

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Élaboration de VTR par voie orale fondée sur des effets reprotoxiques pour les nonylphénols

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Octobre 2017

Édition scientifique

Edition révisée de l'avis de 2010 et du rapport de 2009



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Élaboration de VTR par voie orale fondée sur des effets reprotoxiques pour les nonylphénols

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Octobre 2017

Édition scientifique

Edition révisée de l'avis de 2010 et du rapport de 2009

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 26 octobre 2017

AVIS du 8 avril 2010 révisé¹ **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à l'élaboration de VTR par voie orale fondée sur des effets reprotoxiques pour les nonylphénols (CAS n°104-40-5, 84852-15-3, 25154-52-3, 90481-04-2)

L'avis du 8 avril 2010 de l'Afsset, devenue Anses en juillet 2010, portait lors de sa publication sur la recommandation de VTR pour six substances chimiques : le linuron, le di-n-butylphthalate (DnBP), le benzylbutylphthalate (BBP), le nonylphénol, le toluène et l'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE). La VTR du toluène ayant fait l'objet d'une actualisation des travaux d'expertise en juin 2017, il était nécessaire de procéder à la révision de l'avis de 2010 susmentionné et d'individualiser l'avis pour chacune de ces substances par l'Anses. Le présent avis révisé relatif aux nonylphénols reprend les conclusions et recommandations des travaux d'expertise publiés par l'Afsset en 2010 sans aucune actualisation.

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

Dans le cadre du Plan national santé environnement (PNSE) 2004-2008, l'Afsset s'est auto-saisie en 2003 pour proposer une méthode de construction de valeurs toxicologiques de référence (VTR) fondées sur des effets reprotoxiques. Le 25 juillet 2007, l'Afsset s'est vu confiée la mission de construction de VTR par ses ministères de tutelles.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La caractérisation du danger d'une substance a pour objectif, lorsque les données disponibles le permettent, la construction d'une VTR, indice toxicologique permettant d'établir une relation qualitative, voire quantitative, entre une exposition à une substance chimique et un effet sanitaire chez l'homme. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable.

¹ Annule et remplace l'avis du 8 avril 2010 sans actualisation des travaux d'expertise menés en 2010 – voir annexe 1

Les VTR sont spécifiques d'un type d'effet, d'une substance, d'une durée d'exposition et d'une voie d'exposition. Leur construction diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance : on parle de VTR « à seuil de dose » pour les substances qui provoquent, au-delà d'une certaine dose, des dommages dont la gravité est proportionnelle à la dose absorbée et de VTR « sans seuil de dose », pour les substances pour lesquelles il existe une probabilité, même infime, qu'une seule molécule pénétrant dans l'organisme provoque des effets néfastes pour cet organisme.

Les VTR à seuil s'expriment comme des doses (ou concentrations) journalières admissibles et correspondent à une estimation théorique de la quantité de substance à laquelle un individu peut théoriquement être exposé sans constat d'effet sanitaire néfaste. Les VTR sans seuil s'expriment comme des excès de risque unitaire et correspondent à la probabilité théorique qu'un individu contracte une pathologie s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance.

Les VTR sont utilisées dans le cadre des évaluations des risques sanitaires. Il s'agit le plus souvent de prévenir l'apparition d'un effet dans une population exposée ou d'estimer un risque en fonction des niveaux d'exposition de la population étudiée.

En accord avec le plan d'action relatif aux éthers de glycol préparé par la Direction générale de la santé (DGS) et annoncé lors du Comité national de sécurité sanitaire du 26 février 2003, et avec l'action 21 du PNSE 2004-2008, l'Afsset s'est auto-saisie pour établir un programme national sur les VTR visant à la constitution d'une expertise française solide et partagée par les différentes instances compétentes. Conformément à la demande originelle du Conseil supérieur d'hygiène public de France (CSHPF), et compte tenu des préoccupations nationales et internationales actuelles, le domaine des substances chimiques toxiques sur la reproduction et le développement embryofœtal présentes dans différents milieux de vie a été proposé en priorité.

Le 25 juillet 2007, le Directeur général de la santé (DGS) et le Directeur général de la prévention des risques (DGPR) ont saisi l'Afsset afin de soumettre au CES concerné les VTR proposées à l'issue de la phase pilote mise en place lors de l'élaboration de la méthode de construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques, à savoir le linuron, le di-n-butylphtalate (DnBP), le benzylbutylphtalate (BBP), le nonylphénol, le toluène et l'éther éthylique de l'éthylène glycol (EGEE).

■ **Élaboration d'une méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement**

Afin de proposer une méthode de référence pour la construction de VTR pour les substances toxiques sur la reproduction et le développement et d'identifier quelles pourraient être les substances prioritaires devant faire l'objet de la construction de telles VTR, l'Afsset a mis en place en 2004 un groupe de travail inter établissements regroupant l'Ineris, l'INRS, l'Afssa, l'InVS, l'ENSP, le Cnam, l'Inserm, le CNRS, les CAP et l'UIC. Cette réflexion, qui s'inscrit dans un contexte européen, vise principalement à développer une analyse critique sur le choix et la construction de VTR pour les substances chimiques reprotoxiques les plus préoccupantes. Parallèlement, le groupe de travail s'est réuni à 12 reprises entre 2004 et 2006, et a rendu deux rapports d'expertise :

- Un rapport intitulé « Identification d'une liste de substances toxiques pour la reproduction et le développement, et proposition d'une méthode de hiérarchisation pour l'analyse des valeurs toxicologiques de référence ». Ce rapport a été présenté au Comité d'experts spécialisés (CES) « évaluation des risques liés aux substances chimiques » le 28 janvier 2005 ;

- Un rapport intitulé « Document de référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques », présenté au CES évaluation des risques liés aux substances chimiques le 29 septembre 2006 ;

Ces 2 rapports ont fait l'objet d'un avis de l'Agence daté du 16 avril 2007 ; l'ensemble de ces documents sont publiés sur le site internet de l'Afsset.

■ **Élaboration de VTR de substances reprotoxiques dans le cadre d'une phase pilote**

Dans le cadre du développement de la méthode de construction de VTR reprotoxiques, une phase pilote a été réalisée pour « tester » la méthodologie proposée par le groupe de travail sur quelques substances modèles. À cette fin, l'Agence a fait appel à différents organismes d'expertise prestataires pour construire, selon le document de référence du groupe de travail, les VTR reprotoxiques des substances suivantes :

- Toluène (INERIS)
- Ether éthylique de l'éthylène glycol ou EGEE (INERIS)
- Linuron (Vincent Nedellec Consultant)
- Benzyl butyl phtalate ou BBP (Vincent Nedellec Consultant)
- Nonylphenol (ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise)
- Di-n-butyl-phtalate ou DnBP (ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise)

La construction et les propositions de VTR pour les six substances étudiées lors de la phase pilote font l'objet des annexes 2 et 3 du « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques. Afsset. Décembre 2006 » disponible en ligne sur le site de l'Agence. L'élaboration de ces VTR avait pour objet de valider la méthode proposée et les valeurs obtenues n'avaient donc pas fait l'objet d'un avis du CES.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

Le 25 juillet 2007, le Directeur général de la santé (DGS) et le Directeur général de la prévention des risques (DGPR) ont demandé à l'Afsset par courrier de faire valider ces VTR proposées à l'issue de la phase pilote. L'Afsset a subséquemment confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine lors de sa séance du 20 septembre 2007. Le CES a mandaté un expert rapporteur pour chaque substance, nommés par décision du Directeur général de l'Afsset, avec pour mission de :

- faire une relecture attentive et une analyse critique du rapport du prestataire ;
- réaliser une analyse critique des choix effectués aux différentes étapes de la construction de VTR au regard des éléments disponibles dans la méthode de construction des VTR pour les effets sur la reproduction et le développement ;
- faire une analyse critique des données bibliographiques publiées depuis la parution de ce rapport ;
- participer à la rédaction du rapport d'expertise collective.

Les travaux des experts rapporteurs ont été soumis et discutés par le CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

Le présent avis se fonde, pour ce qui concerne les aspects scientifiques, sur les rapports des organismes experts prestataires regroupés dans le document de référence de l'Afsset, décembre 2006, annexe 2 cité ci-dessus, sur les rapports d'expertise qui ont été adoptés par le CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » entre le 16 juin 2008 et le 17 septembre 2009 et sur la note de synthèse du CES pour les nonylphénols : Validation de VTR fondées sur des effets reprotoxiques : les nonylphénol (CAS 104-40-5, 84852-15-3, 25154-52-3, 90481-04-2). Version finale. Janvier 2009 ; Note de synthèse adoptée le 6 mars 2009.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

- Les nonylphénols constituent une famille de composés. Bien que l'exposition par voie respiratoire ou cutanée soit possible, la voie orale est la principale voie d'exposition en population générale. Il a donc été jugé pertinent de construire des VTR par voie orale, une pour les composés linéaires et une autre pour les composés ramifiés.
- Aucune donnée humaine n'est disponible. Chez l'animal, des effets sur les ovaires, l'ouverture vaginale et le développement de la glande mammaire. Les effets de type œstrogénique peuvent être retenus comme effet critique. Ces effets observés chez le rat sont pertinents chez l'homme.
- Le mécanisme avancé (action œstrogénique) est plausible et corrélé aux effets mis en évidence.
- Depuis 2004, le 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3) et le n-nonylphénol (CAS 25154-52-3) sont classés par l'UE comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 3 pour le développement et la fertilité en application de la Directive 67/548/CE.

L'Afsset propose ainsi la construction de deux VTR, l'une pour le nonylphénol linéaire et l'autre pour le nonylphénol ramifié, spécifiques aux effets sur le développement et la reproduction. Compte tenu des effets sur le développement, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique. Par manque de données chez le mâle, cette VTR s'applique par défaut aux deux sexes.

-- Nonylphénol ramifié CAS 90481-04-2 et 84852-15-3 --

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Effets sur le développement de la glande mammaire	Absence de NOAEL LOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹	300	VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹
Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez les rates Long Evans	Pas de construction de BMDL	UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3	
Moon <i>et al.</i> , 2007			

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

-- Nonylphénol linéaire CAS 25154-52-3 et 104-40-5 --

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce (F1)	NOAEL = 10 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ LOAEL = 50 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	300	VTR = 0,03 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹
Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rates Sprague-Dawley	Pas de construction de BMDL	UF _A 10 UF _H 10 UF _D 3	
Nagao <i>et al.</i> , 2001			

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_D : Insuffisance de données

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

Il est important de souligner que l'on ne dispose pas des mêmes informations pour la construction des VTR des 2 types de nonylphénol. En effet, la VTR du nonylphénol ramifié est fondée sur des effets sur le développement de la glande mammaire (Moon *et al.*, 2007) alors que ces effets n'ont pas été étudiés spécifiquement pour le nonylphénol linéaire dans l'étude de Nagao *et al.*. Ainsi, l'agence recommande de réaliser une veille scientifique qui permettrait de réévaluer la VTR du nonylphénol linéaire lorsque de nouvelles données prenant en compte ce type d'effet seront publiées.

Enfin, l'Afsset recommande d'étudier les effets des différents isomères de nonylphénols isolément afin d'apprécier l'influence de la longueur de la chaîne principale et de permettre une comparaison des effets toxiques d'une exposition à ces substances chimiques structuralement proches.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES qui portent sur l'élaboration d'une VTR reprotoxique par voie orale pour les nonylphénols.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Nonylphénol, reprotoxicité, développement, fertilité, valeurs toxicologiques de référence, dose critique, facteurs d'incertitude, effets santé, population générale

ANNEXE 1 : SUIVI DES ACTUALISATIONS DU RAPPORT

Date	Version	Description de la modification
Novembre 2009	01	Rapport relatif à l'élaboration de VTR reprotoxiques pour le linuron, le di-n-butylphtalate, le benzylbutylphtalate, les nonylphénols, le toluène et l'éther éthylique de l'éthylène glycol
Juin 2017	02	Séparation du précédent rapport pour avoir un rapport par substance Pas d'actualisation de l'expertise

Valeurs toxicologiques de référence

Elaboration d'une VTR reprotoxique par voie orale pour les nonylphénols (n°CAS 104-40-5, 84852-15-3, 25154-52-3, 90481-04-2)

Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »
Saisine n°2017-SA-0211
Saisine liée n°2003/AS03-5

RAPPORT **d'expertise collective de novembre 2009 révisé** **en juin 2017¹**

Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

Novembre 2009

¹ Annule et remplace le rapport de novembre 2009 – voir annexe 2

Mots clés

Nonylphénol, reprotoxicité, développement, fertilité, valeurs toxicologiques de référence, dose critique, facteurs d'incertitude, effets santé, population générale.

Key words

Nonylphenol, reprotoxicity, development, fertility, TRV, Toxicological reference value, critical dose, uncertainty factor, health effects, general population

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

RAPPORTEURS

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche INRA, Directeur de l'UMR 406 et du Laboratoire de Toxicologie Environnementale, INRA d'Avignon. Membre du Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

- Evaluation des risques liés aux substances chimiques – 10 juillet 2008, 25 septembre 2008, 23 octobre 2008, 27 novembre 2008 et 22 janvier 2009

Président

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie

Membres

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des Universités en biologie environnementale

Mme Claire BEAUSOLEIL – Pharmacien toxicologue responsable des évaluations européennes des substances chimiques. Démission le 28 septembre 2009.

M. Luc BELZUNCES – Directeur de recherche, responsable du laboratoire de toxicologie environnementale à l'INRA

Mme Christine CEZARD – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

M. Michel DESLAURIERS – Médecin toxicologue, pôle de toxicologie industrielle

M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET – Evalueur de risque en santé environnement

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Pharmaco-toxicologue

M. Olivier FARDEL – Professeur des Universités en toxicologie

Mme Hélène FENET – Pharmacien, Maître de conférence en sciences de l'environnement et santé publique

M. Luc FERRARI – Pharmacien toxicologue

M. Luc FONTANA – Maître de Conférences des Universités – Praticien hospitalier, Médecine, Santé au travail

Mme Nathalie FOUILHE SAM-LAI – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

Mme Barbara GOUGET – Chercheur en toxicologie des contaminants physico-chimiques. Démission le 1er juillet 2009.

Mme Dominique GUENOT – Chercheur en cancérologie et neurosciences

M. Cong Khanh HUYNH – Dr ès Science, ingénieur chimiste spécialisé en santé au travail

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise

Mme Béatrice LALERE – Docteur en chimie analytique et en environnement

Mme Annie LAUDET-HESBERT – Pharmacien toxicologue, retraitée de l'INRS

M. Jean-Pierre LEPOITTEVIN – Professeur des universités en dermatochimie

Mme Anne-Christine MACHEREY – Docteur en toxicologie, spécialisée dans la prévention du risque chimique

Mme Florence MENETRIER – Pharmacien, chef de projet dans le domaine de la toxicologie nucléaire, CEA

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur d'Université en toxicologie et sécurité alimentaire, Pharmacien-Toxicologue

M. Daniel PICART – Retraité de l'enseignement et de la recherche en chimie structurale

M. Alain-Claude ROUDOT – Enseignant chercheur en statistique et analyse de risque

Mme Béatrice SECRETAN – Docteur en toxicologie spécialisée dans l'évaluation de la cancérogénicité des substances

Mme Anne STEENHOUT – Chimiste, spécialiste en évaluation intégrée des risques sanitaires

M. Robert TADRIF – Chimiste et toxicologue, spécialisé en santé environnement et santé au travail

M. Eric THYBAUD – Ecotoxicologue.

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

Mme Nathalie BONVALLOT – Chef de projet scientifique – toxicologue – Afsset

M. Christophe ROUSSELLE – Chef d'unité - toxicologue – Afsset

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX – Afsset

CONTRIBUTIONS EXTÉRIEURES AU COLLECTIF

« Construction d'une VTR reprotoxique pour le BBP (benzyle butyle phtalate), selon la méthode proposée dans le document de référence. Rapport final. Juin 2006 » M. Vincent NEDELLEC – Evalueur de risque. Vincent Nedellec Consultant. Saulx-les-Chartreux.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Expertise collective : synthèse de l'argumentaire et conclusions	7
Sigles et abréviations	17
Liste des figures	17
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	18
1.1 Contexte.....	18
1.2 Objet de la saisine.....	18
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	19
2 Recueil des données toxicologiques.....	20
2.1 Toxicocinétique.....	21
2.2 Effets sanitaires	21
2.2.1 Effets néphrotoxiques	21
2.2.2 Effets reprotoxiques	21
2.3 Mécanisme d'action	23
3 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR	25
3.1 Le nonylphénol ramifié (CAS 90481-04-2 et 84852-15-3)	25
3.1.1 Choix de l'effet critique.....	25
3.1.2 Choix de l'étude	25
3.1.3 Choix de la dose critique.....	25
3.1.4 Choix des facteurs d'incertitude.....	26
3.1.5 Synthèse	26
3.2 Le nonylphénol linéaire (CAS 25154-52-3 et 104-40-5)	26
3.2.1 Choix de l'effet critique.....	26
3.2.2 Choix de l'étude	27
3.2.3 Choix de la dose critique.....	27
3.2.4 Choix des facteurs d'incertitude.....	27
3.2.5 Synthèse	28
4 Conclusions de l'expertise collective	29
5 Bibliographies	31
ANNEXES	32
Annexe 1 : Lettre de saisine.....	33
Annexe 2 : Suivi des actualisations du rapport	35
Annexe 3 : Tableau comparatif des études de Moon <i>et al.</i> (2007) et de Chapin <i>et al.</i> (1999).....	36

Annexe 4 : Tableau comparatif des études de Hossaini *et al.* (2001) et Nagao *et al.* (2007).....39

Expertise collective : synthèse de l'argumentaire et conclusions

)) afsset.))

EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatif à la construction de VTR fondées sur les effets reprotoxiques des
Nonylphénols

Saisine Afsset n°2003/AS03

Ce document synthétise les travaux du prestataire et du rapporteur et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre du programme de travail de l'Afsset sur les VTR reprotoxiques, une phase pilote a été organisée afin de s'assurer de la mise en pratique de la méthode de construction proposée. Des VTR reprotoxiques ont été construites sous forme de prestation pour le linuron, le di-n-butylphthalate (DnBP), le benzylbutylphthalate (BBP), les nonylphénols, le toluène et le 2-éthoxyéthanol (EGEE). La DGS a saisi l'Afsset le 25 juillet 2007 pour que ces VTR soient validées dans le cadre de l'expertise collective de l'Agence.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté un rapporteur pour l'expertise du nonylphénol qui a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise ».

Description de la méthode

Sur la base du document « construction d'une VTR reprotoxique pour le nonylphénol » réalisé par l'équipe du laboratoire de toxicologie de l'Université de Bretagne Occidentale¹, le rapporteur a évalué la conformité de la méthode employée par rapport aux préconisations du groupe de travail sur les points suivants : i) recherche d'informations et ii) profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Il a ensuite donné son avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose pour les effets reprotoxiques (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

¹ Annexe 2 du document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques

² NOAEL : « no observed adverse effect level » ; LOAEL : « lowest observed adverse effect level » ; BMDL : « benchmark dose lower confidence level » (limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose)

Mathématiquement, la construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{Dose \cdot critique}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Dose \text{ critique} = NOAEL, LOAEL \text{ ou } BMDL^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

La méthode est détaillée dans le document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques (Afsset. Décembre 2006) et la construction de la VTR du nonylphénol s'appuie sur cette méthode.

Une discussion collégiale au sein du CES a permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultat de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

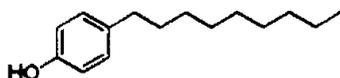
Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est basé sur les monographies réalisées au préalable par des instances nationales et sur la littérature parue postérieurement à ces monographies.

Les nonylphénols constituent une famille de composés de formule $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$ possédant un noyau benzénique et une chaîne carbonée à 9 carbones, linéaire ou ramifiée. Les nonylphénols ramifiés possèdent une chaîne principale de 8 carbones au maximum, le degré de branchements et leurs positions sont très variables selon les isomères. Les principaux composés sont :

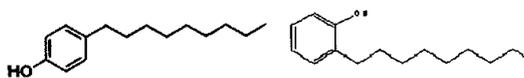
- 4-nonylphénol linéaire, 4-n-nonylphénol ou p-nonylphénol (n°CAS 104-40-5),
- 4-nonylphénol ramifié (n° CAS 84852-15-3),
- n-nonylphénol (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire) (n° CAS 25154-52-3),
- Nonylphénol ramifié (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée) (n° CAS 90481-04-2).

NONYLPHENOL LINEAIRE

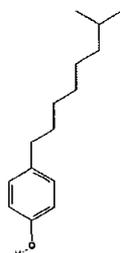
4-nonylphénol linéaire
(n° CAS 104-40-5)



n-nonylphénol, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire
(n° CAS 25154-52-3)

**NONYLPHENOL RAMIFIE**

4-nonylphénol ramifiée
(n° CAS 84852-15-3)



Nonylphénol ramifié, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée
(n° CAS 90481-04-2)

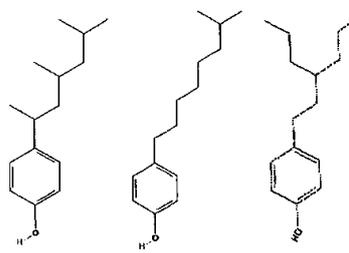


Figure 1 : Formules chimiques des principaux composés

Les données rapportées ci-dessous concernent les formes linéaires et ramifiées. Dans cette note d'expertise, le terme nonylphénol, s'il n'est pas précisé, couvre tous les types de nonylphénol.

Le nonylphénol est utilisé principalement pour la production de surfactants (NP-polyéthoxylates) contenus dans les produits de consommation (produits ménagers, hygiène corporelle, ...), ainsi que pour la production de résines ou de plastiques, dont des plastiques alimentaires. La population générale peut être exposée lors de l'utilisation de produits de consommation courante. La voie d'exposition peut alors être respiratoire (produits ménagers), cutanée (produits d'hygiène), ou orale (lors de la migration du nonylphénol dans la nourriture à partir des matériaux en contact avec les aliments ou de l'eau de boisson). L'évaluation européenne réalisée sur les nonylphénols linéaire et ramifié (n° CAS 84852-15-3 et 25154-52-3) en 2002 conclut que la voie d'exposition principale est la voie orale (UE, 2002).

Le 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3) et le n-nonylphénol (n°CAS 25154-52-3) sont classés depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 3 pour le développement et pour la reproduction (R63 : risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant et R62 : risque possible d'altération de la fertilité). Ces deux composés sont également classés comme substances nocives (R22 : nocif en cas d'ingestion), corrosives (R34 : provoque des brûlures), et dangereuses pour l'environnement (R50-53 : très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique).

Toxicocinétique

Peu de données de toxicocinétique sont disponibles actuellement. Chez l'animal, l'absorption par le tractus gastro-intestinal du nonylphénol serait rapide et probablement importante. Le métabolisme principal passe par une glucurono- et une sulfo-conjugaison. Les voies d'excrétion principales sont les fèces et les urines. Le nonylphénol a été retrouvé inchangé dans la bile lors

d'exposition de rats à de fortes doses, témoignant d'une saturation métabolique ou d'une excrétion du composé parent concomitante à la métabolisation. Chez l'Homme, la biodisponibilité par voie orale a été estimée à 20 % environ. Les métabolites mis en évidence chez le rat et chez l'Homme sont qualitativement identiques entre ces espèces.

Effets sanitaires

Par voie orale et en exposition chronique, des effets rénaux ont été mis en évidence à des faibles doses (15 mg/kg pc/j) chez le rat. Des effets reprotoxiques et développementaux ont également été mis en évidence pour des expositions du même ordre de grandeur et il apparaît pertinent de prendre en compte ces effets pour la construction de VTR reprotoxiques spécifiques.

Aucune donnée humaine n'est disponible.

- *Effets néphrotoxiques*

Une étude de toxicité à dose répétée (90 jours) conduite chez le rat par voie orale a montré une diminution du gain de poids et de la prise alimentaire, ainsi que des lésions histologiques hépatiques (nécrose cellulaire) et rénales (minéralisation notée lors d'une deuxième lecture anatomopathologique) à 140 mg/kg pc/j de 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3) (CMA, 1997, Cunny *et al.*, 1997). Un NOAEL de 50 mg/kg pc/j a été identifié.

Lors d'une étude sur 3 générations (NTP, 1997, Chapin *et al.*, 1999) où des rats Sprague Dawley ont été exposés par voie orale à du 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3), une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins ont été observées à 50 mg/kg pc/j. En outre, dès 15 mg/kg pc/j et pour toutes les générations, des lésions dégénératives et une dilatation tubulaire rénale non dose-dépendantes ont été mises en évidence.

- *Effets reprotoxiques*

Les effets reprotoxiques du nonylphénol ont été décrits chez des rats exposés sur plusieurs générations ou lors d'exposition *in utero*. Les effets observés aux plus faibles doses sont des perturbations du système reproductif des nouveau-nés (précocité de l'ouverture vaginale et une baisse du poids des ovaires et du compte spermatique), probablement sans atteinte fonctionnelle de la reproduction et de la fertilité, et des modifications des épидидymes lors d'expositions pendant la gestation [UE, 2002].

Ces effets reprotoxiques chez les nouveaux-nés sont observés en présence de modifications au niveau du foie et des reins chez les parents lors d'expositions sur plusieurs générations (Nagao *et al.*, 2001). En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'établir un lien de causalité entre la toxicité générale observée sur la génération F0 (modifications histologiques hépatiques et rénales) et la reprotoxicité mise en évidence sur la génération F1. Par prudence, une VTR fondée sur des effets reprotoxiques peut être proposée.

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, plusieurs études de reprotoxicité de bonne qualité réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après. D'autres études ont été conduites par voie intra-péritonéale. Elles n'ont pas été jugées pertinentes pour la construction d'une VTR reprotoxique car le mode d'administration (voie intra-péritonéale) n'est pas représentatif des conditions réelles d'exposition de l'embryon.

- Etudes de toxicité pré ou postnatale

Une première étude réalisée chez des rats Wistar exposés au nonylphénol du 9^{ème} au 15^{ème} jour de gestation n'a pas mis en évidence de toxicité pour le développement jusqu'à 300 mg/kg pc/j (Initiative Umweltrelevante Altstoffe, 1992).

La seconde étude a été réalisée chez des rats Wistar exposés *in utero* à du 4-nonylphénol linéaire (n°CAS 104-40-5) par gavage de la mère du 11^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation aux

doses de 0, 3, 15 et 75 mg/kg pc/j (Hossaini *et al.*, 2001). Les effets ont été observés après la naissance sur la F1 à J11, J21 et J110. A J110, une diminution dose-dépendante du poids absolu de l'épididyme droit a été observée à partir d'une exposition de 15 mg/kg pc/j. Un NOAEL de 3 mg/kg pc/j a été identifié.

Dans la troisième étude, les rats Sprague-Dawley ont été exposés du 7^{ème} jour de la gestation (GD7) à la 10^{ème} semaine postnatale, par gavage de 4-nonylphénol linéaire (De Jager *et al.* 1999). Les auteurs ont observé une mortalité ainsi qu'une diminution du poids absolu des testicules et des épididymes, une diminution du diamètre des tubes séminifères et de l'épaisseur de l'épithélium basal à 100 mg/kg pc/j, en présence d'une mortalité. Une diminution du compte spermatique a également été observée, mais à 250 mg/kg pc/j. Aucun NOAEL n'a pu être identifié.

Récemment, Moon *et al.* (2007) ont réalisé une étude portant sur les effets d'une exposition orale d'un mélange d'isomères branchés du nonylphénol, aux doses de 0, 10 et 100 mg/kg pc/j, sur le développement de la glande mammaire chez des rats Long Evans. Les mères ont été exposées au nonylphénol ramifié du 15^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation et les effets ont été observés chez les femelles F1 au 4^{ème}, 22^{ème}, 33^{ème}, 41^{ème} et 66^{ème} jour post-natal (J4, J22, J33, J41 et J66, respectivement). A 100 mg/kg pc/j, les effets observés sont une augmentation du poids utérin (J41), une augmentation du taux de branchement des canaux primaires en canaux secondaires (J4), une augmentation du nombre de bourgeons alvéolaires et une différenciation des bourgeons de l'extrémité terminale en bourgeons alvéolaires (J33). Dès 10 mg/kg pc/j, il a été observé une diminution des branchements primaires du canal collecteur de la glande mammaire et un retard dans la migration de l'épithélium mammaire vers le nœud lymphatique (J22).

Des effets endocriniens ont été aussi observés à J41 avec une baisse de la LH pituitaire, une augmentation du nombre de récepteurs de l'œstrogène dans le stroma et l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus et une augmentation du nombre de récepteurs de la prolactine dans les glandes mammaires à la dose de 100 mg/kg pc/j. Il peut être noté une augmentation du nombre de récepteurs de la progestérone dans l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus à 10 mg/kg pc/j et une diminution à 100 mg/kg pc/j. A 10 et 100 mg/kg pc/j, une baisse de la TSH pituitaire est observée. Ainsi, en tenant compte de tous ces effets, un LOAEL de 10 mg/kg pc/j peut être proposé. Aucun NOAEL n'est identifié.

- Etude de toxicité sur plusieurs générations

Dans l'étude du NTP (1997), publiée par Chapin *et al.* en 1999, des rats Sprague-Dawley ont été exposés par voie orale à 0, 15, 50 et 160 mg/kg pc/j (0, 200, 650 et 2000 ppm) de 4-nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3). L'exposition a été maintenue sur trois générations (de la semaine 7 pour F0 à la semaine 8 pour F3). La fertilité et les accouplements sont normaux. On note à 160 mg/kg pc/j un allongement du cycle œstral (chez les F1 et F2) et à 50 et 160 mg/kg pc/j, une ouverture vaginale précoce (chez les F1, F2 et F3), une diminution du poids des ovaires (sans lésion histologique), une diminution de la densité spermatique épididymaire et du compte des spermatozoïdes chez les F2. Pour ces modifications spermatiques, l'explication est incertaine. Les perturbations du système reproductif apparaissent mineures et sans retentissement sur la fertilité. Un NOAEL concernant les effets reprotoxiques a été identifié à 15 mg/kg pc/j. Ces effets sont également accompagnés d'une toxicité générale avec une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins à 50 et 160 mg/kg pc/j. Le NOAEL observé dans cette étude est de 15 mg/kg pc/j pour les effets sur la reproduction.

Dans l'étude de Nagao *et al.* (2001), des rats Sprague-Dawley ont été exposés à un mélange d'isomères linéaires du nonylphénol (n°CAS 25154-52-3) par gavage aux doses de 0, 2, 10 et 50 mg/kg pc/j.

Dans le dernier groupe de dose (50 mg/kg pc/j), une diminution du poids corporel a été mise en évidence dans la génération parentale, mais elle n'est pas significative. Une augmentation du poids du foie et des reins, associée dans la génération parentale (F0) à des modifications

histologiques (hypertrophie centrolobulaire, corps éosinophiles), a également été observée à cette dose. Les auteurs concluent à une absence de signification toxicologique claire, ce qui a été également suggéré dans d'autres études (Cunny *et al.*, 1997).

Chez les femelles F0 et F1, une diminution significative du poids absolu et relatif des ovaires est observée à 50 mg/kg pc/j sans atteinte histologique associée. Chez les femelles de la génération F1, une diminution statistiquement significative de la LH sérique (5,5 ng/mL versus 7,2 ng/mL chez les témoins, $p < 0,05$) et une ouverture vaginale précoce (à PND 31,5 en moyenne versus 33,4 chez les témoins, $p < 0,01$) sont observées à la plus forte dose testée. Une diminution statistiquement significative ($p < 0,05$) du nombre de petits par portée (11,5 versus 13,5 en moyenne chez les témoins) et du nombre de sites d'implantation (12,5 versus 14,9 en moyenne chez les témoins) est observée à 50 mg/kg pc/j dans la génération F2. Une augmentation des niveaux de testostérone chez les mâles et du poids de l'utérus chez les femelles de la génération parentale (F0) est reportée à 2 mg/kg pc/j, mais n'est pas observée aux doses supérieures. Une augmentation du poids de la prostate chez les mâles avant sevrage et une diminution des niveaux de FSH chez les mâles adultes sont observés à 2mg/kg pc/j dans la génération F1. Ces effets ne sont plus mis en évidence pour les doses supérieures (10 et 50 mg/kg pc/j). Les auteurs proposent un NOAEL de 10 mg/kg pc/j pour ces effets reprotoxiques.

Toutes les expérimentations animales retenues sont conduites selon des protocoles rigoureux (lignes directrices de l'OCDE ou s'y apparentant). Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

Mécanisme d'action

Seul le mécanisme d'action lié aux effets reprotoxiques a été investigué. Une réponse utérotrophique et une ouverture vaginale précoce ont été clairement mises en évidence lors d'études *in vivo* chez la rate immature ou ovariectomisée, permettant de conclure à l'activité œstrogénique du nonylphénol. Les études *in vitro* confirment cette activité, qui serait 10^3 à 10^6 fois inférieure à celle du 17- β -œstradiol [UE, 2002].

Le test utérotrophique chez la rate est un test reconnu prédictif des effets perturbateurs endocriniens chez l'Homme. Ainsi, au vu de l'ensemble des données disponibles, les effets reprotoxiques observés chez l'animal pourraient également être observés chez l'Homme.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Comme il existe plusieurs formes de nonylphénol, le CES a proposé de construire deux VTR, l'une pour les formes dont la chaîne alkyle est linéaire et l'autre pour les formes dont la chaîne alkyle est ramifiée.

Le nonylphénol ramifié (CAS n° 90481-04-2 et 84852-15-3)

- *Choix de l'effet critique*

Le nonylphénol ramifié a montré une activité œstrogénique aussi bien dans les études *in vitro* (10^3 à 10^6 fois plus faible que celle de l'œstradiol) qu'*in vivo*. Les différentes études analysées mettent en évidence une activité œstrogénique lors d'exposition *in utero* et sur plusieurs générations. Ces études mettent en évidence des effets sur les ovaires (diminution du poids des ovaires sans lésion histologique) et sur les spermatozoïdes des descendants (diminution de la densité spermatique épидидymaire et du nombre de spermatozoïdes), une ouverture vaginale précoce, et des effets sur le développement des glandes mammaires (diminution des branchements primaires du canal collecteur et retard de migration de l'épithélium vers les nœuds lymphatiques au 22^{ème} jour après la naissance). Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- La plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- La bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

Il convient de noter que les effets sur la glande mammaire semble être le marqueur le plus sensible puisqu'ils sont observés aux doses les plus faibles (LOAEL = 10 mg/kg pc/j). **Le CES a donc retenu les effets sur la glande mammaire comme effet critique.**

- *Choix de l'étude*

Deux études décrites précédemment (Chapin *et al.*, 1999 ; Moon *et al.*, 2007) peuvent être retenues pour les composés ramifiés du nonylphénol. Un tableau comparatif de ces 2 études se trouve en annexe 3.

Le choix de l'étude de **Moon *et al.* (2007)** pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique du nonylphénol ramifié repose sur :

- La prise en compte de l'effet toxique le plus sensible : un LOAEL de 10 mg/kg pc/j a été mis en évidence dans l'étude de Moon *et al.* (2007) pour les effets sur les glandes mammaires tandis que l'étude de fertilité de Chapin *et al.* (1999) a mis en évidence un NOAEL de 15 mg/kg pc/j pour d'autres effets œstrogéniques. Chapin *et al.* n'ont pas étudié les effets sur les glandes mammaires. Le choix de l'étude de Moon *et al.* permet de protéger des effets apparaissant à des doses plus élevées dans l'étude de Chapin.
- La qualité de l'étude jugée acceptable par les experts, même si elle ne suit pas la totalité des recommandations de l'OCDE (ligne directrice 414).

- *Choix de la dose critique*

Parmi les 2 études sélectionnées, celle ayant conduit à observer des effets aux doses les plus faibles (Moon *et al.*, 2007) a été retenue par les experts pour dériver la dose critique.

Le LOAEL de 10 mg/kg pc/j issu de cette étude a donc été proposé comme dose critique.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

- *Choix des facteurs d'incertitude*

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : Selon la méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement, l'Afsset préconise un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Le CES propose un facteur 3 car le LOAEL issu de l'étude de Moon est plus bas que ceux établis dans d'autres études, suggérant que les effets retenus sont très sensibles.
- UF_D : insuffisance de données : non applicable, les données étant jugées suffisantes.

Le nonylphénol linéaire (CAS n° 25154-52-3 et 104-40-5)

- *Choix de l'effet critique*

Le nonylphénol linéaire a montré aussi bien dans les études *in vivo* qu'*in vitro* une activité œstrogénique, 10³ à 10⁶ fois plus faible que celle de l'œstradiol. Les études multigénérationnelles de bonne qualité scientifique mettent en évidence des **effets sur l'ouverture vaginale et les ovaires** dès 50 mg/kg pc/j, sans modification fonctionnelle de la reproduction. Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- la plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- la bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

- *Choix de l'étude*

Les deux études retenues décrites précédemment (cf. partie effets reprotoxiques) concernant le nonylphénol linéaire sont celles de Hossaini *et al.* (2001) et de Nagao *et al.* (2001). Un tableau comparatif de ces deux études se trouve en annexe 4.

Ces deux études sont de bonne qualité (Klimisch 1). Dans l'étude d'Hossaini *et al.* (2001), uniquement la diminution du poids absolu de l'épididyme droit est rapportée par les auteurs comme statistiquement significative. Par conséquent, l'étude ne sera pas retenue pour la construction de la VTR. Ainsi, l'étude de Nagao *et al.* (2001) qui met en évidence une activité œstrogénique chez les rates F1 exposées au nonylphénol linéaire, est retenue comme étude clé pour construire la VTR.

- *Choix de la dose critique*

Dans l'étude retenue (Nagao *et al.*, 2001), la diminution de la LH sérique et du poids des ovaires, et l'ouverture vaginale précoce sont observées à 50 mg/kg pc/j, dose correspondant au LOAEL.

Il est important de souligner que d'autres modifications biologiques apparaissent à la plus faible dose. En effet, une diminution de la FSH est observée chez les mâles de la génération F1 à 2 mg/kg pc/j, mais pas aux doses supérieures (224 ng/ml vs 302 ng/ml chez les témoins). Les auteurs précisent que les données sur les concentrations hormonales doivent être interprétées avec précaution tant que de nouvelles études n'ont pas confirmé leurs résultats. De même, une augmentation du poids relatif et absolu de la prostate et de la vésicule séminale est rapportée pour la seule dose de 2 mg/kg pc/j (respectivement, 12,8±2 mg vs 11,4±2,2 mg chez les témoins et 76,4±13,6 mg vs 68,4±12,9 mg chez les témoins).

Le CES a décidé de retenir comme dose critique le NOAEL de 10 mg/kg pc/j proposé par les auteurs.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques rencontrées pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

Le CES estime cependant que le couple de valeur LOAEL / NOAEL peut être proposé pour la construction de la VTR. Le faible écart entre les deux valeurs renforce la précision de la VTR.

- *Choix des facteurs d'incertitude*

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'Homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : non applicable
- UF_D : insuffisance de données : dans l'étude retenue (Nagao *et al.*, 2001) ont été étudiés de nombreux effets mais pas ceux sur la glande mammaire. Ces effets semblent pourtant apparaître à des niveaux beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10 mg/kg pc/j comme le montre l'étude de Moon *et al.*, 2007 sur le nonylphénol ramifié. Ainsi, le CES propose un facteur de 3 pour l'absence de données sur la glande mammaire.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 22 janvier 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

- ▶ Le nonylphénol est une famille de composés qui a fait l'objet de plusieurs études de reprotoxicité chez le rongeur. Deux VTRs ont été construites, une pour les composés linéaires et une pour les composés ramifiés.
- ▶ Aucune donnée humaine n'est disponible.
- ▶ L'hypothèse retenue est de considérer que les effets observés chez le rat sont pertinents pour l'Homme et que les effets de type œstrogénique peuvent être retenus comme effets critiques. Le mécanisme avancé (action œstrogénique) est plausible et corrélé aux effets mis en évidence.
- ▶ Même si l'objectif est de construire une VTR reprotoxique, d'autres effets, tels que des effets néphrotoxiques, sont susceptibles de se produire à des niveaux de doses comparables.
- ▶ Le rapport européen conclut à un NOAEL de 15 mg/kg pc/j pour les effets sur la reproduction en se basant sur l'étude du NTP, 1997. Les études choisies ici pour construire les VTR sont plus récentes et de ce fait, n'avaient pas pu être prises en compte dans le rapport européen.

Le CES propose ainsi la construction de deux VTR, pour les nonylphénols linéaire et ramifié, spécifiques aux effets sur le développement et la reproduction. Compte tenu des effets sur le développement, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique.

-- Nonylphénol ramifié CAS 90481-04-2 et 84852-15-3 --			
Effet critique	Dose critique*	UF**	VTR
Effets sur le développement de la glande mammaire Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez le rat Long Evans Moon <i>et al.</i> , 2007	LOAEL = 10 mg/kg pc/j Pas de construction de BMDL	300 UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3	VTR = 0,03 mg/kg/j Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen

*Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

** UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n° 2003/AS03

-- Nonylphénol linéaire CAS 25154-52-3 et 104-40-5 --			
Effet critique	Dose critique*	UF**	VTR
Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce (F1)	LOAEL = 50 mg/kg pc/j NOAEL = 10 mg/kg pc/j	300	VTR = 0,03 mg/kg/j
Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rats Sprague-Dawley	Pas de construction de BMDL	UF _A 10 UF _H 10 UF _D 3	Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la glande mammaire) Etude : fort Dose critique : fort VTR : moyen
Nagao <i>et al.</i> , 2001			

*Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

** UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

Recommandations du CES

Le CES souligne que l'on ne dispose pas des mêmes informations pour la construction des VTR des 2 types de nonylphénol. En effet, la VTR du nonylphénol ramifié est fondée sur des effets sur le développement de la glande mammaire (Moon *et al.*, 2007) alors que ces effets n'ont pas été étudiés spécifiquement pour le nonylphénol linéaire dans l'étude de Nagao *et al.*. Ainsi, le CES recommande de réaliser une veille scientifique qui permettrait de réévaluer la VTR du nonylphénol linéaire lorsque de nouvelles données prenant en compte ce type d'effet seront publiées.

Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique² à la dose critique car ce type d'ajustement n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

Enfin, le CES recommande d'étudier les effets des différents isomères de nonylphénols isolément afin d'apprécier l'influence de la longueur de la chaîne principale et de permettre une comparaison des effets toxiques d'une exposition à ces substances chimiques structuralement proches.

Maisons-Alfort, le 06 mars 2009

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES



² Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.

Sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Afsset	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la Benchmark Dose
BMR	Benchmark response
GD	Jour de gestation (« Gestation Day »)
LD	Jour de lactation (« Lactation Day »)
LOAEC	Concentration minimale entraînant un effet néfaste observe (« Lowest Observed Adverse Effect Concentration »)
LOAEL	Dose minimale entraînant un effet néfaste observe (« Lowest Observed Adverse Effect Level »)
NOAEC	Concentration maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (« No Observed Adverse Effect Concentration »)
NOAEL	Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (« No Observed Adverse Effect Level »)
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OEHHA	Office on Environmental Health Hazard Assessment
PND	Jour post-natal (« Post natal Day »)
RfC	Reference Concentration
REL	Reference Exposure Level
VTR	Valeur Toxicologique de Référence
UE	Union Européenne
UF	Facteur d'incertitude (« Uncertainty Factor »)
US EPA	United State Environmental Protection Agency (Etats-Unis)

Liste des figures

Figure 1 : Formules chimiques des nonylphénols des principaux composés	20
--	----

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action biologiques des substances. Ainsi, si une substance est connue comme ayant une action directe sur le matériel génétique humain (l'ADN), alors on considère que les effets indésirables que peut engendrer une exposition à cette substance (qui sont généralement des cancers, sauf si le matériel génétique atteint est celui des cellules germinales) peuvent se produire même pour la plus petite dose reçue. On parle dans ce cas de « VTR sans seuil d'effet ». En revanche, si une substance n'a pas d'action directe sur le matériel génétique humain, alors on considère en général que l'effet indésirable survient au-delà d'une certaine dose reçue et que c'est la gravité de l'effet qui croît avec la dose plutôt que la probabilité de survenue. On parle alors de « VTR à seuil d'effet ».

Les VTR sont par ailleurs largement impliquées dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires, processus décisionnel visant à fournir des éléments scientifiques utiles à la gestion des risques. L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et codifiée qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. Leur élaboration et leur utilisation s'inscrivent donc dans une procédure exigeante, aux conséquences majeures en termes de santé publique.

L'Afsset s'est auto-saisie en 2003 afin d'établir un programme national sur les VTR visant à la constitution d'une expertise française solide et partagée par les différentes instances compétentes. Le domaine des substances chimiques reprotoxiques a été proposé comme priorité d'action. Pour répondre à cet objectif, l'Afsset a constitué un groupe de travail en 2004 afin d'élaborer une méthode de construction pour les VTR fondées sur des effets reprotoxiques. Dans le cadre de ces travaux, un appel à contributions restreint a été proposé par l'Afsset pour la construction de VTR reprotoxiques pour 6 substances (le linuron, le di-n-butylphtalate ou DnBP, le benzylbutylphtalate ou BBP, le nonylphénol, le toluène et le 2-éthoxyéthanol ou EGEE, la finalité étant de :

- s'assurer que la méthode proposée est, en l'état, suffisante pour permettre de construire une VTR reprotoxique ;
- permettre, par un retour d'expérience pratique, d'améliorer la méthode proposée.

Ces 6 substances ont été choisies parmi une liste hiérarchisée de 450 substances potentiellement reprotoxiques pour lesquelles des données toxicologiques sont disponibles. La construction et les propositions de VTR pour les 6 substances étudiées lors de la phase pilote font l'objet des annexes 2 et 3 du « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques. Afsset. Décembre 2006 » disponible en ligne sur <http://www.afsset.fr/>.

1.2 Objet de la saisine

Le 25 juillet 2007, le Directeur général de la santé (DGS) et le Directeur général de la prévention des risques (DGPR) saisissaient l'Afsset afin de faire valider par le CES concerné les VTR

proposées lors de la phase pilote mise en place lors de l'élaboration de la méthode de construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques, à savoir le linuron, le DnBP, le BBP, le nonylphénol, le toluène et l'EGEE.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a mandaté des rapporteurs pour la réalisation des travaux d'expertise pour le linuron, le di-n-butylphtalate, le benzylbutylphtalate, les nonylphénols et le toluène, et le groupe de travail « Valeur Toxicologique de Référence » pour l'éther éthylique de l'éthylène glycol.

Les travaux des experts rapporteurs et du groupe de travail ont été soumis et discutés par le CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques aux séances des 29 mai 2008, 10 juillet 2008, 25 septembre 2008, 23 octobre 2008, 27 novembre 2008, 22 janvier 2009, 25 juin 2009 et 17 septembre 2009. Le rapport produit par le groupe de travail et des rapporteurs tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Les conclusions présentées dans ce document sont ainsi issues d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

2 Recueil des données toxicologiques

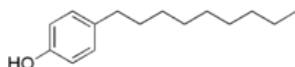
Cette partie est fondée sur le résumé des travaux réalisés en 2006 par le prestataire dans le cadre de la phase pilote. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter au « document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets reprotoxiques, annexe 2 ». Le rapport est basé sur les monographies réalisées au préalable par des instances nationales et sur la littérature parue postérieurement à ces monographies.

Les nonylphénols constituent une famille de composés de formule $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$ possédant un noyau benzénique et une chaîne carbonée à 9 carbones, linéaire ou ramifiée. Les nonylphénols ramifiés possèdent une chaîne principale de 8 carbones au maximum, le degré de branchements et leurs positions sont très variables selon les isomères. Les principaux composés sont :

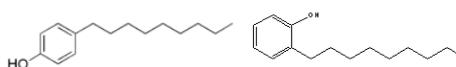
- 4-nonylphénol linéaire, 4-n-nonylphénol ou p-nonylphénol (CAS 104-40-5),
- 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3),
- n-nonylphénol (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire) (CAS 25154-52-3),
- Nonylphénol ramifié (mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée) (CAS 90481-04-2).

NONYLPHENOL LINEAIRE

4-nonylphénol linéaire
(n° CAS 104-40-5)

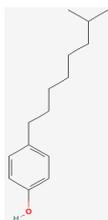


n-nonylphénol, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire
(n° CAS 25154-52-3)



NONYLPHENOL RAMIFIE

4-nonylphénol ramifiée
(n° CAS 84852-15-3)



Nonylphénol ramifié, mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est ramifiée
(n° CAS 90481-04-2)

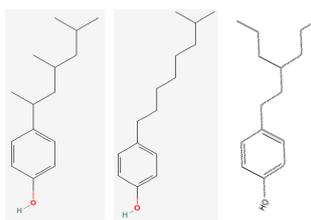


Figure 1 : Formules chimiques des nonylphénols des principaux composés

Les données rapportées ci-dessous concernent les formes linéaires et ramifiées. Dans cette note d'expertise, le terme nonylphénol, s'il n'est pas précisé, couvre tous les types de nonylphénol.

Le nonylphénol est utilisé principalement pour la production de surfactants (NP-polyéthoxylates) contenus dans les produits de consommation (produits ménagers, hygiène corporelle, ...), ainsi que pour la production de résines ou de plastiques, dont des plastiques alimentaires. La population générale peut être exposée lors de l'utilisation de produits de consommation courante. La voie d'exposition peut alors être respiratoire (produits ménagers), cutanée (produits d'hygiène), ou orale (lors de la migration du nonylphénol dans la nourriture à partir des matériaux en contact avec les aliments ou de l'eau de boisson). L'évaluation européenne réalisée sur les nonylphénols linéaire et

ramifié (CAS 84852-15-3 et 25154-52-3) en 2002 conclut que la voie d'exposition principale est la voie orale (UE, 2002).

Le 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3) et le n-nonylphénol (CAS 25154-52-3) sont classés depuis 2004 (29^{ème} ATP) par l'Union Européenne comme substance reprotoxique chez l'Homme de catégorie 3 pour le développement et pour la reproduction (R63 : risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant et R62 : risque possible d'altération de la fertilité). Ces deux composés sont également classés comme substances nocives (R22 : nocif en cas d'ingestion), corrosives (R34 : provoque des brûlures), et dangereuses pour l'environnement (R50-53 : très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique).

2.1 Toxicocinétique

Peu de données de toxicocinétique sont disponibles actuellement. Chez l'animal, l'absorption par le tractus gastro-intestinal du nonylphénol serait rapide et probablement importante. Le métabolisme principal passe par une glucurono- et une sulfo-conjugaison. Les voies d'excrétion principales sont les fèces et les urines. Le nonylphénol a été retrouvé inchangé dans la bile lors d'exposition de rats à de fortes doses, témoignant d'une saturation métabolique ou d'une excrétion du composé parent concomitante à la métabolisation. Chez l'Homme, la biodisponibilité par voie orale a été estimée à 20 % environ. Les métabolites mis en évidence chez le rat et chez l'Homme sont qualitativement identiques entre ces espèces.

2.2 Effets sanitaires

Par voie orale et en exposition chronique, des effets rénaux ont été mis en évidence à des faibles doses ($15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) chez le rat. Des effets reprotoxiques et développementaux ont également été mis en évidence pour des expositions du même ordre de grandeur et il apparaît pertinent de prendre en compte ces effets pour la construction de VTR reprotoxiques spécifiques.

Aucune donnée humaine n'est disponible.

2.2.1 Effets néphrotoxiques

Une étude de toxicité à dose répétée (90 jours) conduite chez le rat par voie orale a montré une diminution du gain de poids et de la prise alimentaire, ainsi que des lésions histologiques hépatiques (nécrose cellulaire) et rénales (minéralisation notée lors d'une deuxième lecture anatomopathologique) à $140 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3) [CMA, 1997, Cunny *et al.*, 1997]. Un NOAEL de $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a été identifié.

Lors d'une étude sur 3 générations [NTP, 1997, Chapin *et al.*, 1999] où des rats Sprague Dawley ont été exposés par voie orale à du 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3), une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins ont été observées à $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. En outre, dès $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et pour toutes les générations, des lésions dégénératives et une dilatation tubulaire rénale non dose-dépendantes ont été mises en évidence.

2.2.2 Effets reprotoxiques

Les effets reprotoxiques du nonylphénol ont été décrits chez des rats exposés sur plusieurs générations ou lors d'exposition *in utero*. Les effets observés aux plus faibles doses sont des perturbations du système reproductif des nouveau-nés (précocité de l'ouverture vaginale et une baisse du poids des ovaires et du compte spermatique), probablement sans atteinte fonctionnelle de la reproduction et de la fertilité, et des modifications des épидидymes lors d'expositions pendant la gestation [UE, 2002].

Ces effets reprotoxiques chez les nouveau-nés sont observés en présence de modifications au niveau du foie et des reins chez les parents lors d'expositions sur plusieurs générations [Nagao *et al.*, 2001]. En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'établir un lien de causalité entre la toxicité générale observée sur la génération F0 (modifications histologiques hépatiques et rénales) et la reprotoxicité mise en évidence sur la génération F1. Par prudence, une VTR fondée sur des effets reprotoxiques peut être proposée.

A partir de la revue de la littérature, et en s'appuyant sur les données les plus récentes, plusieurs études de reprotoxicité de bonne qualité réalisées chez l'animal ont été retenues. Elles sont jugées représentatives des effets reprotoxiques observés. Elles sont synthétisées ci-après. D'autres études ont été conduites par voie intra-péritonéale. Elles n'ont pas été jugées pertinentes pour la construction d'une VTR reprotoxique car le mode d'administration (voie intra-péritonéale) n'est pas représentatif des conditions réelles d'exposition de l'embryon.

- Etudes de toxicité pré ou postnatale

Une première étude réalisée chez des rats Wistar exposés au nonylphénol du 9^{ème} au 15^{ème} jour de gestation n'a pas mis en évidence de toxicité pour le développement jusqu'à 300 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ [Initiative Umweltrelevante Altstoffe, 1992].

La seconde étude a été réalisée chez des rats Wistar exposés *in utero* à du 4-nonylphénol linéaire (n°CAS 104-40-5) par gavage de la mère du 11^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation aux doses de 0, 3, 15 et 75 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ [Hossaini *et al.*, 2001]. Les effets ont été observés après la naissance sur la F1 à J11, J21 et J110. A J110, une diminution dose-dépendante du poids absolu de l'épididyme droit a été observée à partir d'une exposition de 15 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Un NOAEL de 3 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ a été identifié.

Dans la troisième étude, les rats Sprague-Dawley ont été exposés du 7^{ème} jour de la gestation (GD7) à la 10^{ème} semaine postnatale, par gavage de 4-nonylphénol linéaire [De Jager *et al.*, 1999]. Les auteurs ont observé une mortalité ainsi qu'une diminution du poids absolu des testicules et des épидидymes, une diminution du diamètre des tubes séminifères et de l'épaisseur de l'épithélium basal à 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, en présence d'une mortalité. Une diminution du compte spermatique a également été observée, mais à 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Aucun NOAEL n'a pu être identifié.

Récemment, Moon *et al.* (2007) ont réalisé une étude portant sur les effets d'une exposition orale d'un mélange d'isomères branchés du nonylphénol, aux doses de 0, 10 et 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, sur le développement de la glande mammaire chez des rats Long Evans. Les mères ont été exposées au nonylphénol ramifié du 15^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation et les effets ont été observés chez les femelles F1 au 4^{ème}, 22^{ème}, 33^{ème}, 41^{ème} et 66^{ème} jour post-natal (PND 4, 22, 33, 41 et 66, respectivement). A 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, les effets observés sont une augmentation du poids utérin (PND41), une augmentation du taux de branchement des canaux primaires en canaux secondaires (PND4), une augmentation du nombre de bourgeons alvéolaires et une différenciation des bourgeons de l'extrémité terminale en bourgeons alvéolaires (PND33). Dès 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, il a été observé une diminution des branchements primaires du canal collecteur de la glande mammaire et un retard dans la migration de l'épithélium mammaire vers le nœud lymphatique (PND22).

Des effets endocriniens ont été aussi observés à PND41 avec une baisse de la LH pituitaire, une augmentation du nombre de récepteurs de l'œstrogène dans le stroma et l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus et une augmentation du nombre de récepteurs de la prolactine dans les glandes mammaires à la dose de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Il peut être noté une augmentation du nombre de récepteurs de la progestérone dans l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ et une diminution à 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. A 10 et 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, une baisse de la TSH pituitaire est observée. Ainsi, en tenant compte de tous ces effets, un LOAEL de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ peut être proposé. Aucun NOAEL n'est identifié.

- Etude de toxicité sur plusieurs générations

Dans l'étude du NTP (1997), publiée par Chapin *et al.* en 1999, des rats Sprague-Dawley ont été exposés par voie orale à 0, 15, 50 et 160 mg.kg⁻¹pc.j⁻¹ (0, 200, 650 et 2000 ppm) de 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3). L'exposition a été maintenue sur trois générations (de la semaine 7 pour F0 à la semaine 8 pour F3). La fertilité et les accouplements sont normaux. On note à 160 mg.kg⁻¹pc.j⁻¹ un allongement du cycle œstral (chez les F1 et F2) et à 50 et 160 mg.kg⁻¹pc.j⁻¹, une ouverture vaginale précoce (chez les F1, F2 et F3), une diminution du poids des ovaires (sans lésion histologique), une diminution de la densité spermatique épидидymaire et du compte des spermatozoïdes chez les F2. Pour ces modifications spermatiques, l'explication est incertaine. Les perturbations du système reproductif apparaissent mineures et sans retentissement sur la fertilité. Un NOAEL concernant les effets reprotoxiques a été identifié à 15 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Ces effets sont également accompagnés d'une toxicité générale avec une diminution du gain pondéral et une augmentation du poids des reins à 50 et 160 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Le NOAEL observé dans cette étude est de 15 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les effets sur la reproduction.

Dans l'étude de Nagao *et al.* (2001), des rats Sprague-Dawley ont été exposés à un mélange d'isomères linéaires du nonylphénol (CAS 25154-52-3) par gavage aux doses de 0, 2, 10 et 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Dans le dernier groupe de dose (50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹), une diminution du poids corporel a été mise en évidence dans la génération parentale, mais elle n'est pas significative. Une augmentation du poids du foie et des reins, associée dans la génération parentale (F0) à des modifications histologiques (hypertrophie centrolobulaire, corps éosinophiles), a également été observée à cette dose. Les auteurs concluent à une absence de signification toxicologique claire, ce qui a été également suggéré dans d'autres études [Cunny *et al.*, 1997].

Chez les femelles F0 et F1, une diminution significative du poids absolu et relatif des ovaires est observée à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ sans atteinte histologique associée. Chez les femelles de la génération F1, une diminution statistiquement significative de la LH sérique (5,5 ng.mL⁻¹ versus 7,2 ng.mL⁻¹ chez les témoins, p<0,05) et une ouverture vaginale précoce (à PND 31,5 en moyenne versus 33,4 chez les témoins, p<0,01) sont observées à la plus forte dose testée. Une diminution statistiquement significative (p<0,05) du nombre de petits par portée (11,5 versus 13,5 en moyenne chez les témoins) et du nombre de sites d'implantation (12,5 versus 14,9 en moyenne chez les témoins) est observée à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ dans la génération F2. Une augmentation des niveaux de testostérone chez les mâles et du poids de l'utérus chez les femelles de la génération parentale (F0) est reportée à 2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, mais n'est pas observée aux doses supérieures. Une augmentation du poids de la prostate chez les mâles avant sevrage et une diminution des niveaux de FSH chez les mâles adultes sont observés à 2mg.kg⁻¹pc.j⁻¹ dans la génération F1. Ces effets ne sont plus mis en évidence pour les doses supérieures (10 et 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹). Les auteurs proposent un NOAEL de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour ces effets reprotoxiques.

Toutes les expérimentations animales retenues sont conduites selon des protocoles rigoureux (lignes directrices de l'OCDE ou s'y apparentant). Ces études ont donc été classées 1 sur la base de la classification de Klimisch et peuvent être retenues pour la construction d'une VTR.

2.3 Mécanisme d'action

Seul le mécanisme d'action lié aux effets reprotoxiques a été investigué. Une réponse utéro-trophique et une ouverture vaginale précoce ont été clairement mises en évidence lors d'études *in vivo* chez la rate immature ou ovariectomisée, permettant de conclure à l'activité œstrogénique du nonylphénol. Les études *in vitro* confirment cette activité, qui serait 10³ à 10⁶ fois inférieure à celle du 17-β-œstradiol [UE, 2002].

Le test utérotrophique chez la rate est un test reconnu prédictif des effets perturbateurs endocriniens chez l'Homme. Ainsi, au vu de l'ensemble des données disponibles, les effets reprotoxiques observés chez l'animal pourraient également être observés chez l'Homme.

3 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

Comme il existe plusieurs formes de nonylphénol, le CES a proposé de construire deux VTR, l'une pour les formes dont la chaîne alkyle est linéaire et l'autre pour les formes dont la chaîne alkyle est ramifiée.

3.1 Le nonylphénol ramifié (CAS 90481-04-2 et 84852-15-3)

3.1.1 Choix de l'effet critique

Le nonylphénol ramifié a montré une activité œstrogénique aussi bien dans les études *in vitro* (10^3 à 10^6 fois plus faible que celle de l'œstradiol) qu'*in vivo*. Les différentes études analysées mettent en évidence une activité œstrogénique lors d'exposition *in utero* et sur plusieurs générations. Ces études mettent en évidence des effets sur les ovaires (diminution du poids des ovaires sans lésion histologique) et sur les spermatozoïdes des descendants (diminution de la densité spermatique épидидymaire et du nombre de spermatides), une ouverture vaginale précoce, et des effets sur le développement des glandes mammaires (diminution des branchements primaires du canal collecteur et retard de migration de l'épithélium vers les nœuds lymphatiques au 22^{ème} jour après la naissance). Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- La plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- La bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

Il convient de noter que les effets sur la glande mammaire semble être le marqueur le plus sensible puisqu'ils sont observés aux doses les plus faibles (LOAEL = $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$). **Le CES a donc retenu les effets sur la glande mammaire comme effet critique.**

3.1.2 Choix de l'étude

Deux études décrites précédemment [Chapin *et al.*, 1999 ; Moon *et al.*, 2007] peuvent être retenues pour les composés ramifiés du nonylphénol. Un tableau comparatif de ces 2 études se trouve en annexe 3.

Le choix de l'étude de **Moon *et al.* (2007)** pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique du nonylphénol ramifié repose sur :

- La prise en compte de l'effet toxique le plus sensible : un LOAEL de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a été mis en évidence dans l'étude de Moon *et al.* (2007) pour les effets sur les glandes mammaires tandis que l'étude de fertilité de Chapin *et al.* (1999) a mis en évidence un NOAEL de $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour d'autres effets œstrogéniques. Chapin *et al.* n'ont pas étudié les effets sur les glandes mammaires. Le choix de l'étude de Moon *et al.* permet de protéger des effets apparaissant à des doses plus élevées dans l'étude de Chapin.
- La qualité de l'étude jugée acceptable par les experts, même si elle ne suit pas la totalité des recommandations de l'OCDE (ligne directrice 414).

3.1.3 Choix de la dose critique

Parmi les 2 études sélectionnées, celle ayant conduit à observer des effets aux doses les plus faibles [Moon *et al.*, 2007] a été retenue par les experts pour dériver la dose critique.

Le LOAEL de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ issu de cette étude a donc été proposé comme dose critique.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

3.1.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : Selon la méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement, l'Afsset préconise un facteur 3 ou 10 en fonction des cas. Le CES propose un facteur 3 car le LOAEL issu de l'étude de Moon est plus bas que ceux établis dans d'autres études, suggérant que les effets retenus sont très sensibles.
- UF_D : insuffisance de données : non applicable, les données étant jugées suffisantes.

3.1.5 Synthèse

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Effets sur le développement de la glande mammaire	Absence de NOAEL LOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹	300	VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹
Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez les rates Long Evans	Pas de construction de BMDL	UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3	Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen
Moon <i>et al.</i> , 2007			

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

3.2 Le nonylphénol linéaire (CAS 25154-52-3 et 104-40-5)

3.2.1 Choix de l'effet critique

Le nonylphénol linéaire a montré aussi bien dans les études *in vivo* qu'*in vitro* une activité œstrogénique, 10³ à 10⁶ fois plus faible que celle de l'œstradiol. Les études multigénérationnelles de bonne qualité scientifique mettent en évidence des **effets sur l'ouverture vaginale et les ovaires** dès 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, sans modification fonctionnelle de la reproduction. Ces effets sont compatibles avec l'activité œstrogénique mise en évidence. Ils peuvent être retenus comme effets critiques en raison de :

- la plausibilité biologique et du lien démontré avec le mécanisme d'action du nonylphénol ;
- la bonne qualité scientifique des études ayant montré ces effets.

3.2.2 Choix de l'étude

Les deux études retenues décrites précédemment (cf. partie effets reprotoxiques) concernant le nonylphénol linéaire sont celles de Hossaini *et al.* (2001) et de Nagao *et al.* (2001). Un tableau comparatif de ces deux études se trouve en annexe 4.

Ces deux études sont de bonne qualité (Klimisch 1). Dans l'étude d'Hossaini *et al.* (2001), uniquement la diminution du poids absolu de l'épididyme droit est rapportée par les auteurs comme statistiquement significative. Par conséquent, l'étude ne sera pas retenue pour la construction de la VTR. Ainsi, l'étude de Nagao *et al.* (2001) qui met en évidence une activité œstrogénique chez les rates F1 exposées au nonylphénol linéaire, est retenue comme étude clé pour construire la VTR.

3.2.3 Choix de la dose critique

Dans l'étude retenue [Nagao *et al.*, 2001], la diminution de la LH sérique et du poids des ovaires, et l'ouverture vaginale précoce sont observées à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, dose correspondant au LOAEL.

Il est important de souligner que d'autres modifications biologiques apparaissent à la plus faible dose. En effet, une diminution de la FSH est observée chez les mâles de la génération F1 à 2 mg/kg pc/j, mais pas aux doses supérieures (224 ng.mL⁻¹ vs 302 ng.mL⁻¹ chez les témoins). Les auteurs précisent que les données sur les concentrations hormonales doivent être interprétées avec précaution tant que de nouvelles études n'ont pas confirmé leurs résultats. De même, une augmentation du poids relatif et absolu de la prostate et de la vésicule séminale est rapportée pour la seule dose de 2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (respectivement, 12,8±2 mg vs 11,4±2,2 mg chez les témoins et 76,4±13,6 mg vs 68,4±12,9 mg chez les témoins).

Le CES a décidé de retenir comme dose critique le NOAEL de 10 mg/kg pc/j proposé par les auteurs.

Aucune benchmark dose (BMD) n'a été proposée à partir de cette étude compte tenu des difficultés méthodologiques rencontrées pour le choix du niveau de réponse dans le cadre de réponses continues.

Le CES estime cependant que le couple de valeur LOAEL / NOAEL peut être proposé pour la construction de la VTR. Le faible écart entre les deux valeurs renforce la précision de la VTR.

3.2.4 Choix des facteurs d'incertitude

- UF_A : variabilité inter-espèces : le facteur retenu est le facteur maximal de 10 car il n'y a pas de donnée chez l'Homme.
- UF_H : variabilité intra-espèce : le facteur 10 est conservé par défaut lors de l'utilisation d'études réalisées chez l'animal, pour tenir compte de la plus grande variabilité de l'espèce humaine.
- UF_L : utilisation d'un LOAEL : non applicable
- UF_D : insuffisance de données : dans l'étude retenue [Nagao *et al.*, 2001] ont été étudiés de nombreux effets mais pas ceux sur la glande mammaire. Ces effets semblent pourtant apparaître à des niveaux beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ comme le montre l'étude de Moon *et al.*, 2007 sur le nonylphénol ramifié. Ainsi, le CES propose un facteur de 3 pour l'absence de données sur la glande mammaire.

3.2.5 Synthèse

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce (F1)	NOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ LOAEL = 50 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	300	VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹
Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rates Sprague-Dawley	Pas de construction de BMDL	UF _A 10 UF _H 10 UF _D 3	Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la glande mammaire) Etude : fort Dose critique : fort
Nagao <i>et al.</i> , 2001			VTR : moyen

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = uncertainty factors (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces, UFH : variabilité individuelle, UFD : Insuffisance de données

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

4 Conclusions de l'expertise collective

- ▶ Le nonylphénol est une famille de composés qui a fait l'objet de plusieurs études de reprotoxicité chez le rongeur. Deux VTRs ont été construites, une pour les composés linéaires et une pour les composés ramifiés.
- ▶ Aucune donnée humaine n'est disponible.
- ▶ L'hypothèse retenue est de considérer que les effets observés chez le rat sont pertinents pour l'Homme et que les effets de type œstrogénique peuvent être retenus comme effets critiques. Le mécanisme avancé (action œstrogénique) est plausible et corrélé aux effets mis en évidence.
- ▶ Même si l'objectif est de construire une VTR reprotoxique, d'autres effets, tels que des effets néphrotoxiques, sont susceptibles de se produire à des niveaux de doses comparables.
- ▶ Le rapport européen conclut à un NOAEL de $15 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les effets sur la reproduction en se basant sur l'étude du NTP, 1997. Les études choisies ici pour construire les VTR sont plus récentes et de ce fait, n'avaient pas pu être prises en compte dans le rapport européen.

Le CES propose ainsi la construction de deux VTR, pour les nonylphénols linéaire et ramifié, spécifiques aux effets sur le développement et la reproduction. Compte tenu des effets sur le développement, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique.

-- Nonylphénol ramifié CAS 90481-04-2 et 84852-15-3 --

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Effets sur le développement de la glande mammaire	Absence de NOAEL LOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹	300	VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹
Etude de toxicité sur le développement par voie orale chez les rates Long Evans	Pas de construction de BMDL	UF _A 10 UF _H 10 UF _L 3	Niveau de confiance Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen
Moon <i>et al.</i> , 2007			

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle, UF_L : utilisation d'un LOAEL plutôt que d'une dose sans effet.

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

-- Nonylphénol linéaire CAS 25154-52-3 et 104-40-5 --

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Diminution LH sérique, ouverture vaginale précoce (F1)	NOAEL = 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ LOAEL = 50 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	300	VTR = 0,03 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹
Etude de toxicité par gavage sur deux générations chez des rates Sprague-Dawley	Pas de construction de BMDL	UF _A 10 UF _H 10 UF _D 3	Niveau de confiance Recueil de données : moyen (absence d'étude sur la glande mammaire) Etude : fort Dose critique : fort VTR : moyen
Nagao <i>et al.</i> , 2001			

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level; BMD = Benchmark Dose; UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces, UFH : variabilité individuelle, UFD : Insuffisance de données

* Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT.

5 Bibliographies

- Chapin RE, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G, The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study, *Toxicological science*, 1999 Nov;52(1):80-91
- Chemicals Manufacturers Association, Uterine weight assay of p-nonylphenol and p-octylphenol ethoxylate-5 (OPE-5) administered orally to ovariectomized Sprague Dawley rats, 1997, MB Research Labs Project N°MB9 6-4960.07.
- Cunny HC, Mayes BA, Rosica KA, Trutter JA, Van Miller JP, Subchronic toxicity (90-day) study with para-nonylphenol in rats, 1997, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 26, 172-178.
- Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Frandsen H, Larsen JJ, In utero reproductive study in rats exposed to nonylphénol, *Reproductive Toxicology*, 2001 Sep-Oct;15(5):537-43
- Moon HJ, Han SY, Shin JH, Kang IH, Kim TS, Hong JH, Kim SH, Fenton SE, Gestational exposure to nonylphenol causes precocious mammary gland development in female rat offspring, *Journal of reproduction and development*, 2007 Apr;53(2):333-44
- Nagao T, Wada K, Marumo H, Yoshimura S, Ono H, Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study, *Reproductive Toxicol*, 2001 May-Jun;15(3):293-315.
- National Toxicological Program, Nonylphenol : multigenerational reproductive effect in Sprague-Dawley rats when exposed to nonylphenol in the diet, 1997, R.O.W. Sciences study N° 8989-30. In *European Assessment Report on Existing Substances (2002): 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol*, EUR 20387 EN, Series : 2nd Priority List vol. 10.
- Union Européenne, 2002. Risk Assessment Report. 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol Institute for Health and Consumer Protection. European Chemical Bureau. Existing Substances. 2nd Priority List. Volume 10. EUR 20387 EN. 244 pages.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA JEUNESSE ET
DES SPORTS

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DU
DÉVELOPPEMENT ET DE L'AMÉNAGEMENT
DURABLES

Direction générale de la santé

Direction de la prévention des pollutions et des
risques

COURRIER REÇU LE

30 JUIL. 2007

2672

Paris le

25 JUIL. 2007

Le Directeur général de la santé

Le Directeur de la prévention des pollutions
et des risques

à

Madame la Directrice générale de l'Agence
Française de Sécurité Sanitaire de
l'Environnement et du Travail
253 Avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort

GL ←

Objet : Valeurs toxicologiques de référence

Copie : DGT

Par courrier en date du 16 avril 2007, vous nous avez proposé une méthode de construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances toxiques pour la reproduction et le développement et vous nous avez transmis un rapport intitulé « Identification d'une liste de substances toxiques pour la reproduction et le développement et proposition d'une méthode de hiérarchisation pour l'analyse des valeurs toxicologiques de référence ».

Suite à la réunion du 15 juin 2007 entre nos services, nous souhaitons vous confirmer les orientations suivantes.

Il nous paraît en premier lieu pertinent que votre agence poursuive ses travaux méthodologiques. Il nous semble notamment important que l'agence puisse diffuser et valoriser le rapport intitulé « Document de référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques ». A ces fins, nous vous encourageons à assurer, ou faire assurer, la traduction en anglais de ce document pour un meilleur partage des méthodologies scientifiques au niveau européen et une visibilité accrue de l'agence sur la scène européenne et internationale. Par ailleurs, nous souhaitons que l'agence poursuive ses travaux méthodologiques sur les VTR pour les substances cancérigènes et puisse élargir le champ de la méthode de construction élaborée pour les VTR fondées sur des effets reprotoxiques aux effets à seuil.

En ce qui concerne les substances pour lesquelles des VTR nationales devraient être construites, en premier lieu, et pour l'année 2007, nous vous invitons à faire valider par le comité d'experts spécialisés concerné les VTR utilisées lors de la phase pilote de l'élaboration de la méthodologie : toluène, ether éthylique de l'éthylène glycol, linuron, benzyl butyl phtalate, nonylphénol et di-n-

butyl-phtalate. Ainsi, ces six VTR pourront être utilisées en France dans les évaluations des risques sanitaires.

De manière plus globale, nous souhaitons définir à l'avenir un programme national restreint et prioritaire de VTR à élaborer. Ce programme de travail pourra être arrêté sur la base de la liste établie par votre agence ainsi qu'en fonction des priorités de gestion, notamment signalées par nos services déconcentrés en charge de l'instruction des dossiers d'évaluations des risques sanitaires. De plus, il nous semble intéressant de mener les travaux d'élaboration de VTR en synergie avec les autres travaux menés par l'agence sur les substances chimiques. Aussi, nous serions intéressés par la transmission de la liste totale des substances concernées par vos travaux relatifs aux CMR, VLEP, valeurs guides...

En fonction de ces différentes données, une liste prioritaire de substances VTR à élaborer par votre agence pour 2008 vous sera communiquée.

Par ailleurs, nous souhaiterions que votre agence puisse développer et tenir à jour une base de données des VTR nationales, issues du programme évoqué ci-dessus, ou issues de dossiers locaux, où des VTR auront été construites selon les lignes méthodologiques de votre agence et validées par vos soins.

Enfin, en réponse à votre courrier du 27 avril 2007 relatif à l'analyse de la méthode d'élaboration des VTR cancérogènes utilisée par l'INERIS, nous estimons que la construction par l'INERIS des VTR suivant les lignes méthodologiques en cours de définition au sein de votre agence peut être considérée comme phase pilote de l'élaboration de cette méthodologie nationale.

En conséquence, une fois votre méthodologie finalisée et validée, nous vous invitons à faire valider définitivement ces VTR (1,2-dichloroéthane, tétrachlorure de carbone, chloroforme et chlorure de méthylène) par le CES compétent.

Le Directeur général de la santé

LE CHEF DE SERVICE
ADJOINT DU DIRECTEUR GÉNÉRAL
DE LA SANTÉ PAR INTÉRIM

Didier HOUSSIN

Didier EYSSARTIER

**Le Directeur de la prévention des pollutions et
des risques**

Laurent MICHEL

Annexe 2 : Suivi des actualisations du rapport

Date	Version	Description de la modification
Novembre 2009	01	Rapport relatif à l'élaboration de VTR reprotoxiques pour le linuron, le di-n-butylphtalate, le benzylbutylphtalate, les nonylphénols, le toluène et l'éther éthylique de l'éthylène glycol
Juin 2017	02	Séparation du précédent rapport pour avoir un rapport par substance Pas d'actualisation de l'expertise

Annexe 3 : Tableau comparatif des études de Moon *et al.* (2007) et de Chapin *et al.* (1999)

Référence	Chapin <i>et al.</i> , 1999	Moon <i>et al.</i> , 2007
Type d'étude	Etude sur la reproduction sur 3 générations	Etude de toxicité prénatale par gavage sur le développement de la glande mammaire
Substances chimiques, pureté, composition	Nonylphénol ramifié (n°CAS 84852-15-3) provenant de Schnectady International	Nonylphénol (mélange de composés branchés dont 85% d'isomère p), provenant de Kluka Chemical Atrazine (pureté = 97,1%) provenant de Novartis Crop Protection
Voie d'exposition	Voie orale (nourriture)	Voie orale (gavage)
Espèce - souche étudiée - âge - poids	Rats Crl-CD (Charles River) âgés de 11 semaines	Rates Long Evans gestantes, GD ² 10
Conditions de vie	Quarantaine de 8 jours. Animaux en cage individuelle dans une pièce à 68-74 °F et 30-70% d'humidité. Cycle lumineux de 12h. Nourriture et eau <i>ad libitum</i> .	Animaux en cage individuelle dans une pièce maintenue à 20-24°C et 40-50% d'humidité. Cycle lumineux : 14h jour/ 10h nuit Nourriture et eau <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	30 couples par dose	7-8 rates gestantes par groupe de dose
Groupe témoin et nombre	30 couples par dose	7-8 rates gestantes par groupe de dose
Fréquence et durée de l'exposition	Exposition continue de la première dose au F0 jusqu'à l'autopsie des F3	GD15 – GD 19
Doses ou concentrations d'expositions	0, 15, 50 et 160 mg/kg pc/j (0, 200, 650 et 2000 ppm)	0 (huile de maïs), 10 et 100 mg/kg pc/j Atrazine : 100 mg/kg pc/j
Observations	Accouplement confirmé par lavage vaginal. Les femelles sont remises dans les cages des mâles 2 semaines après ou si présence d'un bouchon vaginale. F0 Autopsie (après PND 21) : motilité du sperme, densité du sperme dans l'épididyme, poids corporel, poids foie, reins, rate, ovaires, vagin/col/utérus, épидидyme, testicule droit, prostate et vésicule séminale. TSHC (testicular	Délivrance = GD 21, naissance PND ³ 0 PND 4 = toutes les portées sont mélangées puis reconstituées au hasard avec 10 rats/portées, avec au moins 6 femelles dans chaque. PND 22 (sevrage) = séparation des femelles et mises en cage par 3-4. <i>Observations quotidienne</i> : mortalité, morbidité, comportement, conditions générales, toxicité, poids corporel

² GD : Gestational Day

³ PND : PostNatal Day

	<p>spermatid head counts)</p> <p>Sur l'épididyme gauche et le testicule gauche : motilité, morphologie et TSHC pour le groupe témoin et 160 mg/kg pc/j</p> <p><u>F1</u></p> <p>PND 1, 4, 7, 14 et 21 : Nbr de petits, poids ;</p> <p>PND 1 et 21 : distance anogénitale.</p> <p>Autopsie à PND 21 d'un mâle et une femelle par portée : poids foie, reins, rate, ovaires, vagin/col/utérus, épидидyme et testicule droit.</p> <p>1 rat par sexe et par portée est sélectionné pour former un couple : évaluation journalière ouverture vaginale (à partir de PND 30), descente testiculaire (à partir de PND 16) et séparation préputiale (à partir PND 35).</p> <p>Les mêmes observations sont faites sur les générations suivantes.</p>	<p><i>Autopsie</i> : poids des ovaires, utérus, vagin et hypophyse des femelles (PND 41), dissection des utérus et ovaires</p> <p><i>Evaluation du développement des glandes mammaires</i> : critères morphologiques (PND 4, 22, 33, 41 et 66)</p> <p><i>Immuno-histochimie</i> : récepteurs à l'œstrogène, la progestérone et la prolactine</p> <p><i>Radio-immuno-essai</i> : LH, FSH, TSH et prolactine sérique (à partir du sang collecté à l'autopsie)</p>
<p>Effets observés – toxicité générale / maternelle</p>	<p><u>F0</u></p> <p>Pas de lésions microscopiques sur l'épididyme gauche ou le testicule gauche</p> <p>Chez les mâles, dilatation tubulaire rénale à toutes les doses et ↗ poids relatif des reins à 50 et 160 mg/kg pc/j (PND 55-58)</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel chez les femelles</p> <p><u>F1</u></p> <p>Dilatation tubulaire rénale chez les mâles à toutes les doses et chez les femelles à 160 mg/kg pc/j</p> <p>50 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel chez les femelles.</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel, ↗ poids relatif des reins (PND 55-58) chez les femelles et les mâles</p> <p><u>F2</u></p> <p>Dilatation tubulaire rénale chez les mâles à toutes les doses et chez les femelles aux 2 dernières doses</p> <p>50 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel et ↗ poids relatifs des reins chez les mâles</p> <p>160 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel et ↗ poids relatif des reins chez les mâles et les femelles, ↗ poids absolu du foie chez les femelles</p> <p><u>F3</u></p> <p>Dilatation tubulaire rénale chez les mâles et les femelles à toutes les doses</p> <p>50 mg/kg pc/j : ↘ poids corporel chez</p>	

	<p>les femelles (PND 21) (pas observé à 160 mg/kg pc/j), √ poids corporel chez les femelles adultes</p> <p>160 mg/kg pc/j : √ poids corporel (males et femelles adultes)</p>		
Effets reprotoxiques observés	<p><u>F0</u></p> <p>160 mg/kg pc/j : √ du nombre de petits vivants par portée</p> <p><u>F1</u></p> <p>50 et 160 mg/kg pc/j : Ouverture vaginale précoce (PND 30), √ poids relatif du vagin et utérus (PND 21)</p> <p>160 mg/kg pc/j : √ longueur du cycle œstral, séparation préputiale retardée, √ poids absolu des ovaires, de la prostate et du testicule droit (PND 55-58)</p> <p><u>F2</u></p> <p>% de spermatozoïdes anormal augmenté à toutes les doses, √ longueur de la gestation à toutes les doses</p> <p>15 mg/kg pc/j : Descente testiculaire précoce (pas observé à 650 ppm)</p> <p>50 et 160 mg/kg pc/j : Ouverture vaginale précoce, √ poids absolu et relatif des ovaires, √ compte spermatique épидидymaire</p> <p>50 mg/kg pc/j : √ index de fertilité</p> <p>160 mg/kg pc/j : √ longueur du cycle œstral, descente testiculaire précoce, √ nombre de spermatozoïdes par mg testicule et √ têtes de spermatozoïdes par testicule</p> <p><u>F3</u></p> <p>50 mg/kg pc/j : Descente testiculaire retardée (pas observée à 160 mg/kg pc/j)</p> <p>50 et 160 mg/kg pc/j : Ouverture vaginale précoce, √ poids absolu de l'épididyme droit</p> <p>50 mg/kg pc/j : √ poids absolu des ovaires</p>	<p>Poids des organes (F1)</p> <p>100 mg/kg pc/j : ↑ poids utérin (PND 41)</p> <p><u>Effets sur le développement des glandes mammaires (F1)</u></p> <p>10 mg/kg pc/j : ↓ des branchements primaires du canal collecteur et retard de migration de l'épithélium vers les nœuds lymphatiques (PND 22)</p> <p>100 mg/kg pc/j : migration de la glande mammaire du mamelon vers le nœud lymphatique (PND 4), ↑ du taux de branchements des canaux primaires en canaux secondaires (PND 4), ↑ du nombre de bourgeons alvéolaires et différenciation des bourgeons de l'extrémité terminale en bourgeons alvéolaires chez les femelles (PND 33)</p> <p><u>Effets sur les taux d'hormones (F1)</u></p> <p>10 mg/kg pc/j : ↓ TSH hypophysaire, ↑ du nombre de récepteurs de la progestérone dans l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus</p> <p>100 mg/kg pc/j : ↓ significative des niveaux de LH et FSH hypophysaire pendant la période de gestation (pas ↑ correspondante dans le sérum), ↑ du nombre de récepteurs de l'œstrogène dans le stroma et l'épithélium des glandes mammaires et dans l'utérus, √ du nombre de récepteurs de la progestérone, ↑ du nombre de récepteurs de la prolactine (dose non précisée mais 100 mg/kg selon fig 4)</p>	
	Effet critique pris en compte	Augmentation du cycle œstral, ouverture vaginale précoce, diminution du poids des ovaires, diminution du compte spermatique épидидymaire	Effets sur le développement des glandes mammaires
	Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	NOAEL = 15 mg/kg pc/j (= 200 ppm) LOAEL = 50 mg/kg pc/j (= 650 ppm)	LOAEL = 10 mg/kg pc/j
	Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	1a (lignes directrices de l'OCDE et les bonnes pratiques de laboratoire)	2

Annexe 4 : Tableau comparatif des études de Hossaini *et al.* (2001) et Nagao *et al.* (2007)

Référence	Hossaini <i>et al.</i> , 2001	Nagao <i>et al.</i> , 2001
Type d'étude	Etude de toxicité prénatale par gavage	Etude de la reproduction sur 2 générations
Substances chimiques, pureté, composition	n-Nonylphénol (n°CAS 104-40-5) Pureté de 99,5%	Nonylphénol (n° CAS 25154-52-3, mélange de composés avec une chaîne alkyle linéaire) provenant de Mitsui Chemical Co, Tokyo Pureté : au moins 99,0 %
Voie d'exposition	Voie orale (gavage) des mères -> exposition <i>in utero</i>	Voie orale (gavage)
Espèce - souche étudiée - âge - poids	Rats Wistar (mol:Wist/han) Femelles âgées de 12-14 semaines	Rats Crj:CD(SD)IGS Rats mâles âgés de 6 semaines (poids moyens des rats âgés de 5 semaines = 117,1 ± 2,7 g) Rats femelles âgés de 13 semaines (poids moyens des rats âgés de 10 semaines = 207,0 ± 5,3 g)
Conditions de vie	Animaux en cage individuelle dans une pièce à 22 ± 1°C et 55 ± 5 % d'humidité. Cycle lumineux de 12h. Nourriture semi-synthétique et eau <i>ad libitum</i> .	Animaux en cage dans une pièce maintenue à 23-25 °C et 50-65% d'humidité. Les femelles sont placées dans des cages individuelles une fois fécondées. Cycle lumineux de 12h. Nourriture et eau <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	?	25 rats de chaque sexe par groupe de dose
Groupe témoin et nombre	?	25 rats de chaque sexe par groupe de dose
Fréquence et durée de l'exposition	Exposition de GD11 - GD18	Exposition continue de la première dose administrée aux F0 jusqu'à l'autopsie des F2. F0 : Les mâles F0 sont exposés de 12 semaines avant la cohabitation (2 semaines) jusqu'à l'autopsie tandis que les femelles le sont de 2 semaines jusqu'à l'autopsie (gestation, délivrance et allaitement de 21 jours). F1 : après la période de sevrage (J22) jusqu'à leur autopsie F2 : jusqu'à l'autopsie
Doses ou concentrations d'expositions	0 (huile d'arachide), 3, 15 et 75 mg/kg pc/j Témoin positif : diéthylstilbestrol (30 µg/kg pc/j)	0 (huile de maïs), 2, 10 et 50 mg/kg pc/j
Observations	Après la délivrance = le nombre de ratons / portées est ajusté à 10 (tous les mâles sont gardés en vie) F0 Poids (toutes les semaines jusqu'à GD 14 puis tous les jours jusqu'à la délivrance, enfin toutes les semaines	GD0 = jour où preuve de l'insémination (présence de sperme ou d'un « bouchon vaginal ») Naissance = PND0 F0 Observations des signes cliniques 1-2 fois par jour. Pesés 2 fois/semaines avant la cohabitation

	<p>jusqu'au sevrage)</p> <p><u>F1</u></p> <p>Distance ano-génitale et poids chez les mâles et les femelles (PND 1, 5, 10, 15 et 21)</p> <p>Analyse rLH et rFSH (PND 21 et 110), estradiol (PND 21, mâles) et progestérone (PND 110, mâles)</p> <p><i>Femelles</i> : Age de l'ouverture vaginale (examen à partir PND 28, 30, 32 et 34, puis tous les jours jusqu'à l'ouverture vaginale)</p> <p><i>Mâle</i> : Age de la séparation préputiale (examen tous les jours à partir de PND35). PND 110 : Analyse du sperme (motilité et nombre). PND 21 et 110 : ALAT, cholinestérase, créatinine, protéines totales, urée, glucose, cholestérol total, phosphate et LDH sanguin.</p> <p><u>F0 et F1</u></p> <p><i>Femelles</i> : autopsie (PND 21 pour les F0 et après l'ouverture vaginale pour les F1) : poids corporel, poids du foie, reins et surrénales.</p> <p><i>Mâle F1</i> : autopsie à PND 11, 21 ou 110 : poids du foie, chaque testicule et en plus pour les PND 110, poids surrénales, chaque épидидyme, vésicules séminales et prostate.</p>	<p>pour les 2 sexes et pour les femelles à GD0, 4, 7, 14 et 20 de la gestation et J0, 4, 7, 14 et 21 après la naissance.</p> <p>Mesure de la consommation de nourriture 2 fois/semaines avant la cohabitation pour les 2 sexes mais aussi à GD 1-2, 7-8, 13-14 et 19-20 et J3-4, 6-7 et 9-10 chez les femelles.</p> <p><i>Femelles</i> :</p> <p>Avant la cohabitation : frottis vaginal tous les matins</p> <p>Autopsie à J22.</p> <p>Pesées du cerveau, cœur, poumons, foie, rate, surrénales, thymus, ovaires, utérus, thyroïde et hypophyse chez 10 femelles dans les groupe de 50 mg/kg pc/j et les témoins (foie : aux doses de 2 et 10 mg/kg pc/j).</p> <p>Examen histologique (ovaires, trompes, utérus, vagin, cœur, foie, reins, vessie, rate, poumons, thymus, glandes mammaires, thyroïde, parathyroïde, hypophyse et surrénales) chez 10 femelles dans les groupe de 50 mg/kg pc/j et les témoins (foie : aux doses de 2 et 10 mg/kg pc/j).</p> <p><i>Mâles</i> :</p> <p>Autopsie à 23 semaines.</p> <p>Pesée du cerveau, cœur, poumon, foie, rate, reins, surrénales, thymus, testicules, épидидymes, prostate, vésicules séminales, thyroïde, hypophyse.</p> <p>Quantité de sperme dans épидидyme droit, mobilité spermatique</p> <p><u>F1</u></p> <p>Nombre de petits vivants à la naissance, viabilité (PND 0-4 et 4-21), anomalies à PND 0, distance anogénitale, poids corporel (PND 0, 4, 7, 14, 21 puis une fois par semaine jusqu'à âge de 13 semaines), développement réflexes neuro et physique (PND 4), maturation sexuelle (ouverture vaginale, séparation préputiale PND 4)</p> <p>LH, FSH, TSH, T3 et T4, testostérone, prolactine et 17 bêta estradiol</p> <p>Poids des testicules, épидидymes, vésicule séminale, prostate, ovaires, utérus</p> <p>Examen histopathologique</p> <p>Tests comportementaux et fonctionnels</p> <p><u>F2</u></p> <p>Autopsie à PND 21</p>
<p>Tests statistiques utilisés</p>	<p>Logiciel SAS 6,12</p> <p>Analyse de variance à un facteur : poids corporel, poids du foie, des reins et des surrénales, taille des portées, poids à la naissance</p> <p>Taille des portées utilisées comme</p>	<p>Test de Fisher pour les indices de fertilité et d'accouplement</p> <p>Test de Mann-Whitney pour les différences histologiques entre les 2 groupes, suivi par un test de Fisher pour le nombre de positifs</p> <p>Données issues des portées considérées comme un</p>

	<p>covariance, puis test de Dunett</p> <p>Analyse de variance à un facteur ajusté sur taille des portées : distance ano-génitale, ouverture vaginale et séparation du préputiale, paramètres de motilité du sperme. Si significatif -> test de Dunett ($p < 0,05$)</p> <p>« Proc mixed » avec 2 facteurs principaux (âge et traitements) : poids corporel, niveaux hormonaux, poids du foie et des testicules. Si effets du traitement significatif -> two-tailed <i>t</i> test</p>	<p>seul échantillon. Test de Barlett pour homogénéité des variances.</p> <p>Si Ok → analyse de variance puis si différence significative entre les groupes → test de Dunett (multiples comparaisons)</p> <p>Si non ou si variance = 0 → analyse des rangs Kruskal-Wallis, puis si significatif → test de Dunett (multiples comparaisons).</p> <p>Test de Student pour les concentrations sériques d'hormones</p> <p>Pour les tests, $p \leq 0,05$ et $p \leq 0,01$</p>
Effets observés	<p><u>F1</u></p> <p>15 mg/kg pc/j : ↓ poids absolu du foie chez les mâles (PND 11 et 21) et ↓ poids absolu de l'épididyme droit mais pas du poids relatif (PND 110)</p> <p>75 mg/kg pc/j : ↓ poids absolu du foie chez les mâles F1 (PND 21) mais pas chez les mâles adultes F1 (PND 110)</p>	<p><u>F0</u></p> <p>2 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↘ poids cerveau (poids relatif), ↗ poids cœur, thyroïde, surrénales et épидидymes (poids absolu), ↘ T3 et T4 et ↗ testostérone</p> <p><i>Femelles</i> : ↗ poids de l'utérus (relatif et absolu)</p> <p>50 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ poids cerveau, poumons, thyroïde, surrénales (poids relatif), ↘ poids du thymus, ↗ poids du foie (poids relatif) et reins (poids absolu et relatif) associé à des modifications histologiques (↗ hypertrophie centrolobulaire des hépatocytes, ↘ corps éosinophiles rénaux) et ↗ TSH</p> <p><i>Femelles</i> : ↘ poids des ovaires (relatif et absolu)</p> <p><u>F1 avant sevrage</u></p> <p>2 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ poids relatif et absolu prostate et vésicule séminale (pas D/R) et ↘ TSH et T4</p> <p><i>Femelles</i> : ↘ TSH, T3 et T4</p> <p>50 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ FSH et ↘ T3</p> <p><i>Femelles</i> : ↘ LH et TSH, et ↗ T3</p> <p><u>F1 après sevrage</u></p> <p>2 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↘ poids relatif thymus et ↘ FSH et T3</p> <p>50 mg/kg pc/j :</p> <p><i>Mâles</i> : ↗ poids relatifs foie et reins associé à des modifications histologiques au niveau du foie (↗ hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires), ↘ T3 et ↗ concentration spermatique</p> <p><i>Femelles</i> : ↘ poids corporel, ↘ poids relatif et absolu des ovaires, ↗ hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires et ouverture vaginale précoce</p> <p><u>F2</u></p> <p>50 mg/kg pc/j : ↘ nombre de sites d'implantation et du nombre des petits par</p>

		portées
Effet critique pris en compte	↓ poids absolu de l'épididyme droit	Activité œstrogénique (ouverture vaginale précoce, ↓ LH et ↓ du poids des ovaires)
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	NOAEL = 3 mg/kg pc/j LOAEL = 15 mg/kg pc/j	NOAEL = 10 mg/kg pc/j LOAEL = 50 mg/kg pc/j
Toxicité maternelle	ND	non
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	1	1

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)