pour toutes les molécules recherchées.

Par conséquent, quand les connaissances du métabolisme d'un composé chez l'Homme sont nulles ou incomplètes, comme dans le cas des Clx-BPA et des PB, la recherche d'un biomarqueur d'exposition totale est compromise, car glucuro et sulfoconjugaison ne sont pas les seules voies métaboliques pouvant être impliquées dans la détoxification d'un composé. Le meilleur biomarqueur d'exposition sera alors la forme non-conjuguée.

Dès lors que nous nous intéressons à l'étude de l'exposition et de leur lien avec des issues de santé, il apparaît plus pertinent d'identifier et de quantifier les formes toxicologiquement actives. Dans le cas du BPA et des PB, les connaissances actuelles désignent uniquement leurs formes non-conjuguées (76,77).

Un autre inconvénient de rechercher des métabolites conjugués ou le BPA total après une étape de déconjugaison tient au fait que ces méthodes ne prennent pas en considération les variabilités interindividuelles dans le métabolisme du BPA. Ainsi, le polymorphisme génétique d'enzymes comme l'UGT2B15 est susceptible d'entraîner des différences dans la capacité des individus à conjuguer le BPA (17,73,74). Par conséquent, une concentration plus élevée en métabolites ne signifiera pas obligatoirement une concentration plus élevée en BPA non-conjugué, car un individu métabolisant le BPA avec une faible efficacité présentera des concentrations faibles en BPA conjugué et des concentrations élevées en BPA non-conjugué. Nous pourrions être tentés de croire que cet individu est peu exposé alors que les concentrations toxiques en BPA sont plus importantes que pour un individu au métabolisme pleinement fonctionnel, avec un risque pour la santé potentiellement plus important.

Dans nos travaux, nous avons choisi de quantifier les formes non-conjuguées du BPA et des PB car ces formes sont toxicologiquement actives. Le métabolisme jusqu'alors insuffisamment voire totalement inconnu des Clx-BPA et des PB chez l'Homme nous a confortés dans ce choix. La quantification directe des formes non-conjuguées des PE étudiés constitue dans notre cas le meilleur biomarqueur d'exposition et il représente également l'unique biomarqueur de toxicité.

4. Validation d'une méthode destinée au dosage de micropolluants environnementaux dans les matrices biologiques

À l'heure actuelle, valider une telle méthode de dosage revient à sélectionner des critères en fonction des applications dont elle fera l'objet. Or cette étape de validation est un préalable indispensable à l'obtention de résultats fiables et reproductibles. Les quatre guides et recommandations existants (NORMAN (218), ICH (219), FDA (220) et EMA (221)) font chacun état de critères différents à prendre en considération pour la validation d'une méthode. Les seules recommandations destinées à être appliquées au domaine de l'environnement, issues du guide NORMAN, sont moins détaillées et moins exigeantes que celles issues des autres guides et recommandations. De plus, le mode de validation de chaque critère (LOD, LOQ, linéarité, justesse, fidélité, effets de matrice, contamination inter-échantillons, rendement d'extraction, recouvrement) diffère suivant chaque recommandation. Certains critères sont même absents : pas de recommandation pour déterminer l'effet de matrice dans ICH et NORMAN, pas d'indication pour définir la LOD dans les recommandations de l'EMA et de la FDA. Or la LOD est un critère décisif car elle permet d'attester de la présence ou de l'absence du PE recherché dans un échantillon donné, la présence de PE signifiant une exposition de l'individu. La LOD est donc capitale pour la recherche de relations entre exposition et effet sur la santé. Afin de ne pas conclure à tort à l'absence de PE et de ne pas avoir à censurer à gauche un trop grand nombre de valeurs de concentration (dans le cas d'échantillons d'une cohorte par exemple), la LOD doit être la plus fiable possible. Puisque qu'aucune quantification n'est fiable à la LOD (seulement la détection) la LOD ne peut être une valeur de concentration. De plus, elle est propre à chaque série d'analyse, voire à chaque injection dans le système analytique. La littérature fait état de différentes façons de déterminer cette LOD :

- De façon visuelle par lecture du chromatogramme. Cette méthode, subjective, n'est pas recommandée ;
- Trois fois l'écart type d'un blanc ou d'un standard de très faible concentration dans la matrice, répliqué un nombre déterminé de fois (218) ;
- Par le rapport signal sur bruit (minimum 2 à 3/1) au temps de rétention de l'analyte (219) ;
- Combinaison de l'écart-type (ET) et de la pente de calibration (S), selon la formule :

$$\text{LOD} = (3,3 * \text{ET}) / S \text{ (219) ;}$$

L'ET peut-être calculé à partir de répliqués de blancs, ou de l'ordonnée à l'origine des courbes de calibration.

Dans la littérature, la façon dont la LOD a été déterminée n'est pas toujours précisée. Dans certains cas, il n'en est même pas fait mention. Dans ces conditions, il est difficile de juger de la validité des résultats analytiques obtenus.

Dans nos travaux, du fait de la présence de PB (essentiellement du MePB) dans le lait maternel, nous avons choisi de déterminer la LOD comme étant 3 fois l'écart-type des aires obtenues après

l'injection de 5 blancs. Ce choix s'est par ailleurs avéré adapté dans le cas des analyses du BPA et des Clx-BPA. En effet, de par leur caractère ubiquitaire dans notre environnement, ces analytes sont fréquemment retrouvés dans les matrices biologiques servant à réaliser les gammes de calibration et les contrôles de qualité. Cette méthode permet ainsi de prendre en considération leur présence dans le calcul de la LOD. De plus, avec notre méthode, la LOD a été déterminée pour chaque série de dosage (ce qui n'est pas le cas pour la détermination de la LOQ).

Tout comme dans le cas de la LOD, la validation de la LOQ pose un autre problème, celui de pouvoir quantifier avec une fiabilité rigoureuse les analytes présents dans les matrices biologiques, autrement dit avec une incertitude de mesure limitée. Dans le cas de micropolluants environnementaux susceptibles d'être retrouvés en faibles quantités dans les matrices biologiques, la LOQ doit être la plus fiable possible. Ici, une LOQ « élevée » n'aura pas de conséquence sur le taux de détection des composés, mais elle pourra contribuer à la non quantification des analytes dans un grand nombre d'échantillons analysés et donc au recours à des procédés mathématiques d'imputation de valeurs pour les échantillons non quantifiés, nécessaires aux analyses statistiques, et introduisant des biais (253,254). D'après la littérature, la LOQ peut être déterminée de différentes façons :

- 10 fois l'écart type d'un blanc ou d'un standard de très faible concentration dans la matrice, répliqué un nombre déterminé de fois (218) ;
- Par le rapport signal sur bruit (minimum 10/1) au temps de rétention de l'analyte (219) ;
- Combinaison de l'écart-type (ET) et de la pente de calibration (S), selon la formule :

$$\text{LOQ} = (10 * \text{ET}) / S \text{ (219) ;}$$

- En multipliant la valeur de LOD par un facteur 3 (218) ;
- En calculant la variance de la LOQ après injection d'un nombre défini de réplicats à la LOQ (218) ;
- Comme étant le point de plus faible concentration pour lequel la réponse obtenue est au moins 5 fois supérieure à celle obtenue pour un blanc (221) et dont le CV et le biais obtenus par injection de réplicats sont inférieurs à 20% (221) ;
- Comme selon le point précédent, en ajoutant un minimum de 5 déterminations (220) ;
- Comme étant le point le plus bas de la gamme présentant une variabilité et un biais acceptables (soit un CV inférieur à 20% et un biais compris entre -20% et 20%).

Cette dernière façon est largement reprise dans la littérature. C'est d'ailleurs celle que nous avons retenue pour nos méthodes d'analyses.

Comme nous l'avons vu dans nos travaux, de nombreux travaux ont recours à une utilisation inappropriée de la LOD. En effet, aucune LOQ n'y était calculée et la LOD était alors assimilée à une LOQ, sans tenir compte de l'importante incertitude de mesure qui existe entre la LOD et la LOQ. Les

données quantitatives de ces études ont donc été impactées par cette utilisation inappropriée de la LOD pour quantifier des composés.

Les nombreuses méthodes disponibles pour déterminer la LOD et la LOQ compliquent la comparaison de nos travaux avec ceux de la littérature. Il serait intéressant de proposer de nouvelles recommandations adaptées aux dosages de micropolluants dans les matrices biologiques et reconnues par le plus grand nombre d'experts comme le préconise le scientific committee « Environmental Toxicology » de l'International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDMCT) (281).

E. CONCLUSION

L'interprétation des dosages de micropolluants de l'environnement, dont les perturbateurs endocriniens font partie, appelle à la prudence. En effet, suivant les méthodes analytiques et les limites de détection et de quantification validées, les statistiques descriptives peuvent s'en retrouver modifiées. De plus, du fait du caractère multifactoriel des expositions environnementales (géographiques, sociodémographiques, habitudes de consommation ...), la comparaison des résultats d'une étude à l'autre doit se faire en prenant en considération la variabilité de ces facteurs d'une population à l'autre.

L'étude EDDS est la première à notre connaissance à s'intéresser aux concentrations urinaires en Clx-BPA et apporte des données importantes dans le cas du biomonitoring de ces composés dans le colostrum, du fait d'études antérieures peu nombreuses et menées sur un faible nombre d'échantillons.

Nous avons rigoureusement développé et validé des méthodes de dosage conformément à des recommandations internationales et de données issues de la littérature, en accord avec les critères que nous nous étions fixés. Ces méthodes sont précises, justes et spécifiques à chacun des composés quantifiés dans les matrices étudiées. Elles comportent de basses limites de quantification applicables pour de faibles quantités de PE. Les données apportées par les échantillons de l'étude EDDS soulignent l'intérêt d'étudier le « cocktail » des PE dans les matrices urine et colostrum.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health Glob Access Sci Source*. 2012;11:42.
2. Albouy-Llaty M, Dupuis A, Grignon C, Strezlec S, Pierre F, Rabouan S, et al. Estimating drinking-water ingestion and dermal contact with water in a French population of pregnant women for emerging contaminants risk assessment: the EDDS cohort study. *J Expo Sci Env Epid*.
3. Biesterbos JWH, Dudzina T, Delmaar CJE, Bakker MI, Russel FGM, von Goetz N, et al. Usage patterns of personal care products: important factors for exposure assessment. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. mai 2013;55:8-17.
4. Marie C, Cabut S, Vendittelli F, Sauviant-Rochat M-P. Changes in Cosmetics Use during Pregnancy and Risk Perception by Women. *Int J Environ Res Public Health*. 30 mars 2016;13(4):383.
5. Gaudriault P, Mazaud-Guittot S, Lavoué V, Coiffec I, Lesné L, Dejucq-Rainsford N, et al. Endocrine Disruption in Human Fetal Testis Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants. *Environ Health Perspect*. 04 2017;125(8):087004.
6. Zhao H, Huo W, Li J, Ma X, Xia W, Pang Z, et al. Exposure to benzophenones, parabens and triclosan among pregnant women in different trimesters. *Sci Total Environ*. 31 déc 2017;607-608:578-85.
7. Polinski KJ, Dabelea D, Hamman RF, Adgate JL, Calafat AM, Ye X, et al. Distribution and predictors of urinary concentrations of phthalate metabolites and phenols among pregnant women in the Healthy Start Study. *Environ Res*. 1 avr 2018;162:308-17.
8. Philippat C, Mortamais M, Chevrier C, Petit C, Calafat AM, Ye X, et al. Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environ Health Perspect*. mars 2012;120(3):464-70.
9. Agay-Shay K, Martinez D, Valvi D, Garcia-Esteban R, Basagaña X, Robinson O, et al. Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals during Pregnancy and Weight at 7 Years of Age: A Multi-pollutant Approach. *Environ Health Perspect*. oct 2015;123(10):1030-7.
10. Vela-Soria F, Jiménez-Díaz I, Díaz C, Pérez J, Iribarne-Durán LM, Serrano-López L, et al. Determination of endocrine-disrupting chemicals in human milk by dispersive liquid-liquid microextraction. *Bioanalysis*. 15 août 2016;8(17):1777-91.
11. Grignon C, Venisse N, Rouillon S, Brunet B, Bacle A, Thevenot S, et al. Ultrasensitive determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urine using a high-throughput UPLC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem*. mars 2016;408(9):2255-63.
12. Migeot V, Dupuis A, Cariot A, Albouy-Llaty M, Pierre F, Rabouan S. Bisphenol a and its chlorinated derivatives in human colostrum. *Environ Sci Technol*. 3 déc 2013;47(23):13791-7.
13. Rodríguez-Gómez R, Jiménez-Díaz I, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón A. A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure. *Talanta*. 1 déc 2014;130:561-70.
14. Cariot A, Dupuis A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S, Migeot V. Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta*. 15 oct 2012;100:175-82.
15. Niu Y, Wang B, Zhao Y, Zhang J, Shao B. Highly Sensitive and High-Throughput Method for the Analysis of Bisphenol Analogues and Their Halogenated Derivatives in Breast Milk. *J Agric Food Chem*. 6 déc 2017;65(48):10452-63.
16. The Wingspread Conference - July 1991 - Chemically-induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection. [Internet]. [cité 21 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.americanhealthstudies.org/wastenot/wn220.htm>

17. Bergman A, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller T. State of the Science of Endocrine Disrupting chemicals. 2012.
18. The EU list of potential endocrine disruptors [Internet]. [cité 2 juill 2018]. Disponible sur: <http://eng.mst.dk/topics/chemicals/endocrine-disruptors/the-eu-list-of-potential-endocrine-disruptors/>
19. European Food Safety Authority. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. 2018.
20. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) . Évaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine [Risk assessment of bisphenol A (BPA) on human health] [Internet]. 2013. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0.pdf>
21. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* juin 2009;30(4):293-342.
22. INSERM - reproduction et environnement - 2011 [Internet]. [cité 9 juin 2014]. Disponible sur: http://www.inserm.fr/content/download/34821/220855/file/Synth%C3%A8se_Reproduction_environnement.pdf
23. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* juin 2012;33(3):378-455.
24. Calabrese EJ. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutat Res.* juill 2002;511(3):181-9.
25. Myers JP, Zoeller RT, vom Saal FS. A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect.* nov 2009;117(11):1652-5.
26. Leon DA, Lithell HO, Vågerö D, Koupilová I, Mohsen R, Berglund L, et al. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ.* 25 juill 1998;317(7153):241-5.
27. Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ.* 16 août 1997;315(7105):396-400.
28. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev.* août 2006;82(8):485-91.
29. McCance DR, Pettitt DJ, Hanson RL, Jacobsson LT, Knowler WC, Bennett PH. Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ.* 9 avr 1994;308(6934):942-5.
30. Troisi J, Mikelson C, Richards S, Symes S, Adair D, Zullo F, et al. Placental concentrations of bisphenol A and birth weight from births in the Southeastern U.S. *Placenta.* nov 2014;35(11):947-52.
31. Veiga-Lopez A, Kannan K, Liao C, Ye W, Domino SE, Padmanabhan V. Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *J Clin Endocrinol Metab.* 25 sept 2015;jc20151724.
32. Weinberger B, Vetrano AM, Archer FE, Marcella SW, Buckley B, Wartenberg D, et al. Effects of maternal exposure to phthalates and bisphenol A during pregnancy on gestational age. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* mars 2014;27(4):323-7.
33. Ferguson KK, McElrath TF, Meeker JD. Environmental phthalate exposure and preterm birth. *JAMA Pediatr.* janv 2014;168(1):61-7.
34. Gascon M, Casas M, Morales E, Valvi D, Ballesteros-Gómez A, Luque N, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2015;135(2):370-8.

35. Guida M, Troisi J, Ciccone C, Granozio G, Cosimato C, Di Spiezio Sardo A, et al. Bisphenol A and congenital developmental defects in humans. *Mutat Res. avr* 2015;774:33-9.
36. Ferguson KK, Peterson KE, Lee JM, Mercado-García A, Blank-Goldenberg C, Téllez-Rojo MM, et al. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reprod Toxicol Elmsford N. août* 2014;47:70-6.
37. Michalakis M, Tzatzarakis MN, Kovatsi L, Alegakis AK, Tsakalof AK, Heretis I, et al. Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. *Toxicol Lett. 15 oct* 2014;230(2):139-45.
38. Kalkbrenner AE, Schmidt RJ, Penlesky AC. Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. nov* 2014;44(10):277-318.
39. Braun JM, Kalkbrenner AE, Just AC, Yolton K, Calafat AM, Sjödin A, et al. Gestational exposure to endocrine-disrupting chemicals and reciprocal social, repetitive, and stereotypic behaviors in 4- and 5-year-old children: the HOME study. *Environ Health Perspect. mai* 2014;122(5):513-20.
40. Braun JM, Yolton K, Stacy SL, Erar B, Papandonatos GD, Bellinger DC, et al. Prenatal environmental chemical exposures and longitudinal patterns of child neurobehavior. *Neurotoxicology. sept* 2017;62:192-9.
41. Andersen HR, Debes F, Wohlfahrt-Veje C, Murata K, Grandjean P. Occupational pesticide exposure in early pregnancy associated with sex-specific neurobehavioral deficits in the children at school age. *Neurotoxicol Teratol. févr* 2015;47:1-9.
42. Cohn BA, La Merrill M, Krigbaum NY, Yeh G, Park J-S, Zimmermann L, et al. DDT Exposure in Utero and Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab. août* 2015;100(8):2865-72.
43. Herbst AL, Scully RE. Adenocarcinoma of the vagina in adolescence. A report of 7 cases including 6 clear-cell carcinomas (so-called mesonephromas). *Cancer. 25(4)*:745-57.
44. Fénichel P, Brucker-Davis F, Chevalier N. The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren--the transgenerational effect. *Ann Endocrinol. juill* 2015;76(3):253-9.
45. Tournaire M, Devouche E, Espié M, Asselain B, Levadou A, Cabau A, et al. Cancer Risk in Women Exposed to Diethylstilbestrol in Utero. *Thérapie. oct* 2015;70(5):433-41.
46. Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, et al. Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Prev Biomark. 1 août* 2006;15(8):1509-14.
47. Tournaire M, Devouche E, Epelboin S, Cabau A, Dunbavand A, Levadou A. Birth defects in children of men exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Thérapie. 3 mars* 2018;
48. Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard M-O, Daures J-P, Sultan C. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil Steril. 30 juin* 2011;95(8):2574-7.
49. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature. mai* 2006;441(7092):469-74.
50. Svengen T, Vinggaard AM. The risk of chemical cocktail effects and how to deal with the issue. *J Epidemiol Community Health. avr* 2016;70(4):322-3.
51. Kortenkamp A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curr Opin Pharmacol. déc* 2014;19:105-11.
52. Delfosse V, Dendele B, Huet T, Grimaldi M, Boulahtouf A, Gerbal-Chaloin S, et al. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat Commun. 3 sept* 2015;6:8089.
53. INSERM. Bisphenol A - effets sur la reproduction [Internet]. [cité 3 juin 2014]. Disponible sur: http://www.inserm.fr/content/download/11756/88171/file/synthese_EC_bisphenol_a_vers_final.pdf

54. Bisphénol A (FT 279). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 25 mars 2018]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_279
55. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*. oct 2002;15(10):1281-7.
56. Völkel W, Bittner N, Dekant W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. nov 2005;33(11):1748-57.
57. Commission européenne Joint Research Centre. European Union Risk Assessment Report - Human Health of April 2008 - 4,4'-ISOPROPYLIDENEDIPHENOL (Bisphenol-A) - Part 2 Human Health. Publications Office of the European Union, Luxembourg. 2010.
58. ANSES. Connaissances relatives aux usages du bisphénol-A - 09/2011- 2009-SA-0331 et n°2010-SA-0197 [Internet]. [cité 3 juin 2014]. Disponible sur: <http://www.anses.fr/Documents/CHIM-Ra-BisphenolA.pdf>
59. INERIS. Données technico- économiques sur les substances chimiques en France - Rapport d'étude - le bisphénol-A. 2010.
60. Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ Int*. oct 2015;83:107-15.
61. Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*. janv 2011;82(3):424-30.
62. Marquet F, Payan J-P, Beydon D, Wathier L, Grandclaude M-C, Ferrari E. In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [¹⁴C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol*. sept 2011;85(9):1035-43.
63. Csanády GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol*. juin 2002;76(5-6):299-305.
64. Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere*. mars 2001;42(8):917-22.
65. Michałowicz J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. mars 2014;37(2):738-58.
66. Nakamura S, Tezuka Y, Ushiyama A, Kawashima C, Kitagawara Y, Takahashi K, et al. Ipso substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity. *Toxicol Lett*. 30 mai 2011;203(1):92-5.
67. Knaak JB, Sullivan LJ. Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. mars 1966;8(2):175-84.
68. Jaeg JP, Perdu E, Dolo L, Debrauwer L, Cravedi J-P, Zalko D. Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *J Agric Food Chem*. 28 juill 2004;52(15):4935-42.
69. Atkinson A, Roy D. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen*. 1995;26(1):60-6.
70. Ye X, Zhou X, Needham LL, Calafat AM. In-vitro oxidation of bisphenol A: Is bisphenol A catechol a suitable biomarker for human exposure to bisphenol A? *Anal Bioanal Chem*. janv 2011;399(3):1071-9.
71. Mazur CS, Kenneke JF, Hess-Wilson JK, Lipscomb JC. Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. déc 2010;38(12):2232-8.
72. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere*. déc 2008;74(1):33-6.
73. Hanioka N, Oka H, Nagaoka K, Ikushiro S, Narimatsu S. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation. *Arch Toxicol*. nov 2011;85(11):1373-81.

74. Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SC, Fennell TR. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 nov 2000;168(3):225-34.
75. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol.* févr 2001;14(2):149-57.
76. European Commission, Directorate General for Health & Consumers. Clarification on opinion SCCS [Internet]. Luxembourg: European Commission; 2011 [cité 18 mars 2018]. Disponible sur: <http://dx.publications.europa.eu/10.2772/20395>
77. World Health Organization. Toxicological and health aspects of bisphenol A [Internet]. [cité 18 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/foodsafety/publications/bisphenol-a/en/>
78. Sperker B, Backman JT, Kroemer HK. The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin Pharmacokinet.* juill 1997;33(1):18-31.
79. Iwamori M. Estrogen sulfatase. *Methods Enzymol.* 2005;400:293-302.
80. Ginsberg G, Rice DC. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect.* nov 2009;117(11):1639-43.
81. Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect.* sept 2010;118(9):1196-203.
82. Bisphenol A and baby bottles: challenges and perspectives - EU Science Hub - European Commission [Internet]. EU Science Hub. 2013 [cité 8 juill 2018]. Disponible sur: <https://ec.europa.eu/jrc/en/news/bisphenol-and-baby-bottles-challenges-and-perspectives-8351>
83. Inoue H, Tsuruta A, Kudo S, Ishii T, Fukushima Y, Iwano H, et al. Bisphenol a glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* janv 2005;33(1):55-9.
84. Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM Jr. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* mars 2000;54(1):3-18.
85. Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett.* 10 juill 2008;179(3):155-62.
86. Liao C, Kannan K. Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol.* 1 mai 2012;46(9):5003-9.
87. Arbuckle TE, Marro L, Davis K, Fisher M, Ayotte P, Bélanger P, et al. Exposure to free and conjugated forms of bisphenol A and triclosan among pregnant women in the MIREC cohort. *Environ Health Perspect.* avr 2015;123(4):277-84.
88. Nachman RM, Fox SD, Golden WC, Sibinga E, Groopman JD, Lees PSJ. Serial Free Bisphenol A and Bisphenol A Glucuronide Concentrations in Neonates. *J Pediatr.* juill 2015;167(1):64-9.
89. Nachman RM, Fox SD, Golden WC, Sibinga E, Veenstra TD, Groopman JD, et al. Urinary free bisphenol A and bisphenol A-glucuronide concentrations in newborns. *J Pediatr.* avr 2013;162(4):870-2.
90. Battal D, Cok I, Unlusayin I, Aktas A, Tunctan B. Determination of urinary levels of Bisphenol A in a Turkish population. *Environ Monit Assess.* déc 2014;186(12):8443-52.
91. Battal D, Cok I, Unlusayin I, Tunctan B. Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantitative analysis of free and conjugated bisphenol A in human urine. *Biomed Chromatogr BMC.* mai 2014;28(5):686-93.
92. Provencher G, Bérubé R, Dumas P, Bienvenu J-F, Gaudreau E, Bélanger P, et al. Determination of bisphenol A, triclosan and their metabolites in human urine using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 27 juin 2014;1348:97-104.

93. Trabert B, Falk RT, Figueroa JD, Graubard BI, Garcia-Closas M, Lissowska J, et al. Urinary bisphenol A-glucuronide and postmenopausal breast cancer in Poland. *Cancer Causes Control CCC*. déc 2014;25(12):1587-93.
94. Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Yang X, Fisher JW, Seryak LM, et al. 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 oct 2015;288(2):131-42.
95. Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology*. janv 2007;148(1):116-27.
96. Dodds EC, Lawson W. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*. juin 1936;137(3476):996.
97. Tohmé M, Prud'homme SM, Boulahtouf A, Samarut E, Brunet F, Bernard L, et al. Estrogen-related receptor γ is an in vivo receptor of bisphenol A. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. juill 2014;28(7):3124-33.
98. Kwintkiewicz J, Nishi Y, Yanase T, Giudice LC. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environ Health Perspect*. mars 2010;118(3):400-6.
99. Bonaccorsi L, Nosi D, Quercioli F, Formigli L, Zecchi S, Maggi M, et al. Prostate cancer: a model of integration of genomic and non-genomic effects of the androgen receptor in cell lines model. *Steroids*. oct 2008;73(9-10):1030-7.
100. Iordanidou A, Hadzopoulou-Cladaras M, Lazou A. Non-genomic effects of thyroid hormone in adult cardiac myocytes: relevance to gene expression and cell growth. *Mol Cell Biochem*. juill 2010;340(1-2):291-300.
101. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol Elmsford N*. sept 2007;24(2):139-77.
102. Geens T, Roosens L, Neels H, Covaci A. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*. 1 août 2009;76(6):755-60.
103. Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, Werres F, et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res*. juill 2010;44(14):4115-26.
104. Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage*. 15 août 2012;104:19-34.
105. Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y. Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*. août 2001;44(5):973-9.
106. Belfroid A, van Velzen M, van der Horst B, Vethaak D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere*. oct 2002;49(1):97-103.
107. Wang X, Diao C-P, Zhao R-S. Rapid determination of bisphenol A in drinking water using dispersive liquid-phase microextraction with in situ derivatization prior to GC-MS. *J Sep Sci*. janv 2009;32(1):154-9.
108. Li X, Ying G-G, Su H-C, Yang X-B, Wang L. Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environ Int*. août 2010;36(6):557-62.
109. Sodr e FF, Locatelli MAF, Jardim WF. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. *Water Air Soil Pollut*. 1 f evr 2010;206(1-4):57-67.
110. Santhi VA, Sakai N, Ahmad ED, Mustafa AM. Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Sci Total Environ*. 15 juin 2012;427-428:332-8.
111. Arnold SM, Clark KE, Staples CA, Klecka GM, Dimond SS, Caspers N, et al. Relevance of drinking water as a source of human exposure to bisphenol A. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. mars 2013;23(2):137-44.

112. Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK, Lordo RA, Sheldon LS. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res.* janv 2007;103(1):9-20.
113. LOI n° 2010-729 du 30 juin 2010 tendant à suspendre la commercialisation de tout conditionnement comportant du bisphénol A et destiné à recevoir des produits alimentaires. 2010.
114. LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A. 2012.
115. LOI constitutionnelle n° 2005-205 du 1er mars 2005 relative à la Charte de l'environnement.
116. European Chemicals Agency. MSC unanimously agrees that Bisphenol A is an endocrine disruptor [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>
117. HCSP. Refonte de la Directive européenne 98/83 sur l'eau potable. [Internet]. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2018 mars [cité 18 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=649>
118. von Goetz N, Wormuth M, Scheringer M, Hungerbühler K. Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal Off Publ Soc Risk Anal.* mars 2010;30(3):473-87.
119. Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 avr 2008;228(1):114-34.
120. Sajiki J, Miyamoto F, Fukata H, Mori C, Yonekubo J, Hayakawa K. Bisphenol A (BPA) and its source in foods in Japanese markets. *Food Addit Contam.* janv 2007;24(1):103-12.
121. Muncke J. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *Sci Total Environ.* 1 août 2009;407(16):4549-59.
122. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics.* oct 2010;126(4):760-8.
123. Joskow R, Barr DB, Barr JR, Calafat AM, Needham LL, Rubin C. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc* 1939. mars 2006;137(3):353-62.
124. Fung EY, Ewoldsen NO, St Germain HA, Marx DB, Miaw CL, Siew C, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc* 1939. janv 2000;131(1):51-8.
125. Gallard H, Leclercq A, Croué J-P. Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere.* août 2004;56(5):465-73.
126. Yamamoto T, Yasuhara A. Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere.* mars 2002;46(8):1215-23.
127. Deborde M, von Gunten U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res.* janv 2008;42(1-2):13-51.
128. Andra SS, Charisiadis P, Arora M, van Vliet-Ostaptchouk JV, Makris KC. Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ Int.* déc 2015;85:352-79.
129. Fukazawa H, Watanabe M, Shiraishi F, Shiraishi H, Shiozawa T, Matsushita H, et al. Formation of chlorinated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J Health Sci.* 48(242-249).
130. Liu H, Zhao H, Quan X, Zhang Y, Chen S. Formation of chlorinated intermediate from bisphenol A in surface saline water under simulated solar light irradiation. *Environ Sci Technol.* 15 oct 2009;43(20):7712-7.

131. Horikoshi S, Miura T, Kajitani M, Horikoshi N, Serpone N. Photodegradation of tetrahalobisphenol-A (X=Cl, Br) flame retardants and delineation of factors affecting the process. *Appl Catal B Environ.* 1 déc 2008;84(3):797-802.
132. Zalko D, Prouillac C, Riu A, Perdu E, Dolo L, Jouanin I, et al. Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions. *Chemosphere.* juin 2006;64(2):318-27.
133. Kuruto-Niwa R, Terao Y, Nozawa R. Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol.* août 2002;12(1):27-35.
134. Riu A, le Maire A, Grimaldi M, Audebert M, Hillenweck A, Bourguet W, et al. Characterization of novel ligands of ER α , ER β , and PPAR γ : the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* août 2011;122(2):372-82.
135. Riu A, Grimaldi M, le Maire A, Bey G, Phillips K, Boulahtouf A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect.* sept 2011;119(9):1227-32.
136. le Maire A, Grimaldi M, Roecklin D, Dagnino S, Vivat-Hannah V, Balaguer P, et al. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO Rep.* avr 2009;10(4):367-73.
137. Riu A, McCollum CW, Pinto CL, Grimaldi M, Hillenweck A, Perdu E, et al. Halogenated bisphenol-A analogs act as obesogens in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* mai 2014;139(1):48-58.
138. Mutou Y, Ibuki Y, Terao Y, Kojima S, Goto R. Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol a after exposure to ultraviolet B. *Biol Pharm Bull.* oct 2006;29(10):2116-9.
139. Hu J-Y, Aizawa T, Ookubo S. Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol.* 1 mai 2002;36(9):1980-7.
140. Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K. In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology.* 14 févr 2005;207(2):215-21.
141. Dupuis A, Migeot V, Cariot A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S. Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int.* nov 2012;19(9):4193-205.
142. Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT. On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A.* 21 mai 2010;1217(21):3511-8.
143. Casatta N, Mascolo G, Roscioli C, Viganò L. Tracing endocrine disrupting chemicals in a coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy): Sediment contamination and bioaccumulation in Manila clams. *Sci Total Environ.* 1 avr 2015;511:214-22.
144. Chang B-V, Liu J-H, Liao C-S. Aerobic degradation of bisphenol-A and its derivatives in river sediment. *Environ Technol.* 16 févr 2014;35(4):416-24.
145. Voordeckers JW, Fennell DE, Jones K, Häggblom MM. Anaerobic Biotransformation of Tetrabromobisphenol A, Tetrachlorobisphenol A, and Bisphenol A in Estuarine Sediments. *Environ Sci Technol.* 1 févr 2002;36(4):696-701.
146. Yuan SY, Chen SJ, Chang BV. Anaerobic degradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1 janv 2011;65(1):185-90.
147. Dorival-García N, Zafra-Gómez A, Navalón A, Vílchez JL. Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *J Chromatogr A.* 31 août 2012;1253:1-10.
148. Ruan T, Liang D, Song S, Song M, Wang H, Jiang G. Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere.* 1 avr 2015;124:150-5.

149. Kosaka K, Hayashida T, Terasaki M, Asami M, Yamada T, Itoh M, et al. Elution of bisphenol A and its chlorination by-products from lined pipes in water supply process. *Water Sci Technol Water Supply*. 1 oct 2012;12(6):791-8.
150. Fan Z, Hu J, An W, Yang M. Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds. *Environ Sci Technol*. 1 oct 2013;47(19):10841-50.
151. Lane RF, Adams CD, Randtke SJ, Carter RE. Chlorination and chloramination of bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol A diglycidyl ether in drinking water. *Water Res*. 1 août 2015;79:68-78.
152. Yang Y, Li Z, Zhang J, Yang Y, Shao B. Simultaneous determination of bisphenol A, bisphenol AF, tetrachlorobisphenol A, and tetrabromobisphenol A concentrations in water using on-line solid-phase extraction with ultrahigh-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Int J Environ Anal Chem*. 2 janv 2014;94(1):16-27.
153. Yuan SY, Li HT, Huang HW, Chang BV. Biodegradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment and the microbial community changes. *J Environ Sci Health B*. juill 2010;45(5):360-5.
154. Song S, Song M, Zeng L, Wang T, Liu R, Ruan T, et al. Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environ Pollut*. 1 mars 2014;186:14-9.
155. Zhou Y, Chen M, Zhao F, Mu D, Zhang Z, Hu J. Ubiquitous Occurrence of Chlorinated Byproducts of Bisphenol A and Nonylphenol in Bleached Food Contacting Papers and Their Implications for Human Exposure. *Environ Sci Technol*. 16 juin 2015;49(12):7218-26.
156. Dodson RE, Nishioka M, Standley LJ, Perovich LJ, Brody JG, Rudel RA. Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environ Health Perspect*. juill 2012;120(7):935-43.
157. Odabasi M. Halogenated Volatile Organic Compounds from the Use of Chlorine-Bleach-Containing Household Products. *Environ Sci Technol*. 1 mars 2008;42(5):1445-51.
158. Nazaroff WW, Weschler CJ. Cleaning products and air fresheners: exposure to primary and secondary air pollutants. *Atmos Environ*. 1 juin 2004;38(18):2841-65.
159. Olson DA, Corsi RL. In-home formation and emissions of trihalomethanes: the role of residential dishwashers. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. mars 2004;14(2):109-19.
160. Leri AC, Anthony LN. Formation of organochlorine by-products in bleached laundry. *Chemosphere*. févr 2013;90(6):2041-9.
161. Naumann K. Influence of chlorine substituents on biological activity of chemicals. *J Für Prakt Chem*. juin 1999;341(5):417-35.
162. Vela-Soria F, Ballesteros O, Zafra-Gómez A, Ballesteros L, Navalón A. UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. *Anal Bioanal Chem*. 1 juin 2014;406(15):3773-85.
163. Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, Navalón A, Ballesteros O, Pulgar R, et al. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol Elmsford N*. sept 2007;24(2):259-64.
164. Jiménez-Díaz I, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navea N, Navalón A, Fernández MF, et al. Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 15 déc 2010;878(32):3363-9.
165. Vela-Soria F, Ballesteros O, Camino-Sánchez FJ, Zafra-Gómez A, Ballesteros L, Navalón A. Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Microchem J*. 1 janv 2015;118:32-9.
166. Vela-Soria F, Jiménez-Díaz I, Rodríguez-Gómez R, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Fernández MF, et al. A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC-MS/MS. *Anal Methods*. 1 sept 2011;3(9):2073-81.

167. del Olmo M, Zafra A, Suárez B, Gonzalez-Casado A, Taoufik J, Vílchez JL. Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25 mars 2005;817(2):167-72.
168. Venisse N, Grignon C, Brunet B, Thévenot S, Bacle A, Migeot V, et al. Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC-MS/MS method. *Talanta.* 1 juill 2014;125:284-92.
169. Yang Y, Guan J, Yin J, Shao B, Li H. Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere.* 1 oct 2014;112:481-6.
170. Kalyvas H, Andra SS, Charisiadis P, Karaolis C, Makris KC. Influence of household cleaning practices on the magnitude and variability of urinary monochlorinated bisphenol A. *Sci Total Environ.* 15 août 2014;490:254-61.
171. Haman C, Dauchy X, Rosin C, Munoz J-F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. *Water Res.* 1 janv 2015;68:1-11.
172. Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* oct 2002;40(10):1335-73.
173. Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol JAT.* juill 2008;28(5):561-78.
174. Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Bishop AM, Needham LL. Urinary Concentrations of Four Parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006. *Environ Health Perspect.* mai 2010;118(5):679-85.
175. Lakeram M, Paine AJ, Lockley DJ, Sanders DJ, Pendlington R, Forbes B. Transesterification of p-hydroxybenzoate esters (parabens) by human intestinal (Caco-2) cells. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* sept 2006;36(9):739-49.
176. Aubert N, Ameller T, Legrand J-J. Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food Chem Toxicol.* 1 mars 2012;50(3):445-54.
177. Frederiksen H, Taxvig C, Hass U, Vinggaard AM, Nellemann C. Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* déc 2008;106(2):376-83.
178. Janjua NR, Mortensen GK, Andersson A-M, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol.* 1 août 2007;41(15):5564-70.
179. Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshino T, Matsukuma S, Tsuji T. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J Appl Toxicol JAT.* févr 2007;27(1):1-9.
180. Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* juill 2005;43(7):985-1015.
181. Lobemeier C, Tschötschel C, Westie S, Heymann E. Hydrolysis of parabenes by extracts from differing layers of human skin. *Biol Chem.* oct 1996;377(10):647-51.
182. Jones P., Thigpen D, Morrison J., Richardson A. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. III. The physiological disposition of p-hydroxybenzoic acid and its esters. *Journal of American Pharmaceutical Association.* 1956;(45):265-73.
183. Sabalitschka T, Neufeld-Crzelliter R. Behavior of p-hydroxy-benzoic acid in human body. 1954;rzneimittel-Forsch 4:575–579.
184. Moos RK, Angerer J, Dierkes G, Brüning T, Koch HM. Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Arch Toxicol.* nov 2016;90(11):2699-709.

185. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol.* nov 1998;153(1):12-9.
186. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* déc 2001;39(12):1225-32.
187. Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* janv 2002;80(1):49-60.
188. Lemini C, Jaimez R, Avila ME, Franco Y, Larrea F, Lemus AE. In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol Ind Health.* juill 2003;19(2-6):69-79.
189. Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology.* 11 avr 2007;232(3):248-56.
190. Charnock C, Finsrud T. Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *J Clin Pharm Ther.* déc 2007;32(6):567-72.
191. Zhang S, Mueller C. Comparative analysis of volatiles in traditionally cured Bourbon and Ugandan vanilla bean (*Vanilla planifolia*) extracts. *J Agric Food Chem.* 24 oct 2012;60(42):10433-44.
192. INERIS. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France - Parabènes [Internet]. 2015. Disponible sur: <https://substances.ineris.fr/fr/substance/getDocument/9833>
193. Tavares RS, Martins FC, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J, Peixoto FP. Parabens in male infertility-is there a mitochondrial connection? *Reprod Toxicol Elmsford N.* janv 2009;27(1):1-7.
194. Guo Y, Kannan K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol.* 17 déc 2013;47(24):14442-9.
195. Andersen F. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol.* 2008;27 Suppl 4:1-82.
196. Bazin I, Gadal A, Touraud E, Roig B. Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) in the Environment: Data for Environmental Toxicity Assessment. In: *Xenobiotics in the Urban Water Cycle.* Springer, Dordrecht; 2010. p. 245-57. (Environmental Pollution).
197. Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Médicaments et Parabènes - Point d'information [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Medicaments-et-Parabenes-Point-d-information>
198. Les Parabènes - Cancer et environnement [Internet]. 2017. Disponible sur: <http://www.cancer-environnement.fr/420-Parabenes.ce.aspx>
199. Botta F, Dulio V. Etude - Contaminants émergents dans les eaux de surface continentales (données 2012) - Eaufrance [Internet]. 2014 [cité 26 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.eaufrance.fr/ressources/documents/etude-contaminants-emergents-dans>
200. Canosa P, Rodríguez I, Rubí E, Bollaín MH, Cela R. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. *J Chromatogr A.* 18 août 2006;1124(1-2):3-10.
201. Gasperi J, Geara D, Lorgeoux C, Bressy A, Zedek S, Rocher V, et al. First assessment of triclosan, triclocarban and paraben mass loads at a very large regional scale: case of Paris conurbation (France). *Sci Total Environ.* 15 sept 2014;493:854-61.
202. Carmona E, Andreu V, Picó Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: from waste to drinking water. *Sci Total Environ.* 15 juin 2014;484:53-63.

203. Blanco E, Casais M del C, Mejuto M del C, Cela R. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta*. 4 août 2009;647(1):104-11.
204. Casas Ferreira AM, Möder M, Fernández Laespada ME. GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. *Anal Bioanal Chem*. janv 2011;399(2):945-53.
205. Loraine GA, Pettigrove ME. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ Sci Technol*. 1 févr 2006;40(3):687-95.
206. Académie nationale de Pharmacie. Parabènes et médicaments : un problème de santé publique ? [Internet]. 2013. Disponible sur: http://www.acadpharm.org/dos_public/Recommandations_parabenes_et_medicaments_Conseil_22.05.2013_VF_27.05.2013.pdf
207. Moos RK, Koch HM, Angerer J, Apel P, Schröter-Kermani C, Brüning T, et al. Parabens in 24 h urine samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2012. *Int J Hyg Environ Health*. oct 2015;218(7):666-74.
208. Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson A-M. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol*. juin 2011;21(3):262-71.
209. Nieuwenhuijsen M. Exposure assessment in occupational and environmental epidemiology. 2003;
210. Angerer J, Bird MG, Burke TA, Doerrer NG, Needham L, Robison SH, et al. Strategic biomonitoring initiatives: moving the science forward. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. sept 2006;93(1):3-10.
211. Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Brüning T. Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res*. janv 2011;55(1):7-31.
212. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: State of the art. *Int J Hyg Environ Health*. 22 mai 2007;210(3):201-28.
213. Needham LL, Calafat AM, Barr DB. Uses and issues of biomonitoring. *Int J Hyg Environ Health*. 22 mai 2007;210(3):229-38.
214. Barr DB, Wang RY, Needham LL. Biologic Monitoring of Exposure to Environmental Chemicals throughout the Life Stages: Requirements and Issues for Consideration for the National Children's Study. *Environ Health Perspect*. août 2005;113(8):1083-91.
215. Calafat AM, Longnecker MP, Koch HM, Swan SH, Hauser R, Goldman LR, et al. Optimal Exposure Biomarkers for Nonpersistent Chemicals in Environmental Epidemiology. *Environ Health Perspect*. juill 2015;123(7):A166-168.
216. OMS. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. 2001.
217. Needham LL, Ozkaynak H, Whyatt RM, Barr DB, Wang RY, Naeher L, et al. Exposure assessment in the National Children's Study: introduction. *Environ Health Perspect*. août 2005;113(8):1076-82.
218. NORMAN, Protocol for the validation of chemical and biological monitoring methods. 2009.
219. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005.
220. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation, 2001.
221. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on Bioanalytical Method Validation, 2015.

222. Ye X, Kuklennyik Z, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 21 nov 2006;844(1):53-9.
223. Lee S-Y, Son E, Kang J-Y, Lee H-S, Shin M-K, Nam H-S, et al. Development of a Quantitative Analytical Method for Determining the Concentration of Human Urinary Paraben by LC-MS/MS. *Bull Korean Chem Soc.* 2013;34(4):1131-6.
224. Nahar MS, Soliman AS, Colacino JA, Calafat AM, Battige K, Hablas A, et al. Urinary bisphenol A concentrations in girls from rural and urban Egypt: a pilot study. *Environ Health Glob Access Sci Source.* 2 avr 2012;11:20.
225. Jian W, Edom RW, Weng N. Important considerations for quantitation of small-molecule biomarkers using LC-MS. *Bioanalysis.* 1 oct 2012;4(20):2431-4.
226. Anderson DJ, Brozek EM, Cox KJ, Porucznik CA, Wilkins DG. Biomonitoring method for bisphenol A in human urine by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15 mars 2014;0:53-61.
227. Ito R, Takahashi E, Funamizu N. Production of slow-released nitrogen fertilizer from urine. *Environ Technol.* oct 2013;34(17-20):2809-15.
228. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 1 juill 2003;75(13):3019-30.
229. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 août 2009;877(23):2198-207.
230. Kemperman RFJ, Horvatovich PL, Hoekman B, Reijmers TH, Muskiet FAJ, Bischoff R. Comparative Urine Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Multivariate Statistics: Method Development, Evaluation, and Application to Proteinuria. *J Proteome Res.* 1 janv 2007;6(1):194-206.
231. Medina DAV, Santos-Neto AJ, Cerdà V, Maya F. Automated dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of the organic phase. *Talanta.* 1 nov 2018;189:241-8.
232. Nakiwala D, Peyre H, Heude B, Bernard JY, Béranger R, Slama R, et al. In-utero exposure to phenols and phthalates and the intelligence quotient of boys at 5 years. *Environ Health Glob Access Sci Source.* 20 févr 2018;17(1):17.
233. Fisher M, MacPherson S, Braun JM, Hauser R, Walker M, Feeley M, et al. Paraben Concentrations in Maternal Urine and Breast Milk and Its Association with Personal Care Product Use. *Environ Sci Technol.* 4 avr 2017;51(7):4009-17.
234. Wu C, Huo W, Li Y, Zhang B, Wan Y, Zheng T, et al. Maternal urinary paraben levels and offspring size at birth from a Chinese birth cohort. *Chemosphere.* avr 2017;172:29-36.
235. Azzouz A, Rascón AJ, Ballesteros E. Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 5 févr 2016;119:16-26.
236. Nishihama Y, Yoshinaga J, Iida A, Konishi S, Imai H, Yoneyama M, et al. Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan. *Reprod Toxicol.* 1 août 2016;63:107-13.
237. Jiménez-Díaz I, Artacho-Cordón F, Vela-Soria F, Belhassen H, Arrebola JP, Fernández MF, et al. Urinary levels of bisphenol A, benzophenones and parabens in Tunisian women: A pilot study. *Sci Total Environ.* 15 août 2016;562:81-8.
238. Hines EP, Mendola P, von Ehrenstein OS, Ye X, Calafat AM, Fenton SE. Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. *Reprod Toxicol Elmsford N.* juill 2015;54:120-8.

239. Gavin QW, Ramage RT, Waldman JM, She J. Development of HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of environmental phenols in human urine. *Int J Environ Anal Chem.* 26 janv 2014;94(2):168-82.
240. Moos RK, Angerer J, Wittsiepe J, Wilhelm M, Brüning T, Koch HM. Rapid determination of nine parabens and seven other environmental phenols in urine samples of German children and adults. *Int J Hyg Environ Health.* nov 2014;217(8):845-53.
241. Philippat C, Botton J, Calafat AM, Ye X, Charles M-A, Slama R. Prenatal Exposure to Phenols and Growth in Boys. *Epidemiol Camb Mass.* sept 2014;25(5):625-35.
242. Asimakopoulos AG, Wang L, Thomaidis NS, Kannan K. A multi-class bioanalytical methodology for the determination of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters, benzophenone-type ultraviolet filters, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 10 janv 2014;1324:141-8.
243. Meeker JD, Cantonwine DE, Rivera-González LO, Ferguson KK, Mukherjee B, Calafat AM, et al. Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico. *Environ Sci Technol.* 2 avr 2013;47(7):3439-47.
244. Shirai S, Suzuki Y, Yoshinaga J, Shiraishi H, Mizumoto Y. Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women. *Reprod Toxicol.* 1 janv 2013;35:96-101.
245. Kang S, Kim S, Park J, Kim H-J, Lee J, Choi G, et al. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. *Sci Total Environ.* 1 sept 2013;461-462:214-21.
246. Frederiksen H, Nielsen JKS, Mørck TA, Hansen PW, Jensen JF, Nielsen O, et al. Urinary excretion of phthalate metabolites, phenols and parabens in rural and urban Danish mother-child pairs. *Int J Hyg Environ Health.* nov 2013;216(6):772-83.
247. Smith KW, Braun JM, Williams PL, Ehrlich S, Correia KF, Calafat AM, et al. Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. *Environ Health Perspect.* nov 2012;120(11):1538-43.
248. Casas L, Fernández MF, Llop S, Guxens M, Ballester F, Olea N, et al. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. *Environ Int.* juill 2011;37(5):858-66.
249. Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. *Environ Health Perspect.* déc 2006;114(12):1843-6.
250. Vela-Soria F, Iribarne-Durán LM, Mustieles V, Jiménez-Díaz I, Fernández MF, Olea N. QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of parabens and ultraviolet filters in human milk samples. *J Chromatogr A.* 20 avr 2018;1546:1-9.
251. Souza ID, Melo LP, Jardim ICSF, Monteiro JCS, Nakano AMS, Queiroz MEC. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. *Anal Chim Acta.* 17 août 2016;932:49-59.
252. Ye X, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Anal Chim Acta.* 1 août 2008;622(1):150-6.
253. Zoffoli HJO, Varella CAA, do Amaral-Sobrinho NMB, Zonta E, Tolón-Becerra A. Method of median semi-variance for the analysis of left-censored data: comparison with other techniques using environmental data. *Chemosphere.* nov 2013;93(9):1701-9.
254. Baccarelli A, Pfeiffer R, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Patterson DG, et al. Handling of dioxin measurement data in the presence of non-detectable values: Overview of available methods and their application in the Seveso chloracne study. *Chemosphere.* 1 août 2005;60(7):898-906.

255. Lee J, Choi K, Park J, Moon H-B, Choi G, Lee JJ, et al. Bisphenol A distribution in serum, urine, placenta, breast milk, and umbilical cord serum in a birth panel of mother–neonate pairs. *Sci Total Environ.* 1 juin 2018;626:1494-501.
256. Philips EM, Jaddoe VWV, Asimakopoulos AG, Kannan K, Steegers EAP, Santos S, et al. Bisphenol and phthalate concentrations and its determinants among pregnant women in a population-based cohort in the Netherlands, 2004-5. *Environ Res.* févr 2018;161:562-72.
257. Dereumeaux C, Saoudi A, Pecheux M, Berat B, de Crouy-Chanel P, Zaros C, et al. Biomarkers of exposure to environmental contaminants in French pregnant women from the Elfe cohort in 2011. *Environ Int.* 2016;97:56-67.
258. Arbuckle TE, Davis K, Marro L, Fisher M, Legrand M, LeBlanc A, et al. Phthalate and bisphenol A exposure among pregnant women in Canada--results from the MIREC study. *Environ Int.* juill 2014;68:55-65.
259. Quirós-Alcalá L, Eskenazi B, Bradman A, Ye X, Calafat AM, Harley K. Determinants of urinary bisphenol A concentrations in Mexican/Mexican-American pregnant women. *Environ Int.* sept 2013;59:152-60.
260. Casas M, Valvi D, Luque N, Ballesteros-Gomez A, Carsin A-E, Fernandez MF, et al. Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children. *Environ Int.* 1 juin 2013;56:10-8.
261. Woodruff TJ, Zota AR, Schwartz JM. Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003-2004. *Environ Health Perspect.* juin 2011;119(6):878-85.
262. Ye X, Pierik FH, Angerer J, Meltzer HM, Jaddoe VWV, Tiemeier H, et al. Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int J Hyg Environ Health.* sept 2009;212(5):481-91.
263. Ye X, Pierik FH, Hauser R, Duty S, Angerer J, Park MM, et al. Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. *Environ Res.* oct 2008;108(2):260-7.
264. Deceuninck Y, Bichon E, Marchand P, Boquien C-Y, Legrand A, Boscher C, et al. Determination of bisphenol A and related substitutes/analogues in human breast milk using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 1 mars 2015;407(9):2485-97.
265. Nakao T, Akiyama E, Kakutani H, Mizuno A, Aozasa O, Akai Y, et al. Levels of Tetrabromobisphenol A, Tribromobisphenol A, Dibromobisphenol A, Monobromobisphenol A, and Bisphenol A in Japanese Breast Milk. *Chem Res Toxicol.* 20 avr 2015;28(4):722-8.
266. Cao X-L, Popovic S, Arbuckle TE, Fraser WD. Determination of free and total bisphenol A in human milk samples from Canadian women using a sensitive and selective GC-MS method. *Food Addit Contam Part Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2015;32(1):120-5.
267. Mendonca K, Hauser R, Calafat AM, Arbuckle TE, Duty SM. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *Int Arch Occup Environ Health.* 1 janv 2014;87(1):13-20.
268. Samanidou VF, Frysalis MA, Papadoyannis IN. Matrix Solid Phase Dispersion for the Extraction of Bisphenol-a from Human Breast Milk Prior to Hplc Analysis. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 20 janv 2014;37(2):247-58.
269. Zimmers SM, Browne EP, O'Keefe PW, Anderton DL, Kramer L, Reckhow DA, et al. Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. *Chemosphere.* 1 juin 2014;104:237-43.
270. Yi B, Kim C, Yang M. Biological monitoring of bisphenol A with HPLC/FLD and LC/MS/MS assays. *J Chromatogr B.* 1 oct 2010;878(27):2606-10.
271. Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere.* 1 janv 2007;66(6):1160-4.

272. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2 févr 2006;831(1-2):110-5.
273. Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr.* 18(8):501-7.
274. Otaka H, Yasuhara A, Morita M. Determination of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in Human Milk Using Alkaline Digestion and Cleanup by Solid-Phase Extraction. *Anal Sci.* 2003;19(12):1663-6.
275. Dewalque L, Pirard C, Vandepaer S, Charlier C. Temporal variability of urinary concentrations of phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in a Belgian adult population. *Environ Res.* oct 2015;142:414-23.
276. Braun JM, Smith KW, Williams PL, Calafat AM, Berry K, Ehrlich S, et al. Variability of urinary phthalate metabolite and bisphenol A concentrations before and during pregnancy. *Environ Health Perspect.* mai 2012;120(5):739-45.
277. Fisher M, Arbuckle TE, Mallick R, LeBlanc A, Hauser R, Feeley M, et al. Bisphenol A and phthalate metabolite urinary concentrations: Daily and across pregnancy variability. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* mai 2015;25(3):231-9.
278. Stahlhut RW, van Breemen RB, Gerona RR, Taylor JA, Welshons WV, vom Saal FS. Comment on « Optimal Exposure Biomarkers for Nonpersistent Chemicals in Environmental Epidemiology ». *Environ Health Perspect.* avr 2016;124(4):A66.
279. Calafat AM, Longnecker MP, Koch HM, Swan SH, Hauser R, Goldman LR, et al. Response to « Comment on “Optimal Exposure Biomarkers for Nonpersistent Chemicals in Environmental Epidemiology” ». *Environ Health Perspect.* avr 2016;124(4):A66-67.
280. Grignon C, Dupuis A, Albouy-Llaty M, Condylis M, Barrier L, Carato P, et al. Validation of a probe for assessing deconjugation of glucuronide and sulfate phase II metabolites assayed through LC-MS/MS in biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 sept 2017;1061-1062:72-8.
281. 15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (IATDMCT) [Internet]. 2017. Disponible sur: <http://www.iatdmct2017.jp/>

RÉSUMÉ

Développement et validation de méthodes pour le biomonitoring de perturbateurs endocriniens chez la femme enceinte

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont présents dans notre vie quotidienne, comme c'est le cas pour le Bisphénol-A (BPA), ses dérivés chlorés (Clx-BPA) et les parabènes (PB). Ils agissent pour de très faibles doses, leurs effets peuvent être potentialisés suite à une exposition à des mélanges et de nombreuses affections chez l'enfant et l'adulte sont associées à une exposition *in utero* à ces molécules. Plusieurs études ont évalué l'exposition de femmes enceintes à des mélanges de PE au moyen de dosages dans les urines et le colostrum, mais aucune n'inclut les Clx-BPA dans le mélange. Ce travail avait pour objectif de développer des méthodes d'analyses ultrasensibles permettant de doser les fractions non conjuguées des PB (i) dans les urines (ii) et le colostrum, complémentaires des méthodes existantes pour le dosage des fractions non conjuguées du BPA et des Clx-BPA déjà maîtrisées dans ces deux matrices au sein de notre équipe de recherche. L'ensemble de ces méthodes a été validé sur des échantillons provenant de la cohorte périnatale EDDS (Endocrine Disruptor Deux-Sèvres).

Nous avons quantifié les formes non-conjuguées du BPA, des Clx-BPA et des PB dans les urines de 100 femmes collectées durant le deuxième et le troisième trimestre de la grossesse ainsi que dans 30 colostrums. Les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Nos méthodes ont été rigoureusement validées dans les urines et le colostrum (fidélité et justesse étaient respectivement comprises entre 1,5% et 19,0% et entre -15,2% et 9,6%). Au moins l'un des PE recherchés était détecté dans les urines de chaque participante et la totalité était présente dans respectivement 3 et 4 échantillons durant le deuxième et le troisième trimestre de la grossesse. Le méthylparabène était le PE le plus détecté à la fois dans les urines (97,5%) et le colostrum (90%). Le BPA était détecté dans 48% des urines et 57% des colostrums et les Clx-BPA étaient les PE les moins présents dans ces matrices biologiques. Les différences de concentrations urinaires suivant le trimestre de la grossesse n'étaient pas significatives, à l'exception du monochlorobisphénol-A.

Ce travail propose des méthodes analytiques fiables pour mesurer l'exposition aux PE étudiés et souligne l'importance du dosage de formes non-conjuguées de mélanges de PE dans les matrices biologiques pendant la grossesse.

Mots-clés : santé environnementale, perturbateurs endocriniens, grossesse, bisphénol-A, dérivés chlorés du bisphénol-A, parabènes

SERMENT DE GALIEN

~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

**D'honorer** ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'exercer**, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De ne jamais oublier** ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**En aucun cas**, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent** leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé** de mes confrères si j'y manque.

# RÉSUMÉ

## Développement et validation de méthodes pour le biomonitoring de perturbateurs endocriniens chez la femme enceinte

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont présents dans notre vie quotidienne, comme c'est le cas pour le Bisphénol-A (BPA), ses dérivés chlorés (Clx-BPA) et les parabènes (PB). Ils agissent pour de très faibles doses, leurs effets peuvent être potentialisés suite à une exposition à des mélanges et de nombreuses affections chez l'enfant et l'adulte sont associées à une exposition *in utero* à ces molécules. Plusieurs études ont évalué l'exposition de femmes enceintes à des mélanges de PE au moyen de dosages dans les urines et le colostrum, mais aucune n'inclut les Clx-BPA dans le mélange. Ce travail avait pour objectif de développer des méthodes d'analyses ultrasensibles permettant de doser les fractions non conjuguées des PB (i) dans les urines (ii) et le colostrum, complémentaires des méthodes existantes pour le dosage des fractions non conjuguées du BPA et des Clx-BPA déjà maîtrisées dans ces deux matrices au sein de notre équipe de recherche. L'ensemble de ces méthodes a été validé sur des échantillons provenant de la cohorte périnatale EDDS (Endocrine Disruptor Deux-Sèvres).

Nous avons quantifié les formes non-conjuguées du BPA, des Clx-BPA et des PB dans les urines de 100 femmes collectées durant le deuxième et le troisième trimestre de la grossesse ainsi que dans 30 colostrums. Les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Nos méthodes ont été rigoureusement validées dans les urines et le colostrum (fidélité et justesse étaient respectivement comprises entre 1,5% et 19,0% et entre -15,2% et 9,6%). Au moins l'un des PE recherchés était détecté dans les urines de chaque participante et la totalité était présente dans respectivement 3 et 4 échantillons durant le deuxième et le troisième trimestre de la grossesse. Le méthylparabène était le PE le plus détecté à la fois dans les urines (97,5%) et le colostrum (90%). Le BPA était détecté dans 48% des urines et 57% des colostrums et les Clx-BPA étaient les PE les moins présents dans ces matrices biologiques. Les différences de concentrations urinaires suivant le trimestre de la grossesse n'étaient pas significatives, à l'exception du monochlorobisphénol-A.

Ce travail propose des méthodes analytiques fiables pour mesurer l'exposition aux PE étudiés et souligne l'importance du dosage de formes non-conjuguées de mélanges de PE dans les matrices biologiques pendant la grossesse.

**Mots-clés** : santé environnementale, perturbateurs endocriniens, grossesse, bisphénol-A, dérivés chlorés du bisphénol-A, parabènes