

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Institut de chimie des milieux et matériaux de Poitiers - IC2MP
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Santé-Environnement

Présentée par :
Axelle Cariot

Analyse de traces de micropolluants dans l'eau et le lait maternel en vue d'évaluer leur impact sur la santé

Directeur(s) de Thèse :
Sylvie Rabouan, Antoine Dupuis

Soutenue le 26 novembre 2012 devant le jury

Jury :

Président	Bernard Legube	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	Gwenola Burgot	Professeur des Universités, Université de Rennes 1
Rapporteur	Arnaud Salvador	Professeur des Universités, Université de Lyon 1
Membre	Sylvie Rabouan	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Antoine Dupuis	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Patrick Mazellier	Professeur des Universités, Université de Bordeaux 1

Pour citer cette thèse :

Axelle Cariot. *Analyse de traces de micropolluants dans l'eau et le lait maternel en vue d'évaluer leur impact sur la santé* [En ligne]. Thèse Santé-Environnement. Poitiers : Université de Poitiers, 2012. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté de Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : sciences pour l'environnement Gay Lussac
Secteur de recherche : Santé-Environnement

Présentée par :

Axelle CARIOT

Analyse de traces de micropolluants dans l'eau et le lait maternel en vue d'évaluer leur impact sur la santé

Directeur de Thèse : Pr Sylvie RABOUAN
Co-directeur de Thèse : Dr Antoine DUPUIS

Soutenue le 26 novembre 2012
devant la Commission d'Examen

JURY

Bernard LEGUBE	Professeur (Université de Poitiers)	Président
Gwenola BURGOT	Professeur (Université de Rennes)	Rapporteur
Antoine DUPUIS	Maître de conférences (Université de Poitiers)	Co-directeur
Patrick MAZELLIER	Professeur (Université de Bordeaux-1)	Examineur
Sylvie RABOUAN	Professeur (Université de Poitiers)	Directeur
Arnaud SALVADOR	Professeur (Université Claude Bernard de Lyon-1)	Rapporteur

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers, UMR CNRS 7285 et avec le soutien financier du programme Eaux et Sols de l'Université de Poitiers.

Je tiens à remercier Madame Nathalie KARPEL VEL LEITNER, directeur de recherche au CNRS de m'avoir accueillie dans l'équipe Eaux, Sols, Santé, Environnement.

Ces travaux ont été effectués sous la direction de Madame Sylvie RABOUAN, Professeur à l'Université de Poitiers, que je tiens à remercier chaleureusement pour ses conseils et son soutien durant ce travail, ainsi que lors de nos conversations sur mon avenir professionnel. Merci de m'avoir fait bénéficier de votre expérience professionnelle et personnelle. Je n'oublierai pas les discussions intéressantes que nous avons eues sur l'origine des maladies et leur guérison. Je vous adresse toute mon amitié.

Ce travail a été codirigé par Monsieur Antoine DUPUIS, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers. Je vous adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir guidée dans mon cursus de pharmacie spécialisée, et guidée tout au long de ces 3 années de thèse. Merci de m'avoir formée à l'analytique. Merci pour vos idées et votre réflexion scientifique. Merci de m'avoir consacré de votre temps pour me faire partager votre passion et votre vision du métier de pharmacien et de chercheur.

Je suis honorée de la présence à ce jury de Madame Gwenola BURGOT, Professeur de l'Université de Rennes, ainsi que de Monsieur Arnaud SALVADOR, Professeur à l'Université de Lyon. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie Monsieur, Patrick MAZELLIER, Professeur à l'université de Bordeaux d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Bernard LEGUBE, Professeur à l'université de Poitiers pour son appui indispensable à la réalisation de ce travail de thèse, et sa présence dans le jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Virginie MIGEOT, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier au Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers et à Madame Marion ALBOUY-LLATY, médecin Assistant Hospitalo-Universitaire, pour m'avoir initiée à la santé publique, nécessaire au thème interdisciplinaire santé-environnement de ma thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Pascale PIERRE-EUGENE pour son aide précieuse dans les manips, sa disponibilité et sa gentillesse. Merci pour ta prévoyance et pour ton organisation.

Merci à Camille et à Céline avec qui j'ai partagé mon bureau. Merci pour votre soutien dans les moments difficiles. Merci de m'avoir changée les idées quand j'en avais besoin. Merci à Céline pour ton dynamisme et ton enthousiasme.

J'adresse également mes remerciements aux doctorants Mélissa, Arnaud, Gaëlle, Diab, Ghizlaine et les autres pour votre accueil dans le laboratoire et pour m'avoir facilitée le partage de la vie au laboratoire de l'ENSIP.

Je tiens à remercier Elodie Verzeni pour son aide précieuse sur le Xevo.

Je remercie également les nombreux internes de pharmacie hospitalière de Poitiers : Anne, Astrid, Cécile, Claire, Elodie, Fanny, Guillaume, Hélène, Lauranne, Marine, Miriame, Pauline, Sophie, Valérie...de m'avoir accueillie à la pharmacie et informée des changements lorsque je n'y étais plus en stage mais uniquement en garde. Merci pour les bons moments passés à l'internat le midi et lors des sorties.

Je n'oublie pas de remercier ma famille qui m'a beaucoup encouragée. Merci à mon père d'avoir toujours eu de l'ambition pour moi. Merci à ma mère d'avoir cru en moi et pour son amour inconditionnel.

Merci, Sébastien pour ton oreille toujours attentive de mes paroles qui ne te lassent jamais. Merci d'être toujours le plus beau, le plus fort et le plus intelligent. Merci de me permettre de mettre au clair mes idées souvent brouillonnes. Merci d'avoir supporté la distance durant ces trois années. La vie quotidienne à deux est pour bientôt.

SOMMAIRE

Liste des acronymes et abréviations	9
INTRODUCTION	11
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
CHAPITRE I : LE BISPHENOL A	17
I.1. Formule, propriétés physico-chimiques et usages	17
I.2. Présence dans l'environnement	19
I.3. Exposition de la population générale	21
I.4. Toxicocinétique	22
I.5. Toxicité	24
<i>I.5.a. Mécanisme d'action</i>	<i>24</i>
<i>I.5.b. Valeur Toxicologique de Référence (VTR) du BPA</i>	<i>25</i>
<i>I.5.c. Récapitulatif des effets toxiques du BPA</i>	<i>27</i>
<i>I.5.d. Courbes effet dose non monotones.....</i>	<i>30</i>
I.6. Biomonitoring.....	32
CHAPITRE II : LES NONYLPHENOLS.....	35
II.1. Formules, structures, propriétés chimiques et usages.....	35
II.2. Présence dans l'environnement	36
II.3. Exposition de la population	38
II.4. Toxicocinétique	38
II.5. Toxicité	40
II.6. Biomonitoring.....	41
CHAPITRE III : LES DÉRIVÉS CHLORÉS DU BISPHENOL A ET DU NONYLPHENOL	43
III.1. Origine des dérivés chlorés et présence dans l'environnement	43
III.2. Toxicité	45
III.3. Biomonitoring.....	47
CHAPITRE IV : VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE	49
IV.1. Contexte	49
IV.2. Vocabulaire général de validation.....	51
IV.3. Comparaison de la méthodologie des procédures de validation de 3 guides applicables au domaine de la santé environnementale	53
PARTIE II : TRAVAUX PERSONNELS.....	59
CHAPITRE V : CHIMIE ANALYTIQUE ET DIFFICULTÉS MÉTROLOGIQUES DES NONYLPHENOLS EN SANTÉ-ENVIRONNEMENTALE.....	61
Résumé	61
Analytical chemistry and metrological issues related to nonylphenols in environmental health.....	63
Abstract	63
V.1. Introduction	63
V.2. Généralités sur l'analyse des nonylphénols	65
<i>V.2.a. The nonylphenols present in the environment</i>	<i>65</i>
<i>V.2.b. Naming nonylphenols.....</i>	<i>66</i>
<i>V.2.c. References for nonylphenols.....</i>	<i>68</i>

V.3. Analysis of 353NP in the environment.....	72
V.3.a. <i>Materials and methods</i>	72
V.3.b. <i>Results</i>	75
V.4. Discussion	76
V.5. Conclusion.....	82
Acknowledgements.....	83
References.....	83

CHAPITRE VI : QUANTIFICATION DU BISPHEENOL A, DU 353 NONYLPHENOL ET DE LEURS DERIVES CHLORES DANS LES USINES DE TRAITEMENT D'EAU POTABLE 87

Résumé.....	87
Quantification of Bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants	89
Abstract	89
VI.1. Introduction	90
VI.2. Materials and method	93
VI.2.a. <i>Commercial chemicals and reagents</i>	93
VI.2.b. <i>Synthesis of 353-nonylphenol, chlorinated 353-nonylphenol and chlorinated bisphenol A</i>	93
VI.2.c. <i>Water Samples</i>	95
VI.2.d. <i>Preparation of standard solutions</i>	95
VI.2.e. <i>Solid phase extraction</i>	95
VI.2.f. <i>LC-MS/MS analysis</i>	96
VI.2.g. <i>Blank, linearity and recovery</i>	97
VI.2.h. <i>Limit of detection and limit of quantification</i>	98
VI.2.i. <i>Intra-day and inter-day coefficients of variation</i>	98
VI.3. Results.....	98
VI.3.a. <i>Analytical performance</i>	98
VI.3.b. <i>Water sample analysis</i>	102
VI.4. Discussion	103
VI.4.a. <i>Method optimization</i>	103
VI.4.b. <i>Water sample analysis</i>	104
VI.5. Conclusion.....	108
Acknowledgment	108
References.....	109

CHAPITRE VII : QUANTIFICATION DU BISEPHENOL A ET DE SES DERIVES CHLORES DANS LE LAIT MATERNEL PAR UPLC-MS-MS..... 87

Résumé.....	113
Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method	115
Abstract	115
VII.1. Introduction	116
VII.2. Materials and methods	118
VII.2.a. <i>Chemicals and reagents</i>	118
VII.2.b. <i>Milk samples</i>	120
VII.2.c. <i>Preparation of standard solutions</i>	120
VII.2.d. <i>Sample preparation</i>	120
VII.2.e. <i>On-line SPE-UPLC-MS/MS analysis</i>	120
VII.2.f. <i>Method validation</i>	121
VII.3. Results and discussion.....	123
VII.3.a. <i>Method optimization</i>	123
VII.3.b. <i>Matrix effects and extraction recovery</i>	125
VII.3.c. <i>Analytical performance</i>	126
VII.3.d. <i>Method application</i>	128
VII.4. Conclusion	128

Acknowledgments.....	129
References.....	129

CHAPITRE VIII : MISE EN EVIDENCE DU BISPHENOL A ET SES DERIVES CHLORES DANS LE COLOSTRUM DE FEMMES.....133

Résumé.....	133
Occurrence of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human colostrum	135
Abstract	135
VIII.1. Introduction	135
VIII.2. Methods.....	137
<i>VIII.2.a. Subjects and sample collection</i>	<i>137</i>
<i>VIII.2.b. Materials and methods.....</i>	<i>137</i>
<i>VIII.2.c. Assessment of exposure</i>	<i>138</i>
VIII.3. Results.....	139
<i>VIII.3.a. Concentration of BPA and its chlorinated derivatives in women's colostrums</i>	<i>139</i>
<i>VIII.3.c : Exposure of women to BPA and its chlorinated derivatives</i>	<i>141</i>
VIII.4. Discussion.....	141
Acknowledgements.....	144
References.....	144

CHAPITRE IX : MISE EN EVIDENCE DU BISPHENOL A ET DE SES DERIVES CHLORES DANS L'EAU DE BOISSON.....147

IX.1. Introduction.....	147
IX.2. Matériel et méthode	148
<i>IX.2.a. Composés chimiques et réactifs</i>	<i>148</i>
<i>IX.2.b. Préparation des solutions standards</i>	<i>149</i>
<i>IX.2.c. Prélèvement et préparation des échantillons</i>	<i>149</i>
<i>IX.2.d. Dosage des composés.....</i>	<i>150</i>
<i>IX.2.e. Validation de la méthode d'analyse</i>	<i>151</i>
<i>IX.2.g. Analyse des eaux de boisson</i>	<i>152</i>
IX.3. Résultats et discussion	152
<i>IX.3.a. Performance analytique</i>	<i>152</i>
<i>IX.3.b. Analyse des eaux de boisson</i>	<i>152</i>

PARTIE III : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....159

ANNEXE : QUESTIONNAIRES DES PATIENTS PERMETTANT D'EVALUER LEUR EXPOSITION A L'EAU ET AUX MOLECULES D'INTERET.....169

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....175

LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATION

353NP	353-nonylphénol
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BMD	Benchmark Dose
BMI	Body Mass Index
BPA	Bisphénol A
BPA-d16	Bisphénol A deutéré
C353NP	monochloro-353-nonylphénol
CAS	Chemical Abstracts Service
CBPA	monochloro-bisphénol A
CV	Coefficient de Variation
DC353NP	dichloro-353-nonylphénol
DCBPA	dichloro-bisphénol A
DWTP	Drinking Water Treatment Plant
EB	Eau Embouteillée
EDC	Endocrine Disruptor Compound
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EQS	Environmental Quality Standard
ERD	Eau du Robinet du Domicile
ERL	Eau du Robinet du Laboratoire
ESI	Electrospray Ionization
EU	European Union
FDA	Food and Drug Administration
GAC	Granulated Activation Carbone
GC	Gaz Chromatography
HPLC	High-Performante Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
IM	Information Missing
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IS	Internal Standard
ISO	International Organization for Standardization
K _{ow}	Coefficient de partage octanol-eau
LC	Liquid Chromatography
LD	Limite de Détection
LLE	Liquid-Liquid Extraction
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
LOAEL	Lowel Observed Adverse Effect Level
LQ	Limite de Quantification
mLOD	Méthod Limit Of Detection
mLOQ	Méthod Limit Of Quantification

MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry
NHANES	National Health And Nutrition Examination Survey
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NORMAN	Network of Reference laboratories and related organizations for Monitoring and bio-monitoring of emerging pollutants
NP	Nonylphénol
NPE	Nonylphénol Ethoxylate
NPEO	Nonylphénol Ethoxylate
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OP	Octylphenol
PAC	Powder Activation Carbone
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
PPM	Partie Par Millions
PVC	Polychlorure de Vinyle
QA	Quality Assurance
QC	Quality Control
RE	Rendement d'Extraction
RSD	Relative Standard Deviation
S/N	Signal-to-Noise
SD	Standard Deviation
SPE	Solid Phase Extraction
SW	Surface Water
TCPA	trichloro-bisphénol A
TeCBPA	tétrachloro-bisphenol A
TW	Treated Water
UE	Union Européenne
UF	Uncertainty Factor
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
USA	United States of America
VTR	Valeur Toxicologique de Référence
W	Woman

INTRODUCTION

La reconnaissance de l'influence de l'environnement sur la santé humaine a émergé officiellement au plus haut niveau, lors de la conférence d'Helsinki organisée par le bureau européen de l'organisation mondiale de la Santé en 1994. Une chartre de l'environnement et de la santé a été mise en place par les membres, décrivant des droits et obligations pour les individus, les gouvernements et les différents acteurs. Cette chartre décrit également les éléments de la stratégie et les priorités d'action afin de réduire le risque sur la santé.

Plus d'une centaine de produits chimiques fabriqués par l'homme ont montré qu'ils perturbaient le système endocrinien de l'animal et de l'homme. Un inventaire européen a classé 42 substances dont le bisphénol A et les nonylphénols en catégorie I (prioritaire) car présentent de toute évidence un effet perturbateur endocrinien (European Union, 2000). Le bisphénol A et les nonylphénols sont utilisés en masse dans l'industrie à travers le monde depuis plus de 40 ans.

Le bisphénol A (BPA) est utilisé comme monomère dans la production de plastiques de type polycarbonates et de résines epoxy. Les nonylphénols sont utilisés en majorité pour la fabrication des nonylphénols étoxylés (NPE) qui entrent dans la composition de nombreux produits tels que les détergeants, émulsifiants, agents de mouillage, textiles. Les nonylphénols (NP) sont également utilisés comme adjuvant dans la fabrication de plastique. L'homme est en contact permanent avec le BPA et les NP car ils entrent dans la composition d'un très grand nombre d'objets. Le BPA et les NP sont présents dans l'environnement car ils peuvent y être rejetés lors de la fabrication, l'utilisation et leur élimination dans les eaux usées.

La complexité des phénomènes qui caractérise un risque sanitaire rend difficile l'identification d'un lien entre un facteur environnemental et un effet sanitaire. Le cadre de référence qui s'impose au niveau international distingue l'évaluation des risques (qui ressort du domaine scientifique) et la gestion des risques (qui relève de la décision politique). Classiquement la démarche d'évaluation des risques est décomposé en 4 étapes : 1- l'identification des dangers, 2- la définition des relations dose-réponse, 3- l'évaluation de l'exposition des populations, 4- la caractérisation des risques sanitaires. La troisième étape permet d'identifier les populations qui ont été, sont, ou seront en contact avec l'agent dangereux, et les niveaux et durées d'exposition correspondants notamment par des études de biosurveillance ou biomonitoring (Bates *et al.*, 2005, AFSSET, 2006). Ces études sont basées sur l'analyse des polluants environnementaux ou leurs métabolites dans les milieux biologiques des individus concernés. La caractérisation du risque qui constitue l'aboutissement de la démarche s'élabore à partir d'études épidémiologiques.

Dans le cas du BPA et des NP les 2 premières étapes ont été établies. La relation dose-réponse est connue chez l'animal par des études de toxicologie (INRS, 2006a, ANSES, 2011). L'évaluation de l'exposition des populations au BPA, NP et leurs dérivés chlorés nécessite la mise en œuvre d'analyse de ces micropolluants dans l'environnement des individus et des études de biomonitoring. Le choix du milieu biologique approprié pour les études de biomonitoring et également le choix de la molécule ou du métabolite recherché sont guidés par la toxicocinétique du micropolluant dans l'organisme humain.

La première partie de ce document de thèse fait le point sur l'état de la littérature au sujet du bisphénol A, des nonylphénols et de leurs dérivés chlorés respectifs.

Une deuxième partie présente notre travail personnel, sous forme d'articles publiés ou en préparation de publication, concernant les dosages du bisphénol A et /ou des nonylphénols dans l'eau et le lait maternel.

Enfin une discussion générale et conclusion termine ce rapport.

PARTIE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LE BISPHEENOL A

I.1. FORMULE, PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET USAGES

Le bisphénol A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2'-diphénylpropane) (N°CAS 80-05-7) est un produit issu de la synthèse chimique dont la formule est présentée dans la figure 1. Il fait partie de la famille des diphénylalcane hydroxylés ou bisphénols. Sa masse moléculaire est de 228,29 g.mol⁻¹ et il se présente sous forme de poudre blanche peu soluble dans l'eau. Son log K_{ow} de 3,32 indique son affinité pour les graisses.

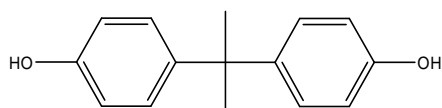


Figure 1 : structure chimique du bisphénol A

Le BPA a été synthétisé pour la première fois en 1891 par Alexandre Dianin. Puis, dans les années 1930, son activité œstrogénique a été étudiée lors de la recherche d'hormones de synthèse. Dans ce contexte, il a été abandonné au profit du diéthylstribestrol qui avait un effet œstrogénique supérieur.

La BPA est un produit chimique utilisé depuis plus de 50 ans dans la fabrication de polymères et de résines. Sa production mondiale annuelle a été estimée à 3,8 millions de tonnes en 2006 (INRS, 2006a, INRS, 2006b). A l'échelle européenne, la production annuelle a été évaluée à 1,6 millions de tonnes en 2005 (Commission européenne, 2010). La France ne produit pas de BPA mais importe 6 480 tonnes par an avec une consommation nationale de 3 500 tonnes par an (INRS, 2005). La consommation européenne annuelle a été estimée à 1 million de tonnes en 2005 et 2006.

Le BPA est utilisé majoritairement comme monomère dans la fabrication de polymères tels que les polycarbonates, les polyesters carbonates, les polyarylates, les polysulfones, les polyétherimides et les polyols.

Les polycarbonates représentent les 2/3 de la production mondiale de BPA (Fédération de la plasturgie, 2011). Les polycarbonates contenant du BPA entrent dans la composition de produits courants tels que les CD, DVD, les récipients alimentaires, les articles de vaisselles comme les assiettes, les gourdes, certains équipements électriques (optiques de phare, pare-brises de motos...), les couvertures de panneaux solaires, certains articles d'automobiles, des équipements médicaux (oxygénateurs de sang, incubateurs, dialyseurs, instruments à usage

unique), les verres de vue, les peintures, les vernis, les encres, la fabrication de feuilles, tubes...) (ANSES, 2011).

Les polyesters carbonates sont utilisés notamment dans l'automobile, les transports, les portes de micro-onde, les sèche-cheveux, les fers à repasser, les emballages médicaux...

Les polyarylates contenant du BPA sont utilisés dans les équipements médicaux, le traitement des eaux (conduites, pompes,...), l'automobile,...

Les polysulfones sont utilisés, entre autre, dans le domaine médical (plateaux chirurgicaux, humidificateurs, membranes de filtration pour eau potable, pour hémodialyse), dans l'électroménager (cafetières, cuisinières, sèche-cheveux) et en plomberie.

L'usage des polyéthérimides est très varié et par exemple ils entrent dans la composition des éléments de pompes de distributeur de boisson.

Les polyols représentent une utilisation relativement faible et peuvent servir à fabriquer des peintures, des plastiques et autres produits de grande consommation. Les polymères de BPA entrent aussi dans la composition de cosmétiques (rouges à lèvres, maquillage pour le visage et les yeux et vernis à ongles).

Le BPA est un constituant de nombreuses résines tels que les résines époxydes, les résines vinylisters, les résines phénoplastiques, les résines phénoliques et les résines polyester insaturées.

Les résines époxydes sont la deuxième utilisation du BPA avec 191 520 tonnes de BPA utilisés par an (ANSES, 2011). Le diglycidyl éther de BPA (BADGE ou DGEBA) est la résine époxyde la plus utilisée parmi celles fabriquées à partir du BPA. Les résines époxydes font partie des produits de consommation courante tels que le revêtement intérieur de canettes, de conserves, de pots en verre, de colles multi-usage, des amalgames dentaires. Mais également dans de nombreux autres secteurs : génie civil, secteur automobile, isolants, composites,...

Les autres résines entrent dans la composition de nombreux produits courants tels que les contreplaqués, les panneaux de particules, les peintures, les piscines, les revêtements de sols.

Le BPA est également utilisé comme agent révélateur de couleur dans les papiers thermiques, notamment dans les tickets de caisse et factures de cartes bancaires. Jusqu'en

2005, le BPA était utilisé comme antioxydant dans la fabrication du PVC avec 2250 tonnes utilisé par an en 1996/1999 en Europe.

I.2. PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT

Le BPA est un composé semi-persistant, qui est ubiquitaire dans l'environnement. Depuis 10 ans, le BPA a été largement analysé dans les milieux environnementaux.

De multiples études ont quantifié le BPA dans différents milieux aquatiques, incluant les effluents, l'eau de rivière, l'eau souterraine, l'eau potable. Les sources majoritaires de contamination par le BPA du milieu aquatique sont les effluents municipaux et industriels des stations de traitements des eaux usées (Flint *et al.*, 2012). La concentration du BPA dans les effluents de stations d'épuration est souvent inférieure à $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cependant on retrouve dans certaines publications des concentrations bien supérieures. Par exemple en Australie, certains auteurs ont trouvé des concentrations moyennes de $23,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Al-Rifai *et al.*, 2007) ou au Japon des auteurs ont trouvé une concentration moyenne et maximum de 59 et $370 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les effluents traités des industries de recyclage du papier (Fukazawa *et al.*, 2002). Dans les eaux de rivière la concentration en BPA varie de 0,5 à 262 ng.L^{-1} (Flint *et al.* 2012, Fu *et al.* 2007, Kuch & Ballschmiter 2001). Ces concentrations varient selon la période de l'année (Belfroid *et al.* 2002). La contamination dans les eaux souterraines est généralement faible même quand il existe une source de contamination à proximité (agriculture, épandage, effluent de stations d'épuration). Le maximum retrouvé a été de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Flint *et al.* 2012). En France, 44 % des stations de traitement d'eau potable utilisent l'eau de surface pour produire l'eau potable et 18 % sont uniquement alimentées en eau de surface. Le BPA est donc susceptible d'être retrouvé dans l'eau du domicile. Des auteurs ont retrouvé du BPA dans l'eau du robinet au domicile (tableau 1) à des concentrations comprises entre 2,3 et $317,0 \text{ ng.L}^{-1}$. Le BPA est également présent dans l'eau en bouteille par sa libération à partir du contenant en plastique en polycarbonate (Li *et al.*, 2010).

Le BPA est présent dans la terre et les sédiments. La source majoritaire de BPA dans la terre est l'épandage des boues d'épuration. Sa concentration dans les boues d'épuration varie entre 0,1 et $3,2 \times 10^7 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Flint *et al.*, 2012). Dans une étude où le BPA a été dosé parallèlement dans l'eau et les sédiments d'une rivière, une concentration plus importante était retrouvée dans les sédiments (Flint *et al.*, 2012).

Tableau 1: Etudes ayant dosé le BPA dans l'eau du robinet au robinet (LD : limite de détection, LQ : limite de quantification, NR : non renseigné)

<i>Echantillonnage</i>	<i>Blanc</i>	<i>LD</i> (ng.L ⁻¹)	<i>LQ</i> (ng.L ⁻¹)	<i>Méthode de dosage</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>> LD</i>	<i>> LQ</i>	<i>Médiane ou moyenne</i> (ng.L ⁻¹)	<i>Minimum</i> (ng.L ⁻¹)	<i>Maximum</i> (ng.L ⁻¹)	<i>Auteurs , (Année)</i>
eau du robinet du laboratoire (Chine)	NR	10	100	GC-MS	NR	0	NR	NR	NR	NR	Wang <i>et al.</i> (2009)
eaux du robinet chez l'habitant approvisionnées par 6 usines de traitement différentes 2 périodes (juin et décembre) (Chine)	effectué mais résultat non communiqué	0,7	2 (10 fois l'écart-type de 7 échantillons d'eau surchargés à 5 ng.L ⁻¹)	GC-MS	juin :6 décembre : 6	juin : 6/6 décembre : 5/6	juin : 6/6 décembre : 5/6	médiane : juin : 99,0 décembre : 48,6	juin : 2,3 décembre : 19,8	juin : 317 décembre : 123	Li <i>et al.</i> (2010)
eaux du robinet chez l'habitant (Brésil)	NR	30	100 (Paramètre d'ajustement de la courbe)	GC-MS	12	12	4	moyenne : 160 ± 30	NR	NR	Sodre <i>et al.</i> (2010)
eaux du robinet des habitants de Kuala Lumpur et de la région environnante (Malaisie)	présence mais < LD	0,4	1,3 (10 fois le signal/bruit)	GC-MS	30	30	30	moyenne : 14,1	3,5	59,8	Santhi <i>et al.</i> (2012)

I.3. EXPOSITION DE LA POPULATION GENERALE

Selon les agences d'évaluation du risque (EFSA, 2004 et 2006), la principale voie d'exposition de la population générale est la voie alimentaire (INSERM, 2011). En effet, le BPA est un constituant des polymères utilisés comme contenant alimentaire (revêtement interne des canettes et conserves, ...). Les monomères résiduels de BPA et ceux libérés des polymères lors de l'hydrolyse, en particulier lors du chauffage, migrent vers les aliments (Dekant & Volkel, 2008). De ce fait, la concentration de BPA retrouvée dans les aliments est élevée. Par exemple la concentration de BPA dans les conserves a été retrouvée jusqu'à 842 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ au Japon (Sajiki *et al.*, 2007). Dans une étude canadienne, le niveau de BPA dans les boissons en canette était compris entre 0,032 et 4,500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Muncke, 2009).

Des dérivés du BPA tel que le BPA glycidyl dimethacrylate et le BPA diglycidylether sont présents dans les agents de scellement ou les résines composites utilisés en dentisterie. (Fleisch *et al.*, 2010). Le BPA est libéré de la résine dentaire dans la salive grâce à des estérases salivaires. Le BPA est détectable dans les 3 heures qui suivent le placement.

La voie inhalée contribue minoritairement à l'exposition humaine du BPA. Le BPA rejeté dans l'atmosphère a une demi-vie courte de 0,2 jours et devrait se retrouver en majeure partie dans la phase particulaire. En effet, une étude a montré que la concentration du BPA dans la poussière du domicile était en moyenne de 707 ng.g^{-1} . Le BPA présent dans les grosses particules de la poussière ne peut néanmoins pas pénétrer dans les poumons car elles sont piégées par le système muco-ciliaire puis ingérées, conduisant à une exposition orale (Dekant & Volkel, 2008).

Comme de nombreux produits de consommation courante contiennent du BPA, la peau est en contact régulier avec ces produits tels que les feuilles de papier, les CD, les DVD, les lunettes, les emballages alimentaires, les articles de sport, les papiers thermiques... Cependant le passage systémique après l'application cutanée de BPA est limité (<10 %) (ANSES, 2011).

Il est généralement admis par la communauté scientifique que la contamination humaine est majoritairement d'origine alimentaire. Cependant une étude dosant le BPA et ses métabolites dans les urines sur 1469 adultes à jeun pendant 24 heures a montré que le BPA urinaire ne déclinait pas rapidement. Ces auteurs proposent 2 hypothèses : (1) il existe une autre source d'exposition que l'alimentation comme par exemple le passage cutané, (2) la toxicocinétique du BPA non conjugué peut se décrire par un compartiment d'accumulation tel

que le tissu adipeux, d'où le BPA non conjugué est relargué dans le temps (Stahlhut *et al.*, 2009).

I.4. TOXICOCINETIQUE

Des expérimentations chez l'homme adulte à des doses de 0,025 et 5 mg totales montre que le BPA est intégralement absorbé par la voie digestive (INSERM, 2011). Au contraire, l'absorption du BPA par voie cutanée serait de 10 % de la dose appliquée.

Après absorption par voie orale, le BPA subit un effet de premier passage hépatique important (glucurono- et sulfo conjugaison) et seul 1 à 8 % de BPA se retrouvent sous forme inchangée au niveau plasmatique et le reste sous forme de résidus plasmatiques, principalement sous forme glucuronide soluble (92 % - 99 %) (INERIS, 2010, ANSES, 2011, INSERM, 2011). Dans le sang, la forme de BPA inchangé, liée aux protéines plasmatiques représente 90 à 95 % du BPA et la forme non liée 5 à 10 % du BPA. Par son caractère lipophile, la fraction non liée du BPA est distribuée à l'ensemble des tissus. Après administration orale de BPA radiomarqué chez les rongeurs, les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans le foie et les reins.

Chez l'homme, la glucuronidation du BPA est effectuée par l'isoforme UGT2B15 et UGT2B7 (ANSES, 2011). Il existe un polymorphisme génétique de l'UGT2B15 qui pourrait entraîner des différences individuelles dans la détoxification du BPA (INSERM, 2011). La sulfatation du BPA pour former le BPA-sulfate est également une voie d'élimination du BPA mais à moindre mesure chez l'homme. Les formes glucuronides et sulfates sont des voies de détoxification car elles sont inactives sur les récepteurs aux œstrogènes. Chez les rongeurs, la conjugaison à l'acide glucuronide représente aussi la voie majoritaire mais d'autres formes ont été identifiées comme l'hydroxy-BPA-glucuronide (Figure 2).

La bibliographie n'est pas convergente sur le temps de demi-vie du BPA. Généralement les synthèses bibliographiques retiennent une valeur de 4 à 6 h de demi-vie plasmatique du BPA (conjugué + non-conjugué), après administration orale. Pourtant cette expression est inhabituelle, puisqu'en pharmacocinétique on exprime la demi-vie d'un composé et non celle du mélange de ce dernier avec son métabolite (ANSES, 2011). Cependant, des auteurs proposent une apparente demi-vie d'élimination comprise entre 20 et 80 heures après administration orale de BPA radiomarqué au ¹⁴C (Dekant & Volkel, 2008).

Les voies d'administration font varier le rapport [BPA non conjugué]/[BPA conjugué + non conjugué]. Comme la voie sous-cutanée s'affranchit du métabolisme intestinal et du premier passage hépatique, ce rapport est supérieur à la voie orale (Pottenger *et al.*, 2000, ANSES, 2011).

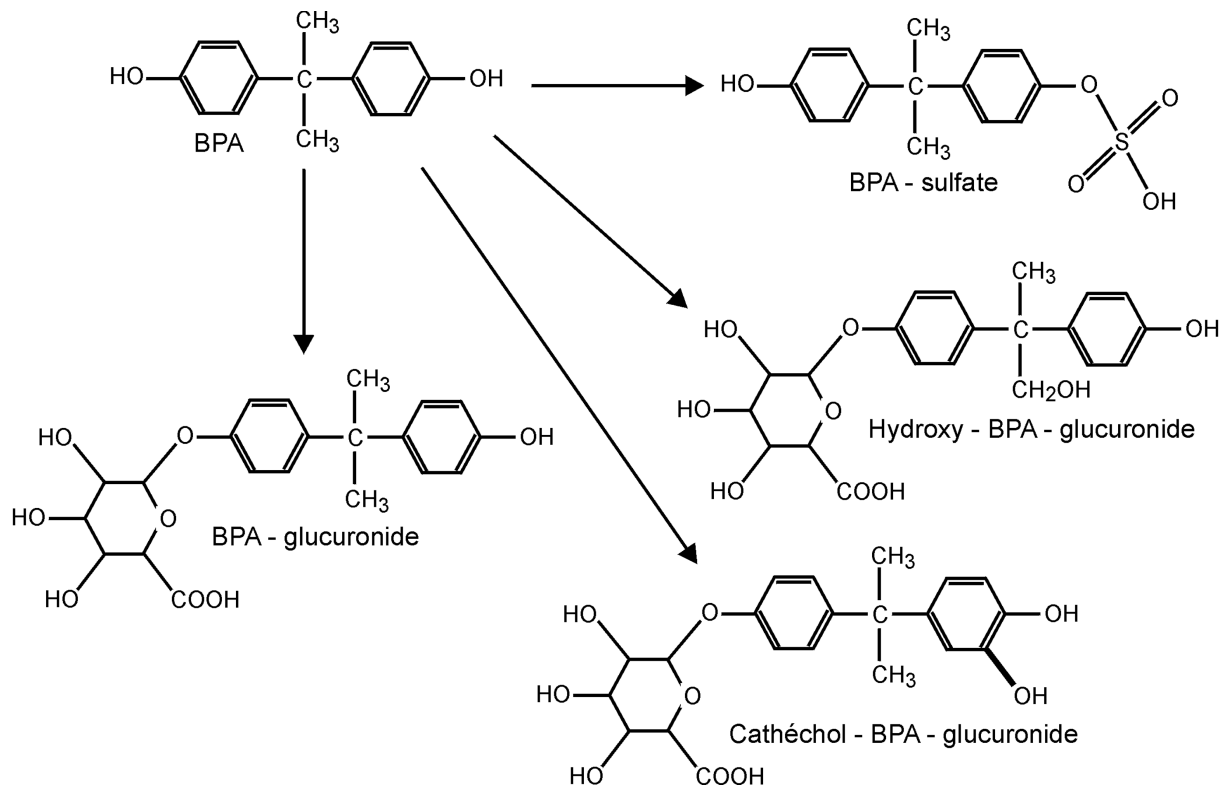


Figure 2: Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (chez l'homme, la voie prépondérante est celle qui conduit au BPA-glucuronide) (INSERM, 2011)

Après ingestion orale d'une dose de 500 µg de BPA marqué à des volontaires, le pic plasmatique est atteint environ 80 minutes après l'ingestion avec une concentration moyenne de 800 nmol.L⁻¹ et est exclusivement sous forme BPA-glucuronide (Volkel *et al.*, 2002).

Le BPA conjugué peut se dé-conjuguer en BPA en présence d'enzyme β-glucuronidase et arylsulfatase C. La β-glucuronidase est présente au niveau des intestins, du foie, des reins et également du placenta et du foie fœtal entraînant la déconjugaison et ainsi la formation du BPA à partir du BPA-conjugué (Ginsberg & Rice, 2009). L'arylsulfatase C, présent dans les premiers mois après la naissance, pourrait également libérer le BPA de sa forme sulfate.

Chez l'homme, le BPA est majoritairement éliminé sous forme BPA-glucuronide par les urines. Le BPA-sulfate et le BPA non conjugué sont retrouvés à des concentrations moindres (Liao & Kannan 2012, Ye *et al.* 2005). Chez la femme, les proportions de BPA-sulfate sont plus importantes que chez l'homme, suggérant une meilleure capacité de sulfatation (Kim *et al.*, 2003). Liao *et al.* ont montré que la concentration de BPA (conjugué + non conjugué) urinaire était significativement plus élevée chez les caucasiens que chez les asiatiques (Liao & Kannan 2012).

Chez la femme plusieurs études ont montré la présence de BPA non conjugué dans le sang de cordon ombilical, le liquide amniotique, le placenta et le sérum des fœtus (Ikezuki *et al.*, 2002, Vandenberg *et al.*, 2007, Kosarac *et al.*, 2012). Les résultats de ces études montrent que le BPA non conjugué passe la barrière placentaire. Nishikawa *et al.* ont perfusé du BPA-glucuronide dans l'utérus de rates en gestation. Dans le fœtus, le ratio BPA-glucuronide/BPA non conjugué était de 95/5 (Nishikawa *et al.*, 2010). La présence de BPA non conjugué serait due à la présence de la glucuronidase placentaire qui déconjugue le BPA conjugué, augmentant l'exposition du fœtus au BPA.

I.5. TOXICITE

Le BPA répond à la définition de perturbateur endocrinien, donnée par la commission européenne de 1997, c'est-à-dire « toute substance exogène qui provoque des effets néfastes sur un organisme sain, ou sa progéniture, dus à des modifications de la fonction endocrine » (European Union, 1997). En 2000, un inventaire des molécules à effets perturbateurs endocriniens a été établi, répertoriant 564 molécules (European Union, 2000). Dans cet inventaire, le BPA a été classé en catégorie 1 (prioritaire) car il présente de toute évidence un effet perturbateur endocrinien.

Le système endocrinien régule une multitude de processus métaboliques, de développements, de reproductions incluant le développement embryonnaire, la formation des gonades, la différenciation sexuelle, la croissance et la digestion.

I.5.a. Mécanisme d'action

L'ensemble des mécanismes d'action du BPA n'est pas encore connu. Le mécanisme le plus connu et démontré est sa liaison aux récepteurs œstrogéniques nucléaires ER α et ER β en tant qu'agoniste partiel aux œstrogènes. Le BPA fait partie des SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) et son activité varie en fonction de la dose, du type de cellule ou de

l'organe. Son activité œstrogénique est due à son groupement 4-hydroxy sur un phénol et le groupement propane hydrophobe (INSERM, 2011). L'affinité aux récepteurs nucléaires est cependant 10 000 fois plus faible que l'œstradiol. Des études in vivo et in vitro montre que le BPA peut agir à plus faible dose et plus rapidement que celles auxquelles il agit sur les récepteurs œstrogéniques nucléaires, ce qui exclut une action unique par les récepteurs nucléaires. Le BPA interagirait également avec les formes membranaires ER α et ER β pouvant expliquer cet effet (ANSES, 2011).

Un nombre croissant d'étude in vitro ont démontré l'interaction du BPA avec de multiples récepteurs tel que le récepteur aux androgènes, le récepteur des hydrocarbures aromatiques, le récepteur des hormones thyroïdiennes, et également le récepteur transmembranaire GPR30 impliqué dans la prolifération cellulaire (ANSES, 2011). Récemment, le BPA a été identifié comme un ligand au récepteur PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor), apparenté aux récepteurs aux œstrogènes. Ces multiples actions possibles pourraient expliquer la relation dose-réponse non monotone observée.

I.5.b. Valeur Toxicologique de Référence (VTR) du BPA

- Principes fondamentaux de la toxicologie

La toxicologie est la discipline intrinsèquement centrée sur les expériences visant à caractériser la relation dose-effet et les mécanismes d'action sous-jacents. Cette relation entre dose et effet est le concept central en toxicologie, sur lequel se fonde le processus d'évaluation des risques, tel que décrit par le National Research Council en 1983 (Gérin *et al.*, 2003, AFSSET, 2006) y compris en santé environnementale. Ce dernier est composé de quatre étapes qui sont (1) l'identification du danger, (2) la caractérisation du danger, (3) la détermination de l'exposition et (4) la caractérisation du risque. Pour l'étape (2), l'extrapolation de données expérimentales est souvent mise en jeu car il n'est généralement pas possible d'exploiter des études épidémiologiques avec un niveau de preuve suffisant de la relation causale. Dans sa forme la plus simple, ce concept de relation dose-effet, établit que si on modifie la quantité de substance potentiellement toxique à laquelle est exposé un organisme vivant (c'est-à-dire la dose), l'apparition et la sévérité de la réponse (effet néfaste) sera aussi modifiée (Holsapple & Wallace, 2008). Les fondements de la toxicologie reposent sur une relation monotone croissante entre la réponse et la dose impliquant que des doses importantes créent des effets importants. Les courbes effets en fonction de la dose sont de

type linéaire ou plafonné maximal. Ce qui conduit à considérer qu'au-delà d'une dose seuil élevé, des effets toxiques sont observés et qu'en dessous d'une dose seuil aucun effet n'est observé. Ce seuil est le NOAEL (No observable adverse effect level). Ainsi, les valeurs toxicologiques de référence (VTR) sont construites à partir de données obtenues lors d'expérimentations animales ou directement chez l'homme lors d'études épidémiologiques. Bien que l'utilisation d'études chez l'homme soit privilégiée pour la construction de ces VTR, force est de constater que les études animales sont en pratique la source essentielle de données toxicologiques pour la construction de VTR. En effet, l'utilisation de doses élevées chez l'animal permet d'observer des signes manifestes de toxicité et est ainsi considérée comme permettant d'obtenir une meilleure appréciation de l'organe cible et d'un effet spécifique. Cependant, la difficulté essentielle de l'évaluation de la relation dose-effet chez l'homme, reste l'extrapolation à la population générale, de données expérimentales obtenues chez l'animal, dans des conditions très différentes de celles vécues par la population. Pour pallier à cela, les toxicologues utilisent des facteurs d'incertitude (UF pour « uncertainty factors » c'est-à-dire facteur d'incertitude global) dans la construction des valeurs toxicologiques de référence (VTR). Ces VTR sont des indices permettant d'établir une relation qualitative, voire quantitative, entre une exposition à une substance chimique et un effet sanitaire chez l'homme. Elles sont spécifiques d'une substance, d'une durée d'exposition et d'une voie d'exposition. L'hypothèse par défaut dans la construction d'une VTR reprotoxique est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse, elles sont appelées VTR à seuil. Mathématiquement, la construction d'une VTR à seuil est définie de la manière suivante : $VTR = Dose\ critique/UF$

La dose critique peut être un NOAEL, un LOAEL ou une BMD définis comme tels :

- le LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) est la dose minimale entraînant un effet néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin ;
- le NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) est la dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin, située directement sous le LOAEL dans les doses du protocole ou dans les expositions identifiées ;
- la BMD (*Benchmark Dose*) est une dose produisant un niveau ou un pourcentage défini de réponse.

Il est à noter que les rares études épidémiologiques exploitables pour construire une VTR ont souvent été effectuées en milieu professionnel et pour des doses supérieures à celles

de l'environnement. Là encore, des transpositions et extrapolations sont nécessaires pour passer de fortes doses à de plus faibles, d'un mode d'exposition à un autre, d'une population particulière à la population générale (AFSSET, 2006, 2007)

- Cas du BPA

L'agence de protection environnementale américaine et les autorités sanitaires en Europe ont déterminé le NOAEL à $5\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Cependant aucun NOAEL n'a jamais été déterminé dans les études de toxicologie. Cette valeur se base sur le LOAEL (low observed adverse effect level) qui a été déterminé à partir de 2 études de l'équipe de Tyl montrant qu'une dose importante chez le rat et la souris était associée à des effets secondaires tels que la réduction du nombre de progéniture, la diminution du poids de naissance et la perturbation de la puberté. A partir de ces travaux la dose acceptable journalière a été extrapolée à $50\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ en utilisant un facteur de sécurité (UF) de 100 (Tyl *et al.*, 2002, Tyl *et al.*, 2008). Ce facteur tient compte : du risque humain évalué à partir d'étude sur l'animal, de la variabilité intra-espèces et de l'extrapolation pour une exposition subchronique à partir d'une exposition chronique (INSERM 2010, Vandenberg *et al.* 2012, Vandenberg *et al.* 2009).

L'organisation mondiale de la santé a estimé l'apport journalier de BPA pour les adultes entre 0,4 et 1,4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de poids corporel et dans le pire des cas 4,2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. L'EFSA (European Food Safety Authority) a estimé cette dose à 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de poids corporel (Gyllenhammar *et al.*, 2012). Cependant, des études pharmacologiques récentes ont estimé qu'une exposition à 400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ permet d'obtenir des concentrations de BPA non conjugué dans le sang proches de celles retrouvées chez l'homme (étude chez le primate et rongeur) (Vandenberg *et al.* 2012).

I.5.c. Récapitulatif des effets toxiques du BPA

Dans plusieurs pays, les agences nationales de sécurité sanitaire ont effectué un travail de compilation sur les études de toxicité du BPA. Nous présentons ci-après les résultats récents (septembre 2011) de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES, 2011). Les experts se sont appuyés sur les études épidémiologiques et les études expérimentales conduites à faible dose chez l'animal, au niveau international. Pour chaque type d'effet, le groupe de travail a évalué ces effets en termes d'effets avérés, effets suspectés, effets controversés ou effets pour lesquels les données disponibles ne permettent pas de conclure. Les effets ont été rangés dans ces différentes catégories en fonction des résultats des études,

du nombre d'études, de la qualité des études (méthodologie appropriée). Aucune étude épidémiologique n'a permis de déterminer un effet avéré chez l'homme. Le tableau 2 résume l'expertise de l'ANSES.

Le gouvernement canadien a été le premier pays à reconnaître l'effet du BPA sur la santé et à interdire en 2008-2009 son utilisation dans les biberons (Flint *et al.* 2012). Au contraire, l'Autorité sanitaire alimentaire européenne (EFSA) conclut dans ses différents rapports de 2007, de 2008, et de 2010 que l'utilisation du BPA dans les emballages alimentaires n'induit pas de risque sur la santé humaine (Flint *et al.*, 2012). Pourtant, la France ne semble pas accepter ces conclusions et suspend en 2010 la vente et l'importation des biberons contenant du BPA. Par la suite, la même année, l'Europe interdit l'utilisation du BPA dans les biberons malgré l'évaluation de l'EFSA (Le Monde, 2010). En 2011, l'assemblée nationale française vote l'interdiction du BPA dans tous les contenants alimentaires à compter de 2014, mais dès 2013 pour les contenants alimentaires de produits destinés aux moins de 3 ans (Le Monde, 2011). Cependant, le sénat a donné un délai supplémentaire aux industriels qui ont jusqu'au 1^{er} juillet 2015 pour retirer le BPA de tous les contenants alimentaires (Le Monde, 2012).

Tableau 2: Synthèse de l'expertise de l'Anses sur les effets sanitaires du BPA (ANSES, 2011) (Exposition adulte : EA, Exposition prénatale EPréN, Exposition périnatale, EPériN, exposition néonatale : EnN, Exposition postnatale : EposN)

	<i>Chez l'animal</i>	<i>Chez l'homme</i>
<i>Effet sur le système reproducteur male</i>	Effet avéré : altération de la production spermatique à l'âge adulte Effet suspecté : diminution des concentrations plasmatique de testostérone, modification du comportement sexuel dus à une exposition pendant la période pubertaire Effet controversé : effet lors de l'EpréN, EpériN, EnN et EpostN (lactation)	Effet controversé sur la fertilité
<i>Effet sur le système reproducteur femelle</i>	Effet avéré : augmentation de la survenue de kystes ovariens, apparition d'hyperplasie de l'endomètre, avancement de l'âge de la puberté (EpréN et EpostN), effet sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope due à une exposition in utéro et EpostN	Effet suspecté : Maturation ovocytaire Ne permettant pas de conclure : Effet sur l'endomètre, sur les ovaires et les issues de grossesses
<i>Effet sur le cerveau et le comportement</i>	Effet avéré : modifications histologiques sur la neurogenèse (EpréN, EpériN)	Données insuffisantes
<i>Effet sur le métabolisme lipidique et glucidique et le système cardio-vasculaire</i>	Effet avéré : augmentation de la lipidémie, tendance à la surcharge pondérale et une activation de la lipogénèse (EA, EpréN, EpériN) Effet controversé : métabolisme du glucose (EpréN, EpériN)	Effet suspecté : pathologie cardiovasculaire et diabète
<i>Effet sur la thyroïde</i>	Effet suspecté : antagonisme des hormones thyroïdiennes (EnN)	Donnée insuffisante
<i>Effet sur le système immunitaire</i>	Effet avéré : induction des lymphocytes T, surproduction des cytokines	Ne permet pas de conclure
<i>Effet sur l'intestin</i>	Effet suspecté : effet anti-inflammatoire et pronociceptif, diminution de la perméabilité intestinale (EA)	Aucune étude
<i>Effet sur la prostate</i>	Effet controversé : augmentation du poids de la prostate (EA, EpréN) Effet suspecté : lésion prostatique de type néoplasique prostatique intraépithéliale	Aucune étude
<i>Effet sur le sein : cancérogénicité</i>	Effet avéré : Accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire à l'âge adulte après une exposition pré et périnatale, développement de lésions hyperplasiques intracanalaires (EPréN et EPériN) Effet suspecté : développement de lésions de type néoplasique (EpériN), augmentation de la susceptibilité des glandes mammaires à développer ultérieurement des tumeurs mammaires	1 seule étude : ne permet pas de conclure

I.5.d. Courbes effet dose non monotones

- Définition et enjeux de l'hormésis

L'hormésis est un phénomène biologique qui se traduit par une courbe dose-effet caractérisée par une manifestation contraire des effets selon les doses. Ainsi, une stimulation peut apparaître aux faibles doses alors qu'une inhibition apparaîtra aux fortes doses (Calabrese & Baldwin, 2002). Il s'agit d'études qui incluent des faibles doses de substances (inférieures au seuil NOAEL), voire très faibles doses, qui montrent des courbes effet-dose, non monotones, en forme de U, U inversé ou en J. Ce phénomène n'est pas fréquemment rencontré dans les essais de toxicité, et s'en trouve sérieusement sous-apprécié en toxicologie (Calabrese, 2002). Pourtant, la récurrence de l'incidence de ce phénomène pour la description de la relation dose-effet des molécules à effet perturbateur endocrinien oblige à reconsidérer le modèle toxicologique de ces molécules (Vandenberg *et al.*, 2012).

Or en santé environnementale, les concentrations des micropolluants incriminés sont le plus souvent des concentrations très faibles, avec une exposition toujours multiple et le plus souvent sur une durée permanente (ou très long terme).

Afin de tenir compte sur le terrain, de ces résultats scientifiques aux faibles doses, une table ronde internationale a été organisée en septembre 2012 par des agences et organismes de l'environnement de plusieurs pays industrialisés (The National Institute of Environmental Health Sciences (USA), The National Institutes of Health (USA), The Oak Foundation, the European Commission, The French Agency for Food, Occupational and Environmental Health (ANSES), The Federal Environment Agency (UBA) in Germany, the Danish Ministry of the Environment and National Food Institute from Denmark and Charite Medical University, Berlin). L'objectif est actuellement de transposer les résultats scientifiques de l'endocrinologie aux faibles doses, à l'évaluation de risques pour la santé humaine (Calabrese, 2011).

- Cas du BPA

Les études chez les rongeurs ont montré qu'une exposition aux perturbateurs endocriniens pendant le stade de développement, induit souvent des effets permanents, tandis qu'une exposition après la puberté entraîne des effets temporaires qui s'arrêtent lorsque les expositions cessent. La période d'exposition est également corrélée à la concentration produisant l'effet. Par exemple, il faut des doses élevées (partie par million) pour faire

apparaître des effets temporaires sur l'utérus adulte, alors que des faibles doses (de l'ordre de partie par billions ou par trillion) durant la période fœtale altèrent le développement de l'utérus de façon durable (Vandenberg *et al.*, 2012).

La définition des faibles doses est variable selon les sources. Concernant le BPA, un groupe de scientifiques du programme de toxicologie national (NTP) a fait, en 2001, une revue de la littérature sur les effets de faibles doses des perturbateurs endocriniens. La NTP définissait l'effet à la faible dose comme étant tout changement biologique survenant (i) à une dose d'exposition de la population générale (pour le BPA : 0,4 à 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) (ii) à une dose utilisée dans les protocoles standards c'est-à-dire à la dose inférieure à celle utilisée dans les études d'évaluation de toxicologie correspondant à la NOAEL (Vandenberg *et al.* 2012). D'un autre côté, la majorité des études se basent aujourd'hui sur la dose journalière tolérable de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ déterminée par l'agence de protection environnementale américaine, l'agence des médicaments et des aliments (FDA) et les autorités sanitaires en Europe. En 2012, Vandenberg *et al.* dans leur revue de la littérature des faibles doses ont considéré que cette dose ne correspondait pas aux études récentes, et ont déterminé une faible dose comme étant inférieure à la dose qui induit une concentration dans le sang qui a été retrouvée dans la population générale c'est-à-dire 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Vandenberg *et al.* par une analyse avec une échelle de preuves ont conclu qu'une faible dose de BPA altère le développement de la prostate des rongeurs (Vandenberg *et al.*, 2012). La revue des NTP (National Toxicology Program) des Etats-Unis de 2008 indique la même conclusion (NTP, 2008). Concernant les pathologies mammaires, Vandenberg *et al.* affirment que des doses faibles de BPA ont un effet sur le développement des glandes mammaires, l'expression des gènes et des protéines dans la glande, et le développement des cancers mammaires en s'appuyant sur une douzaine d'études effectuées dans différents laboratoires montrant des effets similaires à faible dose. Cependant une étude épidémiologique est contradictoire (Vandenberg *et al.*, 2012). En 2006, Vom Saal and Welshons ont examiné 100 études reportant des effets significatifs du BPA inférieurs à la dose de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Ils ont confirmé l'effet de faible dose (Vom Saal & Welshons, 2006). Aujourd'hui des études ont montré que le BPA peut avoir une action œstrogénique à des concentrations du niveau du picomolaire.

De nombreuses études ont démontré l'effet non monotone de la relation dose-effet pour le BPA. Par exemple des cellules de la lignée pituitaires GH3/B6 soumis à différentes

doses de BPA ont montré une courbe en U, lorsque des doses de 10^{-12} , 10^{-11} et 10^{-8} M avaient une réponse significative alors que les doses de 10^{-10} et 10^{-9} M n'en avaient pas (Wozniak *et al.*, 2005). Autre exemple, les souris exposées à des doses différentes de BPA entre le 11^{ème} et le 17^{ème} jour de gestation, ne présentent pas les mêmes effets en fonction de la dose : à $2 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, une augmentation de la taille des glandes préputiales et une diminution de la taille de l'épididyme sont mentionnés, alors qu'à la dose de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, les auteurs observent une diminution quotidienne de spermatozoïdes par gramme de tissu (Vom Saal *et al.*, 1998). Cependant, la notion d'« hormesis » s'attache à comparer un même effet sur une gamme de concentrations très étendue. C'est pourquoi l'étude précédemment citée demande à être complétée par la mesure d'un même effet sur un même modèle d'étude et sur une gamme de doses suffisantes (ANSES, 2011).

Plusieurs études ont suggéré, que ces courbes non monotones pouvaient s'expliquer par une down régulation des récepteurs à forte dose. Ces courbes s'expliquent également par des différences d'affinité pour le récepteur suivant la dose. Par exemple, à faible dose le BPA se lie uniquement aux récepteurs œstrogéniques mais à forte dose, il peut se lier également à d'autres récepteurs hormonaux tel que les récepteurs aux androgènes et thyroïdiens (Vandenberg *et al.*, 2009).

I.6. BIOMONITORING

Le biomonitoring est traduit en français par le terme de biosurveillance humaine. Dans le domaine de la santé environnementale, le biomonitoring permet l'évaluation de l'exposition humaine à un polluant environnemental par la collecte de prélèvements biologiques d'individus présumés exposés et leur analyse afin d'obtenir la mesure d'un biomarqueur. Le biomarqueur recherché peut être le polluant suspecté, son métabolite, ou un produit de réaction. Ces biomarqueurs sont principalement recherchés dans le sang, l'urine, le lait, la salive et le tissu adipeux. La sélection de la matrice biologique dépend de la pharmacocinétique du composé, des caractéristiques de la population et du scénario de l'exposition (Needham *et al.*, 2007). Le biomonitoring cherche à connaître principalement :

- la distribution des niveaux de biomarqueurs dans la population
- leur répartition dans l'espace et selon les caractéristiques individuelles, tel que les habitudes alimentaires
- leur évolution dans le temps

Après mesure du biomarqueur dans la matrice, si l'exposition des individus au micropolluant est avérée, le niveau de contamination est évalué par la concentration obtenue dans les tissus. Ensuite la possibilité d'associer cette dose avec des effets sur la santé peut être recherchée, en mettant en place des études épidémiologiques. De plus en plus, l'évaluation de l'exposition utilisant le biomonitoring est préférée, car plus précise que l'évaluation indirecte qui consiste à mesurer le polluant dans l'environnement de vie des individus, pour en déduire une « dose potentielle » reçue.

Concernant le BPA, les mesures de concentration de cette molécule effectuées depuis 1999 dans le sang, l'urine, le tissu adipeux, le lait maternel et d'autres tissus humains ont confirmé l'imprégnation de la population générale au BPA (Vandenberg *et al.*, 2007), bien que l'ensemble de la littérature disponible sur le sujet n'ait pas toujours présenté le requis suffisant en terme de « maîtrise de la contamination pour l'analyse ». En effet, les premières réserves pour cause de non maîtrise de la contamination en BPA, par les chercheurs qui publient leurs travaux, peuvent être datées de la fin de l'année 2008 (AFSSA, 2008, Dekant & Volkel, 2008).

De nombreuses études ont dosé le BPA dans l'urine à travers le monde. Aux USA, par exemple, le BPA a été détecté pour des sujets âgés de 6 ans et plus, dans 92,6 % des 2517 participants de NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) de 2003-2004 avec une concentration moyenne de BPA (non conjugué + conjugué) de 2,6 ng.mL⁻¹, ainsi que dans 92,9 % des 2548 participants de NHANES de 2005-2006 avec une concentration moyenne de 1,9 ng.mL⁻¹. De même au Canada, le BPA (non conjugué + conjugué) a été détecté pour des sujets âgés de 6 à 79 ans, dans 90,7 % d'urine collectée de 5462 participants au CHMS (Canadian Health Measures Survey) de 2007-2009 (Bushnik *et al.*, 2010, Calafat, 2010). De façon générale, à partir de 2 études américaines et une étude allemande, les jeunes enfants ont des concentrations dans l'urine supérieures aux adolescents et aux adultes (Calafat, 2010). En France, une étude pilote « Elfe » (Etude longitudinale depuis l'enfance) a dosé le BPA dans l'urine des mères en salle de naissance. Quatre-vingt dix pourcents des femmes avait du BPA conjugué ou non à des concentrations moyennes de 2,9 et 0,5 g.g⁻¹ de créatinine pour le BPA (non conjugué + conjugué) et le BPA non conjugué respectivement et le ratio [BPA non conjugué] / [BPA non conjugué + conjugué] était de 0,17 (ANSES, 2011).

De nombreuses études ont dosé le BPA dans le sang. Ces concentrations sont souvent plus basses que dans les urines, car le BPA est rapidement conjugué à l'acide glucuronide

(Calafat, 2010). Kuroda et al ont dosé le BPA non conjugué dans le sang de 9 femmes enceintes avec une concentration médiane de 0,43 ng.mL⁻¹ (Kuroda *et al.*, 2003, NTP, 2008). Padmanabhan *et al.* ont dosé le BPA non conjugué par LC-MS/MS dans le sang de 40 femmes au moment de l'accouchement (Padmanabhan *et al.*, 2008). Les niveaux plasmatiques étaient compris entre 0,5 (limite de détection) et 22,3 ng.mL⁻¹ (moyenne de 5,9 ng.mL⁻¹).

Le BPA non conjugué a été retrouvé dans 55 % des tissus adipeux de 20 femmes à une concentration moyenne de 5,83 ± 3,48 ng.g⁻¹ de tissus adipeux (Fernandez *et al.* 2007). Une étude portant sur 86 enfants a retrouvé des concentrations de BPA non conjugué supérieur de 17,46 ± 14,82 ng g⁻¹ de tissus adipeux (Olea, 2008).

Plusieurs études ont dosé le BPA dans le lait maternel et sont présentées dans le tableau 3. Les concentrations moyenne de BPA non conjugué étaient comprises entre 0,61 et 1,3 ng.mL⁻¹ avec un maximum de 6,3 ng.mL⁻¹, sans tenir compte des résultats obtenus avec la méthode ELISA, car celle-ci est non spécifique et des interactions croisées peuvent exister et conduire à une surestimation de la concentration en BPA (Vandenberg *et al.*, 2007, Dekant & Volkel, 2008).

Tableau 3 : concentration de BPA dans le lait maternel

<i>Echantillon</i>	<i>Forme dosée</i>	<i>Moyenne des concentrations de BPA (ng.mL⁻¹) (écart)</i>	<i>Méthode de dosage</i>	<i>N</i>	<i>Pourcentage détecté (%)</i>	<i>Auteurs (Année)</i>
lait maternel	non conjugué	0,65ng/g (<0,09–0,65)	SPE-GC/MS	3	67	Otaka <i>et al.</i> (2003)
lait maternel	non conjugué	0,61 ± 0,20 (0,28-0,97)	SPE-HPLC-fluo	23	100	Sun <i>et al.</i> (2004)
lait maternel	non conjugué	1,3 (<0,3-6,3) (médiane : 0,4)	SPE en ligne-HPLC-MS/MS	23	60	Ye <i>et al.</i> (2006)
lait maternel	Conjugué + non conjugué	1,9 (<0,3-7,3) (médiane : 1,1)	SPE en ligne-HPLC-MS-MS	23	90	Ye <i>et al.</i> (2006)
colostrum	Conjugué + non conjugué	3,41 ± 0,13 (1-7)	ELISA	101	100	Kuruto-Niwa <i>et al.</i> (2007)

N : nombre d'échantillons

CHAPITRE II : LES NONYLPHENOLS

II.1. FORMULES, STRUCTURES, PROPRIETES CHIMIQUES ET USAGES

Les nonylphénols (NP) sont des molécules exclusivement de sources anthropiques. Ils sont constitués d'un phénol et d'un groupement nonyl linéaire ou ramifié positionné sur le cycle, dont la formule globale est la suivante (Figure 3) :

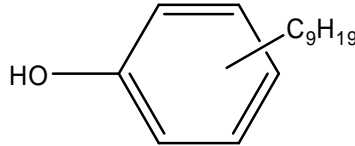


Figure 3: structure générale des NP

Les NP retrouvés dans l'environnement sont majoritairement sous la forme 4-NP (*p*-NP) c'est-à-dire que le groupement nonyl est en position para sur le cycle (position 4 par rapport au phénol). Une division de la Société Américaine de Chimie (American Chemical Society) appelée « Chemical Abstracts Service » (CAS) attribue un numéro, nommé N°CAS, aux substances chimiques, polymères et autres produits afin d'en faciliter le classement. Ainsi le N°CAS permet d'identifier un produit et cela devient particulièrement indispensable dans le cas des NP. En effet, sous la dénomination NP, il existe de nombreux produits et des confusions sont facilement possibles. Le tableau 1 partie V.2.b. (page 66) résume les N°CAS utilisés pour les NP en position para ou majoritairement para, en indiquant la dénomination qui y est le plus souvent associée ainsi que la description de la substance.

L'usage des NP est décrit dans le paragraphe suivant, et les produits utilisés dans l'industrie sont principalement les 4-NP. Par exemple la composition approximative du mélange technique (CAS 84852-185-3) est la suivante : 3-6 % *o*-NP, 90-93 % *p*-NP et 2-5 % decylphénol, et plus de 22 isomères de 4-nonylphénol ramifiés ont été identifiés par chromatographie haute résolution, parmi les 550 possibles (Wheeler *et al.*, 1997, Guenther *et al.*, 2006).

Leur masse moléculaire est de 220 g.mol⁻¹. Avec leur chaîne carbonée en C9, les NP sont des composés hydrophobes avec le logarithme du coefficient de partition K_{ow} compris entre 3,8 et 4,8. A température ambiante, ils se présentent sous la forme d'un liquide visqueux jaune pâle, modérément volatil et pratiquement insoluble dans l'eau (6 mg.L⁻¹ à 20°C) (Vazquez-Duhalt *et al.*, 2005, INRS, 2006a).

Les nonylphénols sont utilisés majoritairement pour la fabrication des nonylphenols éthoxylés (NPE). Les NPE sont des surfactants non ioniques utilisés comme détergents, agents mouillants, agents dispersants, agents antistatiques, émulsifiants et solubilisants. Les secteurs industriels utilisant les NPE sont : l'industrie des savons, des détergents et des détachants, la fabrication de peintures et de vernis, l'industrie de la production textile, l'industrie des pesticides et produits chimiques agricoles, la fabrication du plastique et de la résine synthétique, la fabrication des pâtes et papiers, la fabrication de produits de toilette ainsi que d'autres industries incluant celles qui fabriquent des produits pour le traitement des eaux, des lubrifiants, des additifs et des adhésifs. Les NP sont également utilisés pour la fabrication d'oximes phénoliques qui sont des réactifs pour la purification des minerais de cuivre hors de l'union européenne. Les NP sont utilisés comme additifs et antioxydants dans la fabrication de certains plastiques tel que le PVC et les résines époxy.

En 2003, les NP et NPE ont été inscrits dans la liste des substances dangereuses prioritaires par l'union européenne (directive 2000/60/CE) (UE, 2003b). Depuis 2005, les NP et NPE ont été interdits pour certains usages tels que la production de papier, produits cosmétiques, pesticides, textile, nettoyeurs domestiques...(INERIS, 2005a).

La production annuelle des NP était de 73 500 tonnes en 1997 en Europe et celle des NPE était de 118 000 tonnes (Soares *et al.*, 2008). Les NPE sont utilisés à hauteur de 77 800 tonnes dans l'union européenne, le reste étant exporté. En France les NP sont totalement importés. Néanmoins, il existe en France des sites d'éthoxylation pour la production des NPE à partir des NP (INERIS, 2005b).

II.2. PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT

Il n'existe pas de source naturelle connue de NP et NPE. Leurs présences dans l'environnement résultent uniquement de l'activité anthropique. La contamination peut se produire pendant leur fabrication, la fabrication des produits contenant des NPE, l'utilisation des produits contenant ces molécules et leurs éliminations, que se soient dans les stations d'épuration des eaux usées ou dans les décharges. Il est à noter que la présence des NP dans l'environnement provient principalement de la dégradation des NPE (Soares *et al.*, 2008, Gauthier, 2010).

Les NP ayant une faible solubilité dans l'eau, se répartissent préférentiellement dans la matière organique, cependant leur présence est effective dans les eaux de surface, les eaux souterraines et l'eau potable (Gauthier, 2010). La principale source de NP dans l'eau de

surface (rivières, lacs, estuaires), les océans et les sédiments proviennent des effluents des stations de traitement d'eau usée et des eaux de ruissellements des décharges. Dans l'eau de rivière, les NP sont retrouvés à des concentrations comprises entre 0,6 ng.L⁻¹ et 15 µg L⁻¹. Dans les sédiments marins et de rivière, les NP sont présents à des concentrations comprises entre 0,4 et 3520 mg.kg⁻¹ avec une demi-vie dans les sédiments estimée à 60 jours, et ils s'accumulent aussi dans les organismes aquatiques (Santé Canada, 2001, Soares *et al.*, 2008). Les nonylphénols ont également été retrouvés dans l'eau souterraine. Dans les eaux souterraines, selon les sources de contamination, les concentrations retrouvées en NP étaient comprises entre 1,2 g.L⁻¹ et <100 ng.L⁻¹ (Soares, 2008). Cette contamination provient des rivières contaminées, des fosses septiques, des activités de l'agriculture et des décharges. Cette contamination de l'eau souterraine est problématique car les caractéristiques biologiques et chimiques de ces eaux ne sont pas favorables à la dégradation des NP (peu d'oxygène, peu de microorganismes) (Langwaldt & Puhakka, 2000). L'élimination des NP des eaux par les stations de traitement d'eau potable est très variable. Seule l'étape de chloration a montré une efficacité intéressante (jusqu'à 90 % d'élimination) (Petrovic *et al.*, 2001, 2003, Stackelberg *et al.*, 2007). Cependant, la concentration de NP en sortie d'usine est préoccupante, elle a été mesurée à 92 ng.L⁻¹ en moyenne aux USA (Stackelberg *et al.*, 2007), >200 ng.L⁻¹ en Espagne (Petrovic *et al.*, 2003) et de 2 à 15 ng.L⁻¹ en Allemagne (Kuch & Ballschmiter, 2001).

Etant plus lipophile que les NPE, les NP ont tendance à être absorbés dans les boues des usines de traitement des eaux usées. Par conséquent, des concentrations importantes en NP ont été retrouvées dans les sols fortement exposés à des boues d'épuration (1,4 à 1,6 mg.kg⁻¹) et à des eaux de ruissellement (34 à 14 µg kg⁻¹) comparées aux sols exposés à des sols non amendés ou des sols fertilisés avec du fumier ou une quantité limitée de boue d'épuration (0,01 à 0,98 µg.kg⁻¹) (Soares *et al.*, 2008). Les NP ont également été détectés dans l'atmosphère à des concentrations comprises entre 2,2 à 70 ng.m⁻³. Les NP rejoignent ensuite l'écosystème aquatique et terrestre par les eaux pluviales. L'eau de pluie collectée en Allemagne et en Belgique a montré la présence de NP à des concentrations plus importantes dans le milieu urbain (0,534 µg.dm⁻³) que dans le milieu rural (0,099 µg.dm⁻³) (Gauthier, 2010).

II.3. EXPOSITION DE LA POPULATION

Les NP et NPE sont ubiquitaires dans les denrées alimentaires (Raecker *et al.*, 2011, Gyllenhammar *et al.*, 2012). Les aliments sont donc la principale source d'exposition humaine des NP et NPE. Ils proviennent de leur utilisation comme agent de mouillage dans les pesticides, d'émulsifiant dans les cires pour les légumes et les fruits et de détergent et de désinfectants pour les aliments. Gyllenhammar *et al.* ont démontré que les personnes ayant le plus de NP dans le sang sont ceux consommant le plus de fruits et légumes. Les NP proviennent également de la décomposition du trinonylphénol phosphite, un produit utilisé comme résine polymérique dans les emballages alimentaires. L'exposition de la population aux NP provient également en partie de la consommation d'eau en bouteille et d'eau du robinet. Li *et al.* ont trouvé du 4-NP dans les 21 eaux en bouteille de marques différentes analysées à une concentration médiane de 170 ng.L⁻¹ (Li *et al.*, 2010). Six eaux du robinet provenant de 6 stations différentes ont montré qu'ils contenaient des NP à une concentration médiane de 502 ng.L⁻¹. L'origine des NP dans l'eau du robinet peut aussi provenir du relargage des NP contenus dans les conduites en PVC (Santé Canada, 2001).

De nombreux produits de consommation courante renferment des NP et NPE tels que les produits cosmétiques (les crèmes, shampooings, colorants capillaires, parfums...). Les shampooings et colorants capillaires par exemple contiennent plus de 30 % de NP ou NPE. (Santé Canada, 2001).

L'exposition de la population peut aussi se faire par les poussières de maisons qui contiennent des NP (Wilson *et al.*, 2007).

II.4. TOXICOCINETIQUE

La toxicocinétique des nonylphénols a été détaillée dans un rapport européen (European Union, 2002) à partir d'expérimentations avec des nonylphénols (détaillées ci-après) et de données extrapolées aux octylphénols (chez l'animal). Les données de toxicocinétiques spécifiquement obtenues avec des NP marqués s'appuient sur deux études chez l'animal et une étude chez l'homme par voie orale et intraveineuse (2 volontaires sains).

Les NP sont bien absorbés par voie orale chez l'homme. L'élimination par les fèces est de 1,5 % dans les 56 heures suivant l'absorption. Au contraire, des tests *in vitro* sur des tissus de peaux humaines ou animales montrent que les NP sont faiblement absorbés par voie cutanée.

Après absorption, les NP sont conjugués dans le foie sous forme glucuro- et sulfo-conjugués. Dans le sang, la forme conjuguée est 100 fois plus importante que la forme non conjuguée. Le pic plasmatique de la forme conjuguée est obtenu 1h après l'absorption. Cette donnée est confirmée par les tests chez l'animal. La comparaison des AUC de la voie orale et intraveineuse suggère que la biodisponibilité orale de la forme non conjuguée est d'environ 20 %.

Les NP ne semblent pas être excrétés par voie pulmonaire car des tests chez l'animal ont montré l'absence de NP dans la fraction exhalée. Les NP pourraient être retenus dans le compartiment lipidique. Cependant le dosage des NP dans les tissus et carcasses de l'animal ne montre pas d'accumulation après 7 jours suite à une administration orale. Chez l'homme, 10 % de la dose est excrétée dans les urines sous forme conjuguée ou non et la majorité dans les 8 heures suivant l'absorption orale. Ainsi, l'excrétion par les urines et fèces représente 11,5 % de la dose absorbée, ce qui est en contradiction avec les données chez l'animal montrant que 90 % de la dose absorbée sont excrétés (70 % par les selles et 20 % par les urines) dans les 4 jours après l'administration orale.

Aucune agence européenne n'a estimé la dose journalière tolérable (DJT) des NP mais certains chercheurs danois ont proposé une DJT à $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel. L'apport journalier alimentaire des NP a été estimé à $7,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dans une étude allemande, d'environ $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dans une étude japonaise et de $27 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dans une étude suédoise (Gyllenhammar *et al.*, 2012).

A notre connaissance, il n'existe pas de données ayant prouvé la toxicité sur le système reproducteur chez l'homme. Cependant, les NP ont montré des effets sur la reproduction dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Par exemple les NP ont démontré des effets sur la morphologie des testicules et la fertilité masculine chez le poisson exposé à des doses de $0,96 \text{ mg.L}^{-1}$ pendant 4 semaines. Chez le rat mâle, les NP ont entraîné la vacuolisation et la réduction du diamètre des tubes séminifères, des nécroses cellulaires et la baisse du comptage spermatique et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles (INRS, 2006a). Chez le rat femelle adulte, une augmentation de la durée du cycle ovarien et une diminution du poids des ovaires ont été observées. Chez la femelle pré-pubère, les NP induisent une augmentation du poids de l'utérus, un raccourcissement du délai avant ouverture vaginale et une modification de la durée du cycle (Soares *et al.*, 2008). Chez la souris femelle, les NP induisent des effets sur les cellules de l'utérus à faible dose (0,5 à

5 mg kg⁻¹). Chez la truite arc-en-ciel exposée à 20,3 mg L⁻¹, les NP entraînent la production de la protéine féminine. L'effet sur le système reproducteur peut atteindre les générations suivantes. Chez la souris, les NP peuvent affecter la qualité du sperme de la 1^{ère} génération et cet effet toxique s'intensifie avec les générations. Une diminution significative du nombre de petits nés lors de la 2^{ème} portée de la 2^{ème} génération est observée (Kyselova *et al.*, 2003).

II.5. TOXICITE

Un NOAEL de 15 mg.kg⁻¹.j⁻¹ a été établi pour les modifications du système reproducteur et un LOAEL de 100 mg.kg⁻¹ dans la nourriture pour la toxicité testiculaire (European Union, 2002). Il a été montré que seul le NP non conjugué a un effet sur les récepteurs aux œstrogènes.

L'activité œstrogénique diffère selon le type de NP (Kim *et al.*, 2004, Katase *et al.*, 2008, Uchiyama *et al.*, 2008). Tous les isomères de NP n'induisent pas un effet œstrogénique, et ceux en position para auraient l'effet le plus important. En fonction de l'isomère de position sur la chaîne C9 en para, plusieurs auteurs ont étudié la variabilité de cet effet. La molécule 3E22NP présente l'effet le plus important mais ne représente que 4 à 6 % du mélange technique (CAS 84852-15-3), alors que la molécule 353NP (CAS 186825-36-5) a un effet œstrogénique notoire, plus faible que le précédent mais représente 12 à 20 % de ce mélange (Katase *et al.*, 2008). Dans les études qui ne testaient pas le 3E22NP, le 353NP apparaît comme l'isomère ayant l'effet œstrogénique le plus important (Preuss *et al.*, 2006, Cormio *et al.*, 2011).

En 2001, dans sa revue de la littérature des effets à faible dose, le NTP a affirmé cet effet des NP sur le dimorphisme sexuel, le poids du thymus, les réponses immunitaires et le cycle œstral. Le NTP a défini l'effet à faible dose comme un effet apparaissant dans l'intervalle de dose de l'exposition humaine, ou apparaissant à une dose inférieure à la dose utilisée dans les protocoles. L'agence de protection environnementale des Etats Unis a défini la dose seuil à 15 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour les NP (Vandenberg *et al.*, 2012). Plusieurs études *in vitro* ont démontré une courbe dose-réponse non monotone (Fagin, 2012).

Il a été montré que les NP entrent en compétition avec l'hormone 17β-œstradiol lors de sa liaison aux récepteurs aux œstrogènes. Les NP peuvent augmenter le niveau d'œstrogènes et diminuer le niveau d'androgènes dans le sérum chez la carpe (Gauthier, 2010). Cet effet ne serait pas une compétition directe du récepteur mais une activation en plusieurs étapes du récepteur aux androgènes.

Dans sa revue de la littérature sur la toxicité des NP, Soares *et al.* citent d'autres effets perturbateurs avec des cellules variées. Par exemple, les NP déclenchent une toxicité respiratoire dans les cellules ($EC_{50} = 1,8 \text{ mg.L}^{-1}$), augmentent la prolifération des cellules de la glande mammaire ($0,01 \text{ mg.j}^{-1}$), perturbent le transport de calcium du réticulum sarcoplasmique ($IC_{50} = 880-2420 \text{ mg.L}^{-1}$) et produisent des aberrations chromosomiques (Soares *et al.*, 2008).

II.6. BIOMONITORING

Les NP ont été retrouvés dans divers tissus biologiques tels que le lait maternel, le tissu adipeux, l'urine et le sang. Cependant ces études mentionnent rarement la molécule de NP dosée. Les NP ont été retrouvés dans les 32 laits maternels dosés avec une concentration moyenne de 32 ng.mL^{-1} (type de NP non mentionné) (Ademollo *et al.*, 2008). Lopez-Espinosa *et al.* (2009) ont retrouvé des NP dans 100 % des tissus adipeux ($n = 20$) de femmes espagnoles avec une médiane de 57 ng.g^{-1} (type de NP non mentionné) (Lopez-Espinosa *et al.*, 2009). Dans l'urine, Calafat *et al.* ont détecté la présence de 4-*n*-nonylphenol dans 51 % de 394 adultes avec une concentration inférieure à $0,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ et une concentration au 95^{ème} percentile à $1,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Calafat *et al.*, 2005). Gyllenhammar *et al.* ont dosé le 4-NP et les NPE dans le sang de 100 jeunes femmes en suites de couches (type de 4-NP non mentionné) (Gyllenhammar *et al.*, 2012). Ils ont montré que 85 % des NP étaient sous forme non conjugués et que ceux-ci étaient supérieurs à la limite de détection ($0,5 \text{ ng.g}^{-1}$) chez 46 % des femmes. Dans cette étude, toutes les femmes avaient des NPE en dessous du seuil de détection. Au Japon, 174 sangs de cordon ont été recueillis dans 2 maternités et les 4-NP (*p*-isomères > 80%) ont été dosés. Les NP ont été détectés dans 76 % et 25,8 % des échantillons des 2 maternités, respectivement à des concentrations médianes de 0,9 et $41,8 \text{ ng.g}^{-1}$ et maximales de 211 ng.g^{-1} de plasma (Chen *et al.*, 2008).

CHAPITRE III : LES DERIVES CHLORES DU BISPHENOL A ET DU NONYLPHENOL

III.1. ORIGINE DES DERIVES CHLORES ET PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT

En solution aqueuse, la chloration du bisphénol A (généralement par utilisation d'hypochlorite de sodium) conduit à la formation de dérivés chlorés. Le mono-chloro-BPA apparait en premier suivi du di-, tri et tétra-chloro-BPA (cf Figure 4) (Yamamoto & Yasuhara, 2002, Gallard *et al.*, 2004). Lors de cette réaction, il se crée 2 isomères de dichlorés : le 2,2'-DCBPA et le 2,6-DCBPA. Le 2,2'-DCBPA apparait préférentiellement à pH acide ou alcalin. Au contraire à pH neutre, le 2,6-DCBPA se forme majoritairement. Cependant à pH 8, les 2 dichlorés sont en concentrations similaires (Fukazawa *et al.*, 2002). Le chlore réagit ensuite avec le tétrachloro-BPA en coupant celui-ci au niveau de l'isopropyl pour former le trichlorophénol. La réaction du trichlorophénol avec les autres dérivés chlorés du BPA entraîne la formation de nombreux polychlorés phénoxyphénol (Hu *et al.*, 2002a). La cinétique de chloration du BPA est décrite selon la réaction d'ordre 2 apparent et l'augmentation de la concentration en chlore induit une dégradation plus rapide du BPA (Yamamoto & Yasuhara, 2002, Gallard *et al.*, 2004).

Le dérivé tétra-chloré du BPA est le seul dérivé chloré de BPA utilisé dans l'industrie, et pouvant avoir une origine anthropique dans l'eau, autre que celle produite par la chloration du BPA. Dans l'industrie, il est utilisé principalement comme retardant de flamme et également comme additif dans les polymères et résines époxy, les résines phénoliques et les adhésifs (ANSES, 2011). Sa production mondiale est estimée à moins de 10 000 tonnes/an (Riu *et al.*, 2011a).

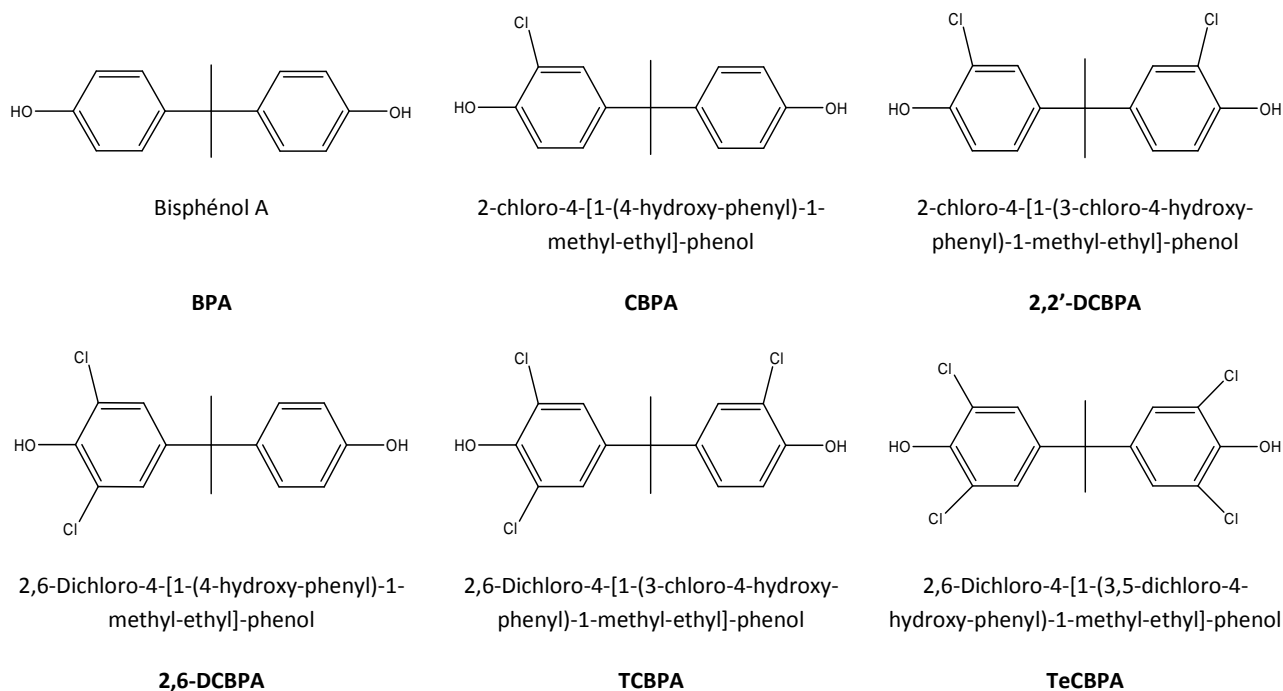


Figure 4 : Le BPA et ses dérivés chlorés

La présence de dérivés chlorés du BPA dans l'environnement est préférentiellement formée par la réaction du chlore avec le BPA plutôt que par la déchloration du TeCBPA (Riu *et al.*, 2011b). L'hypochlorite de sodium est habituellement utilisé dans la désinfection de l'eau, et le blanchiment du papier thermique lors de son recyclage. Fukazawa *et al.* ont retrouvé du BPA et les 5 dérivés chlorés (CBPA, 2,2'-DCBPA, 2,6-DCBPA, TCBPA et TeCBPA) dans les effluents terminaux des usines de recyclage du papier qui sont toutes équipées de processus de traitement de l'eau avant leur évacuation dans l'environnement (Fukazawa *et al.*, 2001, Fukazawa *et al.*, 2002). Les dérivés chlorés dans ces effluents terminaux étaient présents de l'état de trace à 2000 ng.L⁻¹ (Fukazawa *et al.*, 2001, Fukazawa *et al.*, 2002). En 2010, Gallart-Ayala, *et al.* ont également retrouvé les 5 dérivés chlorés du BPA dans des effluents d'eaux usées des usines de recyclage du papier à des concentrations comprises entre 460 et 836 ng.L⁻¹ (Gallart-Ayala *et al.*, 2010). Liu *et al.* ont montré que les dérivés chlorés de BPA peuvent également se former à la surface d'eaux salines contenant du BPA, et irradiées par la lumière solaire (Liu *et al.*, 2009).

De même, les nonylphénols réagissent avec le chlore pour former des dérivés chlorés. Sept composés ont été identifiés par GC/MS par Hu *et al.* par chloration du mélange technique d'isomères de 4-NP (CAS non précisé). Le dérivé mono-chloré est formé en

premier, suivi du dérivé di-chloré (Hu *et al.*, 2002b, Cormio *et al.*, 2011). Les 2 dérivés chlorés sont présentés dans la figure 5. Puis, les nonylphénols perdent soit la totalité de leur chaîne carbonée pour former le trichlorophénol, soit une partie seulement pour former plusieurs autres dérivés dichlorés se distinguant par la longueur de leur chaîne carbonée. Aucune étude de cinétique de chloration des NP constitutifs du mélange technique n'est publiée, à notre connaissance. La cinétique de chloration du nonylphénol linéaire est décrite selon une réaction d'ordre 2 et l'augmentation de la concentration en chlore induit une dégradation plus rapide du 4-*n*-NP (Deborde *et al.*, 2004).

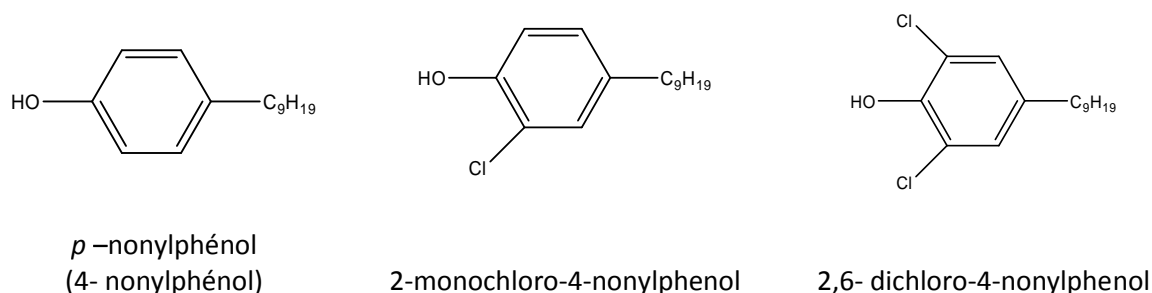


Figure 5 : Structure chimique du *p*-nonylphénol et de ses 2 dérivés chlorés

Toutes les chaînes de traitement d'eau potable présentent une étape finale de chloration. La recherche, dans les tissus biologiques, des dérivés chlorés spécifiques du BPA ou du NP pourrait être un traceur apportant des informations sur l'origine hydrique de ces molécules dans l'organisme.

III.2. TOXICITE

Plusieurs études *in vitro* et une étude *in vivo* chez l'animal ont démontré l'activité œstrogénique des dérivés chlorés du BPA. Hu *et al.* ont mis en évidence un effet œstrogénique persistant après la chloration du BPA et une affinité de la liaison avec les récepteurs œstrogéniques humains 24 fois plus importante pour la solution de BPA après 60 minutes de réaction avec le chlore qu'avant la chloration (Hu *et al.*, 2002a). L'effet œstrogénique de chaque dérivé chloré du BPA pris séparément a été étudié par différentes unités de recherche. Une étude utilisant un système de vecteur GFP (Green Fluorescent Protein), régulé par un élément de réponse aux oestrogènes et transféré à des cellules cancéreuses mammaires montre que le CBPA, le 2,2'-DCBPA et le 2,6-DCBPA ont une plus grande affinité pour le récepteur ER α que le BPA (Kuruto-Niwa *et al.*, 2002). Mutou *et al.* ont observé une activité œstrogénique sur les cellules de levure (*saccharomyce cerevisiae*)

jusqu'à 105 fois plus importantes chez les dérivés chlorés (Mutou *et al.*, 2006). Fukazawa *et al.* confirment également cet effet mais seulement jusqu'à 38 fois supérieur à celui du BPA (Fukazawa *et al.*, 2002). Ces 2 études ont conclu que le 2,2'-DCBPA a la plus grande activité œstrogénique sur les cellules de levure suivi par le TCBPA. Les dérivés chlorés peuvent aussi induire la production de vitellogénine, protéine de transport de lipides considérée comme un dépisteur de l'activité œstrogénique, sur le sérum d'un poisson mâle (Tabata *et al.*, 2004). Le 2,2'-DCBPA, contrairement au CBPA avait une plus grande activité que le BPA (Tabata *et al.*, 2004). Riu *et al.* ont mis en évidence que le BPA et ses dérivés chlorés étaient capables d'activer les récepteurs œstrogéniques (ER α et ER β) et PPAR γ . La capacité d'activer ER β est fonction du nombre de chlore sur le BPA : le BPA et le CBPA ont un effet supérieur au DCBPA suivi par le TCBPA et finalement le TeCBPA. Au contraire, la plus grande activité agoniste au PPAR γ est observée avec le TCBPA et le TeCBPA (Riu *et al.*, 2011b). Chez des rates ovariectomisées, le CBPA et le 2,2'-DCBPA comme le BPA, augmente le poids de l'utérus (Takemura *et al.*, 2005). Ces 2 dérivés chlorés ont une affinité pour ER α plus importante que le BPA. Ces 2 dérivés chlorés se lient aux ER β avec une force identique à celle du BPA. Les autres dérivés chlorés n'ont pas été étudiés.

Parmi le BPA et ses dérivés chlorés, le 2,2'-DCBPA semble avoir la plus grande activité œstrogénique (Fukazawa *et al.*, 2002, Tabata *et al.*, 2004, Takemura *et al.*, 2005, Mutou *et al.*, 2006). Son isomère, le 2,6-DCBPA a été testé par 2 méthodes différentes et montre un effet œstrogénique plus faible (Fukazawa *et al.*, 2002, Kuruto-Niwa *et al.*, 2002). Le TeBPA a une plus faible, ou pas d'activité œstrogénique du tout (Fukazawa *et al.*, 2002, Kuruto-Niwa *et al.*, 2002, Tabata *et al.*, 2004). Il a été mis en évidence d'autres effets perturbateurs, comme des effets anti-thyroïdiens pour le TeCBPA (Kitamura *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2009), ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire des cellules d'astroglome humain et une diminution de la communication intercellulaire par la jonction gap pour le 2,2'-DCBPA (Charron, 2011).

Les dérivés chlorés de NP semblent avoir eux-aussi une activité œstrogénique. La complexité du mélange de NP retrouvé dans l'environnement (voir paragraphe II.1.), explique que la littérature décrive seulement des études à partir de solution chlorée de NP, et non à partir des molécules individualisées. Ainsi, la solution chlorée de NP a une activité œstrogénique sur les cellules de levure 10 fois supérieure à celle de NP non chlorée (Hu *et al.*,

2002b). Au contraire Cormio *et al.* ne retrouvent pas d'augmentation d'activité œstrogénique par rapport à la molécule-mère (Cormio *et al.*, 2011).

En conclusion, comme certains dérivés chlorés ont une activité agoniste œstrogénique, le rôle de perturbateur endocrinien de ces molécules n'est pas à négliger. Cependant leur métabolisme est très peu connu. Riu et al ont étudié la biotransformation de plusieurs dérivés chlorés du BPA dans les cellules du foie de rat, et montrent qu'ils subissent une oxydation P450-dépendante entraînant leur coupure à côté du carbone central et la formation de chlorophénol hydroxylé (Riu *et al.*, 2010).

III.3. BIOMONITORING

Les dérivés chlorés du BPA ont été retrouvés dans plusieurs milieux biologiques humains : le tissu adipeux, le placenta et l'urine. Par contre, ils n'ont pas été détectés dans le sérum. Aucune de ces études n'a distingué les deux DCBPA. Le tableau 4 reprend les résultats de ces études. Le TeCBPA n'a été détecté que dans le tissu adipeux. Il a été recherché et non détecté dans le placenta et il n'a pas été recherché dans les urines et le sérum.

Tableau 4: Concentration de BPA et ses dérivés chlorés dans les milieux biologiques humains (ND : non détecté ; NR : non recherché ; LD : limite de détection)

<i>Milieu biologique</i>	<i>Variable</i>	<i>BPA non conjugué</i>	<i>CBPA</i>	<i>DCBPA</i>	<i>TCBPA</i>	<i>TeCBPA</i>	<i>Méthode de dosage</i>	<i>Auteurs (Année)</i>
Tissus adipeux (femme) (ng.g ⁻¹) N = 20	moyenne	5,83±3,48	3,05±0,28	9,21±9,26	0,74±0,15	ND	GC-MS	Fernandez <i>et al.</i> , (2007)
	taux de détection	55 %	15 %	80 %	10 %	ND		
	LD	0,5	0,5	0,5	3	3		
Tissus adipeux (enfant) (ng.g ⁻¹) N = 86	moyenne	17,46±14,82	7,32±4,25	14,45±9,79	4,13±1,35	3,54±1,94	GC-MS	Olea, (2008)
	taux de détection	62 %	64 %	99 %	2 %	12 %		
	LD (ng.mL ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	3	3		
Placenta (ng.g ⁻¹) N = 49	Min - max	5,7 – 22,2	5,1 – 21,4	12,7 – 58,8	4,0 – 31,2	ND	LC-MS/MS	Jimenez-Diaz <i>et al.</i> , (2010)
	taux de détection	20 %	51 %	51 %	49 %	ND		
	LD	0,2	0,3	0,3	0,4	0,6		
Placenta (ng.g ⁻¹) N = 50	Min-max	1,2 à 15,4	ND	ND	ND	NR	UHPLC-MS/MS	Vela-Soria <i>et al.</i> , (2011)
	moyenne	4,8	ND	ND	ND	NR		
	taux de détection	40 %	ND	ND	ND	NR		
	LD	0,2	0,3	0,3	0,4	NR		
Urine (µg.g ⁻¹) ajustée à la créatinine N = 31	Min - max	<LOQ (0,01) - 12,8	<LOQ (0,05) - 1,68	<LOQ (0,05) - 0,617	<LOQ (0,05) - 0,675	NR	LC-MS/MS	Liao & Kannan, (2012)
	moyenne	0,713	0,055	0,049	0,047	NR		
	taux de détection	97 %	16 %	20 %	20 %	NR		
	LD	0,003	0,02	0,02	0,02	NR		
Sérum (ng.mL ⁻¹) N = 14	Min - max	<LOQ (0,01) - 0,588	ND	ND	ND	NR	LC-MS/MS	Liao & Kannan, (2012)
	moyenne	0,035	ND	ND	ND	NR		
	taux de détection	57 %	ND	ND	ND	NR		
	LD	0,003	0,02	0,02	0,02	NR		

A notre connaissance, il n'existe pas de données sur les dérivés chlorés des nonylphénols dans les milieux biologiques.

CHAPITRE IV : VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE

IV.1. CONTEXTE

La chimie analytique est une discipline scientifique dont la particularité, plus que tout autre, est d'être omniprésente dans le monde de la recherche (les connaissances élaborées dans un domaine se font la plupart du temps sur la base de données acquises par une analyse, relevant aussi bien des concepts et outils de la chimie proprement dite, que de la physico-chimie, la biochimie, la biologie, la physique et même les mathématiques), et aussi dans le monde de la santé (diagnostics médicaux basés sur les analyses médicales notamment).

Dans le cadre environnemental, les conséquences des expositions aux agresseurs (physiques, chimiques ou biologiques) sont multiples et n'apparaissent généralement qu'à long terme, alors même que les populations exposées sont souvent très importantes. De plus, les circonstances et durées d'exposition (en milieu naturel, domestique, professionnel) sont difficiles à quantifier. Les décideurs sont ainsi amenés à prendre des mesures dans des situations le plus souvent caractérisées par de fortes incertitudes scientifiques, et dont les conséquences peuvent représenter d'importants enjeux économiques, sociaux et sanitaires. Le cadre de référence qui s'impose au niveau international, vise à organiser le processus d'élaboration des connaissances scientifiques et les conditions de leur mobilisation à des fins de décisions publiques, et distingue la fonction d'évaluation des risques (qui est du ressort du domaine scientifique) de la gestion des risques (qui relève de la décision politique) (Gérin *et al.*, 2003, AFSSET, 2006).

Ainsi, les sciences analytiques, en contribuant à l'évaluation des risques (basée sur les études scientifiques) jouent un rôle important dans les décisions prises au niveau réglementaire pour la gestion des risques, avec des conséquences qui peuvent être importantes au niveau de la société elle-même. Par conséquent, il est nécessaire de fournir des résultats dont le niveau de preuve est connu, afin d'en apprécier la signification. Pour cela, les laboratoires d'analyses ont développé le principe de qualité et d'assurance qualité. La définition internationale de la qualité est fournie par la norme ISO 8402 de l'International Standardisation Organisation (ISO) : « *La qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins implicites et explicites* ». L'assurance qualité est un ensemble de dispositions mises en œuvre pour assurer que les résultats fournis seront de la qualité requise pour l'usage auquel ils

sont destinés (Quevauviller *et al.*, 2012). Il existe 3 référentiels normatifs ou réglementaires qui servent à organiser l'assurance-qualité au laboratoire :

- ISO 17025 :2005 « Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais »
- ISO 15189:2007 « Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence »
- BPL « Bonnes Pratiques de Laboratoire » (OCDE, 1998). Les industries pharmaceutiques et chimiques ont été les premières à mettre en place des règles strictes et définies au niveau international, intitulées les bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Celles-ci ont été développées par la Food and Drug Administration aux USA en 1976, et ont servi de base à l'élaboration du texte BPL élaboré par l'OCDE (Organisation de Coopération et du Développement Economiques, regroupant 34 pays aujourd'hui). Le champ d'application des BPL de l'OCDE (1998) est ainsi défini dans le texte *« essais de sécurité non cliniques pratiqués sur des éléments contenus dans des produits pharmaceutiques, des pesticides, des cosmétiques, des médicaments vétérinaires, des additifs pour l'alimentation humaine et animale et des produits chimiques industriels. Ces éléments soumis à des essais sont souvent des produits chimiques de synthèse, mais peuvent avoir une origine naturelle ou biologique et être des organismes vivants dans certaines circonstances. Les essais effectués sur ces éléments visent à fournir des données sur leurs propriétés et/ou leur innocuité du point de vue de la santé humaine et/ou de l'environnement »*

L'accréditation d'un laboratoire est une reconnaissance, par un organisme tiers (Cofrac en France), de sa compétence dans un domaine donné, sur la base d'un référentiel normatif définissant les exigences. Ce peut être une démarche volontaire (pour mettre en valeur cette compétence) ou une obligation dans le cadre de la réglementation.

La validation d'une méthode d'analyse fait partie des référentiels précédemment cités : *« Le but de la validation d'une procédure d'analyse est de démontrer qu'elle correspond bien à l'usage pour lequel elle est prévue »* (CEE III/844/87 EN-FINAL, août 89). De nombreux ouvrages, documents et normes relatifs à la validation des méthodes sont disponibles. Ils proposent en général peu de protocoles expérimentaux et se limitent le plus souvent aux

concepts généraux. Les termes et les plans expérimentaux varient selon le référentiel. Chaque laboratoire fait donc le choix d'un référentiel qui correspond le mieux à son activité, et au niveau de reconnaissance souhaitée.

IV.2. VOCABULAIRE GENERAL DE VALIDATION

Selon la norme NF ISO 17025 la validation d'une méthode est « *la confirmation par examen et apport de preuves objectives, du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue et déterminée de la méthode soient remplies* ».

Dans la suite de notre travail, nous détaillons seulement la validation d'une méthode d'analyse et non la totalité des requis décrits dans les référentiels d'assurance-qualité au laboratoire. Les principales caractéristiques de qualité d'une méthode d'analyse sont aussi appelées critères de validation et sont définis ci-après :

Spécificité : (terme anglais : specificity) La spécificité d'une méthode d'analyse est sa capacité à mesurer seulement ce qu'elle est destinée à mesurer. En d'autres termes, une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de l'analyte (AOAC, 2002 , Feinberg, 2009)

Linéarité (ICH, 2005) (terme anglais : linearity): La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité (à l'intérieur de l'intervalle de dosage), à fournir des résultats qui sont directement proportionnels à la concentration de l'analyte de l'échantillon.

Intervalle de mesure (terme anglais measuring interval ISO/IEC Guide 99:2007) L'intervalle de mesure est l'ensemble des valeurs de grandeurs d'une même nature, qu'un instrument de mesure ou un système de mesure donné peut mesurer avec une incertitude instrumentale spécifiée, dans des conditions déterminées (ISO TC 69/SC 6 N, 2011).

Justesse (terme anglais : trueness) (ISO 5725-1, 1994) : La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue sur une grande série de résultats et la valeur acceptée comme référence. La justesse détermine les erreurs systématiques.

Fidélité (terme anglais : precision) (ISO 5725-1, 1994) : La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures obtenue à partir de plusieurs prises d'essai d'un même échantillon homogène, dans des conditions prescrites (trois catégories de conditions sont envisagées). La fidélité détermine les erreurs aléatoires. La fidélité est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais obtenus selon certaines conditions :

- **Conditions de répétabilité** (terme anglais : repeatability conditions) (ISO 5725-1, 1994) : conditions dans lesquelles les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode, sur les individus d'essais identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle temps.

- **Conditions de fidélité intermédiaire** (terme anglais : intermediate precision conditions) (ISO 5725-1, 1994) : conditions dans lesquelles les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essais identiques, dans le même laboratoire avec des changements de conditions, parmi lesquelles : personne, étalonnage, équipements, environnement, temps écoulé entre les mesures.

- **Conditions de reproductibilité** (termes anglais : reproducibility conditions) (ISO 5725-1, 1994) : conditions dans lesquelles les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

Exactitude (terme anglais : accuracy) (ISO 3534, 2006): L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat obtenu et la valeur acceptée comme référence. De plus, la norme ISO 5725-1 présente l'exactitude d'une méthode de mesure comme étant composée de sa justesse et de sa fidélité, puisqu'elle met en jeu une combinaison d'erreurs aléatoires (fidélité) et d'erreurs systématiques (justesse).

Sensibilité (terme anglais : sensibility) (Feinberg, 2009): La sensibilité est le rapport de la variation instrumentale à la variation de la concentration pour différentes solutions étalons, ou pour des ajouts de l'analyte dans une matrice.

Robustesse (terme anglais : robustess) (Feinberg, 2009) : La robustesse est l'importance des effets observés lorsqu'on fait subir de légères variations contrôlées des conditions opératoires.

Limite de quantification (terme anglais : limit of quantification) (ICH, 2005) : La limite de quantification est définie comme la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement, c'est-à-dire avec une variabilité connue et acceptée.

Limite de détection (terme anglais : limit of detection) (ISO/TR 13530) : La limite de détection est définie comme la plus petite quantité ou concentration d'un analyte dans

l'échantillon d'essai qui peut être distinguée, de manière fiable, du bruit de fond (AFNOR, 2009).

IV.3. COMPARAISON DE LA METHODOLOGIE DES PROCEDURES DE VALIDATION DE 3 GUIDES APPLICABLES AU DOMAINE DE LA SANTE ENVIRONNEMENTALE

Il n'existe pas de protocole international unique, dans le cas de la validation d'analyse. Cependant l'harmonisation du vocabulaire et par voie de conséquence la normalisation des définitions (voir paragraphe précédent) permet d'évaluer à l'échelle internationale la qualité d'une analyse. Plusieurs guides sont disponibles, qui détaillent la méthodologie de validation à appliquer dans un contexte donné, en fonction de l'utilisation prévue et déterminée de la méthode, comme défini par la norme ISO 17025.

Dans le domaine de l'environnement, aucune contrainte réglementaire n'impose aux laboratoires de recherche d'être accrédités, sauf en ce qui concerne les laboratoires effectuant des analyses réglementaires obligatoires.

Cependant, la nécessité même, pour le chercheur de s'assurer que les résultats fournis seront de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés, conduit celui-ci à définir le niveau de qualité requis pour ses résultats (en fonction du but à atteindre), et ensuite à faire la validation adaptée des méthodes mises en œuvre. Dans notre travail concernant la santé environnementale, les analyses des molécules sont conduites à partir de milieux biologiques et d'eau, et ont pour objectif d'être utilisées dans des études épidémiologiques. C'est pourquoi, il nous est apparu intéressant de comparer différents guides applicables au dosage des polluants environnementaux dans ces deux milieux et d'y associer les guides applicables à la santé humaine. Finalement, les recommandations internationales, les mieux adaptées au niveau de qualité requis par notre travail correspondent à celles décrites dans les 3 référentiels : l'ICH, NORMAN et la FDA.

L'ICH (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) a établi un guide de validation des procédures analytiques dans le secteur pharmaceutique. Ce guide concerne l'identification de composés, les essais de pureté (dosage et essais limites), et le dosage pharmaceutique et biopharmaceutique. Ce guide est recommandé dans l'union européenne, les Etats-Unis d'Amérique et le Japon. La version actuellement en vigueur est la version 4, mise à jour en 2005 (ICH, 2005).

Le guide NORMAN : (Network of Reference laboratories and related organizations for Monitoring and bio-monitoring of emerging pollutants) est un guide de validation pour les analyses dans le secteur de l'environnement. Ce guide concerne le dosage des polluants émergents et l'évaluation de leur toxicité, et a pour but d'établir une approche européenne commune pour la validation chimique et biologique dans le cadre des études de monitoring (dans l'environnement) et bio-monitoring (dans les milieux biologiques) des polluants émergents dans une large série de matrices. Ce guide tient compte de différents niveaux de validation possible : les laboratoires de recherche, les laboratoires référents et les laboratoires de routine. La version actuelle en vigueur est la version V4.1 de 2009 (Schwesig *et al.*, 2009).

La FDA (Food and Drug Administration) a élaboré un guide de validation de méthode bioanalytique pour les industries. Il concerne le développement de méthode pour de nouveaux médicaments et est applicable particulièrement à l'analyse par spectrométrie de masse et chromatographie liquide pour la quantification de médicaments ou leurs métabolites dans les matrices biologiques. Ce guide tient compte de différents de niveau de validation : la validation d'une nouvelle méthode, les modifications d'une méthode déjà validée et la validation croisée de plusieurs méthodes (US Department of Health and Human Services & Center for Drug Evaluation and Research, 2001). Il existe un document FDA pour le dosage des produits chimiques dans les aliments que nous n'avons pas retenu car il était beaucoup moins détaillé que le précédent (Foods Program Science and Research Steering Committee, 2012).

Ainsi, le tableau 5 réunit les différents critères de validation des trois référentiels précédemment cités, qui permettent de valider au mieux les analyses destinées à être exploitées dans le domaine de la santé environnementale. Concernant l'analyse de traces de polluants environnementaux, dans le guide de l'ICH nous avons considéré la procédure pour l'analyse quantitative d'impuretés, qui correspond à la procédure la plus exigeante. Dans le guide de NORMAN, nous avons considéré le niveau 1 de validation qui s'adresse au développement de méthode. Dans le guide de la FDA, nous avons ciblé la validation complète qui s'adresse au développement d'une nouvelle méthode.

Tableau 5 : Méthodologie de la validation des procédures analytiques selon l'ICH, NORMAN et la FDA dans le cas d'une analyse destinées à être exploitées dans le domaine de la santé environnementale (NR : non renseigné ; LQ : limite de quantification, LD : limite de détection, * ICH et FDA présentent une notion d'exactitude qui en fait correspond à la justesse de la norme ISO 3534-1)

	<i>ICH</i>	<i>NORMAN</i>	<i>FDA</i>
Spécificité/ sélectivité (selectivity/ Specificity)	2 ou plus parmi les procédures analytiques suivantes : - chromatogramme illustratif, - séparation des composés : 2 composés éluant à la suite doivent être résolus, - matrice avec des impuretés comparées à matrice sans impuretés	- Introduction d'interférences dans l'échantillon comparée à un échantillon sans interférence, - calcul de la justesse - comparaison de la concentration déterminée avec d'autre méthode indépendante	Analyse de blancs matrice de 6 origines différentes. L'absence d'interférence doit être vérifiée. La sélectivité doit être testée à la limite de quantification. Dans le cas de l'analyse par LC-MS et LC-MS/MS, l'effet matrice doit être recherché
Justesse (trueness)	(défini abusivement par le terme exactitude) * - Surcharge à 3 niveaux de concentrations/3 répétitions chacun - Calcul du taux de recouvrement qui doit être compris entre 70 et 130 % de la quantité, ou calcul de la différence entre la moyenne obtenue et la valeur vraie	- 5 à 10 répétitions surchargées et non surchargées dans la matrice. - Le recouvrement doit être compris entre des valeurs qui sont fonction de la concentration en analyte (cf tableau du guide, par exemple si la concentration en analyte est de 0,0000001 %, le recouvrement doit être compris entre 40 et 120 %)	(défini abusivement par le terme exactitude) * - Surcharges à 3 niveaux de concentrations minimum/ 5 répétitions chacun. Moyenne du biais doit être <15 % sauf dans le cas de la limite de quantification où il faut être <20 %
Fidélité (Precision) Répétabilité (repeatability) Fidélité intermédiaire (intermediate precision)	Pour chaque valeur de fidélité : calcul de l'écart-type, du coefficient de variation et intervalle de confiance - Minimum de 3 niveaux de concentration/3 répétitions chacun ou minimum de 6 répétitions à 100 % de la concentration test. Idem, dans des conditions qui dépendent de l'utilisation	Dans tous les cas : - 3 répétitions par niveau de concentration. - Calcul de l'écart-type, du coefficient de variation (CV) Calcul de la limite de répétabilité ($r = 2,83 \times CV$ de la répétabilité). La variation ne doit pas dépasser plus de 5 % de r. Calcul de la fonction de Horwitz : $2^{\exp}(1-0,5 \times C)$ et le CV de la répétabilité < 0,5 ou 0,6 x la fonction de Horwitz	Minimum 3 niveaux de concentration/5 répétitions chacun. Le CV doit être < 15 % sauf dans le cas de la limite de quantification où il faut être < 20 %

	<i>ICH</i>	<i>NORMAN</i>	<i>FDA</i>
Recouvrement (recovery)	NR	NR	Comparaison du signal d'un échantillon surchargé dans la matrice au signal du standard. Recouvrement de l'analyte et de l'étalon interne doit être cohérent, fidèle et reproductible. Recouvrement effectué à 3 niveaux de concentrations (faible, médium et fort)
Limite de détection (detection limit)	- Soit évaluation visuelle, - Soit évaluation par le rapport signal/bruit en comparant le signal d'un échantillon à une concentration faible connue et un blanc. En général rapport 3 :1 - Soit $LD = 3,3 \times$ écart-type d'un blanc ou $3,3 \times$ la pente de la courbe d'étalonnage	3 x l'écart-type du blanc de matrice ou 3 x l'écart-type d'un solvant contenant une faible concentration	NR
Limite de quantification (quantification limit)	-Soit évaluation visuelle, -Soit évaluation par le rapport signal/bruit en comparant le signal d'un échantillon à une concentration faible connue et un blanc. En général rapport 10 :1 -soit $LQ = 10 \times$ écart-type d'un blanc ou $10 \times$ la pente de la courbe d'étalonnage. Doit être démontré (vérification de l'exactitude) par l'analyse d'échantillon surchargé à la limite de quantification	$LQ = 3 \times LD$; Doit être démontré (vérification de l'exactitude) en surchargeant à la LQ un blanc matrice	La réponse à la LQ doit être au moins 5 fois supérieure à la réponse d'un blanc. La réponse doit être identifiable et reproductible avec une fidélité < 20 % et une justesse comprise entre 80-120 %
Linéarité (linearity)	Minimum 5 concentrations Calcul r^2 ; pente de la droite de régression, somme des carrés des résidus, intercepte avec l'axe des ordonnées, déviation entre les points et la droite de régression	Dans un standard et dans la matrice Echelle logarithmique : la gamme est comprise entre 95 à 105 % de la ligne horizontale	La gamme doit être faite dans la matrice. Faire un blanc matrice sans étalon interne et un blanc avec étalon interne puis 6 à 8 points de gamme incluant la LQ.
Intervalle de mesure (range)	Fidélité et justesse des points de la droite d'étalonnage, 100 à 120 % de la concentration ciblée pour l'analyse	Déterminé par la LD et LQ	Pour autres points de la gamme, la déviation doit être < 15 % de la valeur nominale (sauf pour la LQ qui doit être < 20 %)
Sensibilité (sensitivity)	NR	Pente de la droite en général	NR

	<i>ICH</i>	<i>NORMAN</i>	<i>FDA</i>
Robustesse (robustess)	Faire varier les paramètres d'ajustement de la méthode : par exemple : le temps d'extraction, le pH de la phase mobile, la température, le débit de la phase mobile...	Introduire des changements délibérés légers à la méthode et déterminer le coefficient de variation d'échantillons surchargés	NR
Stabilité des analytes (analyte stability)	NR	NR	Détermination : - à court terme et à long terme au congélateur et/ou à température ambiante, à faible et haute concentrations. .- sur des solutions-mères de stockage à température ambiante et à la température de conservation. - condition de stockage des échantillons après la préparation et avant l'analyse

A l'issue de la validation, lors du dosage des échantillons, il convient de disposer d'une méthode qui permette de contrôler les coefficients du modèle, afin qu'ils restent dans le domaine de variation compatible avec les performances obtenues lors de la validation (Feinberg, 2009). Les guides Norman et FDA préconisent de réaliser un contrôle-qualité, lors des dosages de routine. Pour cela, la FDA recommande d'insérer des échantillons de contrôle-qualité lors de l'analyse, préparés en surchargeant la matrice, à différentes concentrations d'analytes (US Department of Health and Human Services & Center for Drug Evaluation and Research, 2001).

PARTIE II :
TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V : CHIMIE ANALYTIQUE ET DIFFICULTES METROLOGIQUES DES NONYLPHENOLS EN SANTE-ENVIRONNEMENTALE

Résumé

Depuis ces dernières décennies, l'évolution des risques environnementaux et de leurs répercussions sur la santé ont fait apparaître un champ de recherche scientifique en santé environnementale dans lequel la transdisciplinarité est intrinsèque au sujet. Cet article illustre, dans le cas des nonylphénols, comment les échanges et transferts de connaissances entre chimistes, biologistes, pharmaciens et médecins permettent de comprendre la nécessité de faire évoluer des méthodologies analytiques. Les difficultés soulevées pour le choix d'une substance de référence dans le cas d'une analyse des nonylphénols (multiplicité des isomères, variabilité dans la composition des lots pour un même N° de CAS) sont exposées. En conséquence l'utilisation du 353NP (CAS 186825-36-5) est proposée et discutée comme substance de référence du fait de sa forte proportion dans le mélange industriel ainsi que de son important pouvoir œstrogénique.

ANALYTICAL CHEMISTRY AND METROLOGICAL ISSUES RELATED TO NONYLPHENOLS IN ENVIRONMENTAL HEALTH

Sylvie Rabouan¹, Antoine Dupuis^{1,2}, Axelle Cariot^{1,2}, Marion Albouy-Llaty^{1,2}, Bernard Legube³, Virginie Migeot^{1,2}

¹University de Poitiers, CNRS-UMR 7285 IC2MP, Faculté de Médecine et Pharmacie (Departments of Analytical Chemistry, Pharmaceutics and Epidemiology), 6 rue de la Milétrie, 86034 Poitiers Cedex, France

²CHU de Poitiers, Biology-Pharmacy-Public Health Pole, 2 rue de la Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France

³Université de Poitiers, CNRS-UMR 7285 IC2MP, Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs, 1 rue Marcel Doré, 86022 Poitiers Cedex, France

Trends in Analytical Chemistry, 2012, 37: 112-123

ABSTRACT

In recent decades, the development of environmental risks and their repercussions on health has led to environmental health being a field of scientific research in which interdisciplinarity is intrinsic. This article on nonylphenols (NP) shows how exchanges and knowledge transfer involving chemists, biologists, pharmacists and physicians underscore the need to further the development of analytical methodologies. We spell out the difficulties encountered when selecting a reference material for the analysis of NP (i.e. multiplicity of isomers, and variability in the composition of batches for the same CAS Registry Number). As a result, we propose 353NP (CAS 186825-36-5) as the reference material (because of its high proportion in the industrial mixture and its pronounced estrogenic power).

Keywords: 353NP; Environment; Estrogenic power; Exposure; Health; Nonylphenol; Reference material; Risk; Standard; Water

V.1. INTRODUCTION

High-level official recognition of the influence of the environment on public health was accorded in 1994 at the Helsinki conference organized by the European office of the World Health Organization. A charter on environment and health was drawn up by the members. It describes rights and obligations of people, governments and other actors involved. It also

formulates fundamental principles of general public interest and announces strategic elements and action priorities [1]. The European Environment and Health Strategy integrates information on the state of the environment, the ecosystem and human health, in order to render assessment of the overall environmental impact on human health more efficient. The main thrust of the strategy is to fill the knowledge gap on the link between environment and health, in a first phase focusing on a number of priority adverse health effects, including the endocrine-disruptive effects [2]. Based on human health data, 42 substances were listed as Category 1, including nonylphenols (NP) [3], which are continuously introduced into the aquatic environment by means of industrial, agricultural and municipal effluents. NP are found throughout the environment, particularly in water resources [4]. NP are of major concern to environmental public health due to their high potential for human exposure and their demonstrated toxicity. In animals, NP induce reproductive and developmental toxicity involving feminization, a decrease in male fertility and juvenile survival, malformation during embryo development, adverse effects on organ structure and weight, a decrease in embryonic survival and insufficient body growth [4,5].

From an environmental standpoint, the consequences of exposure to physical, chemical and biological aggressors are multiple and generally long-term, while the number of persons exposed is often exceedingly high. Moreover, the circumstances and the duration of exposure, be they in natural, domestic or professional environments, are hard to quantify. As a result, decision-makers are often compelled to take measures in situations characterized for the most part by the pervasive uncertainty of scientists. The consequences of their decisions may involve high economic stakes and raise questions of social acceptableness going above and beyond their strictly sanitary effects. The frame of reference existing at an international level is aimed at organizing scientific knowledge and bringing it to bear with regard to public decisions. In this respect, risk assessment (science-based) is clearly distinguished from risk management (policy-based) [6,7].

Classically, a risk-assessment approach comprises four distinct steps: (1) hazard identification; (2) definition of dose-response relationships; (3) population-exposure assessment; (4) characterization of the sanitary risks. Step (3) is the subject matter of a methodology known as exposure science, and its objective in real-life situations is to identify and to characterize contact with toxic agents and their penetration into an organism. Unlike toxicology, it is based upon field observations. For that reason alone, exposure assessment is

of great interest [8,9]. Human biomonitoring or biosurveillance is one component of exposure science, which revolves around analysis of environmental pollutants, or their metabolites, in the biological environment of the individuals involved [10–12].

With respect to NP, hazard identification has been established [13,14] and the definition of dose-response relationships is known in the animal through toxicological studies [13–16]. As for assessment of population exposure to NP, exposure science performs analyses of the pollutants in the environment of the individuals being studied and also carries out biomonitoring, which necessitates an appropriate choice of not only the biological sample (e.g., blood, urine, fat, or maternal milk), but also the molecule or metabolite involved. More generally speaking, when choosing, it is necessary to ensure that the risk-assessment approach maintains methodological continuity with regard to the contaminant in both natural and human biological environments, and thereby allows the data to contribute to the characterization of sanitary risks [Step (4)] through epidemiological studies.

The key aim of this article is to focus the scientist's attention on the analytical chemistry and metrological issues related to NP. First, we spell out the difficulties encountered when selecting a substance of reference for the analysis of NP, then propose 353NP (CAS 186825-36-5) as the substance of reference, and, finally, discuss this choice, in a case where the objective of assessing the presence of the NP in the environment so as to evaluate the quality of natural environments is transformed into the objective of evaluating human exposure to the selfsame NP.

V.2. GENERALITIES ON NONYLPHENOL ANALYSIS

VI.2.a. The nonylphenols present in the environment [4,14,17]

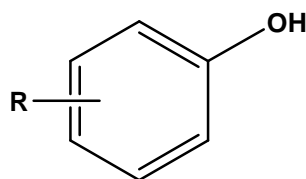
NP ethoxylate (NPE) derivatives are one sub-set of a general group of compounds known under the name of alkylphenol ethoxylates. NPE are mass-produced chemical compounds. In Europe in 2002, as the result of the ethoxylation of NP with ethylene oxide, NP production neighbored 73,500 tons. The most widely utilized alkylphenols are 4-tert-octylphenol (OP, CAS 140-66-9) and 4-NPs (NPs, CAS 84852-15-3). For more than 40 years, NPE have been used as detergents, emulsifiers, wetting agents and dispersing agents, and they are found in a large, wide-ranging number of fields (e.g., textile transformation, pulp and paper treatment, paints, resins for protective coating, recovery of gas and petrol, manufacture of steel, anti-parasite products and energy production). They are also found in a wide array of

consumer products, including cosmetics, cleaning products and paint. Lastly, NP can be used as adjuvants (antioxidants and softeners) in the manufacture of plastics (e.g., epoxy resins and PVC). There are also NPE transformation products, formed by means of microorganisms in the environment.

There exist no known natural sources of NP and NPE. The presence of these substances in the environment results solely from human activity. Release of NP and NPE into the environment may occur at different steps and stages of product life cycles, during primary NPE production, manufacture of products containing NPE and NP, utilization of the products and their elimination in wastewater-treatment facilities, septic tanks, town or factory landfill, or simply in the natural environment.

V.2.b. Naming nonylphenols

In general, the name NP specifies neither the location nor the isomer of the nonyl radical (R), of which the general formula is as follows:



Industrial NP are manufactured via Friedel–Crafts alkylation of phenol with technical nonene (“propylenetrimer”: C₉-olefins with varying degrees of branching). Due to the formation of carbocations during the acidcatalyzed process, the resulting NP mixture is highly complex, mostly containing para-substituted isomers with differently branched nonyl side chains [18,19]. The approximate composition of the technical mixture is: 3–6% o-NP, 90–93% p-NP and 2–5% decylphenol [20]. Besides, approximately 50–80 NP, with 550 possible isomers, are found in biological and other environmentally relevant matrices [21].

There exist numerous CAS numbers for the NP named, and the list in Table 1 is limited to the names pertaining to NP in para or predominantly para substitution – or to 4-NP – since they are relevant to environmental issues. Table 1 was drawn from the Sigma-Aldrich 2011 catalogue (sigma-aldrich.com), the French Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) [13], the Internet site of the Canadian Government [22], and the relevant ISO standards. In this article, we are not dealing with CAS 11066-49-2 (predominantly ortho substitution of the nonyl chain) or CAS 139-84-4 (predominantly meta substitution of the

nonyl chain). Until 2009, references CAS 186825-39-8 and CAS 186825-36-5 were not commercially available in any catalog (regardless of the supplier). The study described below was carried out with a locally synthesized substance of reference 353NP (CAS 186825-36-5) (cf. sub-Section V.3.a. Material and methods, page 72).

Table 1 : Liste of names and CAS numbers of the different para-nonylphenols, drawn from Sigma-Aldrich catalogs 2011, INRS, the Canadian Government Internet site, and ISO standards

<i>CAS Nr</i>	<i>Usual name</i>	<i>Description</i>
104-40-5	4-nonylphenol 4- <i>n</i> -nonylphenol <i>p</i> -nonylphenol	Linear radical
84852-15-3	branched 4-nonylphenol	In para substitution, but as an isomer mixture with ramified radical (without linear radical) for Sigma-Aldrich 90% minimum in position 4 with mention of substitution isomers on the cycle.
25154-52-3	nonylphenol	Isomer mixture according to INRS FT249 and ISO 18857-2 :2009 mixture of substitution isomers on the cycle of the linear nonyl radical. according to ISO 24293:2009 isomer mixture in para substitution for the ramified nonyl radical.
90481-04-2	branched nonylphenol	Ramified radical (in isomer mixture), and mixture of substitution isomers on the cycle
26543-97-5	<i>p</i> -isononylphenol	Isononyl radical in para substitution
87247-00-5	<i>p</i> -tripropylphenol	Tripropylene radical in para substitution
186825-39-8	3E2-nonylphenol	4-(2-ethyl-1-methylhexyl)phenol Available in catalog since 2009
186825-36-5	353-nonylphenol	4-(1-ethyl-1,3-dimethylpentyl)phenol Available in catalog since 2009

This recapitulative list underlines how much it matters that the user of NP pays particular attention to the exact product he wishes to employ. On this score, standard ISO18857-2:2009 explicitly mentions the fact that “CAS numbers 104-40-5 (4-NP, straight chain) and 25154-52-3 (NP, straight chain) have also been incorrectly used to denote the isomer mixture CAS 84852-15-3”. The relevant standard indicates that “the commercially produced NP are predominantly 4-NP with a varied and undefined degree of branching in the alkyl groups. This mixture of isomers falls under the CAS number 84852-15-3”. Issued the same year, standard ISO24293:2009 nonetheless describes the substance of reference to be

used with regard to the concentration of 13 NP isomers corresponding to substitution isomers on the nonyl chain, which is itself in para substitution with regard to the phenol cycle and should be a product designated by the CAS number 25154-52-3 and described as a ‘‘technical mixture of isomers’’ (paragraph 4.8, page 3 of the document [24]). Given this apparent contradiction, we have created chromatographic imprints by GCMS laboratory analysis of each one of the two products: (1) CAS 25154-52-3 (batch N° 50720, supplier DrEhrenstorfer, ref C15629000); and, (2) CAS 84852-15-3 (batch N° 1092230, supplier Fluka, ref 74430). In our analysis, CAS product 84852-15-3 (in para substitution) corresponded to around 75% of CAS product 25154-52-3. It would consequently seem to be the case that the technical mixture with CAS number 25154-52-3 is indeed a mixture of substitution isomers on the cycle and on the chain, and not simply (Table 1) a mixture of molecules with linear radicals (as substitution isomers on the cycle). Conversely, CAS number 84852-15-3 presents a small percentage of substitution isomers on the cycle (other than in para substitution), as mentioned in the Sigma-Aldrich analysis reports: 90% minimum of ramified nonyl chain in position 4; in the impurities, substitution isomers on the cycle are once again reported, along with 0.2% of free phenol and to 3–4% of dinonylphenol. This observation corroborates the fact that industrial manufacture has not totally mastered the reproducibility of the batches, which are indeed complex and relatively variable according to the manufacturer and the batch number [25]. Moreover, in GCMS laboratory analysis, the presence of 4*n*NP (linear radical, CAS 104-40-5) was sought but not found in the two products, a finding signifying concentrations below 5% for CAS 25154-52-3 and CAS 84852-15-3.

It bears mentioning that, in metrology in chemistry, the material (chemical substance) of reference must be of well-known and clearly-defined composition, and we have just observed that for NP:

- (1) the degree of purity of the products with regard to their description is variable;
- (2) it can be found out by examining the analysis report;
- (3) all the isomers of the mixture are not necessarily subjected to dosage during the control.

V.2.c. References for nonylphenols

The latest advances in monitoring chemical pollutants to assess water-quality status in accordance with the Water Framework Directive (WFD) and the attendant challenges were thoroughly reviewed in 2009 [26], and are listed in the Directive 2008/105/EC [27]. In the

case of NP, the common position adopted by the European Parliament and the Council on 16 December 2008, on Environmental Quality Standards (EQSs) in the field of water policy and in amending Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and 2000/60/EC, was to propose CAS 104-40-5 (4nNP) as EQS (<0.3 µg/L when expressed as an annual average value, or <2 µg/L when expressed as a maximum allowable concentration) with the mention that “Unless otherwise specified, it applies to the total concentration of all isomers”, even though the recommended standard method ISO 18857-2 [28] postulates CAS 84852-15-3 as the material of reference, whereas ISO 24293 [24] postulates CAS 25154-52-3. In the case of France and as a response to the questions put forward by the Agences de l’Eau (the French public establishments entrusted with implementing the WFD) concerning the CAS N° to be used, in December 2010 the Institut National de l’Environnement Industriel et des Risques recommended for use as a standard a substance internally codified by the Service d’Administration National des Données et Référentiels sur l’Eau (SANDRE 6598) and containing NP CAS 84852-15-3, CAS 25154-52-3 and CAS 104-40-5 [29].

Tables 2 and 3 list the different methods and substances used as references for the determination of NP in water and in complex matrices other than water, drawn from scientific literature published between 2002 and 2011. They show that the measurement benchmarks to be used may differ according to the studies in two significant respects:

- (1) designation of the NP with no indication of the CAS N°; or,
- (2) non-standardized expressions of results [i.e. variability with regard to the substance of reference (CAS N°) or to the means of calculation (with or without internal standard)].

As for dosage in an aqueous environmental sample, Table 2 illustrates the wide variety of calculation methods and substances selected as materials of reference, notwithstanding the harmonization texts established in 2006 with ISO standard 18857-1 (Water quality: Dosage of selected alkylphenols, part 1 published in 2006, updated in 2009) and then the ISO standard 24293 (Water quality: Determination of individual isomers of NP, published in 2009).

We consider the choice of substance of reference later in this article, particularly in the Discussion (Section 4).

Table 2: The different reference nonylphénols used in the literature (examples) for assays in water (environment and drinking water)

<i>Ref. (year)</i>	<i>Technique</i>	<i>Nonylphenol of reference as mentioned in the publication</i>	<i>Supplier</i>	<i>Method with internal standard</i>
^a (2002)	GC/MS	CAS 25154-52-3	not mentioned	Absent
^b (2005)	Not indicated	CAS 25152-52-3 CAS 104-40-5	not relevant	
^c (2005)	GC/MS	4- nonylphenol	Sigma-Aldrich	Bisphenol A-d16
^d (2005)	HPLC/(ESI)MS	Technical grade 4-nonylphenol	Aldrich	4-heptylphenol (aldrich)
^e (2006)				
^f (2006)	GC/MS AFNOR – Europe ISO 18857-1	CAS 84852-15-3	Not relevant	4- <i>n</i> -nonylphenol (ring- ¹³ C ₆) or 4- <i>n</i> -nonylphenol (CAS 104-40-5) if absent from the sample to be dosed
^g (2006)	GC/MS	Technical 4-nonylphenol (NP)	Riedel de Haen	4- <i>n</i> -nonylphenol (CAS104-40-5; Riedel de Haen)
^h (2007)	HPLC (Fluo)	4-nonylphenol	Lancaster	4- <i>n</i> -nonylphenol (CAS104-40-5 ; Riedel de Haen)
ⁱ (2007)	HPLC/ (ESI)MS/MS	4-nonylphenol CAS 84852-15-3	Aldrich	4- <i>n</i> -nonylphenol d8 (Dr Ehrenstorfer)
^j (2008)	HPLC/ (ESI)MS/MS	4- <i>n</i> -nonylphénol	CIL Cluzeaux	absent
^k (2008)	Laboratory (included 7) intercomparison study GC/MS without derivatization or GC/MS with derivatization or LC/MS/MS or HPLC (Fluo)	4-nonylphenol CAS 84852-15-3	Not mentioned	4- <i>n</i> -nonylphenol d8 or 4- <i>n</i> -nonylphenol d6 or 4-bromophenol or atrazine d5 or without internal standard

^l (Stottmeister <i>et al.</i> , 2009)(2009)	Interlaboratory trial (included 14) according to ISO 18857-2 GC/MS with derivatization	NP	Sasol	4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol (ring-13C6) Abbrev.: 363 NP-13C6
^m (ISO18857-2:2009(E), 2009) (2009)	GC/MS ISO 18857-2	CAS 84852-15-3	not relevant	4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol (ring-13C6) Abbrev.: 363 NP-13C6
ⁿ (ISO24293:2009(E), 2009) (2009)	GC/MS ISO 24293-1	CAS 25154-52-3	not relevant	4- <i>n</i> -nonylphenol (ring- ¹³ C ₆)
^o (Loos <i>et al.</i> , 2010) (2010)	HPLC/ (ESI)MS/MS	Nonylphenol CAS 84852-15-3	not mentioned	4- <i>n</i> -nonylphenol d8 (Dr Ehrenstorfer)
^p (2010)	VALLME/HPLC (Fluo) ((VALLME=Vortex Assisted Liquid-Liquid MicroExtraction)	Nonylphenol	Riedel de Haen pestanal®	absent
^q (Lin <i>et al.</i> , 2011) (2011)	LLLME/HPLC (Fluo) (LLLME=Liquid-Liquid-Liquid MicroExtraction)	4- <i>n</i> -nonylphenol	Alfa Aesar Johnson Matthey	absent
^r (Jardim <i>et al.</i> , 2011) (2011)	LC/MS/MS	4- <i>n</i> -nonylphenol	Supelco	absent
^s (2011)	GC/MS	NP	Fluka	<i>n</i> NP

^a Kolpin *et al.* Environ Sci Technol. 36 (2002) 1202. ^b French Ministry of Ecology, Water Framework Directive, Chemical and Ecological Status of Water in France ^c Wang *et al.* Anal Bioanal Chem. 383 (2005) 857. ^d Cespedes *et al.* Chemosphere. 61 (2005) 1710. ^e Cespedes *et al.* Anal Bioanal Chem. 385 (2006) 992. ^f ISO18857-1:2006 ^g Voutsas, P. Hartmann, C. Schaffner, W. Giger *et al.* Environ Sci Pollut Res Int. 13 (2006) 333. ^h Ghanem *et al.* Chemosphere. 69 (2007) 1368. ⁱ Loos *et al.* Chemosphere. 66 (2007) 690. ^j Stavrakakis *et al.* Environ Technol. 29 (2008) 279. ^k Loos *et al.* Trends in Analytical Chemistry. 27 (2008) 89. ^l Stottmeister *et al.* Analytical Chemistry. 81 (2009) 6765. ^m ISO18857-2:2009(E) ⁿ ISO24293:2009(E) ^o Loos *et al.* Water Res. 44 (2010) 2325. ^p Yiantzi *et al.* Talanta. 80 (2010) 2057. ^q Lin *et al.* Journal of Separation Science. 34 (2011) 428. ^r Jardim *et al.* Separation and Purification Technology. *in press* (2011) ^s Amiridou *et al.* J Hazard Mater. 185 (2011) 1. 281.

Table 3: The different nonylphenols of reference used in the literature (examples) for assays in complex matrices other than water

<i>Ref. (year)</i>	<i>Matrix</i>	<i>Technique</i>	<i>Nonylphenol of reference mentioned in the publication</i>	<i>Supplier</i>	<i>Method with internal standard/Quality control (QC)</i>
^a (2005)	urine	GC/MS	4-n-NP (linear)	absent	Isotope (name not indicated)/QC
^b (2007)	eggs and milk	LC/MS/MS	4-n-NP technical purity NP	Tokyo Kasei Kogyo	absent
^c (2008)	breast milk	GC/MS	nonylphenol	ChemService	Dodecylbenzene
^d (2009)	soil	TD/GC/MS	4-nonylphenol (technical mix)	Aldrich	absent
^e (2009) ^f (2010)	breast milk and milk	GC/MS	4-nonylphenols technical grade	Aldrich	cumylphenol
^g (2011)	powdered milk	HPLC/MS/MS	NP	Aldrich	absent

^a Calafat *et al.* Environ Health Perspect. 113 (2005) 391. ^b Shao *et al.* J Chromatogr B. 850 (2007) 412. ^c Ademollo *et al.* Environ Int. 34 (2008) 984. ^d Llorca-Porcel *et al.* Journal of Chromatography A. 1216 (2009) 5955. ^e Lin *et al.* Food Chemistry. 114 (2009) 753. ^f Chen *et al.* Food and Chemical Toxicology. 48 (2010) 1939. ^g Ferrer *et al.* Food Chemistry. 126 (2011) 360.

V.3. ANALYSIS OF 353NP IN THE ENVIRONMENT

V.3.a. Materials and methods

Commercial chemicals and reagents. Methanol, hexane, acetone, ethyl acetate, and dichloromethane of high analytical grade (Pestipur) quality were purchased from SDS (Peypin, France). Sodium thiosulfate, internal standard 4n-NP-2,3,5,6-D4, was purchased from Sigma-Aldrich, Inc. Water was pre-treated by a Purelab Prima and then purified by a Purelab classic (ELGA, Antony, France). Nitrogen alphas-1 was purchased from Air Liquide (Paris, France). 4-NP (diastereomer mixture of 4-(3,5-dimethylheptan-3-yl)phenol named 353NP) was custom synthesized by @rtMolecule (Poitiers, France). Purity was superior to 98%, and the ratio of diastereomer mixture synthesized in the present study was 353NP(E):353NP(G) = 45:55 (according to the nomenclature proposed by Katase [25]).

Water samples. Inflow and effluent water (IW and EW) samples were collected from the eight municipal drinking water-treatment plants (DWTPs) located in the French Poitou-Charentes region (n=16). Sampling was performed on three different days and samples were pooled before analysis. IW samples were directly collected at the river surface above the

DWTP and EW samples were collected at the outlet pipes of the DWTP. EW samples were stored with the addition of a reducer (5 mg of sodium thiosulfate/250 mL) in order to stop chlorination of target compounds, and all samples were kept frozen at -20°C until analysis.

Preparation of standard solutions. A 200 mg.L⁻¹ methanol stock solution of 353NP was stored at +4°C. Extemporaneously, the initial stock solutions were diluted in methanol/water 50/50 (v/v) in order to obtain working standard solutions at 2, 4, 8, 20 and 40 µg.L⁻¹ (MeOH-standard). Internal standard solution was prepared in methanol/water 50/50 (v/v) at 20 µg.L⁻¹ from initial stock solution (200 mg.L⁻¹).

Solid-phase extraction. Prior to the extraction, 1.25 mL of methanol and 100 µL of the internal standard solution (50 µg.L⁻¹) were added to an aliquot of 250 mL of water sample. Water samples were extracted by means of solid phase extraction (SPE). The SPE procedure for clean-up and concentration of water samples was performed using a glass C18 upticlean end-capped cartridge 200 mg (Interchim, Montluc, on, France). Cartridges were conditioned with 4 mL of dichloromethane/ hexane (50/50) and twice with 3 mL of methanol/acetone/ ethyl acetate (2/2/1) (v/v/v) and then equilibrated with 5 mL of purified water. Water samples (250 mL) were passed through the wet cartridges, washed with 5 mL of purified water and dried for 15 min. For all of these different steps, flow rate was set at 10 mL.min⁻¹. Elution was performed with a mixture of hexane/dichloromethane 50/50 (v/v) (2 x 2 mL) along with a mixture of methanol/acetone/ethyl acetate 2/2/1 (v/v/v) (2 x 2 mL) at a flow rate of 2 mL.min⁻¹. Extracts were evaporated at 40°C to dryness under a gentle nitrogen stream. Residues were dissolved in 250 µL of a purified water/methanol (50/50) solution. Finally, 25 µL of extract were injected into a LC/MS/MS apparatus.

LC/MS/MS analysis. Concentration of 353NP was determined using an LC/MS/MS system consisting of an HPLC ultimate 3000 (DIONEX, Sunnyvale, USA) coupled to an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). The HPLC column was a supercosil ABZ 5 (3 µm particle size, 150 mm x 4.6 mm) (Supelco, St Louis, USA). Mobile-phase composition was methanol/water 85/15 (v/v), using an isocratic solvent program. The MS/MS was equipped with an atmospheric pressure chemical-ionization (APCI) interface, operating in negative-ionization mode. Quantitative analysis was carried out in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, using two specific combinations of a precursor-product-ion transition for each compound. Retention times and precursor-product transitions along with their corresponding collision energies are shown in Table 4.

MS/MS detector conditions were set as follows: ion-source gas 150 psig; probe temperature 550°C; curtain gas 20 psig; collision gas 9 psig, entrance potential -5.0 V, nebulizer current - 1.

Table 4. MS/MS parameters

<i>Compound</i>	<i>Retention time (min)</i>	<i>MRM(m/z)</i>	<i>Declustering potential (V)</i>	<i>Collision energy (V)</i>	<i>Collision cell exit potential (V)</i>	<i>Dwell time (ms)</i>
353NP	4.45	219-133	-70	-35	-20	40
(E+G)		219-147	-70	-26	-11	40
4nNPD4	6.05	223-110	-80	-40	-30	40

Method validation. 353NP contamination may arise from laboratory accessories, reagent, SPE procedures and apparatus. In order to avoid such contamination, only pre-treated glassware (500°C, 5 h), Teflon seals and high-quality solvent were used throughout the study. Two kinds of blanks were performed. The first blank involved purified water with sodium-thiosulfate addition as the sample-loading step on which the SPE procedure was carried out; the second blank was obtained using an SPE procedure without the sample loading step. Linearity of the chromatographic response was assessed on three different days using standard curves including five calibration points in the range 2–40 ng.L⁻¹. Recovery (R) was determined by analysis of n river water samples (exempt from target compounds) spiked at two different concentrations (20 ng.L⁻¹ and 40 ng.L⁻¹) with 353NP (n = 10) and 4nNPD4 (n = 7). The recovery value included matrix effect and losses during SPE. The limit of detection (mLOD) and the limit of quantification (mLOQ) of the method were calculated, respectively, as three times and 10 times the signal-to-noise (S/N) ratio in blanks, corrected with the recovery. Intra-day and inter-day coefficients of variation were calculated for 20 ng.L⁻¹. Sample concentrations were determined using the corresponding MeOH-standard curve calibration and corrected by the recoveries. The intra-day coefficient of variation was obtained with five replicates of quality control (QC) sample at 20 ng.L⁻¹. The inter-day coefficient of variation was obtained from experiments performed on three separate days with two replicates of QC sample at the same concentration. Accuracy was assessed by measuring the ratio between calculated (C_{water}) and theoretical values.

V.3.b. Results

Method validation. 353NP was detected in blank extracts but at a level lower than the mLOQ. Regardless of whether purified water was loaded prior to SPE procedure, the results were similar. Moreover, no trace of 353NP was detected following direct injection of solvents. A small degree of contamination appeared as the extraction technique was being applied, and it was taken into account as we calculated the results. Recoveries for 353NP and 4nNPD4 were respectively 49% (RSD 19%) and 35% (RSD 58%). Calibration curves of 353NP provided adequate linearity, as shown by correlation coefficients greater than 0.99. The method provided mLOD and mLOQ values of 1.4 ng.L⁻¹ and 4.1 ng.L⁻¹, respectively, for 353NP. Intra-day and inter-day variation obtained from QC of the 20 ng.L⁻¹ of 353NP were, respectively, 5.6% (n = 5) and 14.9% (n = 6), while accuracies were 98.3% and 89.2%, respectively, in intra-day or inter-day analyses.

Water-sample analysis. Appropriate internal QC were considered so as to evaluate the validity of the optimized analytical procedure and to check that no outliers occurred during routine analysis sequences. Signal specificity was systematically checked by comparison of each retention time and fragmentation ratio with the corresponding standard. Calibration curves were also regularly checked for linearity ($r^2 \geq 0.99$). Moreover, quantification of QC (20 ng.mL⁻¹) was regularly performed during DWTP water-sample analysis (bias 611.0%, RSD 17.0%). 353NP was detected in concentrations in the range 13.5–124.9 ng.L⁻¹ in the IW and from <mLOD–59.4 ng.L⁻¹ in the EW (Fig. 1).

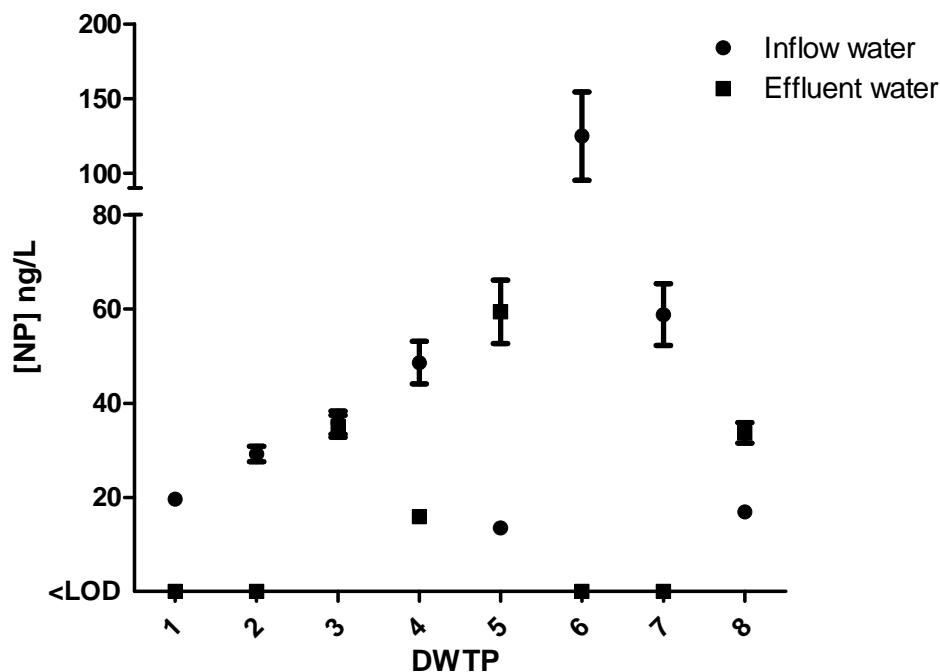


Figure 1. ^{353}NP concentration in water (inflow and effluent of eight drinking-water-treatment plants).

V.4. DISCUSSION

Analytical chemistry is a discipline whose key objective does not lie in the mere application of methods producing a numerical figure in exchange for an experimental sample [30]. Quite to the contrary, it plays an instrumental role in decision-making with regard to problems as wide-ranging and vital as medical diagnosis, QC for industrial products, protection of the environment, and environmental epidemiology. After all, risk characterization as defined by the National Research Council [7] is continually enhanced by studies emanating from research in three areas where measurement matters: the field, toxicology, and epidemiology. By basing presentations on analytical chemistry methodology in the form of a triad bringing together (a) the problem to be resolved, (b) how the problem is framed, and (c) the chemical information to be obtained [30], the issues in environmental health pertaining to NP may be understood as follows:

- (a) in learning whether or not there are endocrine-disruptive effects to be observed in humans provoked by the NP present in the environment;
- (b) to consider that ^{353}NP is the NP isomer liable to be largely responsible for endocrine disruption, because it is largely present in the environment; and,

(c) to perform 353NP analysis in environmental water and biomonitoring.

Since NP in the environment involve more than 100 substitution isomers [21], exhaustive analysis of these is hardly realistic. And when the final objective involves studying the endocrine-disruptive effects that may or may not be attributed to these molecules, the first priority is to decide on the molecule to be found in the environment and a biological sample. The choice of the right molecule is contingent on the model, which is tantamount to the way the problem is framed. The model is a tool designed to detect the NP isomer bearing the brunt of responsibility for endocrine-disruptive effects. Researchers have got to define this NP isomer, a hormonally active agent otherwise known as an endocrine disruptor, which predominates in technical NP mixtures and is found in the environment and biological samples. We set out the arguments in favor of the 353NP molecule (CAS 186825-36-5) in the following paragraphs, in which we respectively discuss the chromatographic separation and MS detection of NP, and the consequences of the modified objectives of NP analysis in the framework of environmental health on the NP-analysis benchmark reference. Lastly, we explain the final selection, along with the analytical procedure.

Chromatographic separation and MS detection. Due to the similarities of the chemical and physical properties of the many NP isomers, complete separation and identification of individual isomers remains quite difficult, if not altogether impossible. Routine analysis using gas chromatography (GC) with an apolar capillary column yields separation of 13 p-NP isomers, which comprise more than 90% of the 4-NP isomers that are detectable in technical products and environmental samples in general [24,31]. One may note that no single 4nNP molecule appears in these technical mixtures (concentration below the mLOD). Much recent research has been focused on the application of highly sophisticated coupling systems to the isomer-specific determinations of NP. For example, the coupling of twodimensional GC and mass spectrometry (GCxGC/MS) has led to the identification of 80–110 different isomers in technical NP from different manufacturers [21,32,33]. It should also be noted that there exist 211 possible constitutional isomers of p-NP out of a total of 550 possible compounds, taking into consideration the chiral C-atoms [18,21]. The composition of isomers in the proposed reference varies according to the batch numbers, and their fragmentation fails to yield the same fragments [19], so it becomes downright impossible to quantify with regard to the technical mixture, which consequently cannot function as a reference. In the overall context of the WFD, the reliability [QC/quality assurance (QA)] and comparability of the analytical data

gathered in a given environment are of paramount importance, as they lead to enhanced demonstration of the correspondence of the ensuing measurements to the established references [34], as occurred in 2009 for the ISO 18857-2 protocol, with the participation of 14 laboratories from four different countries in Europe and Canada [35]. The first approach (ISO protocol 18857-1:2006) adopted by the research community and the international measurement organizations is to proceed by GC/MS with regard to the sum of the isomer-peak areas: particular attention must be paid to substances that coelute with NP and yield the same ion(s) because the coelution can interfere in the determination and exert substantial influence on the final result. ISO protocol 18857-2:2009 (with CAS 84852-15-3 as the standard) is aimed at ensuring that interfering peaks are excluded from the sum of the areas, and limits inclusion to the peaks from the sample attributable to the multi-component analyte [28]. The second approach by GC/MS is proposed in ISO protocol 24293:2009 (with CAS 25154-52-3 as the standard), and it involves in quantifying specific isomers identified by their retention time along with two selected diagnostic ions; the specificity of the signal used must be verified. The two choices are both satisfactory in terms of the objective of analysis proper to the ISO standards, which is to quantify NP in the environment [35]. But when the objective of a study is to assess sanitary risk by means of biomonitoring (assays in biological samples) and environmental analysis (water) in order to study their correlation, these two methods of analysis are no longer suitable, for reasons to be explained later.

The final objective of the study. Using the preceding benchmarks, the sum of the signals recorded in the samples for the sought-after analytes is compared to the sum of the signals emanating from the mixture of reference and expressed in terms of concentration with regard to the substance of reference. If the proportions of the different isomers are the same in the samples of reference as in the unknown quantities, this mode of calculation engenders practically no evaluation error in determination of the NP content (in the form of a mixture). In reality, all relevant findings lead us to believe that the relative proportions of the different isomers to be found in unknown biological samples are bound to differ from those to be found in a reference mixture, which corresponds to the raw material utilized in industry . . . and to the source of biological sample contamination! Three separate arguments lead to the same conclusion, as follows.

(1) The relative proportions of the different NP isomers vary from one manufactured batch to another, which means that the substance of reference is not the same when the batch number has been modified (between two different manufacturers or even the same manufacturer).

(2) How each of these different isomers evolves in the environment cannot be known. All the literature tells us is that (2.1) NP would certainly appear to be the main product of degradation of NP ethoxylates; (2.2) does not undergo further transformation; and, (2.3) is strongly adsorbed onto the sludge solids [4]. As for the pattern of relative of NP-isomer concentrations, it has been found to vary from one environmental sample to the next [36,37]. The proportion of isomers in the environmental sample subjected to analysis will inevitably differ from the proportion in the substance of reference.

(3) The same goes for the proportions of the isomers in the biological samples subjected to analysis. No data in conjunction with bioconcentration for isomers such as “partition coefficient” (K_{OW}) are presently available. The rare published studies on the subject indicate nothing other than $\log K_{OW}$ for the technical NP mixtures [38,39], and in a study on 353NP bioconcentration, it is pointed out that “a correlation between the metabolism and the K_{OW} seems to be unlikely, and that two mechanisms triggering the bioconcentration (partitioning between two phases and biotransformation)” can be distinguished from each other and “described both mechanisms with a simple weight-dependent bioconcentration model” [40]. Another study mentions considerable algal bioaccumulation, but the material & methods section does not indicate the CAS N° used in NP [41].

To sum up, if the scientific community wishes to pose as an objective the comparison of studies seeking to draw a connection between environmental NP content and human-impregnation levels, it is necessary to use the same substance of reference for environmental analyses and biomonitoring. In absence of this condition, comparative studies are pointless, and information with regard to exposure science will remain limited.

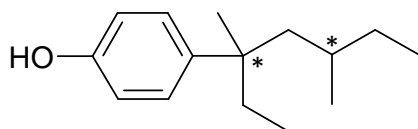
Selection. It is consequently necessary to seek a reference NP, present in the environment per se and in the biological environment, comprising a substance defined by its chemical formula and of known purity, in order to express the results in terms of a precisely defined molecule. In Table 1, CAS 84852-15-3, CAS 25154-58-3 and CAS 90481-04-2 are isomer mixtures and cannot be selected, nor can CAS 26543-97-5, CAS 87247-00-5 or CAS 104-40-5, which are indeed single substances, but have not been employed industrially in the production of ethoxylated NP, and are consequently of no relevance to studies of the

environment or environmental health. Moreover, the 4*n*NP isomer (linear radical, CAS N° 104-40-5) is not detectable (<5%) in the technical NP mixtures used for industrial purposes, and research in surface water and drinking water ([42–44]) shows that the compound is absent or minimally present (<mLOQ), as is the case with concentrations in urine [45].

The substance of reference liable to be selected will be one of the branched isomers of the technical mixture used by industry (CAS n_ 84852-15-3). Which one? Along with analytical development aimed at quantifying NP in the technical mixture, numerous researchers have studied the estrogenic power of the main isomers contained in industrial mixtures [25,46–50], specifically in 353NP [47,51,52]. Since isomer 3E2NP (CAS 186825-39-8, Table 1) is not one of the isomers studied by the authors consulted while this article was being written, it will not be taken into account. On the contrary, if the 353NP para-NP molecule (CAS 186825-36-5) has been selected as a reference in this work of ours, it is for the following reasons:

- (1) it represents 12–20% of the isomer mixture CAS 84852-15-3, and, through the MVLN test, the 353NP molecule significantly contributes to the estrogenic effect with regard to CAS 84852-15-3;
- (2) the 3E2NP para-NP molecule, which presents the most pronounced estrogenic power through the YES test, represents only 4–6% of the CAS 84852-15-3 mixture; and,
- (3) 353NP has been shown to be present in living organisms using a radiolabeled NP isomer to investigate the bioconcentration in *Daphnia magna* [40].

The 353NP nomenclature corresponds to 4-(1-ethyl-1,3-dimethyl-pentyl)-phenol. It contains two asymmetrical carbons and is presented in the form of a diastereomeric mixture of 353NP(E) and 353NP(G) (according to the nomenclature proposed by Katase [25]):



Using the nomenclature proposed by Guenther, this is molecule 111, as described in the Electronic Supplementary Material [21].

Our analytical procedure. In the work presented in this article, we attempted to detect the presence of 353NP in environmental water and at the entrance to a DWTP, and we then

analyzed the water coming out of the plant. Our goal was to propose a protocol for analysis and to evaluate the presence or the absence of this molecule in the environment. High-purity solvents and glass – instead of plastics – were used and specific purification procedures were performed, but they did not avoid 353NP contamination, which was probably due to leaching effects during SPE. Other studies have also reported NP contamination in blanks [53]. In the present study, 353NP contaminations did not exceed the mLOQ, but, still, special attention needs to be paid when proceeding. During MS-parameter optimization, the negative-ionization mode produced higher signal intensity than the positive-ionization mode and a much better signal-to-noise ratio (S/N). APCI (atmospheric pressure chemical ionization) and ESI (electrospray ionization) interfaces have been compared using both a methanol solution of compound and spiked river water. The ESI interface produced higher sensitivity using methanol solution. Due to a significant matrix effect, the best results in spiked water were obtained using the APCI interface, which was consequently chosen for use in this study.

In this work, 4*n*NP-2,3,5,6-D4 was initially envisioned for use as the internal standard, based on the recommendation of 4*n*NP (ring-13C6) in the ISO24293: 2009(E), and, because the presence of 4*n*NP has been reported in environmental samples [42,44], the unlabeled 4*n*NP cannot be employed as internal standard. However, as our method was drawn up, it became obvious that the physicochemical properties of 4*n*NP-2,3,5,6-D4 differ too pronouncedly from those of 353NP to be an acceptable choice. Not only is retention time appreciably longer, (6.05 min instead of 4.45 min for 353NP), but it presents a weak and excessively variable yield of extraction (35% with RSD of 58%). Others authors [54] have also shown that the structure and the shape of this molecule with a linear alkyl chain differ markedly from the isomers in the technical mixture, especially in the response factor by GC/MS, so they have proposed a 4-NP isomer with a secondary alkyl side chain (4-(2,6-dimethylhept-3-yl)phenol) to serve as internal standard. In the same way, ISO18857-2:2009(E) recommended the 4-(3,6-dimethyl-3-heptyl) phenol (ring-13C6) as internal standard. The results described herein consequently employ external calibration as a means of calculation, but use of an isotope-labeled 353NP (deuterium or carbon-13) is recommended in order to be able to calculate by means of internal calibration. In experimental conditions, the 353NP isomer was characterized by its retention time (4.45 min, diastereomers E+G co-eluted) and the *m/z* fragmentation 219–133 and 219–147. In our water-sample analysis results, the presence of 353NP is evaluated in terms of inflow and effluence of DWTP producing from surface water. 353NP was found in all surface-water samples analyzed in this

study at a level in the range 13.5–124.9 ng/L. Similar or different results are reported in the literature, but these comparisons should be put forward with caution, given the complications that we have mentioned about the NP standard to be used [53,55–58]. Concentration decreased in most of the effluent water samples (Fig. 1, Nr 1-2-4-6-7) from 2.2% to 100%, with a median of 100%. Authors from different countries reported similar results with overall elimination in the range 73–100% [56,58,59]. However, we found more 353NP in some EW samples (than in corresponding IW), probably because our EW and IW withdrawals were carried out at the same time in the DWTP, without taking into account (water) flow time in the plant and the (unknown) fluctuations in 353NP concentrations in the IW, but it is also possible that some 353NP was released during drinking-water production and transport [60].

As a general rule, NP quantification may be carried out by 353NP analysis. However, so far, the methods used in NP analysis have failed to yield adequately distinct results, and it would consequently be preferable to select a single, clearly identified isomer.

V.5. CONCLUSION

The analytical data gathered in an environmental perspective constitute the foundations of the European water-quality assessment system, as described in the WFD. In this context, reliability (QC/QA) and comparability of measurements are of paramount importance as they lead to enhanced demonstrations of the correspondence of ensuing measurements to the established references.

In this article, we have detailed the difficulties encountered in selecting a substance of reference in the case of NP determination (multiplicity of the isomers, variability in the composition of batches for the same CAS number). What is more, the references to NP used in today's environmental analyses (CAS 84852-15-3 and CAS 25154-52-3, respectively, in conjunction with standards ISO18857-2:2009 and ISO24293:2009) are not transposable in assays of this micro-pollutant in biological samples.

Classically, a risk-assessment approach involves four basic steps or stages, including the exposure assessment, which is meant to assess population exposure to NP, through analyses of the pollutant in the environment of the individuals studied and its biomonitoring. Here, the choice of the molecule to be analyzed at this stage has been shown to be the most pertinent with regard to 353NP (high proportion in the industrial mixture and pronounced estrogenic power). As a general rule, given that this choice should help to ensure that the risk assessment approach will be part and parcel of a methodological continuum, it is necessary to carry out

follow up in not only human biological samples, but also water; the data gathered will consequently contribute to the characterization of sanitary risks [Step (4)] by means of epidemiological studies.

In this work, the concentration at the entrance and the outlet of the DWTP producing from surface water, showed that 353NP was found in all surface-water samples analyzed at a level of 13.5–124.9 ng/L, and also remained in some effluents (drinking water). Moreover, Preuss *et al.* have shown 353NP bioconcentration, using U-ring-C14-labeled 353NP, in daphnies [40].

To conclude, while 353NP assays do not allow for quantification of all the NP, evidence of its presence in the environment and during biomonitoring can allow estimation of NP exposure. That is why the 353NP molecule (CAS 186825-36-5) can be recommended for the purpose of not only studies of the quality of environmental and drinking water, but also epidemiology studies, in which correlations are sought between presence of the contaminant in the environment and its presence in biological samples. As a result, the sizable number of environmental data gathered during analysis campaigns could be used in an epidemiological context and thereby enhance assessment of the public health risk with regard to NP from an environmental health standpoint.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Pascale Pierre-Eugène for her technical assistance, the Ianesco laboratory (Re´gis Brunet and Marie-Jeanne Gourmaud, Poitiers, France) for their contribution to the LC/MS/MS analyses, the @rtMolecule laboratory (Fabien Zunino and Omar Karam) for their know-how in organic synthesis, and all of them for having so generously shared their work experience. We are also very grateful to the AFSSET (study EST-2007-70/LEGUBE) for its financial contribution to the project. Finally, we wish to thank Jeffrey Arsham for having provided the English translation.

REFERENCES

- [1] AFSSET, Sante´ et Environnement: de´finitions et e´volutions re´centes, AFSSET document, 2006 (http://www.afssa.fr/ET/DocumentsET/01_definitions.pdf (accessed 6 December 2011)).
- [2] European Commission (EC), COM (2003) 338 final, A European Environment and Health Strategy http://eurlex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=en&type_doc=COMfinal&an_doc=2003&nu_doc=338 (accessed 27 February 2012).

- [3] European Commission (EC), Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption, Final report M0355008/1786Q/10/11/00, EC, Brussels, Belgium, 2000.
- [4] A. Soares, B. Guieysse, B. Jefferson, E. Cartmell, J.N. Lester, *Environ. Int.* **34** (2008) 1033.
- [5] R.E. Chapin, J. Delaney, Y.F. Wang, L. Lanning, B. Davis, B. Collins, N. Mintz, G. Wolfe, *Toxicol. Sci.* **52** (1999) 80.
- [6] M. Gérin, P. Gosselin, S. Cordier, C. Viau, P. Quénel, E. Dewailly, *Environnement et Santé Publique, Fondements et Pratiques, TEC&DOC*, 2003.
- [7] AFSSET, Evaluation et gestion des risques: références et pratiques, AFSSET document, 2006 (http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/601426307947303666722720917425/02_evaluation_gestion_risques.pdf) (accessed 6 December 2011).
- [8] M.N. Bates, J.W. Hamilton, J.S. LaKind, P. Langenberg, M. O'Malley, W. Snodgrass, *Environ Health Perspect.* **113** (2005) 1615.
- [9] P.S.I. Sari-Minodier, K. Coulibaly, L. Decosse, A. Botta, *Santé Publique* **20** (2008) 577.
- [10] J. Angerer, U. Ewers, M. Wilhelm, *Int. J. Hyg. Environ. Health* **210** (2007) 201.
- [11] R. Smolders, K.W. Schramm, M. Nickmilder, G. Schoeters, *Environ. Health* **8** (2009) 8.
- [12] R. Smolders, K.W. Schramm, U. Stenius, J. Grellier, A. Kahn, T. Trnovec, R. Sram, G. Schoeters, *J. Toxicol. Environ. Health, B* **12** (2009) 107.
- [13] INRS, Nonylphénol et 4-nonylphénol ramifié INRS, 2006 (www.inrs.fr/default/dms/inrs/FicheToxicologique/...FT-249/ft249.pdf) (accessed 6 December 2011).
- [14] R. Vazquez-Duhalt, F. Marquez-Rocha, E. Ponce, A.F. Licea, M.T. Viana, *Appl. Ecol. Environ. Res.* **4** (2005) 1.
- [15] J.P. Hernandez, W. Huang, L.M. Chapman, S. Chua, D.D. Moore, W.S. Baldwin, *Toxicol. Sci.* **98** (2007) 416.
- [16] B. Phillips, in: R.M. Harrison, R.E. Hester (Editors), *Overview of the Endocrine Disrupters Issue*, Royal Society of Chemistry, London, UK, 1999, p. 1.
- [17] G.G. Ying, B. Williams, R. Kookana, *Environ. Int.* **28** (2002) 215.
- [18] R.M. Boehme, T. Andries, K.H. Datz, B. Thiele, K. Guenther, *Chemosphere* **80** (2010) 813.
- [19] B.D. Bhatt, J.V. Prasad, G. Kalpana, S. Ali, *J. Chromatogr. Sci.* **30** (1992) 203.
- [20] T.F. Wheeler, J.R. Heim, M.R. LaTorre, A.B. Janes, *J. Chromatogr. Sci.* **35** (1997) 19.
- [21] K. Guenther, E. Kleist, B. Thiele, *Anal. Bioanal. Chem.* **384** (2006) 542.
- [22] Canada Environnement, Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles: substances chimiques et polymères, 2009 (http://www.ec.gc.ca/substances/nsb/cpguide/fra/app5_f.html#tablea5_3) (accessed 6 December 2011).
- [23] International Organization for Standardization (ISO), ISO18857-1:2006, Qualité de l'eau: Dosage d'alkylphénols sélectionnés, partie 1, ISO, Geneva, Switzerland, 2006.
- [24] International Organization for Standardization (ISO), ISO24293:2009(E), Water quality - Determination of individual isomers of nonylphenol - method using solid phase extraction (SPE) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), ISO, Geneva, Switzerland, 2009.
- [25] T. Katase, K. Okuda, Y.S. Kim, H. Eun, H. Takada, T. Uchiyama, H. Saito, M. Makino, Y. Fujimoto, *Chemosphere* **70** (2008) 1961.
- [26] P. Lepom, B. Brown, G. Hanke, R. Loos, P. Quevauviller, J. Wollgast, *J. Chromatogr., A* **1216** (2009) 302.
- [27] European Commission (EC), Directive 2008/105/EC, Environmental quality standards in the field of water policy (<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:EN:PDF>) (accessed 27 February 2012).
- [28] International Organization for Standardization (ISO), ISO18857-2:2009(E), Water Quality - Determination of selected alkylphenols-part 2: Gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols, their ethoxylates and bisphenol A in non-filtered samples following solid-phase extraction and derivatisation, ISO, Geneva, Switzerland, 2009.

- [29] M.P. Strub, N_ CAS du nonylphenol et de l'octylphenol, report DRC-09-102844-15164D, 2010 (http://www.aquaref.fr/system/files/2009_Fiche%25234_DRC-09-102844-15164D.pdf) (accessed 6 December 2011).
- [30] M. Feinberg, Labo-stat: guide de validation des méthodes d'analyse, Editions Tec & Doc, Paris, France, 2009.
- [31] T. Vega Morales, M.E. Torres Padran, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodriguez, Trends Anal. Chem. **28** (2009) 1186.
- [32] T. Ieda, Y. Horii, G. Petrick, N. Yamashita, N. Ochiai, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. **39** (2005) 7202.
- [33] A. Vallejo, M. Olivares, L.A. Fernandez, N. Etxebarria, S. Arrasate, E. Anakabe, A. Usobiaga, O. Zuloaga, J. Chromatogr., A **1218** (2011) 3064.
- [34] P. Quevauviller, La Houille Blanche **4** (2009) 72.
- [35] E. Stottmeister, O.P. Heemken, P. Hendel, G. Donnevert, S. Frey, H. Allmendinger, G. Sawal, B. Jandel, S. Geiss, R. Donau, A. Koch, I. Heinz, M. Ottaviani, E. Veschetti, W. Hartl, C. Kubwabo, C. Bente, V. Tobinski, H. Woldmann, R. Spilker, Anal. Chem. **81** (2009) 6765.
- [36] Y.S. Kim, T. Katase, Y. Horii, N. Yamashita, M. Makino, T. Uchiyama, Y. Fujimoto, T. Inoue, Mar. Pollut. Bull. **51** (2005) 850.
- [37] Y. Horii, T. Katase, Y.S. Kim, N. Yamashita, Bunseki Kagaku **53** (2004) 1139.
- [38] S. Gutierrez, C. Fernandez, B.I. Escher, J.V. Tarazona, Environ. Int. **34** (2008) 773.
- [39] R.M. Burgess, M.C. Pelletier, J.L. Gundersen, M.M. Perron, S.A. Ryba, Environ. Toxicol. Chem. **24** (2005) 1609.
- [40] T.G. Preuss, M. Telscher, H.T. Ratte, Environ. Pollut. **156** (2008) 1211.
- [41] G. Correa-Reyes, M.T. Viana, F.J. Marquez-Rocha, A.F. Licea, E. Ponce, R. Vazquez-Duhalt, Chemosphere **68** (2007) 662.
- [42] C. Stavrakakis, R. Colin, V. Hequet, C. Faur, P. Le Cloirec, Environ. Technol. **29** (2008) 279.
- [43] C.Y. Lin, M.R. Fuh, S.D. Huang, J. Sep. Sci. **34** (2011) 428.
- [44] W.F. Jardim, C.C. Montagner, I.C. Pescara, G.A. Umbuzeiro, A.M. Di Dea Bergamasco, M.L. Eldridge, F.F. Sodra, Sep. Purif. Technol. **84** (2012) 3.
- [45] A.M. Calafat, Z. Kuklenyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J. Ekong, L.L. Needham, Environ. Health Perspect. **113** (2005) 391.
- [46] T. Uchiyama, M. Makino, H. Saito, T. Katase, Y. Fujimoto, Chemosphere **73** (2008) S60.
- [47] T.G. Preuss, J. Gehrhardt, K. Schirmer, A. Coors, M. Rubach, A. Russ, P.D. Jones, J.P. Giesy, H.T. Ratte, Environ. Sci. Technol. **40** (2006) 5147.
- [48] Y.S. Kim, T. Katase, S. Sekine, T. Inoue, M. Makino, T. Uchiyama, Y. Fujimoto, N. Yamashita, Chemosphere **54** (2004) 1127.
- [49] M. Makino, T. Uchiyama, H. Saito, S. Ogawa, T. Iida, T. Katase, Y. Fujimoto, Chemosphere **73** (2008) 1188.
- [50] A.S. Russ, R. Vinken, I. Schuphan, B. Schmidt, Chemosphere **60** (2005) 1624.
- [51] T.G. Preuss, H.T. Ratte, Umweltwiss Schadst Forsch. **19** (2007) 227.
- [52] U. Kammann, M. Vobach, W. Wosniok, A. Schaffer, A. Telscher, Environ. Sci. Pollut. Res. **16** (2009) 227.
- [53] R. Loos, G. Locoro, S. Contini, Water Res. **44** (2010) 2325.
- [54] A.R. Fischer, N.T.P. Lan, C. Wiedemann, P. Heide, P. Werner, A.W. Schmidt, G. Theumer, H.J. Knalker, J. Chromatogr., A **1217** (2010) 2950.
- [55] A. Lagana, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal. Chim. Acta **501** (2004) 79.
- [56] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barcelo, Anal. Chem. **73** (2001) 5886.
- [57] P.E. Stackelberg, J. Gibs, E.T. Furlong, M.T. Meyer, S.D. Zaugg, R.L. Lippincott, Sci. Total Environ. **377** (2007) 255.
- [58] Z. Zhang, Y. Feng, P. Gao, C. Wang, N. Ren, J. Environ. Monit. **13** (2011) 1366.
- [59] M. Petrovic, D. Barcelo, A. Diaz, F. Ventura, J. Am. Soc. Mass Spectrom. **14** (2003) 516.
- [60] J.E. Loyo-Rosales, G.C. Rosales-Rivera, A.M. Lynch, C.P. Rice, A. Torrents, J. Agric. Food Chem. **52** (2004) 2016.

- [61] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 1202.
- [62] French Ministry of Ecology, Water Framework Directive, Chemical and Ecological Status of Water in France, 2005.
- [63] Y. Wang, W. Hu, Z. Cao, X. Fu, T. Zhu, *Anal. Bioanal. Chem.* **383** (2005) 857.
- [64] R. Cespedes, S. Lacorte, D. Raldua, A. Ginebreda, D. Barcelo, B. Pina, *Chemosphere* **61** (2005) 1710.
- [65] R. Cespedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barcelo, *Anal. Bioanal. Chem.* **385** (2006) 992.
- [66] D. Voutsas, P. Hartmann, C. Schaffner, W. Giger, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **13** (2006) 333.
- [67] A. Ghanem, P. Bados, A.R. Estuaun, L.F. de Alencastro, S. Taibi, J. Einhorn, C. Mougin, *Chemosphere* **69** (2007) 1368.
- [68] R. Loos, G. Hanke, G. Umlauf, S.J. Eisenreich, *Chemosphere.* **66** (2007) 690.
- [69] R. Loos *et al.*, *Trends Anal. Chem.* **27** (2008) 89.
- [70] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovolas, N. Kalogerakis, *Talanta* **80** (2010) 2057.
- [71] D. Amiridou, D. Voutsas, *J. Hazard Mater.* **185** (2011) 1.
- [72] B. Shao, H. Han, X. Tu, L. Huang, *J. Chromatogr., B* **850** (2007) 412.
- [73] N. Ademollo, F. Ferrara, M. Delise, F. Fabietti, E. Funari, *Environ. Int.* **34** (2008) 984.
- [74] J. Llorca-Porcel, M. Martinez-Parreno, E. Martinez-Soriano, I. Valor, *J. Chromatogr., A* **1216** (2009) 5955.
- [75] W.-C. Lin, S.-L. Wang, C.-Y. Cheng, W.-H. Ding, *Food Chem.* **114** (2009) 753.
- [76] G.-W. Chen, W.-H. Ding, H.-Y. Ku, H.-R. Chao, H.-Y. Chen, M.-C. Huang, S.-L. Wang, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 1939.
- [77] E. Ferrer, E. Santoni, S. Vittori, G. Font, J. Manes, G. Sagratini, *Food Chem.* **126** (2011) 360.

CHAPITRE VI : QUANTIFICATION DU BISPHEENOL A, DU 353 NONYLPHENOL ET DE LEURS DERIVES CHLORES DANS LES USINES DE TRAITEMENT D'EAU POTABLE

Résumé

L'exposition humaine au Bisphénol A (BPA) et aux Nonylphénols (NP) constitue un problème majeur de santé publique, du fait du caractère ubiquitaire de ces molécules et de leur toxicité en tant que perturbateur endocrinien. Leurs dérivés chlorés formés pendant la chloration, lors de l'étape de désinfection de l'eau dans les usines de traitement d'eau potable, présentent des effets perturbateurs endocriniens supérieurs à leurs composés parents. Un nombre très restreint d'études ont montré leur présence dans l'eau potable. Nous avons donc développé une méthode de dosage de ces composés précise et reproductible, afin de quantifier leur teneur dans l'eau de surface (en entrée) ainsi que dans l'eau traitée (en sortie, eau potable) de huit usines de traitement d'eau potable françaises.

Les échantillons d'eau ont été extraits sur phase solide et quantifiés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. Les limites de détection étaient comprises entre 0,3 et 2,3 ng.L⁻¹ pour le BPA et ses dérivés chlorés et de 1,4 et 63,0 ng.L⁻¹ pour le 353NP et leurs dérivés chlorés. Le bisphénol A et le 353NP ont été retrouvés dans la majorité des échantillons d'eau, à une concentration comprise respectivement entre 2,0 et 29,7 ng.L⁻¹ et de non détecté à 124,9 ng.L⁻¹. Dans la majorité des usines, une diminution du BPA et du 353NP a été observée entre l'eau de surface et l'eau traitée (de 36,6 à 78,9 % et de 2,2 à 100 % pour le BPA et le 353NP respectivement). Aucun dérivé chloré n'a été détecté. Même si le BPA et le 353NP ont été éliminés en grande partie dans les usines étudiées, ils n'ont pas été éliminés complètement. Ces résultats montrent que l'eau produite par les usines de traitement d'eau potable constitue toujours une source d'exposition pour l'homme.

QUANTIFICATION OF BISPHENOL A, 353-NONYLPHENOL AND THEIR CHLORINATED DERIVATIVES IN DRINKING WATER TREATMENT PLANTS

Antoine Dupuis^{a,b,c}, Virginie Migeot^{a,b,c}, Axelle Cariot^{a,b,c}, Marion Albouy-Llaty^{a,b,c}, Bernard Legube^a and Sylvie Rabouan^{a,b}

^aUniversité de Poitiers, IC2MP, UMR CNRS 7285, CETE, Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers, 1 rue Marcel Doré, 86022 Poitiers Cedex, France

^bUniversité de Poitiers, Faculté de Médecine et Pharmacie, 6 rue de la Milétrie, 86034 Poitiers Cedex, France

^cUniversité de Poitiers, CHU Poitiers, Pôle BioSPharm 2 rue de la Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France

Environmental Sciences and Pollution Research, 2012, **19**: 4193-4205

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) and nonylphenols (NP) are of major concern to public health due to their high potential for human exposure and to their demonstrated toxicity (endocrine-disruptor effect). A limited number of studies have shown that BPA and NP are present in drinking water. The chlorinated derivatives that may be formed during the chlorination step in drinking water treatment plants (DWTP) exhibit a higher level of estrogenic activity than their parent compounds.

The aim of this study was to investigate BPA, 353NP and their chlorinated derivative concentrations using an accurate and reproducible method of quantification. This method was applied to both surface and treated water samples from eight French DWTPs producing from surface water.

Solid phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry was developed in order to quantify target compounds from water samples.

The limits of detection ranged from 0.3 to 2.3 ng.L⁻¹ for BPA and chlorinated BPA and from 1.4 to 63.0 ng.L⁻¹ for 353NP and chlorinated 353NP. BPA and 353NP were found in most analyzed water samples, at a level ranging from 2.0 to 29.7 ng.L⁻¹ and from 0 to

124.9 ng.L⁻¹, respectively. In most of DWTPs a decrease of BPA and 353NP was observed between surface water and treated water (36.6 to 78.9 % and 2.2 to 100.0 % for BPA and 353NP respectively). Neither chlorinated BPA nor chlorinated 353NP was detected.

Even though BPA and 353NP have been largely removed in the DWTPs studied, they have not been completely eliminated, and drinking water may consequently remain a source of human exposure.

Keywords: Bisphenol A, 353-nonylphenol, Chlorinated derivatives, Drinking water treatment, LC-MS-MS, Water analysis

VI.1. INTRODUCTION

A wide variety of identified man-made chemicals have been found to disrupt the endocrine systems of life forms such as fish, wildlife and human beings. And yet, the endocrine-disrupting phenolic compounds bisphenol A (BPA) and nonylphenol (NP) are widely used in industry. BPA plays a role in the production of epoxy-resins and polycarbonate plastics, and is also employed as a stabilizer or antioxidant in many types of plastics, such as the polyvinylchloride (PVC) used for water pipes. Nonylphenols (technical mixture) serve as plastic additives and antioxidants. Moreover, nonylphenol ethoxylates (NPEOs) are widely used as surfactants, in domestic detergents, in pesticide formulations, and in industrial settings (Katase *et al.* 2008), producing NP, as a by-product, in the environment (Soares *et al.* 2008). Moreover, BPA and NP are continuously introduced into the aquatic environment by means of industrial, agricultural and municipal effluents. More specifically, BPA has been detected in sediments, sewage, soil, water samples... (Vandenberg *et al.* 2007). In a comparable way, nonylphenols are found throughout the environment, particularly in water resources (Soares *et al.* 2008).

BPA and NP are of major concern to environmental public health due to their high potential for human exposure and their demonstrated toxicity (European Union 1997; Kang *et al.* 2006). Humans are exposed to BPA in the food they eat, in the water they drink, and in much of the work they do... Occupational exposure to BPA and NP could potentially occur, especially during their manufacture (NTP, 2008). Numerous studies have focused on possible BPA exposure from dietary sources (Vandenberg *et al.* 2007). Occurrences of BPA and NP have been widely reported in surface water (Voutsas *et al.* 2006). In addition, some studies have shown BPA to be present in drinking water (Li *et al.* 2010; Stavrakakis *et al.* 2008).

These authors also reported on the presence of these molecules in corresponding surface water; in yet another study, NP has been detected in drinking water (Soares *et al.* 2008).

BPA and NP toxicity have been intensively investigated over the past decade. Extensive literature has shown adverse effects on animals following exposure to even a low dose of BPA, including developmental and reproductive toxicity, altered body weight, cancers and abnormally early puberty (Vandenberg *et al.* 2010). In addition, epidemiological studies have suggested that human exposure to BPA may be associated with disorders as wide-ranging as abnormal karyotype, polycystic ovarian syndrome, obesity, endometrial hyperplasia, recurrent miscarriages, prostate and breast cancer, infertility, attention deficit hyperactivity disorder and infertility (Vandenberg *et al.* 2007). In animals, nonylphenol induces reproductive and developmental toxicity involving fertility problems, malformation and insufficient body growth (Chapin *et al.* 1999; Soares *et al.* 2008).

As regards environmental NP, the name indicates not any single molecule, but rather a technical mixture designated by n° CAS84852-15-3 and involving more than 100 substitution isomers (Guenther *et al.* 2006; Wheeler *et al.* 1997). In order to render NP data more reliable and reproducible, it would be advisable that a clearly defined molecule of branched NP isomer be used as the reference standard in assessment of NP exposure.

Taking into account the fact that in most drinking water treatment plants, routine operations are concluded by a chlorination step, the formation of chlorinated derivatives of BPA or NP in drinking water is to be expected (Deborde *et al.* 2004; Deborde and von Gunten 2008; Gallard *et al.* 2004; Yamamoto and Yasuhara 2002). Furthermore, various forms of chlorinated BPA (mono-, di-, tri-, tetra- chloro BPA) have been detected in wastewater from waste paper recycling plants (Fukazawa *et al.* 2002). On the other hand, only limited data are available concerning chlorinated NP derivatives and none of these compounds have been found in analyzed water. Moreover, chlorinated BPA has been detected in adipose tissue (Fernandez *et al.* 2007). Except for tetra-chloro-BPA, BPA and NP chlorinated derivatives are not used in industrial activity (Polo *et al.* 2006). Therefore, the only source of exposure to chlorinated derivatives is likely to be chlorine-treated water. Last but not least, estrogenic activity of chlorinated derivatives may be higher than in parent compounds (Fukazawa *et al.* 2002; Hu *et al.* 2002).

Different analytical methods have been developed so as to monitor and quantify endocrine-disrupting chemicals. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)

and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) have recently been used. One advantage of LC-MS is that it does not require a derivatization step. Isotope dilution-MS/MS using a selected reaction monitoring acquisition mode has been found to maximally improve selectivity and sensitivity when measuring trace levels of environment chemicals (Vandenberg *et al.* 2007).

In the literature, different NP products have been used to prepare standard solutions: technical mixture (CAS 84852-15-3) (Loos *et al.* 2010; Petrovic *et al.* 2001, 2003), linear chain (4-*n*-NP ; CAS 104-40-5) (Lagana *et al.* 2004; Li *et al.* 2010; Stavrakakis *et al.* 2008) or linear mixture (CAS 241-545-23) (Stackelberg *et al.* 2007). Some papers do not mention the exact NP product used (Li *et al.* 2010; Liu *et al.* 2004).

The NP technical mixture is designated by n° CAS 84852-15-3 and involves more than 100 substitution isomers (Guenther *et al.* 2006; Wheeler *et al.* 1997). In the literature, experimenters have used about ten single isomers of branched para-NP of which the relative contents vary in accordance with the manufacturers and the batches (Katase *et al.* 2008), thereby indicating that as concerns the reproducibility of the batches, industrial manufacturing methods have yet to be totally mastered. Use of the NP technical mixture as the standard compound may consequently lead to a discordance in isomer proportions between NP standard solution and NP present in environment (Kim *et al.* 2005). Moreover, since fragmentation of different isomers fails to yield the same fragments (Bhatt *et al.* 1992) use of an NP mixture will produce uncontrolled variable MS signal intensity between standards and unknowns, thereby leading to inexact results.

On the other hand, use of 4-*n*-NP (linear chain) as the standard compound may not be appropriate in environmental analyses because technical mixtures used in industrial applications do not contain 4-*n*-NP (Katase *et al.* 2008). Therefore, 4-*n*-NP should not be the NP isomer present in the environment.

Taking all the above factors into account, a clearly defined molecule of branched NP isomer with a known degree of purity has got to be chosen from the mixture, so as to function as a standard. 353NP is the most abundant isomer (15-20 %) in three available commercial technical mixtures (TCI, Aldrich, Fluka) (Katase *et al.* 2008). Furthermore, 353NP is the compound exhibiting one of the highest levels of estrogenic activity (Preuss *et al.* 2006). Consequently, 353NP has been chosen as the NP standard.

The aim of this study was to develop an accurate and reproducible method to determine levels of BPA, 353-nonylphenol (353NP, used as a clearly defined standard) and chlorinated derivative concentration in order to investigate their occurrence in surface and treated water samples taken from all the drinking water treatment plants (DWTP) producing drinking water from surface water in the Poitou-Charentes area (France).

VI.2. MATERIALS AND METHOD

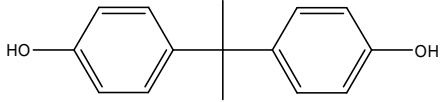
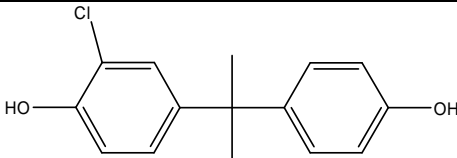
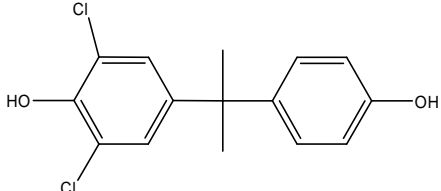
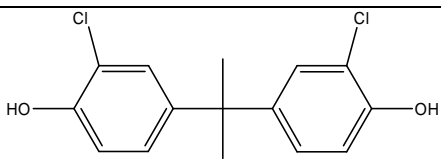
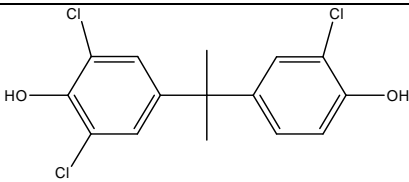
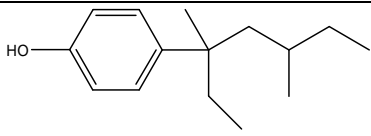
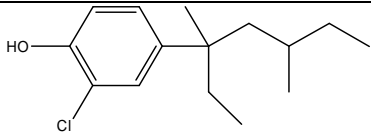
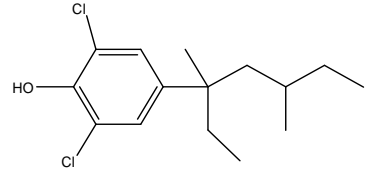
VI.2.a. Commercial chemicals and reagents

BPA (CAS 80-05-7) and internal standard bisphenol A-d16 (CAS 96210-87-6) were obtained from Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO, USA). Methanol, hexane, acetone, ethyl acetate, dichloromethane of high analytical grade (Pestipur®) quality were purchased from SDS (Peypin, France). Sodium thiosulfate was purchased from Sigma-Aldrich, Inc. Water was pre-treated by a Purelab Prima® and then purified by a Purelab classic (ELGA, Antony, France). Nitrogen alphagaz-1 was purchased from Air Liquide (Paris, France).

VI.2.b. Synthesis of 353-nonylphenol, chlorinated 353-nonylphenol and chlorinated bisphenol A

Chlorinated BPA, 353-nonylphenol: (a diastereomer mixture of 4-(3,5-dimethylheptan-3-yl)phenol named 353NP) and chlorinated 353-nonylphenol were custom synthesized by @rtMolecule (Poitiers, France). Briefly, chlorinated BPA (CBPA, 2,6-DCBPA, TCBPA, and 2,2'-DCBPA) was obtained from bisphenol A or its suitably protected precursor with regard to phenol function by direct chlorination using sulfuryl chloride (Synthesis 2003, No. 3, 403-407). 353-nonylphenol was prepared by Friedel-Crafts reaction between phenol and a tertiary nonylalcohol. The chlorinated 353-nonylphenol (C353NP, DC353NP) was synthesized from 353NP by direct chlorination using sulfuryl chloride (Saito *et al.* 2007). The ratio of the diastereomer mixture synthesized in the present study was 353NP-E:353NP-Z = 45:55 (according to the nomenclature proposed by Katase *et al.* (2008)). The purity and chemical structure of these compounds are shown in Table 1.

Table 1. Purity and chemical structure of BPA, NP and chlorinated derivatives

<i>Compounds</i>		<i>Purity</i>	<i>Structure</i>
BPA		HPLC >99% ^a	
2-chloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	CBPA	HPLC >98% ^b	
2,6-Dichloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	2,6-DCBPA	HPLC 98% ^b	
2-chloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	2,2'-DCBPA	HPLC >99% ^b	
2,6-Dichloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol	TCBPA	HPLC >98% ^b	
4-(1-ethyl-1,3-dimethyl-pentyl)-phenol	353NP	GC >98% ^b	
2-chloro-4-(1-ethyl-1,3-dimethyl-pentyl)-phenol	C353NP	GC >98% ^b	
2,6-Dichloro-4-(1-ethyl-1,3-dimethyl-pentyl)-phenol	DC353NP	GC >98% ^b	

^aSigma Aldrich; ^b@rt molecule.

VI.2.c. Water Samples

Surface and treated water (SW and TW) samples were collected from the 8 municipal drinking water treatment plants located in the French Poitou-Charentes area. One sample (250 ml) was performed at three different days and samples were pooled before analysis. SW samples were directly collected at the river surface above the DWTP. TW samples were collected at the outlet pipe of the treatment plant. TW samples were stored with the addition of a reducer (5 mg of sodium thiosulfate/250 mL) in order to stop chlorination of target compounds; all samples were kept frozen at -20°C until analysis.

VI.2.d. Preparation of standard solutions

A 200 mg.L⁻¹ methanol stock solution of each compound (BPA, CBPA, 2,6-DCBPA, 2,2'-DCBPA, TCBPA, 353NP, C353NP and DC353NP) was stored at + 4°C. Extemporaneously, the initial stock solutions were diluted in methanol/water 50/50 (v/v) to obtain working standard solutions at 2, 4, 8, 20 and 40 µg.L⁻¹ (MeOH-standard). Internal standard solution (BPA-d16) was prepared in methanol/water 50/50 (v/v) at 20 µg.L⁻¹ from initial stock solution (200 mg.L⁻¹).

VI.2.e. Solid phase extraction

Prior to the extraction, 1.25 mL of methanol and 100 µL of the internal standard solution (BPA-d16, 50 µg.L⁻¹) were added to an aliquot of 250 mL of water sample. Water samples were extracted by solid-phase extraction (SPE). The SPE procedure for clean-up and concentration of water samples was performed using a glass C18 upti-clean® endcapped cartridge 200 mg (Interchim, Montluçon, France). Cartridges were conditioned with 4 mL of dichloromethane/hexane (50/50) and twice with 3 mL of methanol/acetone/ethyl acetate (2/2/1) (v/v/v) and then equilibrated with 5 mL of purified water. Water samples (250 mL) were passed through the wet cartridges, washed with 5 mL of purified water and dried for 15 min. For all these steps, flow rate was set at 10 mL/min. Elution were performed with a mixture of methanol/acetone/ethyl acetate 2/2/1 (v/v/v) (2x2 mL) and a mixture of hexane/dichloromethane 50/50 (v/v) (2x2 mL) at a flow rate of 2 mL/min. Extracts were evaporated at 40°C to dryness under a gentle nitrogen stream. Residues were dissolved in 250 µL of a purified water/methanol (50/50) solution. Finally, 25 µL of extract were injected onto LC-MS-MS apparatus.

VI.2.f. LC-MS/MS analysis

Concentration of BPA, 353NP and chlorinated derivatives were determined using a LC-MS/MS system consisting of an HPLC ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, USA), coupled to an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA).

HPLC column was a supercosil ABZ[®] (3 μm particle size, 150 mm x 4.6 mm) (Supelco, St Louis, USA). BPA and chlorinated BPA analysis was carried out using a solvent gradient program at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. Initial condition of the mobile phase was methanol/water 50/50 (v/v) for 5 min. The gradient was programmed to linearly increase the amount of methanol up to 99% for 10 min. To clean up the column, methanol was kept constant at 99% during 5 min. 353NP and chlorinated 353NP were analyzed using a solvent isocratic program; mobile phase composition was methanol/water 85/15 (v/v).

The MS-MS was equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface, operating in negative ionization mode. Quantitative analysis was carried out in the multiple reaction monitoring mode (MRM), using two specific combinations of a precursor-product ion transition for each compound. Precursor product transitions as well as their corresponding collision energies are shown in Table 2. MS/MS detector conditions were set as follows : ion source gas 1 50 psig; probe temperature 550°C; curtain gas 20 psig; collision gas 9 psig, entrance potential -5.0 V, nebulizer current -1.

Table 2. MS/MS parameters of BPA, NP and chlorinated derivatives

<i>Compound</i>	<i>Retention time (min)</i>	<i>MRM (m/z)</i>	<i>Declustering potential (V)</i>	<i>Collision energy (V)</i>	<i>Collision cell exit potential (V)</i>	<i>Dwell time (ms)</i>
BPA	12.2	227-212	-90	-40	-20	40
		227-133	-90	-40	-20	40
CBPA	13.7	261-182	-80	-30	-29	40
		261-133	-80	-30	-29	40
2,6-DCBPA	14.6	295-280	-80	-40	-30	40
		297-282	-80	-40	-30	40
2,2'-DCBPA	14.8	295-201	-100	-52	-6	40
		297-203	-100	-52	-6	40
TCBPA	15.5	329-253	-100	-52	-6	40
		331-255	-100	-52	-6	40
353NP	4.5	219-133	-70	-35	-20	40
		219-147	-70	-26	-11	40
C353NP	4.7	253-167	-80	-5	-3	40
		253-253	-80	-40	-13	40
DC353NP	4.9	287-201	-90	-5	-3	40
		287-216	-80	-40	-13	40
BPA-d16	12.0	241-221	-90	-30	-20	40

VI.2.g. Blank, linearity and recovery

NP (including 353NP) and BPA contaminations could arise from laboratory accessories, reagent, SPE procedure, and apparatus. In order to avoid any contamination, only pre-treated glassware (500°C, 5 h), teflon seals and high-quality solvent were used throughout the study. Two kinds of blanks were performed: the first blank was purified water with addition of sodium thiosulfate as a sample loading step, on which SPE procedure was carried out, and the second was obtained by SPE procedure without any sample loading step.

Linearity of the chromatographic response was assessed on three different days using standard curves including 5 calibration points ranging from 2 to 40 ng.L⁻¹.

Recovery was determined by analysis of ten natural water samples (exempt of target compounds) spiked at 2 different concentrations (20 ng.L⁻¹ and 40 ng.L⁻¹). The recovery value includes matrix effect and losses during SPE.

VI.2.h. Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated as three and ten times the signal-to-noise (S/N) ratio, respectively, using blanks and MeOH-standard. BPA-d₁₆ was added before sample treatment and used as an internal standard for all target compounds since corresponding labeled standards were not readily available. To estimate the method limit of detection (mLOD) and the method limit of quantification (mLOQ), the LOD and LOQ values were corrected by the recovery of each compound.

VI.2.i. Intra-day and inter-day coefficients of variation

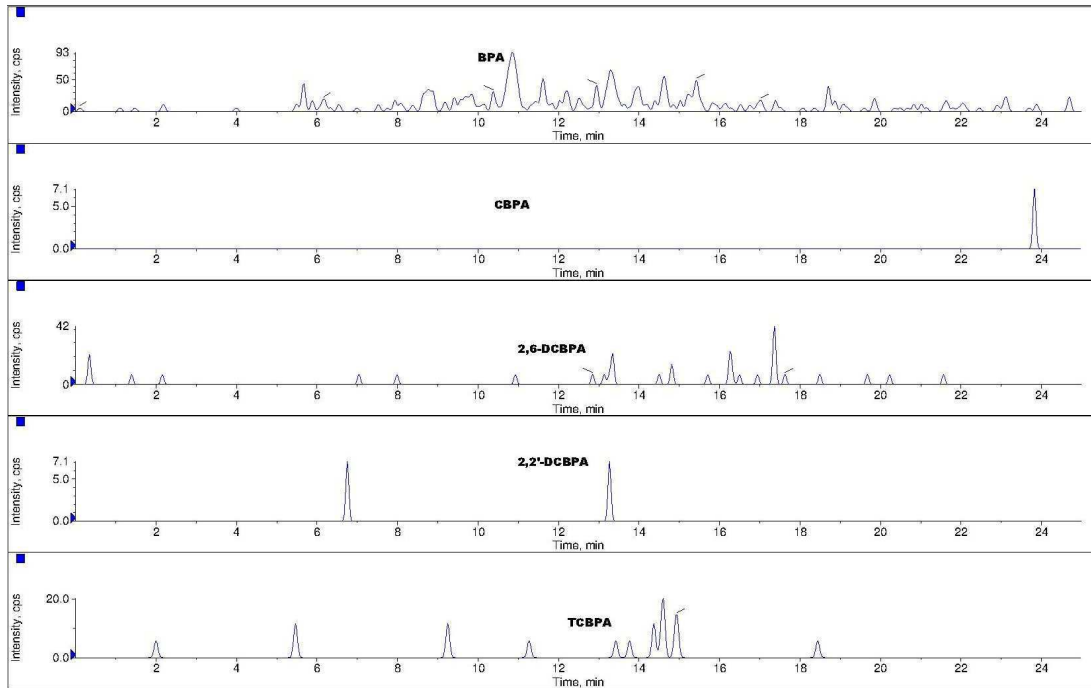
Sample concentrations were determined for each compound using the corresponding MeOH-standard curve calibration and corrected by the recoveries. BPA-d₁₆ recovery was checked in order to confirm that the extraction step had been correctly performed. Intra-day coefficient of variation was obtained with five replicates of quality control sample at 20 ng.L⁻¹. Inter-day coefficient of variation was obtained from experiments performed on three separate days with two replicates of quality control sample at the same concentration. Accuracy was determined during inter-day and intra-day assessments.

VI.3. RESULTS

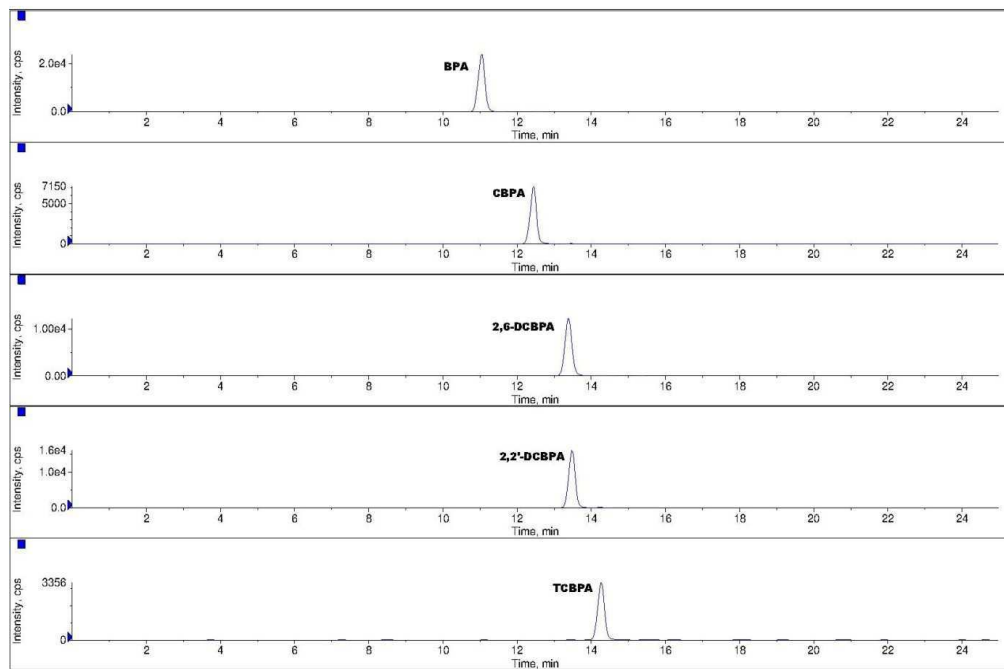
VI.3.a. Analytical performance

BPA and 353NP were detected in blank extracts but at a lower level than limit of quantification (Fig. 1A and Fig. 2A). On the other hand, no chlorinated derivatives were detected. Loading or not loading purified water before SPE procedure as a sample produced similar results. Moreover, no trace of BPA, either 353NP or chlorinated derivatives was detected from direct injection of the solvents used. Altogether, BPA and 353NP contaminations seem to arise from the extraction procedure and have been taken into account in the calculation method.

1A



1B



1C

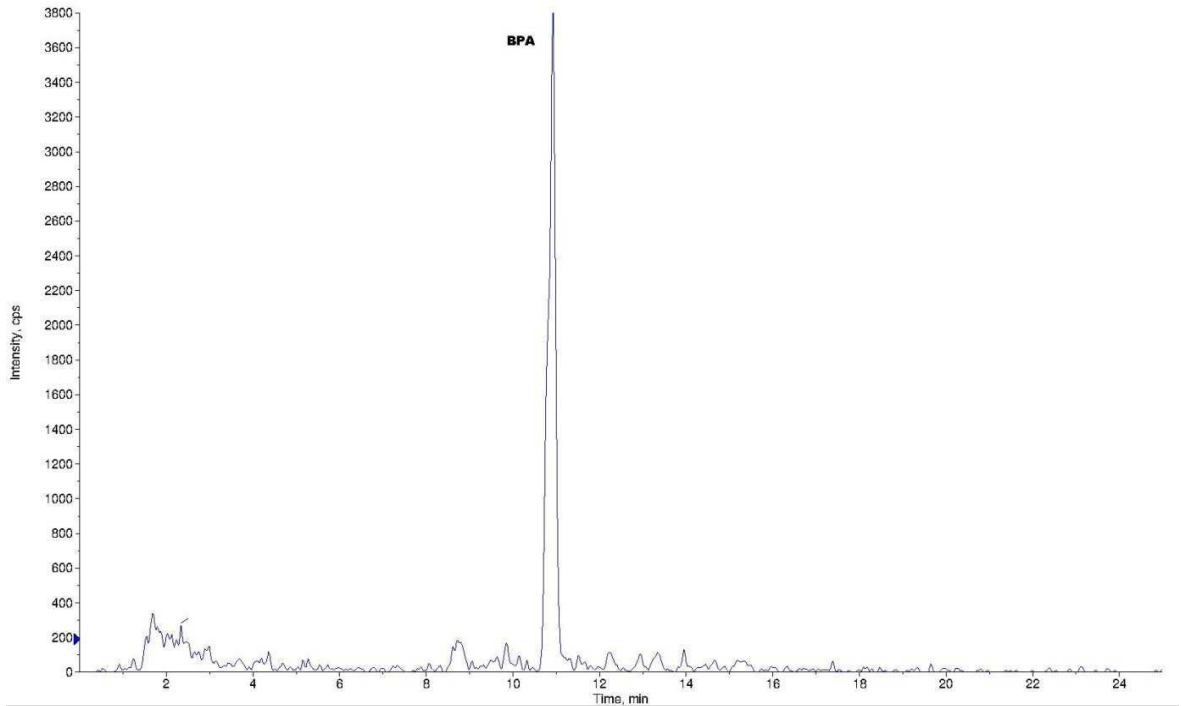
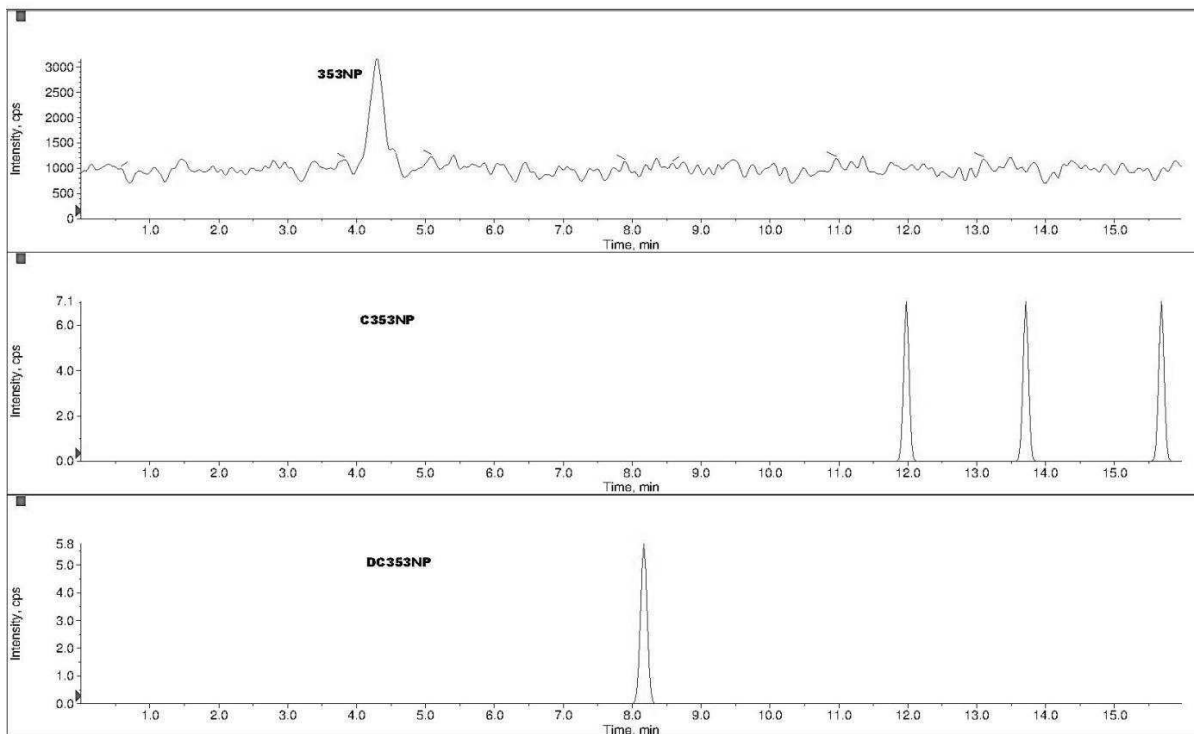
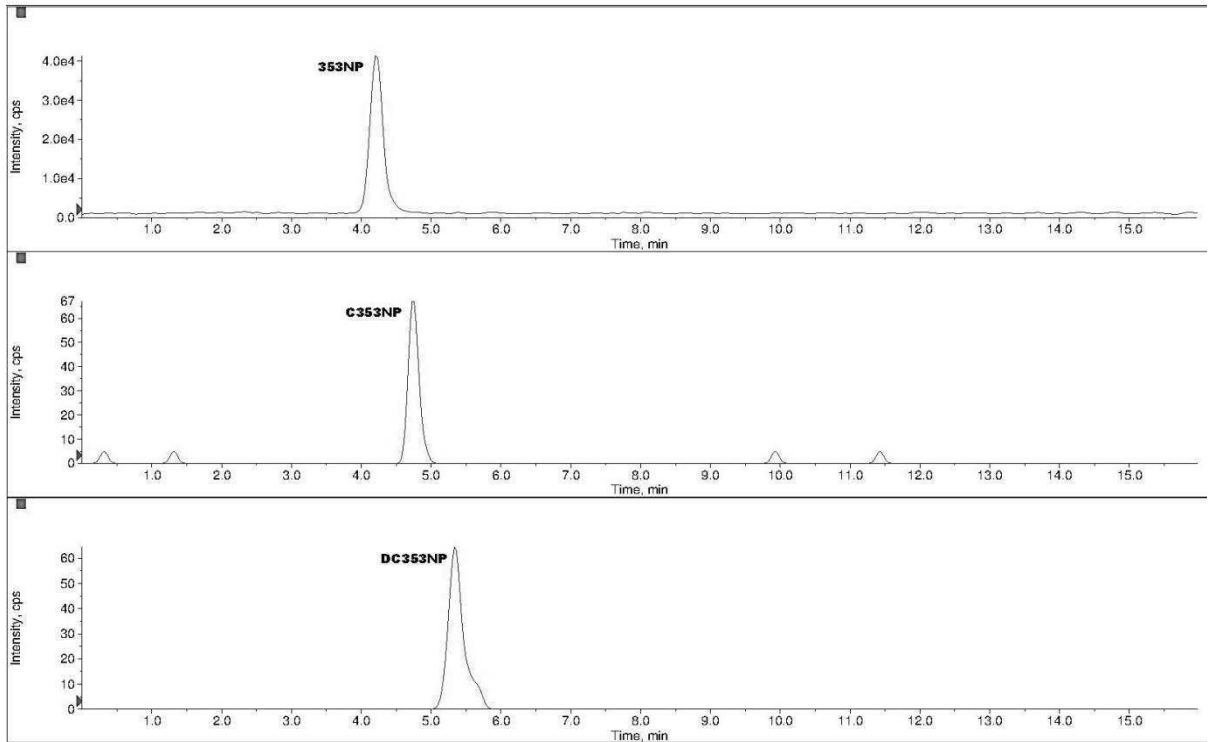


Fig 1. LC-MS-MS chromatogram at quantification transition of BPA, CBPA, 2,6-DCBPA, 2,2'-DCBPA, TCBPA of: (1A) blank, (1B) standard solution corresponding at 20 ng.L⁻¹ and (1C) surface water sample.

2A



2B



2C

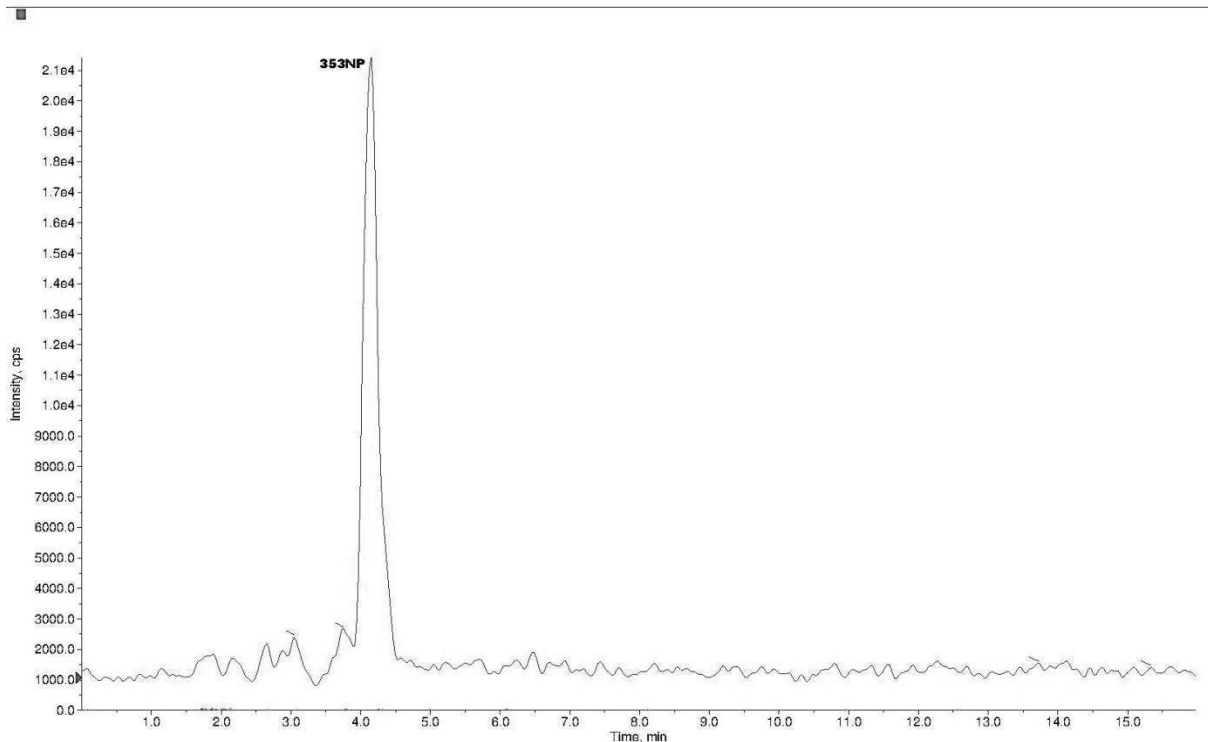


Fig 2. LC-MS-MS chromatogram at quantification transition of 353NP, C353NP, DC353NP of: (2A) blank, (2B) standard solution corresponding at 20 ng.L⁻¹ and (2C) surface water sample.

Calibration curves of BPA, 353NP, chlorinated BPA and chlorinated 353NP provided adequate linearity as shown by the correlation coefficients, which are greater than 0.99. Chromatograms of a standard corresponding at 20 ng.L⁻¹ are presented in figure 1B and 2B. BPA and chlorinated BPA extractions yielded high levels of recovery. However, due to poor extraction recovery of C353NP, a high degree of variability was observed. Therefore, C353NP quantification could not be performed. Results are presented in Table 3.

Table 3. Linearity, recovery data, limits of detection and limits of quantification (ng.L⁻¹) for determination of BPA, 353NP and their chlorinated derivatives. Intra-day and inter-day variation obtained from quality control samples at 20 ng.L⁻¹.

<i>Compound</i>	<i>Linearity</i> (<i>n</i> =3) <i>r</i> ² >	<i>Recovery</i> ^a % (<i>RSD</i> ^b , <i>n</i> =10)	<i>mLOD</i> ^c (ng.L ⁻¹)	<i>mLOQ</i> ^d (ng.L ⁻¹)	<i>Intra-day mean (n=5)</i>		<i>Inter-day mean (n=6)</i>	
					<i>Accuracy</i> ^e (%)	<i>RSD</i> ^b (%)	<i>Accuracy</i> ^e (%)	<i>RSD</i> ^b (%)
<i>BPA</i>	0.999	108 (17)	0.5	1.5	107.6	7	104.5	18
<i>CBPA</i>	0.992	99 (18)	0.7	2.0	113.6	8	112.0	13
<i>2,6-DCBPA</i>	0.998	101 (19)	0.4	1.0	94.8	8	105.2	16
<i>2,2'-DCBPA</i>	0.998	100 (21)	0.3	1.0	104.6	14	111.0	21
<i>TCBPA</i>	0.998	88 (17)	2.3	6.8	102.0	19	102.0	18
<i>353NP</i>	0.997	49 (19)	1.4	4.1	98.3	6	89.2	15
<i>C353NP</i>	0.998	7 (68)	63.0	ND ^f	ND ^f	ND ^f	ND ^f	ND ^f
<i>DC353NP</i>	0.998	38 (15)	4.7	15.5	96.0	7	92.8	9
<i>BPA-d16</i>	ND ^f	99 (19)	ND ^f	ND ^f	ND ^f	ND ^f	ND ^f	ND ^f

^aExpressed as [(mean observed concentration)/(nominal concentration)] x 100, ^bRelative standard deviation, ^cmethod limit of detection, ^dmethod limit of quantification, ^eExpressed as [(mean observed concentration)/(nominal concentration)] x 100, ^fnot determined

The developed method showed similar low values of mLOD and mLOQ for BPA, CBPA, 2,6-DCBPA, 2,2'-DCBPA TCBPA and 353NP. In contrast, C353NP and DC353NP showed higher limits (Table 3).

Intra-day and inter-day variation obtained from quality controls of the target compounds are shown in Table 3. The intra-day relative standard deviation (RSD) was ≤ 19%, while accuracy was determined between 94.8 and 113.6% at 20 ng.L⁻¹. The inter-day relative standard deviation was ≤ 21% and accuracy ranged from 89.2 to 112.0%.

VI.3.b. Water sample analysis

Appropriate Internal Quality Controls were applied so as to assess the validity of the optimized analytical procedure and to verify that no outliers occurred during routine analysis

sequences. Signal specificity was systematically checked by comparison of each retention time and fragmentation ratio with the corresponding standard. Calibration curves were regularly checked for linearity ($r^2 \geq 0.99$). Moreover, quantification of quality control (20 ng.L^{-1}) was regularly performed during DWTP water sample analysis (bias $\leq 11\%$, RSD $\leq 17\%$).

BPA was detected in concentrations ranging from 6.7 to 29.7 ng.L^{-1} in SW with a median of 17.7 ng.L^{-1} and from 2.0 to 16.9 ng.L^{-1} in TW with a median of 7.2 ng.L^{-1} (Table 4). 353NP was detected in concentrations ranging from 13.5 to 124.9 ng.L^{-1} in SW with a median of 32.5 ng.L^{-1} and from $< \text{mLOD}$ to 59.4 ng.L^{-1} in TW with a median of 8.0 ng.L^{-1} (Table 4). BPA and 353NP chlorinated derivatives were lower than the mLOD. Chromatograms of a sample are presented in figure 1C and 2C.

Table 4. BPA and 353NP concentrations (ng.L^{-1}) in untreated and treated water from Poitou-Charentes drinking water treatment plants (DWTP)

<i>DWTP</i>	<i>BPA value (method SD^a)</i>		<i>353NP value (method SD^a)</i>	
	<i>Surface water</i>	<i>Treated water</i>	<i>Surface water</i>	<i>Treated water</i>
1	21.2 (1.6)	5.2 (0.4)	19.6 (1.1)	$< \text{mLOQ}^b$
2	25.1 (1.9)	5.3 (0.4)	29.2 (1.6)	$< \text{mLOQ}^b$
3	29.7 (2.3)	10.8 (0.8)	35.9 (2.0)	35.1 (2.0)
4	22.3 (1.7)	4.7 (0.4)	48.6 (2.7)	15.9 (0.9)
5	6.7 (0.5)	13.7 (1.1)	13.5 (0.8)	59.4 (3.3)
6	8.0 (0.6)	2.0 (0.2)	124.9 (7.0)	$< \text{mLOQ}^b$
7	14.2 (1.0)	9.0 (0.7)	58.8 (3.3)	$< \text{mLOQ}^b$
8	8.0 (0.6)	16.9 (1.3)	16.9 (1.0)	33.7 (1.9)

^astandard deviation, ^b method limit of quantification

VI.4. DISCUSSION

VI.4.a. Method optimization

Chlorinated BPA and chlorinated NP are produced during potabilization processes. Monochloro-, dichloro-, trichloro- and tetrachloro-BPA are the main by-products formed during chlorination (Gallard *et al.* 2004; Yamamoto and Yasuhara 2002). Tetrachloro-BPA, which is commonly used as a flame retardant in polymers, is not of hydro origin alone (Polo *et al.* 2006). Consequently, in this study we did not search for tetrachloro-BPA.

While high-purity solvents were used, as was glass instead of plastics, and even though specific purification procedures were carried out, BPA and 353NP contamination

could not be avoided, and were probably due to leaching effects during solid phase extraction. Other studies have likewise reported BPA contamination from reagents or solvents or leaching from the materials during sampling, storage, processing, and analysis (Dekant and Volkel 2008; Gallart-Ayala *et al.* 2010). Similarly, NP contamination in blank has been described elsewhere (Loos *et al.* 2010). In the present study, BPA and 353NP contaminations did not exceed the limit of quantification, but special attention when proceeding remains advisable.

During MS parameter optimization, negative ionization mode produced higher signal intensity than positive ionization mode and a much better signal-to-noise ratio (S/N) for BPA and 353NP. APCI (Atmospheric pressure chemical ionization) and ESI (electrospray) interfaces have been compared using both a methanol solution of compounds and spiked river water. ESI interface produced higher sensibility with a methanol solution but significant matrix effect was observed in spiked water extracts. The most satisfactory results, providing negligible matrix effect, were achieved using APCI interface, which was consequently chosen for the purposes of this study.

VI.4.b. Water sample analysis

The main objective of this study was to inventory the French Poitou-Charentes area, with regards to the surface and treated water of DWTPs producing drinking water from surface water. So as to render unimportant the concentration variability according to time of sampling, extraction was carried out on three different days, and analysis was performed at each location from a « pool » of the 3 samplings. It should nonetheless be noted that initial variability was at its lowest for surface waters 3, 7 and 8, which came from water retention installations. It should also be mentioned that the figures recorded in this study were obtained at treatment plant entrance and exit, and thereby provide a snapshot image of real-time situations in each plant and can be meaningfully compared on initial examination (no mass balance calculations for the branch).

BPA was found in all the surface water samples analyzed. Our results are in agreement with those reported in the literature on DWTP water samples (Gallart-Ayala *et al.* 2010; Lagana *et al.* 2004; Loos *et al.* 2010; Rodriguez-Mozaz *et al.* 2004; Stackelberg *et al.* 2007; Stavrakakis *et al.* 2008).

BPA was found in all the treated water samples analyzed. In most DWTPs a decrease between SW and TW was observed (1-2-3-4-6-7), ranging from 36.6% to 78.9% with a median of 75.2%. Authors from different countries have reported similar results with overall elimination ranging from 70.0 to 100.0% (Gallart-Ayala *et al.* 2010; Rodriguez-Mozaz *et al.* 2004; Stackelberg *et al.* 2007; Stavrakakis *et al.* 2008). The processes performed in water treatment plants are known to decrease BPA. First of all, most BPA is eliminated during the chlorination step of DWTP due to its high reactivity with chlorine (Deborde *et al.* 2004; Gallard *et al.* 2004; Gallart-Ayala *et al.* 2010; Stackelberg *et al.* 2007). All the DWTPs mentioned in this study include a chlorination step. A sand filtration step has likewise been shown to remove BPA in DWTP (Gallart-Ayala *et al.* 2010; Rodriguez-Mozaz *et al.* 2004). Moreover, ozonation has been suggested as an effective means of eliminating BPA (Deborde *et al.* 2008; Nakada *et al.* 2007). Finally, activated carbon is known to adsorb hydrophobic compounds, including BPA (Rodriguez-Mozaz *et al.* 2004; Stackelberg *et al.* 2007). Different operatory combinations of these water treatment processes are applied in the different Poitou-Charentes area DWTPs (Table 5).

353NP was found in all the surface water samples analyzed in this study. Similar or different results have been reported in the literature, but considering the above-mentioned question on the NP standard to be used, these data have got to be considered with the utmost caution (Lagana *et al.* 2004; Loos *et al.* 2010; Petrovic *et al.* 2001; Stackelberg *et al.* 2007). Stavrakakis *et al.* (2008) did not find any NP in DWTP water samples, maybe due to use of 4-*n*-NP as standard solution. 353NP was found in most of the treated water analyzed (3-4-5-8). 353NP concentration decreased in most of the DWTP TW samples (1-2-4-6-7) from 67.3% to 100.0%, with a median of 100.0%. Authors from different countries have reported similar results with overall elimination ranging from 73.0 to 100.0% (Petrovic *et al.* 2001). Unlike BPA, only the chlorination step allows for effective removal of NP during water treatment process (Petrovic *et al.* 2001, 2003; Stackelberg *et al.* 2007).

Table 5. Description of the treatment process of the eight drinking water treatment plants

<i>DWTP</i>	<i>water origin</i>	<i>Preoxidation</i>	<i>Clarification</i>	<i>Interoxidation</i>	<i>Filtration</i>	<i>Postoxidation</i>	<i>Disinfection</i>	<i>outlet residual chlorine (mg Cl₂L⁻¹)</i>	<i>outlet pH</i>
1	River (43m ³ .s ⁻¹)		Coagulation/flocculation-sedimentation		Sand filtration-ozonation-GAC filtration		Sodium hypochlorite	0.6	8.1
2	river (used only as water of supplement) (1m ³ .s ⁻¹)		Coagulation/flocculation- sedimentation		Sand filtration		Gaseous chlorine	0.3	7.9
3	Dam water	Potassium permanganate	Coagulation/flocculation -flotation	Potassium permanganate	PAC – flocculation-sedimentation - ultrafiltration		Sodium hypochlorite	0.6	8.1
4	River (28 m ³ .s ⁻¹)	Ozonation	Coagulation/flocculation- PAC- sedimentation		Sand filtration	Ozonation	Gaseous chlorine	0.5	7.7
5	River with reservoir	Chlorine dioxide	Coagulation/flocculation - PAC - sedimentation		sand filtration	Ozonation	Chlorine dioxide	0.6	7.9
6	River (1 m ³ .s ⁻¹)	Ozonation	Coagulation/flocculation- sedimentation	Potassium permanganate	Sand filtration-ozonation-GAC filtration		Sodium hypochlorite	0.7	7.5
7	Dam water	Ozonation	Coagulation/flocculation- on-flotation	Ozonation	Sand filtration-postozonation – GAC filtration		Sodium hypochlorite	0.7	8.3
8	Dam water		Coagulation/flocculation- on-PAC-flotation	Ozonation	Sand filtration	Ozonation	Sodium hypochlorite	0.7	7.9

GAC: granulated activation carbon; PAC: powder activation carbon

Contradictorily to some of the other results, we found BPA and 353NP in TW samples, probably because they were not totally eliminated during the different steps of the DWTP process (Gallart-Ayala *et al.* 2010; Petrovic *et al.* 2001). Another hypothesis is that BPA and NP are formed during drinking-water production and transport (Yamamoto and Yasuhara 2002).

On the other hand, we found more BPA and 353NP in some TW samples than in corresponding SW, probably because some BPA or 353NP were released during drinking-water production and transport (Loyo-Rosales *et al.* 2004).

Chlorinated derivatives were not detected in samples collected in either DWTP in surface or in treated water. This is probably due to the mLOD obtained in our conditions. Gallart-Ayala *et al.* (2010) reported similar results for chlorinated BPA derivatives and Petrovic *et al.* (2003) for chlorinated NP derivatives. Up until now, BPA chlorinated derivatives have been detected in environment only in effluent from wastepaper recycling plants, where BPA concentrations are much higher than in DWTP (Fukazawa *et al.* 2002).

This study took place in Poitou-Charentes, a semirural French area with 1.7 million inhabitants. Seventeen percent of the Poitou-Charentes population is supplied with drinking water produced from surface water, 19 % from a mixture of surface water and ground water and 64 % from ground water. The Poitou-Charentes area contains 8 DWTPs, and the drinking water produced from surface water is meant to supply approximately 0.6 million inhabitants. All of the water intakes from the treatment plants were subjected to environmental study prior to operation in order to determine, at each site, the proximate, nearby and eventually distant protection perimeters or buffer zones as defined in article L1321-2 of the French public health code. Since BPA and 353NP were present in all the surface water samples, the results clearly show that Poitou-Charentes, 25,810 km², a mainly rural (agriculture, livestock, forests) and slightly urbanized French region (10 towns with more than 15,000 inhabitants, including three cities with population ranging from 60,000 to 90,000), is particularly affected by endocrine-disruptor compounds, which characterize chronic surface water pollution. Indeed, several plastic and composite factories liable to use BPA and NP are present in Poitou-Charentes, albeit not close to the DWTPs studied. In addition, the manuring of agricultural products containing NPEOs as surfactants may constitute another source of NP.

VI.5 CONCLUSION

The analytical method developed in this work, confirms that BPA and NP analysis require specific procedures in order to avoid contamination by ubiquitous endocrine disruptor compounds (EDC). If 353NP has already been used in some studies assessing the toxicity potency of nonylphenols, to our knowledge no study has aimed at quantifying 353NP in environment. In this study, for the first time, 353NP has been characterized in environmental water, and the results on nonylphenol achieved with this substance of reference (353NP) may allow for comparison with future results obtained under the same conditions.

This paper puts forward the first simultaneous assessment of BPA, 353NP and their chlorinated derivatives in DWTP surface and treated water samples. Whole surface water used for drinking water in Poitou-Charentes area contains BPA and 353NP. Operations in DWTPs have yielded efficient removal of these EDCs but have not eliminated them completely. Moreover, our results suggest possible BPA and NP formation during water treatment. The occurrence of these EDCs in finished water may indicate that drinking water could be a source of human exposure. In order to evaluate this risk and contribute to epidemiological studies, the monitoring of EDCs in both tap water and human tissue is to be recommended. Chlorinated derivatives of BPA and 353NP were not detected in the surface and treated water of the Poitou-Charentes DWTPs. Nevertheless, chlorinated BPA has been detected in biologic tissue (Fernandez *et al.* 2007) likely coming from treated water. It may be added that the treated water analyzed at the exit of DWTP is not the tap water finally consumed. That much said, BPA and NP leaching from plastic pipes of distribution systems may react with the chlorine present in treated water, thereby producing chlorinated derivatives, which could potentially be present in consumer tap water. Further investigations involving consumer tap water consequently need to be performed.

ACKNOWLEDGMENT

Thanks to Pascale Pierre-Eugène for her help as technical assistant. Thanks to Ianesco laboratory (Poitiers, France) for their LC-MS/MS analysis contribution. Thanks as well to Afsset (EST-2007-70/LEGUBE) for their financial support. And thanks to all the DWTP operators and state organs managing delivery of drinking water in the Poitou-Charentes region for their kind assistance as we carried out this study. We would also like to thank Jeffrey Arsham for very helpful discussion.

REFERENCES

- Bhatt BD, Prasad JV, Kalpana G, Ali S (1992) Separation and Characterization of isomers of p-Nonylphenols by Capillary GC/GC-MS/GC-MS/GC-FTIR Techniques. *Journal of Chromatographic Science* 30: 203-210
- Chapin RE, Delaney J, Wang YF, Lanning L, Davis B, Collins B, *et al.* (1999) The effects of 4-nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study. *Toxicological Sciences* 52: 80-91
- Deborde M, von Gunten U (2008) Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res* 42: 13-51
- Deborde M, Rabouan S, Gallard H, Legube B (2004) Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors. *Environ Sci Technol* 38: 5577-5583
- Deborde M, Rabouan S, Mazellier P, Duguet JP, Legube B (2008) Oxidation of bisphenol A by ozone in aqueous solution. *Water Res* 42: 4299-4308
- Dekant W, Volkel W (2008) Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 228: 114-134
- European Union. 1997. *European Workshop on the Impact of endocrine Disrupters on Human Health and the Environment.*
- Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufik J, Navalon A, Ballesteros O, Pulgar R, *et al.* (2007) Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 24: 259-264
- Fukazawa H, Watanabe M, Shiraishi F, Shiraishi H, Shiozawa T, Matsushita H, *et al.* (2002) Formation of chlorinated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J Health Sci* 48: 242-249
- Gallard H, Leclercq A, Croue JP (2004) Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere* 56: 465-473
- Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT (2010) On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A* 1217: 3511-3518
- Guenther K, Kleist E, Thiele B (2006) Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: A systematic numbering system and future trends. *Anal Bioanal Chem* 384: 542-546
- Hu JY, Xie GH, Aizawa T (2002) Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity. *Environ Toxicol Chem* 21: 2034-2039
- Kang JH, Kondo F, Katayama Y (2006) Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226: 79-89
- Katase T, Okuda K, Kim YS, Eun H, Takada H, Uchiyama T, *et al.* (2008) Estrogen equivalent concentration of 13 branched para-nonylphenols in three technical mixtures by isomer-specific determination using their synthetic standards in SIM mode with GC-MS and two new diastereomeric isomers. *Chemosphere* 70: 1961-1972
- Kim YS, Katase T, Horii Y, Yamashita N, Makino M, Uchiyama T, *et al.* (2005) Estrogen equivalent concentration of individual isomer-specific 4-nonylphenol in Ariake sea water, Japan. *Marine Pollution Bulletin* 51: 850-856
- Lagana A, Bacaloni A, De Leva I, Faberi A, Fago G, Marino A (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 501: 79-88
- Li X, Ying GG, Su HC, Yang XB, Wang L (2010) Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environ Int* 36: 557-562

- Liu R, Zhou JL, Wilding A (2004) Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J chromatogr A* 1022: 179-189
- Loos R, Locoro G, Contini S (2010) Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS(2) analysis. *Water Res* 44: 2325-2335
- Loyo-Rosales JE, Rosales-Rivera GC, Lynch AM, Rice CP, Torrents A (2004) Migration of Nonylphenol from Plastic Containers to Water and a Milk Surrogate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2016-2020
- Nakada N, Shinohara H, Murata A, Kiri K, Managaki S, Sato N, *et al.* (2007) Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research* 41: 4373-4382
- NTP (2008) NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. NIH publication n°08-5994 National Toxicology Program/National Institute of Environmental Health Sciences
- Petrovic M, Diaz A, Ventura F, Barcelo D (2001) Simultaneous Determination of Halogenated Derivatives of Alkylphenol Ethoxylates and Their Metabolites in Sludges, River Sediments, and Surface, Drinking, and Wastewaters by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem* 73: 5886-5895
- Petrovic M, Diaz A, Ventura F, Barcelo D (2003) Occurrence and removal of estrogenic short-chain ethoxy nonylphenolic compounds and their halogenated derivatives during drinking water production. *Environ Sci Pollut* 37: 4442-4448
- Polo M, Llompарт M, Garcia-Jares C, Gomez-Noya G, Bollain MH, Cela R (2006) Development of a solid-phase microextraction method for the analysis of phenolic flame retardants in water samples. *J chromatogr A* 1124: 11-21
- Preuss TG, Gehrhardt J, Schirmer K, Coors A, Rubach M, Russ A, *et al.* (2006) Nonylphenol Isomers Differ in Estrogenic Activity. *Environmental Science & Technology* 40: 5147-5153
- Rodriguez-Mozaz S, de Alda MJL, Barcelo D (2004) Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J chromatogr A* 1045: 85-92
- Saito H, Uchiyama T, Makino M, Katase T, Fujimoto Y, Hashizume D (2007) Optical resolution and absolute configuration of branched 4-nonylphenol isomers and their estrogenic activities. *J Health Sci* 53: 177-184
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34: 1033-1049
- Stackelberg PE, Gibs J, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Lippincott RL (2007) Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Sci Total Environ* 377: 255-272
- Stavarakakis C, Colin R, Hequet V, Faur C, Le Cloirec P (2008) Analysis of endocrine disrupting compounds in wastewater and drinking water treatment plants at the nanogram per litre level. *Environ Technol* 29: 279-286
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24: 139-177
- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJR, Schoenfelder G (2010) Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Persp* 118: 1055-1070

Voutsas D, Hartmann P, Schaffner C, Giger W (2006) Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environ Sci Pollut Res Int* 13: 333-341

Wheeler TF, Heim JR, LaTorre MR, Janes AB (1997) Mass Spectral Characterization of p-Nonylphenol Isomers Using High-Resolution Capillary GC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 35: 19-30

Yamamoto T, Yasuhara A (2002) Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 46: 1215-1222

CHAPITRE VII : QUANTIFICATION DU BISPHENOL A ET SES DERIVES CHLORES DANS LE LAIT MATERNEL PAR UPLC-MS-MS

Résumé

Le bisphénol A (BPA) est un composé issu de la synthèse chimique très largement utilisé dans l'industrie. Il a cependant montré son effet toxique comme perturbateur endocrinien. Dans l'eau potable, le chlore a tendance à réagir avec le bisphénol A pour former des dérivés chlorés ayant une activité œstrogénique importante. Dans cette étude, nous avons développé et validé une méthode de dosage ultrasensible du bisphénol A et de ses dérivés chlorés selon les recommandations internationales. Nous avons mis au point une extraction solide-liquide en ligne suivie d'une chromatographie liquide ultraperformante couplée à une détection par un spectromètre de masse en tandem. Nous avons utilisé la dilution isotopique, à l'aide de bisphénol A deutéré comme étalon interne, pour quantifier ces composés dans le lait maternel. La droite d'étalonnage, faite à partir de la matrice lait était comprise entre 0,4 et 6,4 ng.mL⁻¹ pour chaque composé et une linéarité acceptable a été observé ($r^2 > 0,99$). L'exactitude de la méthode a été validée à travers sa fidélité (le coefficient de variation était < 20% à 2 concentrations différentes de 0,4 et de 3,2 ng.mL⁻¹) et sa justesse (le recouvrement était compris entre 81 et 119%). Les limites de détection du BPA et de ses dérivés chlorés étaient comprises entre 0,01 et 0,09 ng.mL⁻¹. A partir d'un échantillon de lait de 500 µL, la limite de quantification a été validée à 0,40 ng.mL⁻¹ pour tous les composés. Cette limite s'est révélée appropriée au regard des concentrations présentes dans des échantillons de lait maternel obtenus auprès de mères donneuses. La méthode analytique développée dans ce travail est en accord avec les recommandations élaborées pour les études de biomonitoring, concernant notamment du dosage du BPA et de ses dérivés chlorés dans le lait maternel.

RELIABLE QUANTIFICATION OF BISPHENOL A AND ITS CHLORINATED DERIVATIVES IN HUMAN BREAST MILK USING UPLC-MS/MS METHOD

Axelle Cariot^{1,2}, Antoine Dupuis^{1,2*}, Marion Albouy-Llaty^{1,2}, Bernard Legube³, Sylvie Rabouan¹ and Virginie Migeot^{1,2}

¹University of Poitiers, CNRS-UMR 7285 IC2MP, School of Medicine and Pharmacy (Department of Analytical chemistry, Pharmaceutics and Epidemiology), 6 rue de la Milétrie, 86034 Poitiers Cedex, France

²University Hospital of Poitiers, Biology-Pharmacy-Public Health Pole, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers Cedex, France

³University of Poitiers, CNRS-UMR 7285 IC2MP, Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieur de Poitiers, 1 rue Marcel Doré, 86022 Poitiers Cedex, France

Talanta, 2012, **100**: 172-182

ABSTRACT

Bisphenol A is a widespread industrial chemical which over the past decade has demonstrated its toxicity as an endocrine disruptor. Chlorine present in drinking water may react with bisphenol A to form chlorinated derivatives, which have demonstrated a heightened level of estrogenic activity. In this work, we have comprehensively validated a method using on-line SPE-UPLC-MS/MS and isotope dilution quantification to measure bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk according to accepted guidelines. Deuterated bisphenol A was used as internal standard. The matrix calibration curve ranged from 0.40 to 6.40 ng.mL⁻¹ for each of the target compounds and provided good linearity ($r^2 > 0.99$). This method was precise (the intra and inter-day coefficient of variation was < 20% at two different concentrations (0.40 and 3.20 ng.mL⁻¹) and accurate (recovery ranged from 81 to 119%). The limits of detection obtained for BPA and its chlorinated derivatives ranged from 0.01 to 0.09 ng.mL⁻¹. The limit of quantification for all the compounds validated at 0.40 ng.mL⁻¹ when using 500 μ l of milk was found to be suitable for the concentration existing in real samples. The analytical method developed in this study is in accordance with

the requirements applicable to biomonitoring of BPA and its chlorinated derivatives in human breast milk.

keywords

Bisphenol A; bisphenol A chlorinated derivatives; human breast milk; UPLC-MS/MS

VII.1. INTRODUCTION

More than one hundred man-made chemicals have been found to disrupt the endocrine systems of animals, and human beings are likewise affected. Among these endocrine-disrupting chemicals (EDCs), bisphenol A (BPA) is one of the high-volume compounds produced, and it is widely used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins [1]. As a result, it may be found in many common consumer products and is abundantly retrieved in the environment leading to widespread exposure to BPA among the general population.

BPA toxicity has been intensively investigated over the past decade and although it shows only weak estrogenic activity, recent studies have demonstrated the effects attributable to even minute doses of BPA [2]. Due to its toxicity, human exposure to BPA needs to be closely assessed in order to evaluate the potential health risk arising from its different sources. With this consideration in mind, wide-ranging works have developed an analytical method of variable complexity meant to quantify BPA in numerous environmental settings. In these studies, BPA has been found throughout the environment: in natural water, air, dust, sewage, consumer products, food, drinking water, tickets... Moreover, as has been demonstrated in wastepaper recycling treatment plants [3], when released into the environment, BPA may produce chlorinated derivatives in the presence of free chlorine [4]. In addition, the estrogenic activity of chlorinated derivatives may be higher than in parent compounds [5].

In environmental health impact assessment, human exposure can be evaluated using through ultratrace level determination of micropollutants in biological fluids and tissues (i.e. biological monitoring or biomonitoring) [6]. Biomonitoring has been proven to be at least as valuable as environmental measures in the estimation of human exposure to environmental contaminants [7]. In this field, a number of authors have proposed analytical methods measuring trace levels of BPA in different biological matrices (urine, blood ...) and thereby

facilitating biomonitoring studies [8]. These different studies have employed analytical methods for BPA determination as wide-ranging as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), liquid chromatography coupled with fluorescence or electrochemical detection, gas chromatography with mass spectrometric detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Among the existing alternatives, tandem mass spectrometry is considered the most specific, accurate and precise detection method used to measure trace levels of environmental chemicals, particularly in complex biological matrices [9].

Human breast milk has been proposed in the assessment of human exposure to environmental chemicals [10], particularly to EDCs [11]. Human breast milk is conducive to biomonitoring studies due to both the possibility of non-invasive sampling and to the relatively large volumes available in the framework of large-scale biomonitoring programs [12]. Moreover, human breast milk may serve as a biomarker of both maternal and prenatal exposure to many different environmental chemicals. Human breast milk could at once be a major route of exposure for breastfed infants and a valuable biological fluid in assessment of exposure to BPA and its chlorinated derivatives. As a consequence, several papers have reported on methods of BPA quantification in human breast milk [13-17]. There does not exist a large amount of published data on quantification of BPA chlorinated derivatives and as far as we know, only a limited number of methods have been dedicated to their determination in biological media (plasma, adipose tissue, placental tissue and recently urine) [18-21]. Unlike BPA, determination of BPA chlorinated derivatives in human breast milk has not to our knowledge been the object of any published study.

Whatever be their purpose, the development and application of chemical measurement methods require implementation of rigorous quality assurance/quality control procedures in accordance with acknowledged guidelines. In the field of biomonitoring, several papers have made recommendations pertaining to the characteristics of a scientifically robust analytical method [7,22,23], with some of them focused on human breast milk biomonitoring [24,25]. It may be concluded that the ideal analytical method for assessment of human exposure to environmental chemicals, in particular BPA and its chlorinated derivatives, should be ultrasensitive, with LOD and LOQ suited to a low level of exposure, highly specific, reproducible, conducive to comparison of results, and simple enough to be successfully applied to a large number of samples. Moreover, such a method will scrupulously respect several reliability criteria such as accuracy (trueness and precision), cross-contamination and correct validation of LOD and LOQ. Several international institutions have proposed an

appropriate framework along with the attendant recommendations (NORMAN, FDA, ISO). However, most of the methods reported in the literature fail to provide sufficiently detailed data on these critical points. Concerning BPA, special attention has to be paid in order to avoid cross-contamination during the different steps of the assessment procedures [26]. And once again, it bears mentioning that most of the published data do not contain enough detailed information to ensure that no BPA contamination has occurred.

Given both the poor sensitivity of analytical techniques and BPA contamination arising from collection procedures, urinary concentrations of total BPA (free plus conjugated) have been proposed as a means of monitoring BPA exposure [27]. However, since conjugated BPA does not display any estrogenic activity, an issue has been raised as regards exposure assessment using total BPA, and that is yet another reason why every effort should be made to develop a method efficiently facilitating determination of unconjugated BPA in the media under consideration.

In light of these factors, we have fully developed a highly sensitive and accurate method to determine not only BPA, but also and for the first time the chlorinated derivatives of BPA, in human breast milk, using liquid-liquid extraction (LLE) followed by an online solid phase extraction-ultrahigh performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry method (SPE-UPLC-MS/MS).

VII.2. MATERIALS AND METHODS


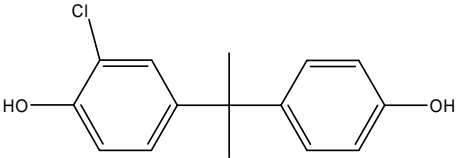
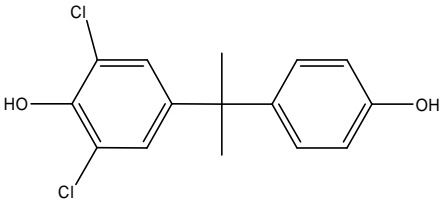
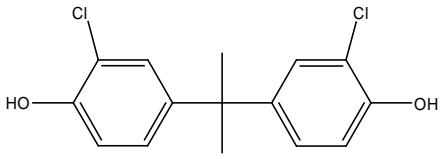
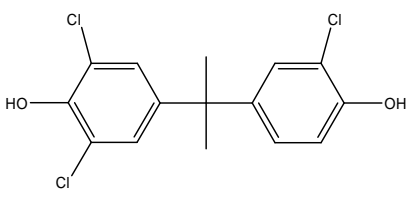
VII.2.a. Chemicals and reagents.

BPA (CAS 80-05-7) and internal standard (IS) bisphenol A-d₁₆ (CAS 96210-87-6) were obtained from Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, USA). Chlorinated BPA were custom synthesized by @rtMolecule (Poitiers, France). The chlorinated BPA (CBPA, 2,6-DCBPA, 2,2'-DCBPA and TCBPA) were obtained from bisphenol A or its suitably protected precursor with regard to phenol function by direct chlorination using sulfuryl chloride [28]. The purity obtained for these compounds was > 98%. The chemical structures of these compounds are shown in Table 1.

Of very high analytical grade quality, the methanol (Pestipur®) and water (Optima®) used during sample preparation were purchased from Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France) and Fisher (Illkirsch, France), respectively. The methanol used during LC-MS/MS analysis was LC-MS grade and supplied by Fisher (Illkirsch, France). Similarly, the water used during LC-MS/MS analysis was pre-treated and then purified by a SynergyTM system

(Millipore, Bedford, USA). Nitrogen alphasaz-1 was purchased from Air Liquide (Paris, France). All the solvents and reagents were tested to ensure that they were free of contamination from compounds.

Table 1- Chemical structure of BPA and its chlorinated derivatives

<i>Compound</i>	<i>Structure</i>
BPA	
2-chloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol CBPA	
2,6-Dichloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol 2,6-DCBPA	
2-chloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol 2,2'-DCBPA	
2,6-Dichloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenol TCBPA	

VII.2.b. Milk samples

The breast milk used in standard solutions and quality controls was collected, under a well-designed protocol (briefly described below), from multiple anonymous donors who had been breastfeeding for over 1 month in order to minimize the possible presence of target compounds. On the other hand and in view of assessing the validity of the analytical method, three breast milk samples were collected from donors under the same conditions but within a few days after delivery. All of the samples were obtained under strictly controlled collection. In order to avoid contamination of target compounds, the milk was drawn manually and directly in pre-treated glass tubes, without using any device, materials, wipes or gloves. All samples were kept frozen at -20°C until analysis.

VII.2.c. Preparation of standard solutions

A $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ methanol stock solution of each compound (BPA, CBPA, 2,6-DCBPA, 2,2'-DCBPA, TCBPA,) was stored at $+4^{\circ}\text{C}$. Extemporaneously, the initial stock solutions were diluted in methanol/water 50/50 (v/v) to obtain working standard solutions at 4, 8, 16, 32 and $64\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ used for spiked milk. Internal standard solution (BPA- d_{16}) was prepared in methanol/water 50/50 (v/v) at $32\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ from initial stock solution (200 mg/L).

VII.2.d. Sample preparation

Human milk was thawed and vortex mixed before use. Then, $50\text{ }\mu\text{l}$ of working standard solutions and $50\text{ }\mu\text{l}$ of IS were added to $500\text{ }\mu\text{l}$ of milk samples and homogenized by shaking. After that, 4 ml of methanol were added and the samples were vortexed for 1 min, sonicated for 10 min and centrifuged at $3500\times g$ for 10 min. Supernatants were evaporated at 60°C to dryness under a gentle nitrogen stream. Residues were dissolved in $1000\text{ }\mu\text{L}$ of water/methanol (70/30) solution. Finally, $50\text{ }\mu\text{l}$ of extract were injected onto the SPE-LC-MS/MS apparatus.

VII.2.e. On-line SPE-UPLC-MS/MS analysis

The concentrations of BPA and chlorinated derivatives were determined using a LC-MS/MS system consisting of an UPLC system Acquity® (Waters, Milford, USA), coupled to a Xevo® TQ triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, USA). An external six-port switching high pressure valve (Rheodyne® MXT 715-000 CIL, Ste Foy la Grande,

France), controlled by the work station, was inserted between the autosampler and the chromatographic column in order to switch on or off the SPE column in the chromatographic system. The SPE column was an Xbridge® C8 10 µm 2.1 x 30 mm (Waters, Milford, USA) and the UPLC column was an ACQUITY CSH™ C18 (1.7 µm particle size, 2.1 x 100 mm, Waters, Milford, USA).

Fifty microliters of the sample were loaded onto the SPE column using a 515 HPLC pump (Waters, Milford, USA), with MeOH/water (20/80) at a flow rate of 2 mL.min⁻¹. For 2 minutes, the SPE column was washed with MeOH/water (20/80). After that, the valve switched on the SPE column so that the analyte retained on the SPE column was back-eluted by the UPLC pump at a flow rate of 0.40 mL.min⁻¹. The gradient was programmed as follows: 2.0 to 2.5 min MeOH/water (50/50), then the amount of methanol increased linearly up to 90% (2.5 to 4.0 min) then up to 99% (4.0 to 4.5 min), then the methanol was kept constant at 99% during column clean up step (4.5 to 10 min), then the methanol linearly decreased to MeOH/water (50/50) (9.9 to 12 min), and the column equilibrated with MeOH/water 50/50 (10 to 13 min). Concomitantly, the valve switched in the initial position at 11 min and SPE column equilibrated with MeOH/water 20/80 at 2 mL.min⁻¹ for 2 minutes. The temperature of the chromatography column was maintained at 40°C in a column oven.

The MS-MS detector was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface, operating in negative ionization mode. Quantitative analysis was carried out in the multiple reaction monitoring mode (MRM), using two specific combinations of a precursor-product ion transition for each compound. Precursor product transitions along with their corresponding collision energies are shown in Table 2. MS/MS detector conditions were set as follows : source temperature 150°C; desolvation temperature 550°C, cone gas flow 50 L.Hr⁻¹, desolvation gas (nitrogen) 1000 L.Hr⁻¹; collision gas (argon) 0.28 mL.min⁻¹, capillary potential 3.5 V, cone potential -66V, extractor potential -29V.

VII.2.f. Method validation

BPA contaminations may arise from laboratory accessories, reagent, SPE procedure, or the apparatus. In order to avoid contamination, only pre-treated glassware (500°C, 5 h), teflon seals and high-quality solvent were used throughout the study.

Linearity of the chromatographic response was assessed on five different days using standard curves including 5 calibration points ranging from 0.40 to 6.40 ng.mL⁻¹.

Table 2- MS/MS parameters of BPA and its chlorinated derivatives

<i>Compound</i>	<i>Retention time (min)</i>	<i>MRM (m/z)</i>	<i>Cone voltage (V)</i>	<i>Collision energy (V)</i>	<i>Dwell time (s)</i>
BPA	4.6	227.0-211.9	38	18	0.150
		227.0-133.0	38	27	0.150
BPA-d ₁₆	4.6	241.1-223.1	38	20	0.120
		241.1-142.0	38	26	0.120
CBPA	4.7	260.1-181.9	41	27	0.007
		260.1-209.9	41	24	0.007
DCBPA	4.9	294.9-215.9	37	30	0.015
		294.9-243.9	37	24	0.015
2,2'-DCBPA	4.9	294.9-166.9	37	24	0.015
TCBPA	5.0	328.8-249.9	44	30	0.020
		328.8-277.8	44	25	0.020

Sample concentrations were determined for each compound using the corresponding spiked milk standard curve calibration. Calibration curves were constructed using compounds/IS peak area ratio versus compound concentration. BPA-d₁₆ was used as an internal standard for all target compounds since the corresponding labeled standards were not readily available.

Accuracy was determined by analysis of quality controls performed using human breast milk (exempt from target compounds) spiked at two different concentrations (0.40 ng.mL⁻¹ and 3.20 ng.mL⁻¹).

Intra-day coefficient of variation was obtained with replicates of quality control sample at 0.40 ng.mL⁻¹ (n=5) and 3.20 ng.mL⁻¹ (n=3). Inter-day coefficient of variation was obtained from experiments performed on five separate days of quality control sample at 0.40 ng.mL⁻¹ and 3.20 ng.mL⁻¹.

The limit of detection (LOD) was defined according to NORMAN guidelines based on ISO/DIS 13530 as three times the standard deviation of a blank sample of human breast milk [29]. According to several guidelines, the limit of quantification (LOQ), set at the level of the lowest calibration standard, was fully validated using quality controls performed using milk samples spiked at this low concentration.

VII.3. RESULTS AND DISCUSSION

VII.3.a. Method optimization

Several studies have likewise reported BPA contamination from reagents or solvents or leaching from the materials during sampling, storage, processing, and analysis [8, 26, 30]. Therefore, special attention should be paid when proceeding. In the present study, use of high-purity solvents along with glass instead of plastics, and the comprehensive implantation of specific purification procedures allowed us to eliminate BPA contamination. Chromatograms of a blank solvent are presented in Fig. 1. While BPA was detected in some of the pooled breast milk used for standards and quality controls, it was always at a level markedly lower than the limit of quantification (between 0 and 0.12 ng.mL^{-1}) and has been taken into account in the calculation method (Fig. 2). To summarize, the BPA/IS peak area ratio of blank milk was subtracted from the BPA/IS ratio of each standard used to construct the calibration curve. On the other hand, no BPA chlorinated derivatives were detected in any of the pooled breast milk.

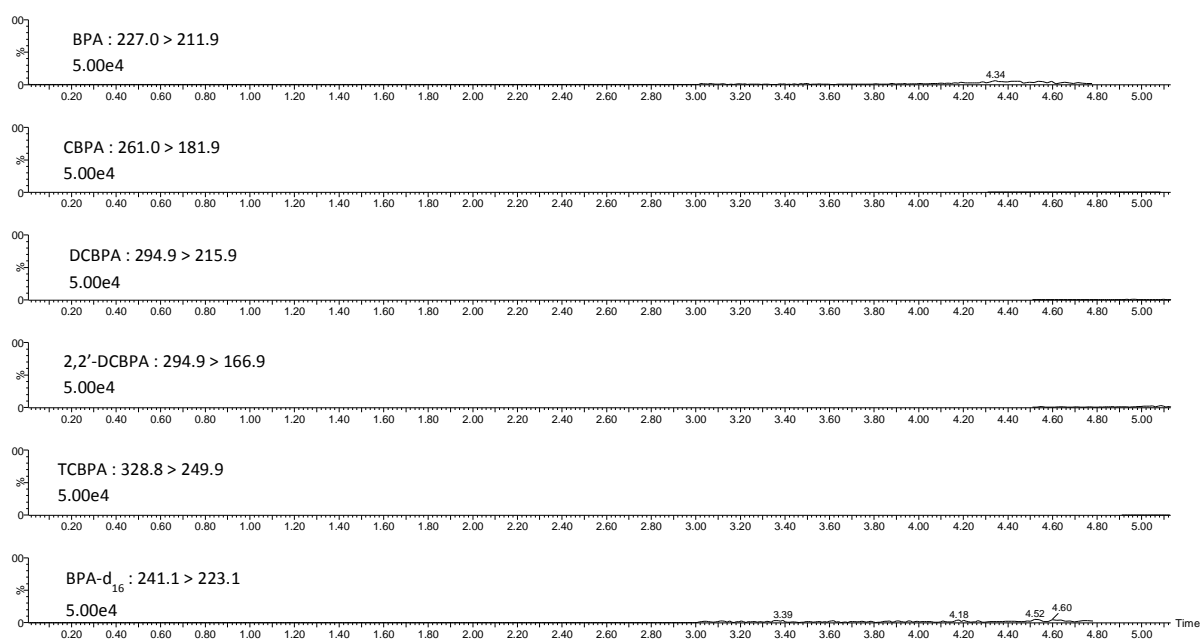


Fig. 1- Chromatograms of a blank solvent.

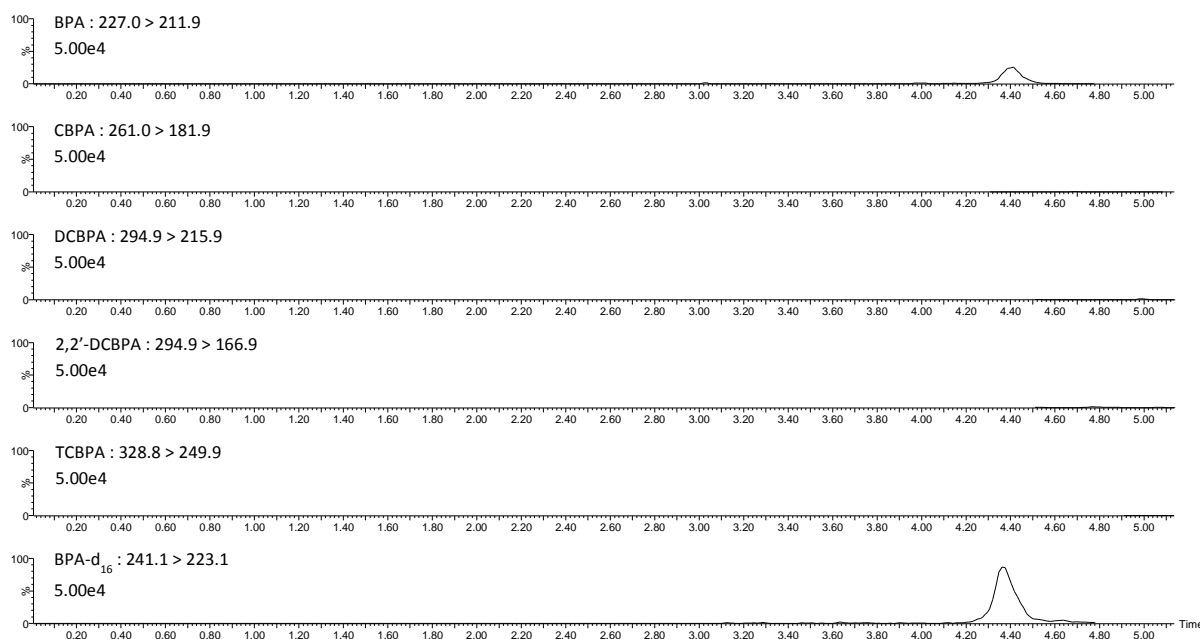


Fig. 2- Chromatograms of a blank milk containing BPA at a low level (0.10 ng.mL⁻¹).

Only a limited number of studies have reported analytical methods of BPA quantification in human breast milk. One of them used ELISA [15] but due to the non-specificity of the anti-BPA antibody, cross-reactivity may occur. Moreover, the mean concentration of BPA determined in this study was higher than in others; as previously shown, this may have been due to its having been overestimated [31]. Consequently, ELISA cannot be considered suitable for BPA exposure monitoring [8]. Among the other papers, some used fluorescence detection [13,16] or GC-MS [17], whereas only one study employed the isotope dilution tandem mass spectrometry method [14] so as determine BPA. On the other hand, to our knowledge, no study has been published concerning the determination of BPA chlorinated derivatives in human breast milk. Moreover, there does not exist a substantial amount of published data on quantification of BPA chlorinated derivatives. As far as we know, few methods have been suggested as means of determining chlorinated BPA in biological fluids (plasma, adipose tissue, placental tissue and, recently, urine) and not all of them have used the isotope dilution tandem mass spectrometry method. This work is consequently the first to put forward an analytical method adapted to large-scale biomonitoring studies aimed at assessing exposure to BPA and its chlorinated derivatives through use of human breast milk.

BPA chlorination may provide two dichlorobisphenol A isomers (2,2'-DCBPA + 2,6-DCBPA, Table 1). Since the response in mass spectrometry is structurally dependent,

accurate determination of these two isomers requires the use of pure synthetic reference compounds for calibration [32]. Contrarily, use of a mixture or only one of the isomers as a calibration standard of dichlorobisphenol A may provide biased results [33]. To our knowledge, no independent determination of both dichlorobisphenol A isomers existed prior to the present study. Under our chromatographic conditions, the two isomers could not be separated.

Moreover, if a specific transition was available for quantitation of 2,2'-DCBPA, no specific transition providing sufficient intensity was found to be available for 2,6-DCBPA. On the other hand, two transitions were shared by the two isomers, which produced the same signal intensity and enabled quantification of the total amount of DCBPA (2,2'-DCBPA + 2,6-DCBPA) (Table 2). Finally, quantification of 2,6-DCBPA was obtained by subtracting the amount of 2,2'-DCBPA from the total DCBPA obtained. In this way, we were able to independently quantify both dichlorobisphenol A isomers.

VII.3.b. Matrix effects and extraction recovery

Even though liquid chromatography with MS/MS detection is considered the method of choice in quantitative determination of environmental chemicals in biological fluids, matrix effects may compromise accuracy [34]. Nevertheless, most of the published papers dealing with BPA or BPA and its chlorinated derivatives do not mention matrix effects, which were observed on a significant scale during our experiments and led to correspondingly significant signal intensity inhibition. Several approaches involving sample preparation (LLE, SPE, SPE online), LC separation (UPLC), or use of isotopically labeled standards may help to overcome these effects [33]. In this study, we coupled UPLC to tandem mass spectrometry, but even after LLE plus online SPE, significant matrix effects were still observed. While BPA-d₁₆ was used as internal standard, corresponding labeled compounds were not readily available for BPA chlorinated derivatives, so we decided to attempt another approach in order to compensate for matrix effects and to guarantee accuracy. Since sample dilution (the so-called dilute and shoot procedure) has been proposed as a strategy to reduce matrix effects [35], we evaluated the impact on matrix effects of the dilution of samples prior to injection, thereby increasing the volume used to dissolve the residue obtained after LLE. Following LLE extraction, blank samples of human breast milk (n=3) were spiked at 3.20 ng.mL⁻¹ and then diluted using different volumes of mobile phase (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mL) before injecting onto SPE-UPLC-MS/MS. Reconstitution with 1.0 mL of mobile phase yielded

complete recovery of the signal for all the target compounds, compared to a standard injected under the same conditions. However, due to the variability of human breast milk composition, matrix effect may still exist. Therefore, the use of isotopically labeled standards should be maintained.

Finally, online SPE recovery was assessed by comparing the response obtained after direct injection ($n=3$) of a standard solution at 3.20 ng.mL^{-1} to the response obtained after injection onto SPE-UPLC-MS/MS of the same standard. Levels of extraction recovery greater than 80% were obtained for the five target compounds compared to direct injection of the same samples onto UPLC-MS/MS.

VII.3.c. Analytical performance

Calibration curves of BPA and chlorinated BPA provided adequate linearity as shown by the correlation coefficients, which are greater than 0.99. Chromatograms of a milk standard spiked at 0.8 ng.mL^{-1} are presented in Fig. 3. The validation results for the method proposed in this study are presented in Table 3. Trueness of the five target compounds ranged from 81 to 119% and their precision was equally satisfactory, as evidenced by RSD values $\leq 20\%$. Moreover, these results are consistent with the current accepted guidelines, especially those applied in the field of bioanalytical or environmental chemistry [29,36].

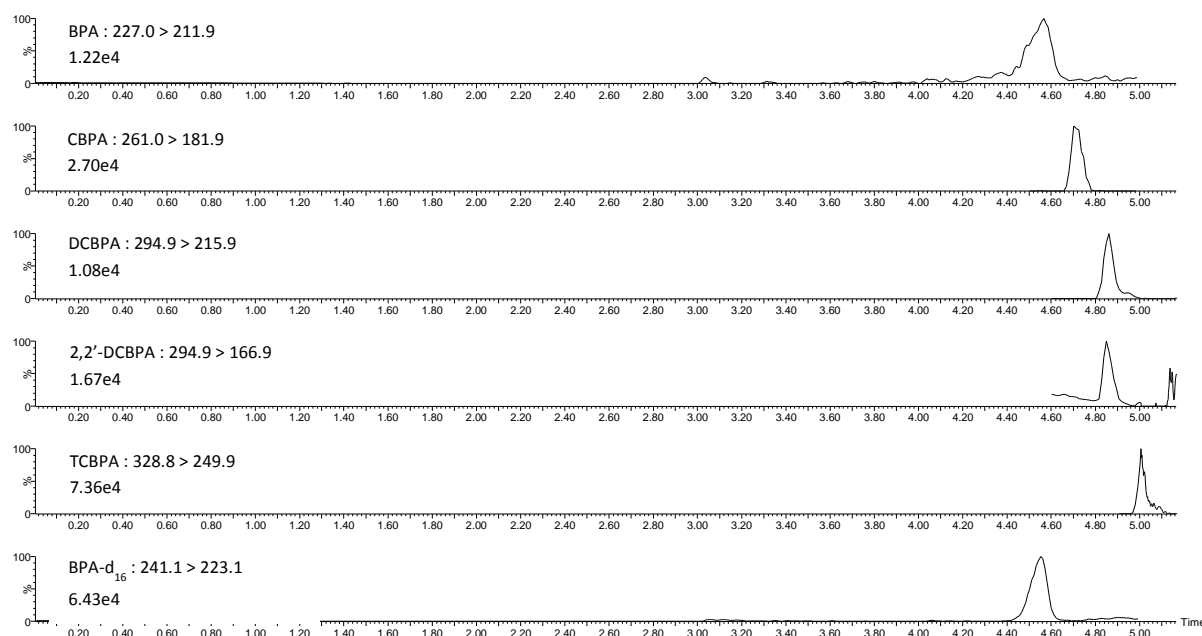


Fig. 3- Chromatograms of a milk standard spiked at 0.8 ng.mL^{-1} .

Table 3- Analytical performance parameters

<i>Compound</i>	<i>LOQ^a</i> (ng.mL ⁻¹)	<i>LOD^b</i> (ng.mL ⁻¹)	<i>Spiked</i> <i>Concentration</i> (ng.mL ⁻¹)	<i>Intra-day mean (n=5)</i>		<i>Inter-day mean (n=13)</i>	
				<i>Trueness^c</i> (%)	<i>Precision^d</i> (%)	<i>Trueness^c</i> (%)	<i>Precision^d</i> (%)
BPA	0.40	0.09	0.40	101	15	103	11
			3.20	93	1	98	14
CBPA	0.40	0.01	0.40	90	6	98	15
			3.20	81	15	99	17
2,6-DCBPA	0.40	0.05	0.40	81	18	98	19
			3.20	107	20	92	16
2,2'-DCBPA	0.40	0.05	0.40	91	6	103	15
			3.20	119	2	107	15
TCBPA	0.40	0.04	0.40	103	18	109	14
			3.20	91	7	97	15

^alimit of quantification, ^blimit of detection, ^cExpressed as [(mean observed concentration) / (nominal concentration)] x 100, ^dExpressed as relative standard deviation

The estimated LOD obtained for BPA and its chlorinated derivatives ranged from 0.01 ng.mL⁻¹ to 0.09 ng.mL⁻¹ (Table 3). While other studies have proposed lower LOD for BPA, particularly rigorous determination of LOD was performed in this work, as should be the case in any development of an analytical method suitable for biomonitoring studies in which concentration levels below the LOD have got to be statistically treated. Therefore, merely reporting measurements <LOD as non-detectable is not adequate, and it is clearly imperative that a precise number be assigned. Nevertheless, in many biomonitoring papers, the method used to determine LOD is missing or poorly described. The S/N method is frequently proposed so as to estimate BPA LOD in human breast milk, and other researchers have used standard deviation of a low-level standard. As regards BPA quantification, these methods fail to take into account potential background contaminations. Therefore, LOD estimation would be improved through use of a blank sample (i.e. non-fortified media) in order to determine a value that statistically differs from zero, as proposed by the method applied in this study.

In this study, the LOQ determined for BPA was set at 0.40 ng.mL⁻¹. Only one paper has reported a better LOQ (0.21 ng.mL⁻¹) using GC-MS analysis, but this study proposed a highly time-consuming sample preparation step and required a relatively large volume of milk (25 g). The other authors did not report any LOQ or LOQ greater than the one validated in this study, in which chlorinated BPA presents the same LOQ, set at 0.40 ng.mL⁻¹. Whereas no data are available concerning LOQ of BPA chlorinated derivatives in human breast milk, most of the studies carried out with other biological matrices reported equivalent LOQ. One

of them reported better LOQ, but it had been determined in standard solution not using spiked matrix.

VII.3.d. Method application

Fig.4 shows a chromatogram obtained from a human breast milk sample collected within a few days after delivery in which BPA and some of its chlorinated derivatives were found. BPA, 2,2'-DCBPA, 2,6-DCBPA and TCBPA have been detected and/or quantified in the three samples analyzed, but none of them were found to contain CBPA (Table 4).

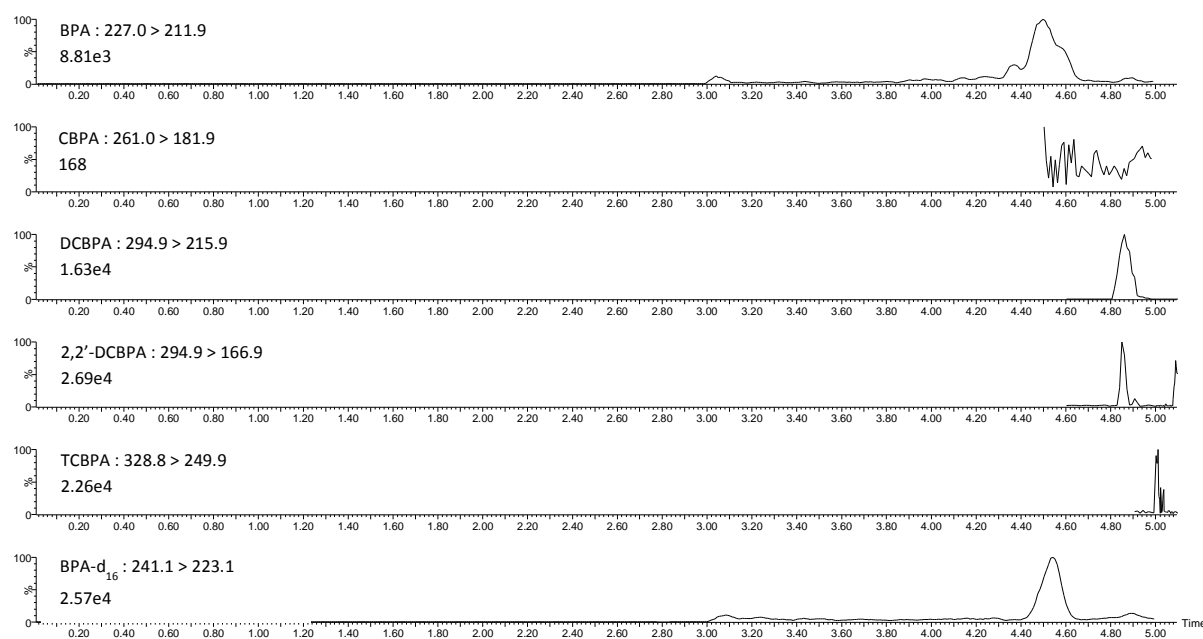


Fig. 4- Chromatograms of milk sample n°3.

Table 4- Concentration (ng.mL⁻¹) of BPA and its chlorinated derivatives in three human breast milk samples

<i>Samples</i>	<i>BPA</i>	<i>CBPA</i>	<i>2,2'-DCBPA</i>	<i>2,6-DCBPA</i>	<i>TCBPA</i>
milk 1	0.80	<LOD ^a	1.09	0.97	<LOD ^a
milk 2	3.29	<LOD ^a	4.13	<0.40	0.68
milk 3	3.07	<LOD ^a	<0.40	1.40	<LOD ^a

^alimit of detection

VII.4 CONCLUSION

Comparability and reliability of monitoring data are essential to any meaningful environmental exposure assessment involving the management of environmental risks. With

regard to emerging pollutants, there is cause for concern as to the comparability of data at the international level. Generally speaking, the methods used when monitoring emerging pollutants have yet to be validated to a sufficient extent.

It bears mentioning, in this respect, that the chemist has a particular responsibility to assume in ensuring the reliability of the results obtained in biomonitoring studies. Bearing this basic exigency in mind, the method comprehensively developed and validated in this study provides ultrasensitive quantification allowing for reliable determination of BPA and its chlorinated derivatives, while the reported LOD and LOQ are altogether consistent with the concentrations observed in actual human breast milk. Full observance of the requirements mentioned above is essential to assessment of exposure to BPA and its chlorinated derivatives for individuals, along with the major decision-makers in public health.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to Pascale Pierre-Eugène and Elodie Verzeni for their help as technical assistants. We are also grateful to the “Water Program” from the University of Poitiers for its financial contribution to the project. We likewise wish to thank Jeffrey Arsham for his highly helpful reading of our original text. Finally, we wish to thank all the generous milk donators along with Professor Fabrice Pierre and Claire Ydier for their assistance in breast milk collection.

REFERENCES

- [1] L.N. Vandenberg, R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, W.V. Welshons, *Reprod. Toxicol.* 24 (2007) 139-177.
- [2] L.N. Vandenberg, T. Colborn, T.B. Hayes, J.J. Heindel, D.R. Jacobs, Jr., D.H. Lee, T. Shioda, A.M. Soto, F.S. Vom Saal, W.V. Welshons, R.T. Zoeller, J.P. Myers, *Endocr. Rev.* 33 (2012) 378-455.
- [3] H. Fukazawa, M. Watanabe, F. Shiraishi, H. Shiraishi, T. Shiozawa, H. Matsushita, Y. Terao, *J. Health Sci.* 48 (2002) 242-249.
- [4] H. Gallard, A. Leclercq, J.P. Croue, *Chemosphere* 56 (2004) 465-473.
- [5] H. Takemura, J. Ma, K. Sayama, Y. Terao, B.T. Zhu, K. Shimoi, *Toxicology* 207 (2005) 215-221.
- [6] L.L. Needham, A.M. Calafat, D.B. Barr, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 210 (2007) 229-238.
- [7] M.N. Bates, J.W. Hamilton, J.S. LaKind, P. Langenberg, M. O'Malley, W. Snodgrass, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 1615-1621.
- [8] W. Dekant, W. Volkel, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228 (2008) 114-134.
- [9] L.L. Needham, D.G. Patterson, D.B. Barr, J. Grainger, A.M. Calafat, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 397-404.
- [10] C.M. Berlin, J.S. LaKind, S.E. Fenton, R.Y. Wang, M.N. Bates, R.L. Brent, M. Condon, B.L. Crase, M.L. Dourson, A.S. Ettinger, B. Foos, P. Furst, G.P. Giacoia, D.A.

- Goldstein, S.G. Haynes, K.D. Hench, S. Kacew, G. Koren, R.A. Lawrence, A. Mason, M.A. McDiarmid, G. Moy, L.L. Needham, I.M. Paul, L.C. Pugh, Z. Qian, L. Salamone, S.G. Selevan, B. Sonawane, A.J. Tarzian, M. Rose Tully, K. Uhl, J. Toxicol. Environ. Health A 68 (2005) 1825-1831.
- [11] M. Stefanidou, C. Maravelias, C. Spiliopoulou, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 9 (2009) 269-276.
- [12] R. Smolders, K.W. Schramm, M. Nickmilder, G. Schoeters, *Environ. Health*, 8 (2009) 8.
- [13] Y. Sun, M. Irie, N. Kishikawa, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 501-507.
- [14] X. Ye, A.M. Bishop, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Chim. Acta* 831 (2006) 110-115.
- [15] R. Kuruto-Niwa, Y. Tateoka, Y. Usuki, R. Nozawa, *Chemosphere* 66 (2007) 1160-1164.
- [16] B. Yi, C. Kim, M. Yang, *J chromatogr B*, 878 (2010) 2606-2610.
- [17] H. Otaka, A. Yasuhara, M. Morita, *Anal Sci* 19 (2003) 1663-1666.
- [18] I. Jimenez-Diaz, A. Zafra-Gomez, O. Ballesteros, N. Navea, A. Navalon, M.F. Fernandez, N. Olea, J.L. Vilchez, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 3363-3369.
- [19] M. del Olmo, A. Zafra, B. Suarez, A. Gonzalez-Casado, J. Taoufik, J.L. Vilchez, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 167-172.
- [20] M.F. Fernandez, J.P. Arrebola, J. Taoufik, A. Navalon, O. Ballesteros, R. Pulgar, J.L. Vilchez, N. Olea, *Reprod. Toxicol.* 24 (2007) 259-264.
- [21] C. Liao, K. Kannan, *Environ.Sci. Technol.* 46 (2012) 5003-5009.
- [22] R. Smolders, K.W. Schramm, U. Stenius, J. Grellier, A. Kahn, T. Trnovec, R. Sram, G. Schoeters, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 12 (2009) 107-123.
- [23] A.M. Calafat, L.L. Needham, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1481-1485.
- [24] J.S. LaKind, R.L. Brent, M.L. Dourson, S. Kacew, G. Koren, B. Sonawane, A.J. Tarzian, K. Uhl, *J. Toxicol. Environ. Health A* 68 (2005) 1713-1769.
- [25] L.L. Needham, R.Y. Wang, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) A317-A324.
- [26] Y. Watabe, T. Kondo, H. Imai, M. Morita, N. Tanaka, K. Hosoya, *Anal. Chem.* 76 (2004) 105-109.
- [27] A. Calafat, Background paper on BPA biomonitoring and biomarker studies; FAO/WHO Expert Meeting on Bisphenol A (BPA) Food and Agriculture Organization of the United nation World health Organization:2010.http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/6.1_bpa_biomonitoring_and_biomarker_studies.pdf (accessed june 15th, 2012).
- [28] G.X. Yu, H.J. Mason, K. Galdi, X.M. Wu, L. Cornelius, N. Zhao, M. Witkus, W.R. Ewing, J.E. Macor, *Synthesis* (2003) 403-407.
- [29] D. Schwesig, U. Borchers, L. Chancerelle, A. Duffek, U. Eriksson, A. Goksøyr, M. Lamoree, P.P. Lepom, P. Leonards, D. Leverett, M. McLachlan, V. Poulsen, R. Robinson, K. Silharova, P. Tolgyessy, J. Wegener, D. Westwood, 2009. Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants; Protocol for the validation of chemical and biological biomonitoring methods. http://www.norman-network.com/public_docs/norman_v1_v2_v3_version_02_final_feb2009.pdf (accessed june 15th, 2012).
- [30] D.A. Markham, J.M. Waechter, M. Wimber, N. Rao, P. Connolly, J.C. Chuang, S. Hentges, R.N. Shiotsuka, S. Dimond, A.H. Chappelle, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 293-303.

- [31] H. Fukata, H. Miyagawa, N. Yamazaki, C. Mori, *Toxicol. Mech. Methods*, 16 (2006) 427-430.
- [32] S. Rabouan, A. Dupuis, A. Cariot, M. Albouy-Llaty, V. Migeot, *Trends Anal. Chem.*, 37 (2012) 112-127.
- [33] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, *Mass spec. rev.* 29 (2010) 776-805.
- [34] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019-3030.
- [35] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1474-1782.
- [36] US Department of health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, 2001.

CHAPITRE VIII : MISE EN EVIDENCE DU BISPHEENOL A ET SES DERIVES CHLORES DANS LE COLOSTRUM DE FEMMES

En préparation

Résumé

Le Bisphenol A (BPA) est un produit chimique utilisé en masse dans l'industrie depuis ces dernières décennies. Il a montré son effet toxique comme perturbateur endocrinien. Dans l'eau potable, le chlore réagit avec le bisphénol A pour former des dérivés chlorés ayant une activité œstrogénique importante. Cette étude a quantifié le BPA et ses dérivés chlorés dans le colostrum de 21 femmes afin d'évaluer la contribution de l'eau dans la contamination par le BPA. La quantification de ces composés a été déterminée par dilution isotopique et en utilisant une SPE-LC-MS/MS. Les 21 femmes ont rempli un questionnaire évaluant l'exposition à l'eau et au BPA et ses dérivés chlorés. Le BPA a été détecté dans 19 colostrums et ses dérivés chlorés dans 21 colostrums. Les concentrations moyennes étaient de $1,87 \pm 1,38 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=19), $1,87 \pm 1,23 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=7), $1,56 \pm 0,74$ (n=18) ng.mL^{-1} et $0,68 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=1) pour le BPA, ses 2 dichloro et le trichloro-BPA respectivement. L'exposition des femmes à l'eau, déterminée par le questionnaire, était en accord avec la bibliographie. Aussi, aucune des femmes n'étaient dans des conditions de surexposition aux BPA et ni à ses dérivés chlorés. Nos résultats montrent que la non prise en compte de la formation de BPA chlorés dans l'eau sous estime le rôle du milieu aquatique dans la toxicité humaine du BPA.

OCCURRENCE OF BISPHENOL A AND ITS CHLORINATED DERIVATIVES IN HUMAN COLOSTRUM

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a widespread industrial chemical which over the past decade has demonstrated its toxicity as an endocrine disruptor. Chlorine present in drinking water may react with BPA to form chlorinated derivatives, which have demonstrated a heightened level of estrogenic activity. The study assessed BPA and its chlorinated derivatives in the colostrum of 21 women in order to assess water contribution of BPA contamination. The quantification of the compounds was determined using on-line SPE-UPLC-MS/MS and isotope dilution method. In addition, the 21 women completed a questionnaire on the day of colostrum collection that covers exposure to water as well as specific exposure to BPA and its chlorinated derivatives. BPA was detected in 19 colostrums and chlorinated derivatives in 21 colostrums. Mean concentrations were $1.87 \pm 1.38 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=19), $1.87 \pm 1.23 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=7) and 1.56 ± 0.74 (n=18) ng.mL^{-1} and 0.68 ng.mL^{-1} (n=1) for BPA, the two dichloro-BPA and trichloro-BPA respectively. Exposure to water evaluated by the questionnaire was in agreement with the bibliography. None of these women were in situations that could have overexposed them to BPA and its chlorinated derivatives. Our results show that failure to take into account the production of BPA chlorinated derivatives in water may lead to underestimation of the relevance of an aquatic environment as a source of BPA toxicity detrimental to human health.

VIII.1. INTRODUCTION

Bisphenol A (BPA) is of major concern to environmental public health due to its demonstrated toxicity and its high potential with regard to human exposure (European Union, 1997, Kang *et al.*, 2006).

BPA toxicity has been intensively investigated over the past decade, and it is now widely considered to have an estrogenic effect. Extensive literature has shown adverse effects on animals following exposure to even a low dose of BPA, including developmental and reproductive toxicity, altered body weight, cancers and abnormally early puberty (Vandenberg *et al.*, 2010, Vandenberg *et al.*, 2012). As for adverse health effects in humans, they are still being debated, and are suspected in diabetes, cardiovascular diseases and with regard to reproductive systems (oocyte maturation) (ANSES, 2011).

Fetuses and newborn babies are especially at risk of BPA, which is able to cross the placental barrier (Ikezuki *et al.*, 2002). More generally, organisms in early stages of development are quite sensitive to changes induced by endocrine disruptors (Foster, 1998, Birnbaum & Fenton, 2003, ANSES, 2011). Toxic effects of BPA during pregnancy and the neonatal period have been demonstrated in animals, even at very low doses found to be compatible with human exposure (Kabuto *et al.*, 2004, Salián *et al.*, 2009a, b).

BPA is frequently used in production of polycarbonate resins (66 %) and epoxy resins (30 %), which are components of many commonly available consumer products (Plastics Europe, 2007). While polycarbonate resin is used, especially in food and drink containers and in compact discs, epoxy resins are used for coatings such as corrosion protectors in food and beverage cans. BPA is also a component of resin epoxy, which is employed as a dental composite (dental fillings and sealing agent) (Fleisch *et al.*, 2010).

BPA has been found throughout the environment: in air, dust, sewage, consumer products, food, drinking water, tickets.... Numerous studies have focused on possible BPA exposure from dietary sources via food and packaging material or from work contact in industries producing or using BPA (Vandenberg *et al.*, 2007). Moreover, water can be a potential route of exposure to BPA since it is continuously introduced into the aquatic environment by means of industrial, agricultural and municipal effluents. Occurrences of BPA have been widely reported in various aqueous media around the world (Flint, 2012): surface water, drinking water from drinking water treatment plants, bottled water, household tap water... (Li *et al.*, 2010, Sodre *et al.*, 2010, Santhi *et al.*, 2012). Most of these studies consider that regarding BPA contamination, the share of water is generally negligible. However, none of these data have taken into account the other uses of water, than drinking

Given the fact that in most drinking water treatment plants, routine operations are concluded by a chlorination step, the formation of chlorinated derivatives of BPA (mono-, di-, tri- and tetra-chlorobiphenol A) in drinking water is to be expected (Yamamoto & Yasuhara, 2002, Gallard *et al.*, 2004). Furthermore, various forms of chlorinated BPA (mono-, di-, tri-, tetra- chloro BPA) have been detected in wastewater from waste paper recycling plants (Fukazawa *et al.*, 2001, Fukazawa *et al.*, 2002). With the exception of tetra-chloro-BPA, BPA derivatives are not used in industrial activity (Polo *et al.*, 2006). Consequently, the only source of production of chlorinated derivatives is likely to be chlorine-treated water. Last but not least, estrogenic activity in chlorinated derivatives (mono-BPA, di-BPA, tri-chloro BPA)

may be higher than in parent compounds (Fukazawa *et al.*, 2002, Hu *et al.*, 2002, Kuruto-Niwa *et al.*, 2002, Tabata *et al.*, 2004, Takemura *et al.*, 2005), once again with the exception of tetra-chloro-BPA, which presents less estrogenic activity than the others, or none at all. The chlorinated derivatives present in biological matrices may verify hypothesized BPA exposure from water.

The aim of this work is to investigate the presence of chlorinated derivatives of BPA in human biological matrices (i.e. colostrum) in order to verify the hypothesis that water is far from negligible with regard to the health effect represented by BPA. With this in mind, we quantified BPA and its chlorinated derivatives in the colostrums of 21 women. Exposure to BPA and its chlorinated derivatives was assessed by a means of questionnaire.

VIII.2. METHODS

VIII.2.a. Subjects and sample collection

Twenty-one human colostrums were collected from healthy women at the university hospital of Poitiers (France) from April to October 2011. Eligible subjects included were ≥ 18 years of age, expected to be in hospital for at least 3 days after delivery, practiced breastfeeding and were part of the social security system. All women signed the informed consent form after having received an explanation of the study. Approval was obtained from the local ethics committee of the university hospital of Poitiers.

The samples were collected by a student midwife within three days after delivery. All of the samples were obtained under strictly controlled collection. In order to avoid contamination of target compounds, the milk was drawn manually and directly in pre-treated glass tubes, without using any device, materials or gloves. All samples were kept frozen at -20°C until analysis.

VIII.2.b. Materials and methods

BPA and four chlorinated derivatives [monochloro- (CBPA) dichloro- (2,2'-DCBPA and 2,6-DCBPA) and trichloro-bisphenol A (TCBPA)] were analysed in milk samples using an on-line isotope dilution SPE-UPLC-MS-MS. The method of quantification of BPA and its chlorinated derivatives in human milk had previously been developed and validated (Cariot *et al.*, 2012). To summarize, 500 μl of milk was first spiked by the internal standard (BPA-d16). Then, the BPA and its chlorinated derivatives were extracted by 4 mL of methanol. After

centrifugation, the supernatants were evaporated to dryness and the residues were dissolved in 1000 μL of water/methanol. Finally, 50 μL of extract were injected onto the SPE-LC-MS/MS apparatus.

The LC-MS/MS system consisted of an UPLC system Acquity[®] (Waters, Milford, USA), coupled to a Xevo[®] TQ triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, USA). The SPE column was an Xbridge[®] C8 10 μm 2.1 x 30 mm (Waters, Milford, USA) and the UPLC column was an ACQUITY CSH[™] C18 (1.7 μm particle size, 2.1 x 100 mm, Waters, Milford, USA). The target compound were extracted by the on-line SPE column and then separated by a gradient of methanol/water.

The MS-MS detector was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface, operating in negative ionization mode. Quantitative analysis was carried out in the multiple reaction monitoring mode (MRM), using two specific combinations of a precursor-product ion transition for each compound.

Since BPA is a ubiquitous contaminant in the laboratory environment, care was taken to avoid contact with plastics, and only pre-treated glassware (500°C, 5 h), teflon seals and high-quality solvent were used throughout the study.

The limits of quantification (LOQ) were validated at 0.40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for all the compounds. The limits of detection were 0.09, 0.01, 0.05 and 0.04 for BPA, CBPA, DCBPA and TCBPA respectively.

Calibration curves were regularly checked during analyses for linearity ($r^2 \geq 0.99$). Moreover, quantification of quality control (0.4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 3.2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) was regularly performed during colostrum sample analysis (trueness ranged from 80 to 120 %, precision \leq 20 %).

VIII.2.c. Assessment of exposure

The day of sampling, a questionnaire was distributed to the women in order to obtain information on water exposure as well as specific exposure to BPA and its chlorinated derivatives.

The characteristics of the women included age, parity and body mass index (BMI) calculated as $\text{weight}/(\text{height})^2$.

In order to determine specific exposure to BPA, the women were asked to mention and detail any dental care they had undergone over the previous month; they also had to provide information pertaining to their professions. Finally, participants were requested to indicate whether or not they had any experience working in either dental clinics or factories producing plastics, DVDs, CDs, paper or food packaging.

Exposure to water included both intake and contact. In order to estimate water intake, they were asked how many cups of tap water and bottle water they consumed each day. Water included all cold and hot beverages. Bottled water included all water purchased in bottles (spring water, mineral water ...). We considered one bottle of 1.5 L to represent 7 cups, while a bowl represented 3 cups. Contact with water was evaluated in terms of frequency and duration of baths and showers taken at home and time spent at a swimming pool. In order to further detail their contact with water, they were asked to indicate whether or not they had a home swimming pool, how its water was treated, and whether or not their work entailed contact with water (swimming pool attendant, hairdresser, cook...).

VIII.3. RESULTS

VIII.3.a. Concentration of BPA and its chlorinated derivatives in women's colostrums

BPA, 2,2'-DCBPA, 2,6-DCBPA and/or TCBPA were detected in all of the colostrums analyzed, but none of them were found to contain CBPA (Table1)

The mean quantified concentration of BPA in the colostrum was $1.87 (\pm 1.38) \text{ ng.mL}^{-1}$ and the median was 1.47 ng.mL^{-1} . Among chlorinated derivatives, DCBPA was the most frequently and abundantly found in the colostrum. Means of quantified concentrations of 2,2'-DCBPA and 2,6-DCBPA were $1.87 (\pm 1.23)$ and $1.56 (\pm 0.74) \text{ ng.mL}^{-1}$ respectively. The median concentrations were 1.62 and 1.40 ng.mL^{-1} for 2,2'-DCBPA and 2,6-DCBPA respectively.

Table 1: Concentration of BPA and its chlorinated derivatives in the 21 colostrums in ng.mL⁻¹ and characteristics of the 21 women.

<i>Colostrum</i>	<i>BPA (ng.mL⁻¹)</i>	<i>CBPA (ng.mL⁻¹)</i>	<i>2,2'- DCBPA (ng.mL⁻¹)</i>	<i>2,6- DCBPA (ng.mL⁻¹)</i>	<i>TCBPA (ng.mL⁻¹)</i>	<i>Age (years)</i>	<i>BMI^c (kg.m⁻²)</i>	<i>Dental care</i>	<i>Bottled water consumed per day (L/day)</i>	<i>Tap water consumed per day (L/day)</i>	<i>Times per week of dermal exposure to water (showering, bathing, swimming) (min)</i>
W1	1.54	< LOD ^a	0.96	1.13	< LOD ^a	29	21,4	no	0.6	2.4	70
W2	0.54	< LOD ^a	<LOD	<0.4	<0.4	38	19,5	no	1.4	1.8	70
W3	1.26	< LOD ^a	<0.4	1.62	< LOD ^a	37	25,0	no	0.0	1.5	630
W4	0.65	< LOD ^a	< LOD ^a	1.41	< LOD ^a	31	26,3	Care of caries	0.0	3.6	325
W5	3.45	< LOD ^a	< LOD ^a	1.27	< LOD ^a	30	20,9	no	1.4	0.2	280
W6	0.80	< LOD ^a	1.09	0.97	< LOD ^a	39	26,2	Molar extraction	1.4	2.6	105
W7	3.29	< LOD ^a	4.13	<0.4	0.68	35	22,0	Ceramic and metal crown	0.0	1.2	70
W8	< LOD ^a	< LOD ^a	1.62	2.82	< LOD ^a	34	21,6	no	0.0	2.4	64
W9	1.47	< LOD ^a	2.82	1.21	< LOD ^a	38	25,7	scaling	0.0	1.8	28
W10	2.14	< LOD ^a	0.62	2.08	< LOD ^a	34	18,8	no	0.4	2.8	95
W11	1.75	< LOD ^a	< LOD ^a	2.77	< LOD ^a	32	27,5	no	2.0	1.0	105
W12	< LOD ^a	< LOD ^a	< LOD ^a	1.80	< LOD ^a	28	22,5	no	0.0	3	70
W13	2.44	< LOD ^a	< LOD ^a	1.51	< LOD ^a	30	18,8	no	0.8	1.6	70
W14	0.83	< LOD ^a	< LOD ^a	2.89	< LOD ^a	40	20,1	no	0.0	1.2	70
W15	2.25	< LOD ^a	<0.4	2.12	< LOD ^a	38	23,0	scaling	1.6	0.2	115
W16	1.41	< LOD ^a	< LOD	1.01	< LOD ^a	35	17,8	no	1.4	1.2	140
W17	1.06	< LOD ^a	< LOD	<0.4	< LOD ^a	29	18,8	no	1.8	0.0	140
W18	6.12	< LOD ^a	<0.4	1.18	< LOD ^a	28	23,3	no	1.2	2.2	85
W19	3.07	< LOD ^a	<0.4	1.40	< LOD ^a	27	22,8	no	0.8	2.4	70
W20	0.75	< LOD ^a	1.88	0.42	<0.4	25	21,3	no	1.4	1.4	130
W21	0.76	< LOD ^a	< LOD ^a	0.43	<0.4	31	20,8	no	1.6	0.4	189

^alimit of detection, ^bInformation Missing, ^cBoby Mass Index

VIII.3.c : Exposure of women to BPA and its chlorinated derivatives

All of the women completed the questionnaire. The mean age of the 21 women was 33 ± 4 years (25-40). The mean BMI was $22.1 \pm 2.8 \text{ kg.m}^{-2}$ (17.8-27.5). The mean parity of the women was 2 ± 1 .

Five (24 %) women had dental care during the previous month. None of them had worked in a factory making plastic, DVDs, CDs, paper or food packaging or in a dental clinic. Two of them (W3, W7) had previously held jobs requiring contact with water.

Mean total fluid intake was 2.5 L per day. Tap water consumption represented 65 % of all fluid intake. Almost women (95 %) drank tap water with a mean of 1.8 ± 0.9 L per day (0.2-3.6). Fewer women (67 %) drank bottle water with a mean of 1.3 ± 0.5 L per day (0.4-2.0) (Table 2).

Mean duration of dermal exposure including shower, bath, and swimming pool was evaluated at 139 ± 134 minutes per week (28-630). Showering was reported by 95 % of the women with a mean duration of 77 ± 42 min per week (28-175). Bathing was reported by 48 % of the woman with a mean duration of 106 ± 194 min per week (15-630). Only four women (19 %) reported going regularly to a public swimming pool with an average time of swimming of 83 minutes per week (W4, W10, W15 and W21). Two other women had a swimming pool at home (W17, W19) and one of them was treated by chlorine (W19). Woman W17 did not reply to the question.

Details on characteristics of each woman are shown in Table 1.

VIII.4. DISCUSSION

The average total fluid intake by pregnant women in our study was found to be 2.5 L per day. Similarly, the total fluid intake was found to range from 1.86 to 3.4 L/day in USA, 2.7 L/day in Italy and 1.8 L/day in UK (Shimokura *et al.*, 1998, Zender *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2009).

These results showed that tap water constitutes a major of daily fluid intake in pregnant women (65 %) a finding confirmed by most other authors. Zender *et al.* found a similar proportion of tap water in the USA (71 %) (Zender *et al.*, 2001).

In this study we determined that the pregnant women included spent 123 min per week bathing or showering. Similarly, in the UK Kaur *et al.* found that women spent 109 min per

week and Smith *et al.* reported 146 min per week. Shimokura *et al.* found a lower weekly duration in the USA (88.2 min per week) (Shimokura *et al.*, 1998, Kaur *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 2009).

We may conclude that when taking into account different climates and cultural characteristics, the food and water intake and contact with water that we have reported are in agreement with the literature. None of the women were in situations that could have overexposed them to BPA and its chlorinated derivatives.

While the sample size of our study was too small to allow us to carry out statistical analyses, it should be pointed out that the colostrum of woman 17 (W17), the only one who did not drink any tap water, did not contain any quantifiable chlorinated derivatives.

Human milk is a major uptake route for lipophilic compounds due to its fat composition. It is considered one of the most acceptable matrices for monitoring lipophilic compounds since it is at once easy to collect and enriched in lipophilic compounds (Yu *et al.*, 2007, Smolders *et al.*, 2009). As the first breast milk, produced by the mammary gland in the late pregnancy, colostrum reflects maternal as well as newborn exposure to many different environmental chemicals during the last month of pregnancy and the first period of breast feeding. Contaminants accumulate in colostrum as the latter is being produced, in a lapse of time that can, unlike the short lapse of time associated with mature human milk, day after day.

This study is the first to report the presence of chlorinated derivatives of BPA in human colostrum; they were indeed detected in all colostrums. This result provides confirmation for the hypothesis that water is not negligible regarding to the health effect of BPA through its chlorinated derivatives. Other studies have reported on the presence of chlorinated BPA in several tissues: adipose tissue, placenta tissue and urine. Among the chlorinated derivatives of BPA, DCBPA was the most frequently found in colostrum (100 %) and in adipose tissue (80 % versus 15 % and 10 % for CBPA and TCBPA respectively). Moreover, the proportions of chlorinated derivatives of BPA were almost the same in urine (16 to 20 %) and in adipose tissues (49 to 51 %). Unlike the three other tissues and fluids, CBPA was not found in colostrum. Concentrations in colostrum were lower than those found in adipose tissue and placenta, a finding probably due to longer accumulation time in adipose and placenta tissues. Among chlorinated derivatives, DCBPA also represented the highest concentration in adipose tissues as in colostrum: mean concentration in adipose tissues was 3.05, 9.21 and 0.74 ng.g⁻¹ for MBPA, DCBPA and TCBPA respectively. On the contrary,

Liao *et al.* reported mean concentrations of chlorinated BPA in urine lower than in colostrum, due to the absence of urine accumulation; it should be recalled that BPA decreases quickly in blood after exposure.

A limited number of studies have reported BPA quantification in human breast milk. Only one of them quantified BPA in colostrum, using ELISA as a quantification method (Kuruto-Niwa *et al.*, 2007). Due to the non-specificity of the anti-BPA antibody, cross-reactivity may occur. Moreover, if the mean concentration of BPA determined in this study was higher than in others, this may have been due to its having been overestimated (NTP, 2008). Consequently, BPA concentration cannot be considered as an established fact. By contrast, the other studies worked on mature milk. In our study, 80 % of the colostrum samples contained BPA. The other studies found similar results with 60 to 100 % of human milk samples containing BPA (Otaka *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2004, Ye *et al.*, 2006). The mean concentration of BPA in the 19 analysed colostrums ($1.87 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) was higher or close to the BPA unconjugated concentration reported in the other studies using human milk. Unlike mature human milk which is produced day after day, colostrum is produced over the last few days preceding delivery, a fact that may help to explain the higher quantity of BPA found in colostrum.

Furthermore, urinary concentration of BPA has been widely investigated. Urine is considered as a reference matrix for biomonitoring studies of BPA (Calafat, 2010). However, most of the studies have reported not on BPA itself, but rather on metabolites of BPA (Dekant & Volkel, 2008, Lakind, 2008, Bushnik, 2010). As regards those studies having determined actual quantification of BPA, on account of the artifactual BPA contamination occasioned by the ubiquitous presence of BPA in the environment, their results are lacking in reliability.

The results we have obtained confirm our hypothesis according to which BPA water contamination leads to chlorinated BPA human exposure. Due to production of these toxic compounds, BPA water contamination is consequently a major concern for human health. Failure to take into account the production of chlorinated derivatives from BPA in water may lead to underestimation of the relevance of an aquatic environment as a source of BPA toxicity detrimental to human health.

Curiously, concentrations of chlorinated derivatives are similar to the concentration of BPA. However, if one may consider that occurrence of BPA in the oral intake is higher than its chlorinated derivatives (releasing from food packaging), two hypotheses may be suggested

according to the toxicokinetics of the compounds. While we may consider the most frequent source of BPA exposure to be oral intake, chlorinated derivatives and BPA present different toxicokinetics that entail greater accumulation of the chlorinated derivatives in the colostrum. Since chlorine increases the lipophilic nature of BPA, chlorinated BPA may present a greater affinity for colostrum than BPA. In other cases, if we consider the toxicokinetics to be the same, humans could be exposed to chlorinated BPA by means other than oral ingestion, for example dermal contact (domestic water) as was suggested by Stahlhut *et al.* and Christensen *et al.* (Stahlhut *et al.*, 2009, Christensen *et al.*, 2012).

Let us conclude by stating that in all environments, especially aquatic ones, contamination may expose humans to BPA, which means that its elimination from the plastic used in food packaging would not suffice.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Pascale Pierre-Eugène and Elodie Verzeni for their help as technical assistants. We are also grateful to the “Water and Soils Program” of the University of Poitiers for its financial contribution to the project. We likewise wish to thank Jeffrey Arsham for his highly helpful reading of our original text. We especially wish to thank all the generous milk donors along with Professor Fabrice Pierre and Claire Ydier for their assistance in breast milk collection. Finally, we would like to extend our warm thanks to waters[®] for the technical materials and the experimental assistance.

REFERENCES

- ANSES (2011): Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail. Effets sanitaires du bisphénol A. Rapport d'expertise collective; Connaissances relatives aux usages du bisphénol A. rapport d'étude
- Birnbaum LS, Fenton SE (2003): Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Persp* 111, 389-94
- Bushnik T, Haines D, Levallois P, Levesque J, Van Oostdam J, Viau C (2010): Lead and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health reports / Statistics Canada, Canadian Centre for Health Information = Rapports sur la sante / Statistique Canada, Centre canadien d'information sur la sante* 21, 7-18
- Calafat A (2010): Background paper on BPA biomonitoring and biomarker studies, Food and Agriculture Organization of the United nation, World health Organization
- Cariot A, Dupuis A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S, Migeot V (2012): Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta* 100, 175-82
- Christensen KL, Lorber M, Koslitz S, Bruning T, Koch HM (2012): The contribution of diet to total bisphenol A body burden in humans: Results of a 48hour fasting study. *Environ Int* 50C, 7-14

- Dekant W, Volkel W (2008): Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 228, 114-34
- European Union (1997): European Workshop on the Impact of endocrine Disrupters on Human Health and the Environment. Report EUR 17549, Environment and Climate Research Program DG XII European Commission.
- Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ (2010): Bisphenol A and Related Compounds in Dental Materials. *Pediatrics* 126, 760-8
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E (2012): Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage* 104, 19-34
- Foster WG (1998): Endocrine disruptors and development of the reproductive system in the fetus and children: is there cause for concern? *Canadian journal of public health. Revue canadienne de sante publique* 89 Suppl 1, S37-41, S52, S41-6
- Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y (2001): Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere* 44, 973-9
- Fukazawa H, Watanabe M, Shiraishi F, Shiraishi H, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y (2002): Formation of chlorinated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J Health Sci* 48, 242-9
- Gallard H, Leclercq A, Croue JP (2004): Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere* 56, 465-73
- Hu JY, Aizawa T, Ookubo S (2002): Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Pollut* 36, 1980-7
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y (2002): Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17, 2839-41
- Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T (2004): Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sciences* 74, 2931-40
- Kang JH, Kondo F, Katayama Y (2006): Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226, 79-89
- Kaur S, Nieuwenhuijsen MJ, Ferrier H, Steer P (2004): Exposure of pregnant women to tap water related activities. *Occup Environ Med* 61, 454-60
- Kuruto-Niwa R, Terao Y, Nozawa R (2002): Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol* 12, 27-35
- Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R (2007): Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66, 1160-4
- Lakind JS, Naiman DQ (2008): Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: estimates from the 2003-2004 NHANES urinary BPA data. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 18, 608-15
- Li X, Ying GG, Su HC, Yang XB, Wang L (2010): Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environ Int* 36, 557-62
- NTP (2008): NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. NTP CERHR MON, i-III1
- Otaka H, Yasuhara A, Morita M (2003): Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction. *Anal Sci* 19, 1663-6
- Plastics Europe (2007): Application of Bisphenol A. En ligne : <http://www.bisphenol-a-europe.org/uploads/BPA%20applications.pdf> [consulté en octobre 2012]
- Polo M, Llompart M, Garcia-Jares C, Gomez-Noya G, Bollain MH, Cela R (2006): Development of a solid-phase microextraction method for the analysis of phenolic flame retardants in water samples. *J chromatogr A* 1124, 11-21
- Salian S, Doshi T, Vanage G (2009a): Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life Sci*

- Salian S, Doshi T, Vanage G (2009b): Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 265, 56-67
- Santhi VA, Sakai N, Ahmad ED, Mustafa AM (2012): Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Sci. Total Environ.* 427, 332-8
- Shimokura GH, Savitz DA, Symanski E (1998): Assessment of water use for estimating exposure to tap water contaminants. *Environ Health Persp* 106, 55-59
- Smith RB, Toledano MB, Wright J, Raynor P, Nieuwenhuijsen MJ (2009): Tap water use amongst pregnant women in a multi-ethnic cohort. *Environ Health* 8 Suppl 1, S7
- Smolders R, Schramm KW, Nickmilder M, Schoeters G (2009): Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environ Health* 8-16
- Sodre FF, Locatelli MAF, Jardim WF (2010): Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. *Water Air and Soil Pollution* 206, 57-67
- Stahlhut RW, Welshons WV, H. SS (2009): Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Non-Food Exposure, or Both. *Environ Health* 117, 784-9
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K (2004): Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 18, 501-7
- Tabata A, Watanabe N, Yamamoto I, Ohnishi Y, Itoh M, Kamei T, Magara Y, Terao Y (2004): The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci Technol* 50, 125-32
- Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K (2005): In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 207, 215-21
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007): Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24, 139-77
- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJR, Schoenfelder G (2010): Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Persp* 118, 1055-70
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, Vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP (2012): Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr Rev* 33, 378-455
- Yamamoto T, Yasuhara A (2002): Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 46, 1215-23
- Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM (2006): Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 831, 110-5
- Yu ZW, Palkovicova L, Drobna B, Petrik J, Kocan A, Trnovec T, Hertz-Picciotto I (2007): Comparison of organochlorine compound concentrations in colostrum and mature milk. *Chemosphere* 66, 1012-8
- Zender R, Bachand AM, Reif JS (2001): Exposure to tap water during pregnancy. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 11, 224-30

CHAPITRE IX : MISE EN EVIDENCE DU BISPHEENOL A DE ET SES DERIVES CHLORES DANS L'EAU DE BOISSON

IX.1. INTRODUCTION

L'exposition humaine au Bisphénol A (BPA) par l'eau de boisson a été démontrée par : (i) sa présence dans l'eau embouteillée, provenant en majorité de sa libération à partir des contenants en plastiques (Vandenberg *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2010), (ii) sa présence dans l'eau du robinet a été étudiée mais les études sont peu nombreuses. Les concentrations retrouvées dans ces études sont comprises entre 2,3 à 123 ng.L⁻¹ (Li *et al.*, 2010, Sodre *et al.*, 2010, Santhi *et al.*, 2012b).

Le chlore utilisé pour la désinfection de l'eau réagit avec le BPA pour former des dérivés chlorés (Yamamoto & Yasuhara, 2002, Gallard *et al.*, 2004). Peu d'étude ont recherché la présence de ces dérivés chlorés dans l'environnement. Certaines ont été menées dans les effluents d'usines du recyclage de papier et ont retrouvé la présence de ces dérivés chlorés (Fukazawa *et al.*, 2001, Fukazawa *et al.*, 2002, Gallart-Ayala *et al.*, 2010). En revanche, ils n'ont pas été détectés à la sortie des stations de traitement d'eau potable (Gallart-Ayala *et al.*, 2010, Dupuis *et al.*, 2012). Ainsi, ces résultats ne montrent pas d'exposition directe à ces dérivés chlorés chez l'homme. Cependant, les dérivés chlorés du BPA ont bien été retrouvés à des concentrations variables dans les tissus biologiques tels que le tissu adipeux, le placenta, les urines et le lait maternel, signifiant une exposition humaine à ces composés (Fernandez *et al.*, 2007, Jimenez-Diaz *et al.*, 2010, Cariot *et al.*, 2012, Liao & Kannan, 2012). Une hypothèse explicative serait que le BPA, libéré des canalisations en PVC distribuant l'eau potable, formerait des dérivés chlorés, par réaction avec le chlore résiduel présent dans cette eau. Ces composés se retrouveraient alors dans l'eau potable, qui deviendrait source d'une exposition.

L'objectif de ce travail a donc été dans un premier temps de développer une méthode de dosage du BPA et de ses dérivés chlorés dans l'eau de boisson, telles que l'eau du robinet et les eaux embouteillées, par UPLC-MS/MS. Dans un deuxième temps, l'objectif a été de vérifier ou non la présence de ces composés dans quelques eaux de boisson.

IX.2. MATERIEL ET METHODE

IX.2.a. Composés chimiques et réactifs

Le BPA (CAS 80-05-7) et l'étalon interne, le bisphénol A-d₁₆ ont été obtenus par Sigma-Aldrich Inc (St Louis, USA). Les 4 dérivés chlorés du BPA : CBPA, 2,2'-DCBPA, 2,6-DCBPA et TCBPA ont été synthétisés par @rtMolecule (Poitiers, France). La synthèse a été décrite antérieurement (Cariot *et al.*, 2012). Leurs structures chimiques sont présentées dans la figure 1.

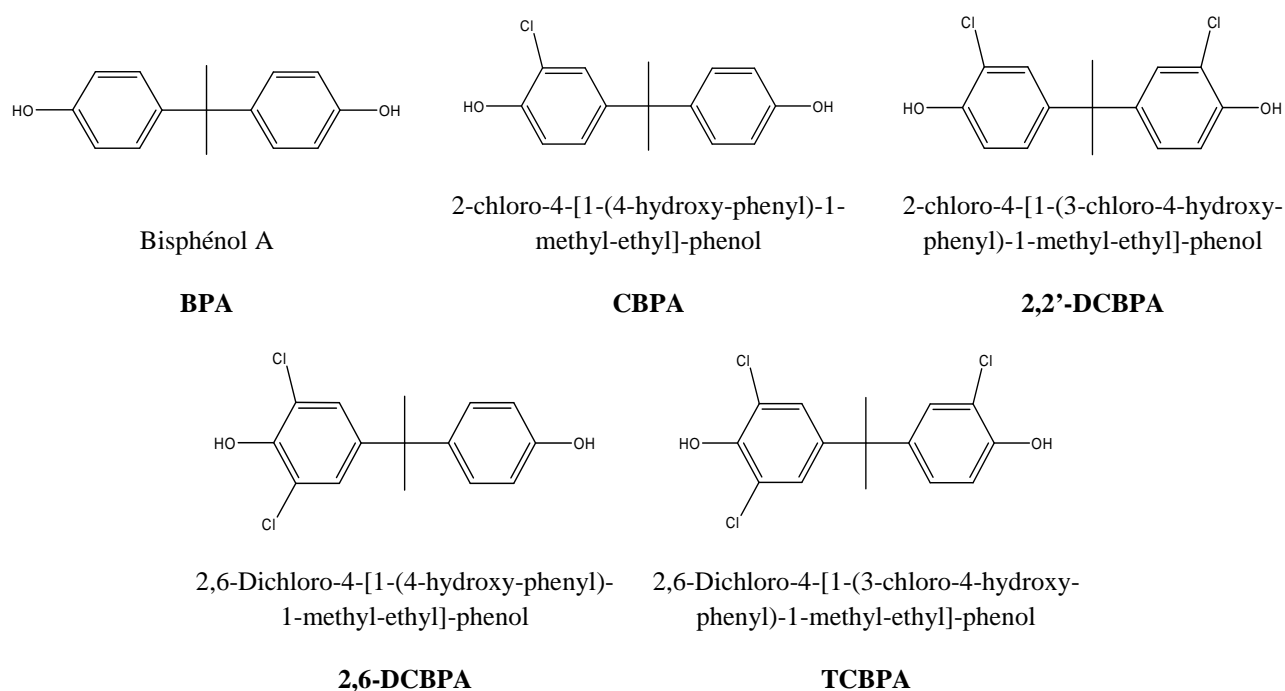


Figure 1 : Structure chimique du BPA et de ses dérives chlorés

Les solvants utilisés étaient de très haute qualité analytique. Le méthanol (Plus for residual pesticide analysis[®]), l'acétonitrile (Pestipur[®]), l'acétone (Pestipur[®]) et l'acétate d'éthyle (Pestipur[®]) utilisés pendant la préparation des échantillons, provenaient de Carlo Erba Réactif (Val-de-Reuil, France). Le méthanol utilisé pour le dosage était de qualité LC-MS (Fisher, Illkirsch, France). L'eau utilisée pendant toute l'analyse était de qualité LC-MS (Optima[®]) et provenait de Fisher scientific (Illkirsch, France). L'azote alphasaz-1[®] était approvisionné chez Air Liquide. (Paris, France). Le thiosulfate de sodium utilisé (Normapur[®]) était fourni par Prolabo[®] (Fontenay-sous-Bois, France).

IX.2.b. Préparation des solutions standards

Chaque composé (BPA, CBPA, 2,6-DCBPA, 2,2'-DCBPA, TCBPA) a été stocké à +4°C dans une solution méthanolique à 200 mg.L⁻¹. Les solutions standards de travail ont été préparées à partir des solutions initiales. L'étalon interne (BPA-d16) a été préparé à une concentration de 1,6 ng.mL⁻¹, dans l'eau contenant 5 % de méthanol à partir d'une solution méthanolique à 200 ng.mL⁻¹ stockée à +4°C.

IX.2.c. Prélèvement et préparation des échantillons

Lors de la préparation et l'analyse des échantillons, une attention particulière a été apportée pour éviter la contamination par le BPA. Tous les solvants ont été contrôlés avant leur utilisation. Pendant la préparation des échantillons, la solution a été en contact uniquement avec le verre et le Teflon[®]. Quand cela était possible, la verrerie utilisée a été calcinée à 500°C pendant 5 heures. La verrerie jaugée a été nettoyée par le méthanol avant son utilisation. Les prélèvements d'eau ont été faits sous contrôle strict. De même les échantillons ont été transportés dans des conditions de conservation optimales (réfrigération) et congelés dans les meilleurs délais.

Soixante-quinze microlitres d'une solution de thiosulfate à 46 g.L⁻¹ ont été ajoutés au flacon avant le prélèvement d'eau pour arrêter la réaction avec le chlore. Le dosage des composés a été conduit à partir de 250 mL d'échantillon d'eau. Les échantillons d'eau ont été surchargés avec 12,5 mL de méthanol avant de subir une extraction sur phase solide avec une cartouche Oasis HLB[®] (Waters, Milford, USA). Pour cela, la cartouche a tout d'abord été conditionnée par 2 fois 3 mL d'un mélange de méthanol/acétonitrile/acétone/acétate d'éthyle (v/v/v/v) (1/1/1/1) puis équilibrée par 2 fois 3 mL d'eau. Les 262,5 mL d'échantillon d'eau avec 5% de méthanol ont ensuite été déposés sur la cartouche à un débit de 10 mL.min⁻¹, suivi du dépôt d'un millilitre de la solution de BPA-d₁₆ (1,6 ng.mL⁻¹). La cartouche a ensuite été lavée par 3 mL d'un mélange méthanol/eau 20/80 (v/v). L'élution a été effectuée par 2 fois 3 mL de méthanol à un débit d'environ 0,5 mL.min⁻¹. Le méthanol a été évaporé à sec à 30°C sous flux d'azote. Le résidu a été dissous dans 250 µL d'une solution méthanol/eau (50/50) (v/v). Au final, 50 µL ont été injectés dans l'UPLC-MS-MS.

La gamme extraite a été préparée à partir de l'eau optima[®] et était comprise entre 0,80 et 12,80 ng.L⁻¹.

IX.2.d. Dosage des composés

Le BPA et ses dérivés chlorés ont été dosés par une LC-MS/MS composée d'une UPLC Acquity® (Waters, Milford, USA), couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle Xévo TQ® (Waters, Milford, USA). La séparation des composés a été effectuée sur une colonne Acquity CSH® C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm, Waters, Milford, USA) thermostatée à 40°C. La phase mobile était constituée d'un gradient méthanol/eau délivré à un débit de 0,4 ml.min⁻¹. La composition initiale de l'éluant était de 50 % de méthanol pendant 0,5 min. Puis la quantité de méthanol a été augmentée linéairement entre 0,5 et 2,0 min pour atteindre 90 % et passer à 99 % entre 2,0 et 2,5 min. Le méthanol a ensuite été maintenu à 99 % pendant 5 min (2,5 à 7,5 min), puis a été diminué linéairement jusqu'à la composition de départ (7,5 à 8,0 min). La colonne a été équilibrée avec ce mélange pendant 2 min avant l'injection suivante.

Le détecteur MS/MS était équipé d'une source à électrospray opérant en mode négatif. La quantification des composés a été effectuée en mode MRM avec 2 transitions. Les paramètres du spectromètre de masse, communs à l'ensemble des composés, sont les suivants: la température de la source est de 150°C, la température et le débit de gaz de désolvation (azote) sont de 1000 L.h⁻¹ et de 550 °C respectivement, le débit de gaz du cône est de 50 L.h⁻¹, le débit de gaz de collision (argon) est de 0,28 mL.min⁻¹, la tension du capillaire est de 3,5 kV, la tension de l'extracteur est de -29 V et celle du cône est de -66 V. Les paramètres spécifiques à chaque composé sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1- Paramètres MS/MS du BPA et de ses dérivés chlorés

<i>Composés</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>MRM (m/z)</i>	<i>Tension de cône (V)</i>	<i>Energie de collision (V)</i>	<i>Dwell time (s)</i>
BPA	2,3	227,0-211,9	38	18	0,150
		227,0-133,0	38	27	0,150
BPA-d ₁₆	2,3	241,1-223,1	38	20	0,120
		241,1-142,0	38	26	0,120
CBPA	2,6	260,1-181,9	41	27	0,007
		260,1-209,9	41	24	0,007
DCBPA	2,8	294,9-215,9	37	30	0,015
		294,9-243,9	37	24	0,015
2,2'-DCBPA	2,8	294,9-166,9	37	24	0,015
TCBPA	2,9	328,8-249,9	44	30	0,020
		328,8-277,8	44	25	0,020

IX.2.e. Validation de la méthode d'analyse

La quantification a été réalisée par étalonnage interne. Le BPA-d₁₆ a été utilisé comme étalon interne pour tous les composés, car les isotopes des dérivés chlorés n'étaient pas disponibles commercialement. La courbe d'étalonnage a été construite par le rapport des aires du composé sur l'étalon interne, en fonction de la concentration du composé.

La linéarité a été déterminée par le coefficient de corrélation de la courbe de calibration utilisant 6 points extraits (0,00 - 0,80 - 1,60 - 3,20 - 6,40 et 12,80 ng.L⁻¹) sur 5 jours.

L'exactitude (justesse + fidélité) de la méthode a été déterminée à partir d'eau optima[®] surchargée à 2 concentrations différentes (0,80 et 6,40 ng.L⁻¹) puis extraite.

Les coefficients de variation intra-journaliers ont été obtenus par 5 répliques surchargés à 0,80 et 6,40 ng.L⁻¹. Les coefficients inter-journaliers ont été obtenus sur 3 répliques, 3 jours différents aux mêmes concentrations.

La limite de détection (LD) a été définie par 3 fois l'écart-type de blancs d'échantillon (250 mL d'eau optima[®]) pour les dérivés chlorés du BPA. Concernant le BPA, la LD a été définie à partir de blancs obtenus suivant le protocole décrit ci-dessus, mais sans le dépôt d'eau sur la cartouche puisque l'eau optima[®] contenait une faible quantité de BPA (environ 0,20 ng.L⁻¹). Ces blancs ont été appelés « blanc-extrait ». La limite de quantification a été validée en surchargeant l'eau optima[®] à une concentration de 0,80 ng.L⁻¹(paragraphe IX.3.a.).

Les rendements d'extraction (RE) de l'extraction solide-liquide ont été déterminés à partir d'échantillons de 250 mL d'eau optima[®] surchargée à 6,40 ng.mL⁻¹ puis extraite. Ils ont été calculés par l'équation suivante:

$$RE(\%) = \frac{A_{ECH}}{A_{EXT}} \times 100$$

où A_{ECH} est la moyenne des aires du pic du composé de 3 échantillons d'eau surchargés à 6,40 ng.L⁻¹ avant l'extraction et A_{EXT} est la moyenne des aires du pic du composés de 3 extraits d'eau surchargés à 6,40 ng.L⁻¹ après l'extraction.

IX.2.g. Analyse des eaux de boisson

Quatre eaux embouteillées dans un contenant en plastique, de marques différentes ont été analysées (EB1 à EB4). Cinq eaux du robinet ont été prélevées dans des laboratoires sur 2 sites à Poitiers (ERL1 à ERL5). Douze eaux du robinet ont été prélevées chez l'habitant dans l'agglomération de Poitiers (ERD6 à ERD17). Quatre eaux provenaient de robinets servant très peu (ERL3, ERL4, ERL5 et ERD17).

Lors de l'analyse, des échantillons de contrôle-qualité étaient régulièrement dosés. Ils correspondaient à 250 mL d'eau optima[®] surchargés en BPA et en dérivés chlorés à des concentrations de 0,80 ng.L⁻¹.

IX.3. RESULTATS ET DISCUSSION

IX.3.a. Performance analytique

Le BPA a été détecté dans le blanc-extrait mais à un niveau très inférieur à la limite de quantification. Le chromatogramme d'un blanc-extrait est présenté sur la figure 2. Cette contamination (irréductible) a été prise en compte dans la méthode de calcul pour exprimer le résultat des eaux. En ce qui concerne, les dérivés chlorés, ils n'ont pas été détectés dans les blancs d'échantillon.

Les courbes d'étalonnage de la gamme extraite du BPA et de ses dérivés chlorés montrent une bonne linéarité ($r^2 > 0,99$). Un chromatogramme d'un standard blanc-extrait et à 0,80 ng.L⁻¹ est présenté respectivement dans les figures 3 et 4. Les résultats de validation sont présentés dans le tableau 2. La justesse des 5 composés était comprise entre 82 et 107 % et les coefficients de variation évaluant la fidélité étaient inférieurs à 35 % dont 4 étaient supérieurs à 20 % parmi les dérivés chlorés aux concentrations de 0,80 ng.mL⁻¹. Cette variabilité était

acceptable compte-tenu de l'objectif de cette étude, qui était de mettre en évidence la présence de ces composés dans les eaux de boisson.

Tous les rendements d'extractions étaient supérieurs à 96 %.

Tableau 2 : les critères de performance analytique (^alimite de quantification, ^blimite de détection, ^ccalculé par [(concentration moyenne observée) / (concentration nominale)] x 100, ^dexprimé par le coefficient de variation).

Composés	LQ ^a (ng.L ⁻¹)	LD ^b (ng.L ⁻¹)	Concentration de surcharge (ng.L ⁻¹)	Exactitude Intra- journalière (n=5)		Exactitude Inter- journalière (n=9)	
				Justesse ^c (%)	Fidélité ^d (%)	Justesse ^c (%)	Fidélité ^d (%)
BPA	0,80	0,06	0,80	92	5	93	7
			6,40	101	5	101	4
CBPA	0,80	0,01	0,80	107	23	107	18
			6,40	101	9	97	11
2,6-DCBPA	0,80	0,01	0,80	93	25	106	19
			6,40	107	11	103	12
2,2'-DCBPA	0,80	0,01	0,80	82	35	84	31
			6,40	98	19	95	15
TCBPA	0,80	0,01	0,80	82	17	88	17
			6,40	98	15	97	13

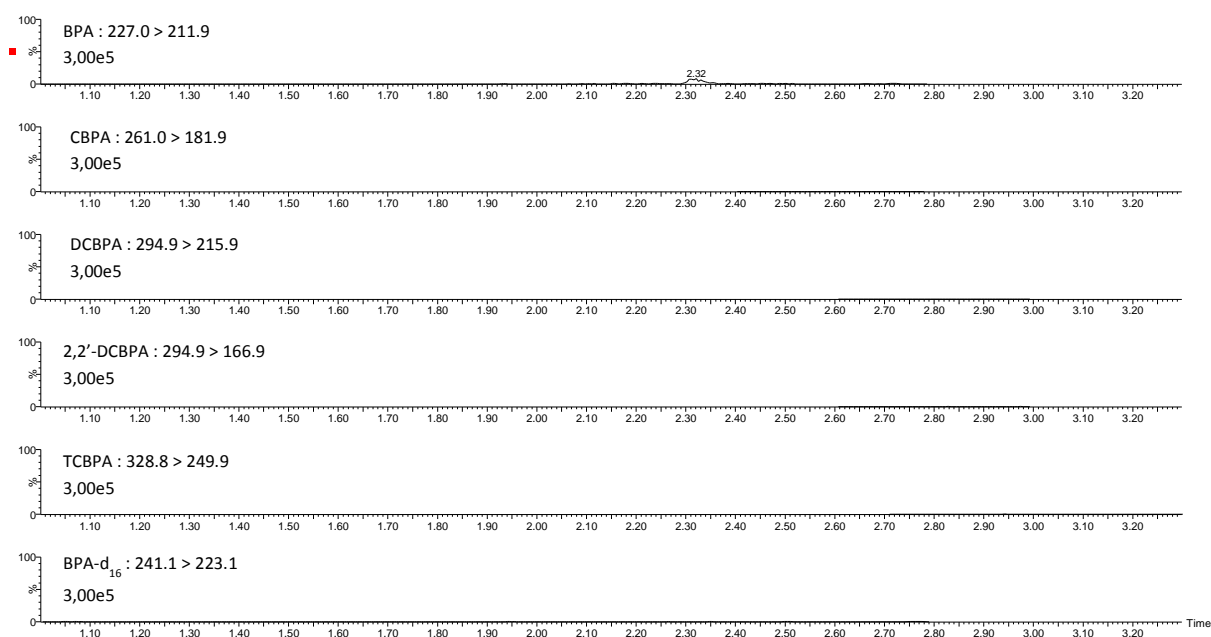


Figure 2 : Chromatogramme d'un blanc de solvant

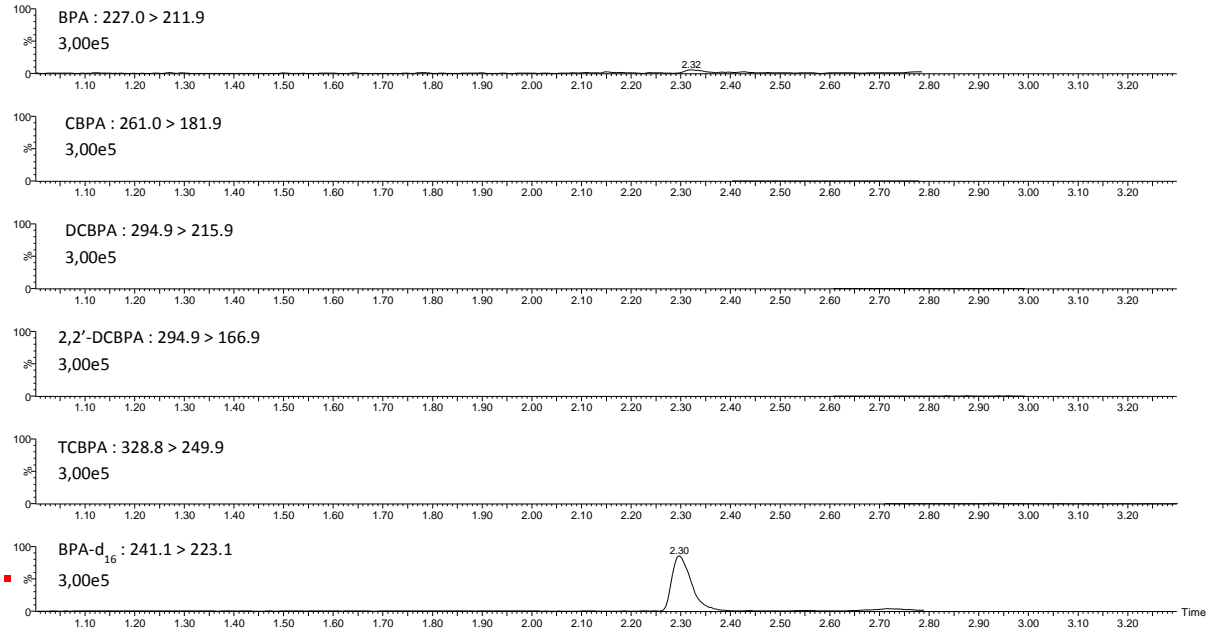


Figure 3 : Chromatogramme d'un blanc extrait.

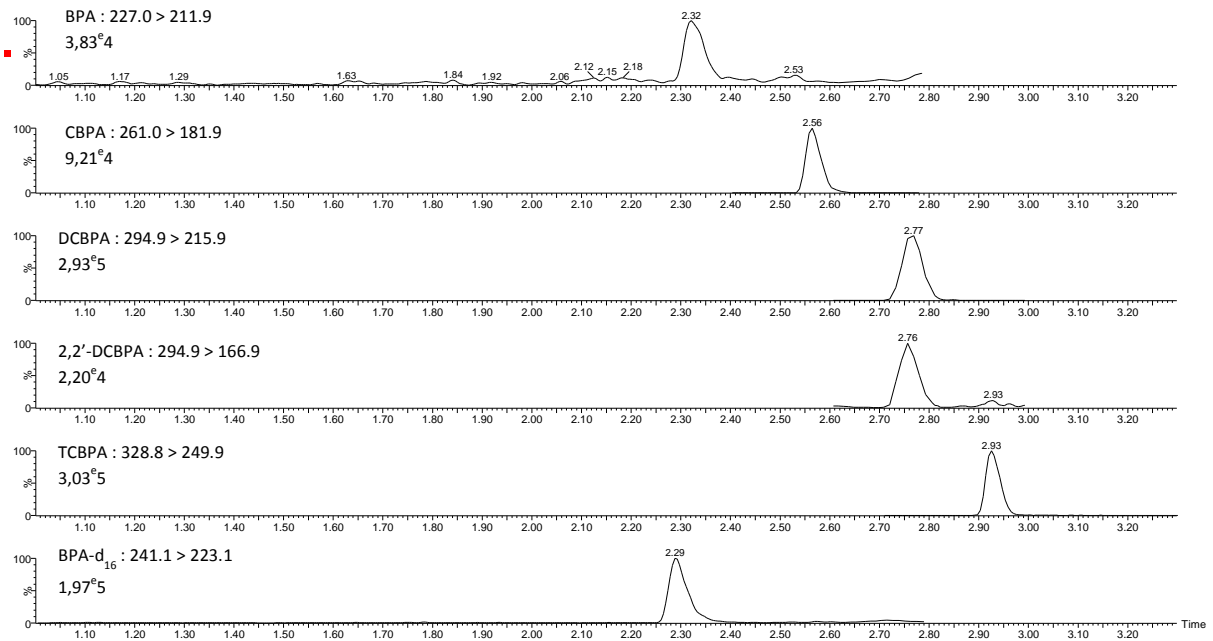


Figure 4 : Chromatogramme d'un point de la gamme à $0,8 \text{ ng.L}^{-1}$

La justesse des contrôles-qualité était comprise entre 82,1 et 119,2 %. La linéarité des droites d'étalonnage était vérifiée ($r^2 > 0,99$).

IX.3.b. Analyse des eaux de boisson

Le BPA a été détecté dans toutes les eaux embouteillées dont 2 ont été quantifiés à des concentrations de $1,05$ et $1,72 \text{ ng.L}^{-1}$, et aucun dérivé chloré n'a été détecté (Tableau 3).

Plusieurs auteurs avaient déjà démontrés la libération du BPA depuis le contenant plastique, mais aucun n'avait recherché de dérivés chlorés de BPA. Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse précédente puisque le chlore n'est pas présent dans ces eaux embouteillées (chloration interdite par la législation) et donc seule la molécule de BPA est retrouvée dans l'eau embouteillée.

Concernant les échantillons d'eau du robinet, le BPA a été détecté dans tous les échantillons à des concentrations comprises entre 0,80 et 262,08 ng.L⁻¹. Les eaux provenant de robinets peu utilisés (ERL3, ERL4, ERL5 et ERD17) avaient des concentrations plus importantes en BPA. Les dérivés chlorés ont été détectés dans 8 échantillons d'eau. Par ailleurs, les eaux contenant des dérivés chlorés quantifiables étaient elles aussi, des eaux de robinets peu utilisés. Les figures 5 et 6 présentent des chromatogrammes d'eau de boisson.

Dans les robinets peu utilisés, l'eau stagnante se chargerait en BPA, libéré des parois du tuyau d'adduction, entraînant une concentration plus importante comparée aux eaux circulantes. En s'appuyant d'une part, sur les études cinétiques (Gallard *et al.*, 2004) en eau purifiée, montrant que les dérivés chlorés apparaissent transitoirement lors de la chloration, car sont eux-mêmes oxydés et disparaissent du milieu, et d'autre part, en supposant que ce profil cinétique n'est pas modifié lors de la chloration dans une eau réelle (c'est-à-dire contenant des matières organiques et minérales en solution) comme c'est le cas avec l'eau potable, le phénomène observé peut être décrit de la façon suivante. Le chlore réagit avec le BPA et forme tout d'abord les dérivés chlorés du BPA (CBPA, DCBPA et TCBPA) qui sont ensuite dégradés par une oxydation prolongée générée par la présence de chlore résiduel. Quand le chlore résiduel est consommé totalement, la dégradation du BPA en dérivés chlorés s'arrête. Il reste alors dans l'eau stagnante les dérivés chlorés précédents non dégradés totalement, et il apparaît à nouveau du BPA, puisqu'il est continuellement relargué par les tuyaux.

Lors des analyses, 3 concentrations retrouvées de BPA (20,33, 20,68 et 262,08 ng.L⁻¹) sortaient de la gamme d'étalonnage que nous avons préparée (0,80 à 12,60 ng.L⁻¹). Les résultats ont donc été calculés par extrapolation de la gamme d'étalonnage. Pour des études ultérieures, il conviendra de faire une deuxième gamme de linéarité plus large.

Tableau 3 : Concentration en ng.L⁻¹ de BPA et de ses dérivés chlorés dans les échantillons d'eau
(EB : eau embouteillée, ERL : eau du robinet du laboratoire, ERD : eau du robinet du domicile, LD : limite de détection).

<i>Eaux</i>	<i>BPA</i>	<i>MCBPA</i>	<i>2,2'-DCBPA</i>	<i>2,6-DCBPA</i>	<i>TCBPA</i>
EB1	1,72	<LD	<LD	<LD	<LD
EB2	< 0,80	<LD	<LD	<LD	<LD
EB3	1,05	<LD	<LD	<LD	<LD
EB4	< 0,80	<LD	<LD	<LD	<LD
ERL1	1,12	<0,80	<LD	<0,80	<0,80
ERL2	6,29	<0,80	<LD	<0,80	<LD
ERL3	27,68	2,08	1,78	<LD	2,45
ERL4	20,33	4,61	1,72	1,15	3,68
ERL5	262,08	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD6	8,12	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD7	<0,80	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD8	4,01	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD9	<0,80	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD10	4,92	<0,8	<LD	<0,80	<LD
ERD11	2,56	<LD	<LD	<0,80	<LD
ERD12	0,92	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD13	<0,80	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD14	<0,80	<LD	<LD	<0,80	<0,8
ERD15	4,37	<LD	<0,8	<0,80	<0,8
ERD16	1,17	<LD	<LD	<LD	<LD
ERD17	3,17	3,34	3,42	3,31	3,27

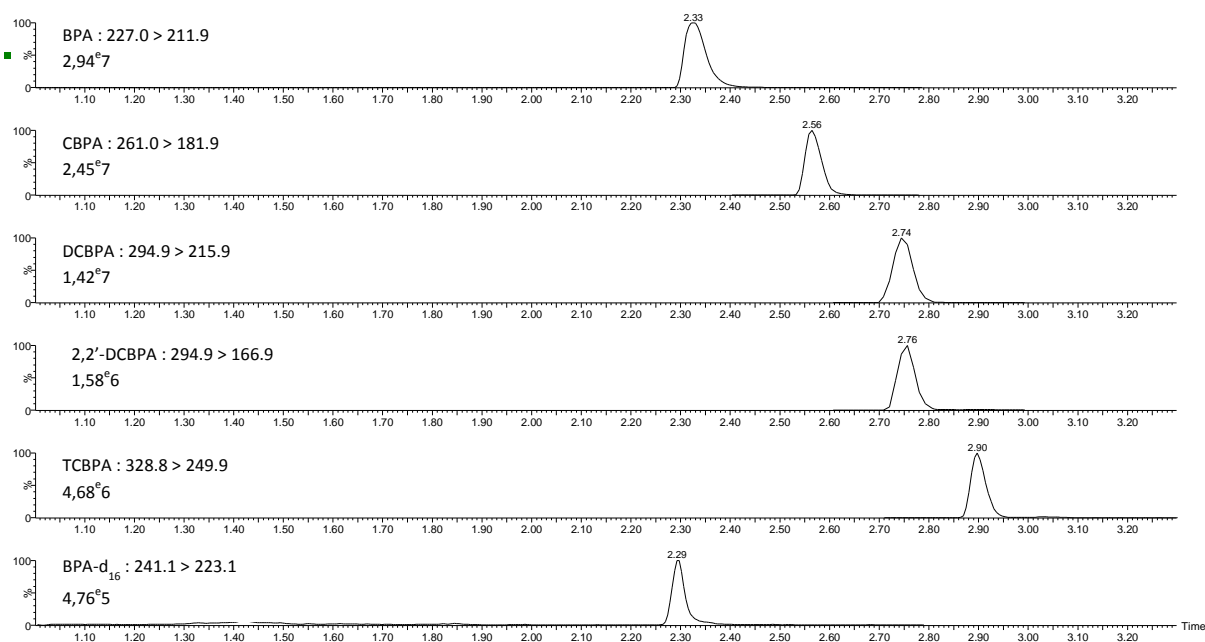


Figure 5 : Chromatogramme de l'échantillon d'eau du robinet n°17 (ERD17)

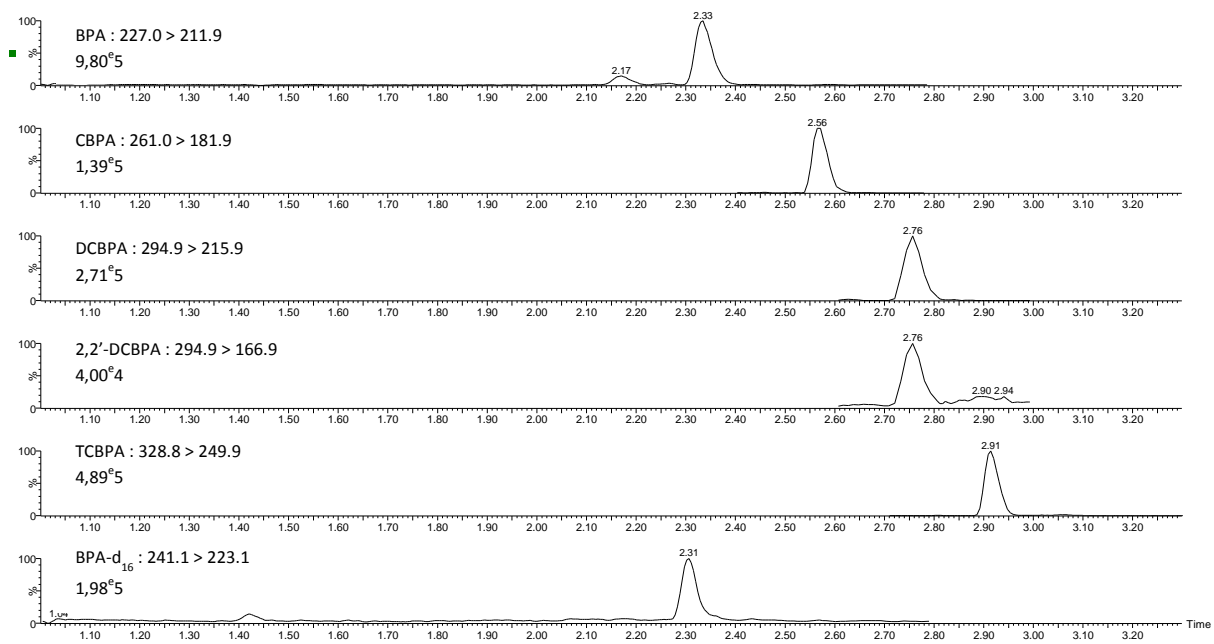


Figure 6 : Chromatogramme de l'échantillon d'eau du robinet n°3 (ERL3)

PARTIE III :
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

En matière d'environnement et de santé, la stratégie européenne prévoit d'élaborer un système communautaire qui intègre l'ensemble des informations sur l'état de l'environnement, l'écosystème et la santé des personnes afin d'évaluer plus efficacement les incidences globales de l'environnement sur la santé (UE, 2003a).

L'évaluation du lien entre la santé et l'environnement, doit se baser sur une méthodologie fiable à chaque étape. Il est crucial de mettre la mesure, et le protocole analytique qui lui est associée, en adéquation avec le contexte et les objectifs recherchés afin de permettre une évaluation réelle des impacts, et par la suite d'amener à des prises de décisions sereines et acceptées. Cette confiance passe nécessairement par l'acquisition de données, dont le niveau de qualité est connu et correspond aux objectifs à atteindre (Quevauviller *et al.*, 2012).

Nous allons d'abord discuter le développement et la validation des méthodes de dosage des micropolluants organiques, puis les résultats des dosages. Enfin, nous terminerons par les perspectives de notre travail.

- Développement des méthodes de dosage

Des appareils sophistiqués avec un haut degré de sensibilité et spécificité sont nécessaires pour le dosage de traces de micropolluants dans les milieux biologiques et environnementaux. Pour cela, la technique de spectrométrie de masse en tandem avec dilution isotopique est considérée comme la plus sensible, spécifique, juste et fidèle (Calafat, 2010).

Dans un premier temps la LC-MS/MS Ultimate 3000[®] (Dionex) - API 4000[®] (Applied Biosystems) utilisée pour doser le BPA, le NP et leurs dérivés chlorés dans les eaux des usines s'est avérée suffisamment sensible. Par la suite, l'acquisition d'une UPLC-MS/MS dernière génération, un Acquity - Xévo TQ[®] (Waters) plus performante a été nécessaire pour le dosage du BPA et ses dérivés chlorés dans l'eau de boisson et le colostrum. Les critères de validation ont été améliorés lors du changement d'appareils et sont discutés ci-après :

- La méthode d'obtention des limites de quantification (LQ) :

- dans les eaux des usines, les LQ avaient été déterminées par 10 fois le rapport signal sur bruit de blanc-matrice et d'un standard dans une solution méthanolique. Elles étaient comprises entre 1,5 à 6,8 ng.L⁻¹ (LC-MS/MS Ultimate 3000[®] - API 4000[®]). Ensuite, lors de l'optimisation de la méthode la

détermination de la LQ et sa validation a été faite par surcharge d'échantillon d'eau ou de lait à la limite de quantification estimée par 10 fois le rapport signal sur bruit. Dans l'eau du robinet, avec l'UPLC-MS/MS Acquity® - Xévo TQ®, la limite de quantification a été améliorée à 0,8 ng.L⁻¹ pour tous les composés.

- dans le lait maternel : une étude préliminaire réalisée avec le LC-MS/MS Ultimate 3000® API 4000® avait dosé le BPA et ses dérivés chlorés (sauf le trichloré du BPA, par manque de sensibilité) dans le lait maternel à partir d'un millilitre de lait, et avait obtenu des LQ proches de 4 ng.mL⁻¹ (Dupuis, 2010). Cependant, les analyses de 21 colostrums avait permis seulement de détecter le BPA et ses dérivés mono et dichlorés sans pouvoir les quantifier. Le changement de spectromètre de masse (Xevo TQ®) et de chromatographie (UPLC) a permis de définir des conditions opératoires permettant d'atteindre des LQ de 0,4 ng.mL⁻¹ à partir de 0,5 millilitre de lait, pour tous les composés, y compris le dérivé trichloré de BPA.
- *La méthode d'obtention des limites de détection (LD)*. Les LD avaient été déterminées par 3 fois le rapport signal sur bruit de la matrice et du standard dans une solution méthanolique, avec le LC-MS/MS Ultimate 3000®. Ensuite, lors de l'optimisation de la méthode avec l'UPLC-MS/MS Acquity - Xévo TQ®, la LD a été calculée par 3 fois l'écart-type du signal obtenu sur plusieurs blanc-matrice (lait ou eau). Cette méthode de calcul est apparue plus appropriée car elle tient compte de la variabilité du bruit de fond.
- *La justesse*: la meilleure maîtrise de la méthode en utilisant des gammes extraites (UPLC-MS/MS Acquity® - Xevo TQ®) plutôt que des gammes méthanol/eau corrigées par le rendement d'extraction (LC-MS/MS Ultimate 3000®-API 4000®) a permis de doser avec plus de justesse les traces de polluants.

Concernant les nonylphénols particulièrement, le faible rendement d'extraction du 353-nonylphénol et ses dérivés chlorés a entraîné une limite de détection et de quantification trop hautes et une mauvaise justesse et fidélité. Aucun consensus international n'étant posé à ce jour, quand à la substance de référence à utiliser pour le biomonitoring des nonylphénols et donc aussi de ses dérivés chlorés, nous avons différé l'optimisation de ce dosage, et nous avons proposé, dans un premier temps, à la communauté scientifique le choix du 353NP

comme molécule de référence. De plus, nous avons constaté une contamination interne de l'Acquity® - Xévo TQ® importante, probablement dûe à un relargage interne par certaine(s) partie(s) de l'appareil.

Un effet de matrice important est apparu lors du développement de la méthode de dosage dans le lait. Celui-ci résulte d'une co-élution de composés de la matrice qui altère l'ionisation des molécules ciblées, induisant la suppression ou l'amplification du signal. L'utilisation de l'isotope stable du composé recherché comme étalon interne est la plus judicieuse, car celui-ci élué en même temps que le composé cible. Dans notre cas, disposant seulement sur catalogue du BPA deutéré (BPAd₁₆), nous avons dû diminuer cet effet matrice au maximum, en optimisant la préparation des échantillons et la résolution en chromatographie, pour quantifier le BPA et ses dérivés chlorés en utilisant uniquement le BPA d₁₆. Au final, la méthode d'analyse développée, a nécessité plusieurs manipulations (extraction liquide-liquide, dilution et SPE en ligne) pour ainsi supprimer totalement l'effet de matrice. Donc pour simplifier cette préparation d'échantillon, il faudrait utiliser les isotopes stables des dérivés chlorés (synthèse à façon) comme étalon interne. De cette façon, la justesse lors du dosage des colostrums s'en trouverait améliorée.

Ainsi, les méthodes d'analyses développées durant ce travail permettent de fournir des données, ayant un niveau de preuve défini par la validation. Celle-ci est appuyée sur les recommandations internationales du domaine de la santé d'une part et de l'environnement d'autre part. Lors de l'analyse des échantillons inconnus, la mise en place d'un contrôle-qualité valide le bon déroulement de la procédure d'analyse, et confirme la validité des résultats obtenus. En effet, la maîtrise de la qualité de ces résultats est essentielle pour ne pas biaiser les résultats des études épidémiologiques, pour lesquelles ils sont destinés.

- Biomonitoring

La sélection de la matrice biologique dans laquelle sera recherché le composé ciblé, pour effectuer des études de biomonitoring, est guidée par la toxicocinétique de ce composé. En examinant la bibliographie concernant le biomonitoring du bisphénol A, on constate que les biomarqueurs sont le plus souvent mesurés dans le sang et/ou l'urine. D'une part, il a été montré que le BPA est un composé dont la concentration sanguine diminue rapidement après l'exposition par voie orale du sujet, compte-tenu du premier passage hépatique, et de la vitesse élevée de métabolisation. Par conséquent, les concentrations sanguines en BPA sont

très faibles et sont majoritairement non détectées dans les échantillons (Calafat, 2010). De plus, compte-tenu des matériaux des dispositifs médicaux de prélèvement, une contamination durant le prélèvement sanguin ne peut être exclue. Pour ces raisons, le sang peut difficilement être utilisé dans des études de biomonitoring. D'autre part, l'urine a l'avantage d'être une matrice dont le prélèvement est non invasif et des volumes importants sont disponibles chez toutes les populations. Lors du prélèvement, la contamination peut être facilement maîtrisée. Les concentrations urinaires de BPA varient selon la période de temps écoulée après un repas et la dernière miction, la fréquence des repas... (Volkel, 2004). Ainsi, dans les deux cas (sang et urine), le prélèvement effectué à un temps donné ne représente que l'exposition ponctuelle, c'est comme une « image instantanée ». Or le biomonitoring doit permettre d'accéder à une mesure plus globale de l'exposition, quel qu'en soient la source et la voie.

Dans la démarche d'évaluation des risques, il est nécessaire d'avoir une estimation de l'exposition à long terme pour rechercher un lien entre l'exposition au BPA et la santé. Compte-tenu du caractère lipophile du BPA, lors d'exposition sur du long terme, celui-ci s'accumule dans le tissu adipeux, qui est un compartiment constitué majoritairement de lipides. Ainsi, le tissu adipeux pourrait être une meilleure matrice biologique pour rechercher le reflet d'une exposition chronique. Cependant il n'est pas facilement disponible et doit être prélevé lors d'opération chirurgicale.

L'hypothèse émise dans ce travail, de trouver les micropolluants dans le colostrum s'appuie sur le raisonnement suivant. Le colostrum est produit par le métabolisme corporel qui mobilise les réserves de l'organisme et notamment les graisses. Si ces dernières ont accumulées des xénobiotiques, ceux-ci se trouvent relargués dans le colostrum. Comme celui-ci est fabriqué sur plusieurs jours avant sa sécrétion, les concentrations en xénobiotiques obtenues dans le colostrum donnent alors une image de l'imprégnation corporelle à plus long terme que celles obtenues dans le sang ou l'urine. Lors d'études ultérieures, il serait intéressant de rechercher la corrélation entre le colostrum et les graisses. Contrairement au tissu adipeux, le colostrum présente l'avantage d'un recueil non invasif. Par ailleurs, la faible quantité prélevée (0,5 mL) dans cette étude ne peut avoir de conséquence vis-à-vis du nouveau-né. Même si la mesure de xénobiotiques dans le colostrum représente effectivement l'imprégnation de la femme enceinte, c'est une manière d'appréhender l'exposition globale de la population générale.

L'examen de la bibliographie montre une utilisation terminologique qui porte à confusion à deux niveaux. L'expression « BPA total » est le plus souvent inappropriée car elle définit par la somme du « BPA libre » et du BPA conjugué (glucuro- et sulfo-conjugué). En effet, cette expression « BPA total » porte à confusion car elle laisse penser que la mesure ainsi effectuée est celle de tout le BPA dont la toxicité va se répercuter sur l'organisme. Or, le BPA conjugué est un métabolite du BPA, qui n'a pas d'activité toxique et qui se déconjugue très peu durant son séjour dans l'organisme, avant son élimination. De plus l'expression « BPA libre » précédemment citée porte aussi à confusion car le BPA non conjugué se répartit au niveau sanguin entre le BPA lié aux protéines plasmatiques et celui non lié qui est véritablement libre. D'ailleurs, en pharmacocinétique du médicament, la fraction libre représente toujours celle non liée aux protéines plasmatiques. C'est pourquoi, lors du biomonitoring du bisphénol A dans le colostrum, nous recommandons de rechercher uniquement le BPA et non son conjugué et nous évitons l'usage des 2 expressions « BPA total » et « BPA libre ».

De façon générale, nous avons mis en évidence l'imprégnation du BPA et de ses dérivés chlorés chez la femme enceinte, puisque la majorité des prélèvements présentait du BPA (90 %) et l'ensemble des prélèvements présentaient des dérivés chlorés. Les valeurs moyennes mesurées, étaient respectivement de $1,87 \pm 1,38 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=19), $1,87 \pm 1,23 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=7), $1,56 \pm 0,74 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=18) et $0,68 \text{ ng.mL}^{-1}$ (n=1) pour le BPA, le 2,2'-DCBPA, le 2,6-DCBPA et le TCBPA. Le colostrum est donc une voie d'excrétion du BPA et de ses dérivés chlorés. Concernant une relation entre la consommation d'eau et la présence de BPA et ses chlorés dans le lait maternel, l'échantillon de population était trop faible pour permettre de conclure dans le cadre de ce travail.

Alors que les premiers résultats n'avaient montré aucun dérivé chloré du BPA (LD de 0,3 à 2,3 selon le composé) dans l'eau potable en sortie d'usine, les analyses effectuées au hasard sur 4 eaux du robinet ont montré leurs présences dans l'eau lorsque les robinets étaient rarement utilisés. Cependant, cette situation particulière ne peut pas correspondre à l'exposition réelle d'une population. Il est donc légitime de se demander, si la présence dans l'eau potable de ces dérivés chlorés à des niveaux ultra-faibles serait à l'origine de leur présence dans les tissus biologiques ? De façon générale, la contamination de l'homme par ces dérivés chlorés du BPA présents dans l'eau peut se faire via l'ingestion de l'eau ou le contact avec la peau. A notre connaissance, le passage cutané des dérivés chlorés de BPA n'a

pas été étudié. Celui du BPA a été estimé entre 10 % et 46 % selon les études. Les dérivés chlorés du BPA étant plus lipophiles, ils sont donc susceptibles de mieux traverser la barrière transcutanée que le BPA. Or, les composés en traversant la peau, gagnent la circulation sanguine sans être métabolisés par le foie (lors du premier passage hépatique). Au contraire, la majorité des molécules ingérées par voie orale, sont métabolisées par le foie avant de rejoindre la circulation sanguine. Cette métabolisation inactive la majorité des composés comme le BPA en les conjuguant, et une faible partie du BPA (10 %) est non métabolisé et rejoint la circulation sanguine (ANSES, 2012).

Ainsi, les dérivés chlorés présents dans l'eau peuvent être directement à l'origine de leur présence dans l'organisme par un passage par voie orale et/ou cutanée. Cependant, une voie indirecte d'exposition aux dérivés chlorés du BPA de l'eau peut aussi être envisagée, lors d'une accumulation par la chaîne alimentaire : l'eau est en contact des aliments tels que les fruits et légumes qui sont ensuite consommés (par l'Homme ou l'animal) et l'eau est aussi ingérée par les animaux. De cette façon, les dérivés chlorés de BPA peuvent donc se retrouver dans nos aliments, et non seulement dans l'eau, bien que l'origine en soit exclusivement hydrique cependant.

Notre travail a permis de valider une méthode de dosage fiable, sensible et reproductible du BPA et 4 de ses dérivés chlorés dans le colostrum humain. L'étape ultime de mise en relation entre les données d'expologie et les effets sur la santé, nécessitera des études complémentaires, notamment concernant la relation entre l'exposition et le taux des analytes dans les milieux biologiques, à partir de cohorte permettant d'atteindre un niveau de puissance suffisant sur les résultats. Ensuite il sera encore nécessaire de rechercher la relation entre les niveaux biologiques et des effets sur la santé humaine.

C'est dans ce but, qu'une étude de cohorte, localisée dans les Deux-Sèvres est mise en place dans notre équipe de recherche depuis octobre 2011. La population des Deux-Sèvres pourrait être plus particulièrement exposée aux micropolluants présents dans l'eau car un peu plus d'un quart de la population est alimentée par de l'eau potable provenant exclusivement d'eau de surface préalablement traitée. C'est parmi la population exclusivement desservie par ce type d'eau (87 communes) que les femmes de cette cohorte ont été recrutées. Grâce à cette cohorte il sera possible de comparer les 3 méthodes d'estimation de l'exposition hydrique des dérivés chlorés du BPA qui sont la méthode du questionnaire, le dosage dans l'eau du robinet et le dosage dans le colostrum et les urines des femmes. Cette cohorte devrait apporter une

meilleure connaissance de l'exposition des femmes enceintes à un mélange de perturbateurs endocriniens, composé du BPA et ses dérivés chlorés, de l'atrazine et ses métabolites, de la carbamazépine[®] et ses métabolites et des parabènes. Enfin, cette cohorte devrait permettre de mettre en relation l'exposition aux perturbateurs endocriniens et la santé de l'enfant, en s'appuyant sur le critère du petit poids de naissance. En effet, les modèles animaux ont établi une relation entre l'exposition pendant la gestation au BPA et le poids de naissance des portées, entraînant une diminution du poids de naissance (Savabieasfahani *et al.*, 2006, Ranjit *et al.*, 2010). Dans ces études de toxicité, les doses de BPA administrées aux animaux étaient souvent inférieures (courbe effet dose non monotone) à celles retrouvées dans l'environnement.

Le sénat a voté l'interdiction du BPA dans tous les contenants alimentaires à compter du 1^{er} juillet 2015 (Le Monde, 2012). L'ANSES cherche déjà des produits de remplacement pour les emballages alimentaires et a lancé fin 2011 un appel pour recueillir des données sur les produits de substitution possible du BPA. Le rapport définitif de la synthèse sera publié avant la fin 2012. Cependant, cette substitution risque de s'avérer insuffisante, puisque les effets sur la santé pourront continuer de se manifester, par la contamination en BPA de l'environnement aquatique. D'autre part cette substitution par une nouvelle molécule ne soulève-t-elle pas le risque d'arriver aux mêmes conclusions qu'avec le BPA après 50 ans ? C'est pourquoi il convient d'approfondir les connaissances concernant le BPA, afin de s'en servir comme modèle de compréhension du lien entre l'homme et son environnement, et utiliser ce modèle pour le choix du produit de remplacement.

ANNEXE

QUESTIONNAIRE DES PATIENTS PERMETTANT D'ÉVALUER LEUR EXPOSITION A L'EAU ET AUX MOLECULES D'INTERET.

Identification du patient (à remplir par les enquêteurs) : 3 premières lettres du nom du patient et 2 premières lettres du prénom du patient - -A001

QUESTIONNAIRE PATIENT

Questionnaire destiné aux patients ayant accepté le formulaire de consentement concernant l'étude sur les perturbateurs endocriniens.
Nom (les 3 premières lettres) :
Prénom (les 2 premières lettres) :
Date de Naissance :
Sexe :
Taille:
Poids :

Monsieur, Mademoiselle, Monsieur

Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à l'étude concernant les perturbateurs endocriniens et de répondre à ce questionnaire. Il nous permettra d'évaluer vos habitudes de vie notamment en ce qui concerne votre consommation d'eau.

Ce questionnaire comporte 25 questions et ne vous prendra pas plus de 5-10 min à remplir.

Vous avez l'entière liberté de répondre ou non à certaines questions, sans que cela n'ait de conséquences.

Les données seront, bien sûr, analysées de façon anonyme et confidentielle. Nous vous rappelons que cette étude a fait l'objet d'une autorisation de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL).



Identification du patient (à remplir par les enquêteurs) : 3 premières lettres du nom du patient et 2 premières lettres du prénom du patient - -A001

Lieux de vie :

1. Dans quelle ville vivez vous ? _____
Votre adresse exacte : _____
Code postal : _____
2. Avez-vous déménagé récemment (au cours du dernier mois) ?
 Oui Non
Si oui, dans quelle ville viviez vous avant ? _____

Emploi :

1. Avez-vous un emploi (y compris emploi saisonnier)?
 Oui Non (si non passez directement à la question 2)
Quel est votre métier? _____
Dans quelle entreprise travaillez vous ? _____
Dans quelle ville travaillez vous ? _____
Depuis combien de temps (précisez)? _____
2. Travaillez vous (ou Avez-vous déjà travaillé) ?
 dans une usine fabriquant des plastiques
 dans une usine fabriquant des CD, des DVD
 dans une usine fabriquant des textiles
 dans une usine fabriquant du papier, des emballages alimentaires
 dans un cabinet dentaire
 en contact avec l'eau (employé dans une piscine, plongeur, cuisinier, coiffeur...)
 Non : dans aucune de ces entreprises

Antécédents médicaux :

1. Avez-vous subi au cours du mois précédent des soins dentaires ?
 Oui Non
Si oui de quel type soins s'agit-il (décrivez)? _____
2. Avez-vous des variations de poids (pertes et/ou gains) régulières (Variations de 2kilos ou plus par semaine) ?
 Oui Non
3. Avez-vous perdu plus de 4kilos au cours du dernier mois (hors accouchement récent) ?
 Oui Non
4. Avez-vous pris plus de 4 kilos au cours du dernier mois (hors prises de poids lié à la grossesse) ?
 Oui Non
5. Avez-vous subi une intervention de type liposuction ?
 Oui Non

Consommation d'eau :

1. Quelle quantité d'eau du robinet buvez-vous en moyenne par jour ? Comptez environ 7 verres dans une bouteille de 1,5L et 3 tasses dans un bol

	A votre domicile		En dehors de votre domicile	
Dans votre thé		Tasses/j		Tasses/j
Dans le café		Tasses/j		Tasses/j
En infusion		Tasses/j		Tasses/j
En verre d'eau		Verres/j		Verres/j
Ajout de jus, sirop, apéritif anisé ...		Verres/j		Verres/j
Autres		Verres/j		Verres/j

Identification du patient (à remplir par les enquêteurs) : 3 premières lettres du nom du patient et 2 premières lettres du prénom du patient - -A001

Ne boit pas d'eau du robinet :

Possédez vous à votre domicile un dispositif de traitement de l'eau du robinet ?

Oui Non

Si oui lequel ?

- Pichet avec filtre
 Filtre sur le robinet
 Adoussiceur d'eau
 Autre : décrivez : _____

2. Quelle quantité d'eau embouteillée buvez-vous en moyenne par jour? Comptez environ 7 verres dans une bouteille de 1,5L et 3 tasses dans un bol

	A votre domicile		En dehors de votre domicile	
Dans votre thé		Tasses/j		Tasses/j
Dans le café		Tasses/j		Tasses/j
En infusion		Tasses/j		Tasses/j
En verre d'eau		Verres/j		Verres/j
Ajout de jus, sirop, apéritif anisé		Verres/j		Verres/j
Autres		Verres/j		Verres/j

Ne boit pas d'eau embouteillée :

3. Vous arrive-t-il régulièrement (plus d'une fois par semaine) de faire bouillir de l'eau puis de la mettre dans des contenants en plastique alors qu'elle est encore chaude ?

Oui Non

4. Combien de douche prenez-vous en moyenne ?

- 2 par jour
 1 par jour
 tous les 2 jours
 2 fois par semaine
 moins d'une fois par semaine
 jamais

Combien de temps restez-vous sous la douche en moyenne ? ____ min

5. Combien de bains prenez-vous en moyenne ?

- 2 par jour
 1 par jour
 tous les 2 jours
 2 fois par semaine
 moins d'une fois par semaine
 jamais

Combien de temps restez-vous dans le bain en moyenne ? ____ min

Identification du patient (à remplir par les enquêteurs) : 3 premières lettres du nom du patient et 2 premières lettres du prénom du patient - -A001

Loisir :

1. Etes vous un sportif de haut niveau (plus de 5heures par semaines) ?
 Oui Non
2. Vous baignez-vous régulièrement dans une piscine municipale?
 Oui :3 fois ou plus par semaine
 Oui environ 1 à 2 fois par semaine
 Oui moins d'une fois par semaine
 Non
3. Possédez-vous une piscine à votre domicile ?
 Oui Non
Si oui quel est le procédé de traitement de l'eau ?
 Chlore
 Eau salée
 Oxygène actif
 Autres : Décrivez _____
4. Quand vous vous baignez, combien de temps en moyenne restez-vous dans l'eau ?
 15 min
 30 min
 45 min
 60 min
 75 min
 plus de 75 min
5. Allez-vous dans des spas, jacuzzi Hammam... ?
 Oui : 1 fois ou plus par semaine
 Oui : 2 à 3 fois par mois
 Oui : 1 fois par mois
 Oui : moins d'une fois par mois
 Non, jamais

Merci de votre aide dans la réalisation de notre enquête

Remettre au à votre chirurgien (ou la sage femme) ce questionnaire une fois rempli



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ademollo N, Ferrara F, Delise M, Fabietti F, Funari E (2008): Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ Int* 34, 984-7
- AFNOR (2009): Qualité de l'eau : protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire - NF T 90-210
- AFSSA (2008): Avis relatif à l'évaluation des expositions et des risques sanitaires liés au Bisphénol A dans l'eau destinée à la consommation humaine
- AFSSET (2006): Evaluation et gestion des risques : références et pratiques, AFSSET document
- AFSSET (2007): Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement.
- Al-Rifai JH, Gabefish CL, Schafer AI (2007): Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. *Chemosphere* 69, 803-15
- ANSES (2011): Effet sanitaire du bisphénol A. Connaissance relatives aux usages du bisphénol A. 2009-SA-0331 et n°2010-SA-0197, Agence nationale de sécurité sanitaire.
- AOAC (2002): AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods.
- Bushnik T, Haines D, Levallois P, Levesque J, Van Oostdam J, Viau C (2010): Lead and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health reports / Statistics Canada, Canadian Centre for Health Information = Rapports sur la sante / Statistique Canada, Centre canadien d'information sur la sante* 21, 7-18
- Calabrese EJ (2002): Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutat Res* 511, 181-9
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2002): Defining hormesis. *Human & experimental toxicology* 21, 91-7
- Calabrese EJ (2011): How hormesis will change the risk assessment process. *Encyclopedia of Environmental Health*, 95-9
- Calafat A (2010): Background paper on BPA biomonitoring and biomarker studies, Food and Agriculture Organization of the United nation, World health Organization
- Calafat AM, Kuklanyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL (2005): Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Persp* 113, 391-5
- Cariot A, Dupuis A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S, Migeot V (2012): Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta* 100, 175-82
- Charron L (2011): Etude des effets du bisphénol A dichloré sur la communication cellulaire des cellules d'astrocytome humain U-251, par la technique de gap-FRAP, Université de Poitiers, Poitiers
- Chen ML, Chang CC, Shen YJ, Hung JH, Guo BR, Chuang HY and Mao IF (2008): Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere* 73, S239-45.
- Commission européenne JRC (2010): European Union Risk Assessment Report - 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A), Commission européenne
- Cormio PG, Christmann M, Rastall A, Grund S, Hollert H, Schuphan I, Schmidt B (2011): Chlorinated isomers of nonylphenol differ in estrogenic and androgenic activity. *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 46, 329-36
- Deborde M, Rabouan S, Gallard H, Legube B (2004): Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors. *Environ Sci Technol* 38, 5577-83
- Dekant W, Volkel W (2008): Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 228, 114-34
- European Union (1997): European Workshop on the Impact of endocrine Disrupters on Human Health and the Environment. Report EUR 17549, Environment and Climate Research Program DG XII European Commission.

- European Union (2000): Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption. In: DG-ENV (Hrsg.). BKH Consulting Engineers, Final report M0355008/1786Q/10/11/00
- European Union (2002): European union risk assessment report on existing substances, 4 nonylphenol (branched) and nonylphenol
- Fédération de la plasturgie (2011): Point de situation sur les produits de base du bisphénol A. Note de position communiquée aux Ministères., Plastics Europe, Elipso
- Fagin, D. (2012): Toxicology: The learning curve. *Nature* 490, 462-5.
- Feinberg M (2009): Labo-stat : guide de validation des méthodes d'analyse. Tec&Doc, Paris
- Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, Navalon A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL, Olea N (2007): Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 24, 259-64
- Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ (2010): Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics* 126, 760-8
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E (2012): Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage* 104, 19-34
- Foods Program Science and Research Steering Committee (2012): Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program
- Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y (2001): Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere* 44, 973-9
- Fukazawa H, Watanabe M, Shiraishi F, Shiraishi H, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y (2002): Formation of chlorinated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J Health Sci* 48, 242-9
- Gallard H, Leclercq A, Croue JP (2004): Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere* 56, 465-73
- Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT (2010): On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A* 1217, 3511-8
- Gauthier K (2010): Évaluation de l'efficacité des mesures du gouvernement fédéral, visant à réduire le nonylphénol et ses dérivés éthoxylés, Université de Sherbrooke, 95 pp
- Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quénel P, Dewailly E (2003): Environnement et Santé Publique - Fondements et Pratiques. Tec&Doc. Edisem
- Ginsberg G, Rice DC (2009): Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Persp* 117, 1639-43
- Guenther K, Kleist E, Thiele B (2006): Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: A systematic numbering system and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 542-6
- Gyllenhammar I, Glynn A, Darnerud PO, Lignell S, van Delft R, Aune M (2012): 4-Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. *Environ Int* 43, 21-8
- Holsapple MP, Wallace KB (2008): Dose response considerations in risk assessment--an overview of recent ILSI activities. *Toxicol Lett* 180, 85-92
- ICH Icohotrfropfhu (2005): Validation of analytical procedures : text and methodology Q2(R1) Step 4 version
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. (consultation en juillet 2012)
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y (2002): Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17, 2839-41
- INERIS (2005a): Nonylphenols et Ethoxylates. Données technico-économique sur les substances chimiques de France.

- INERIS (2005b): Etude de l'analyse des alkylphénols
- INERIS (2010): Rapport d'étude : Le bisphenol A
- INRS (2006a): Nonylphénol et 4-nonylphénol ramifié.
- INRS Indreds (2005): Inventaire des agents CMR
http://chat.inrs.fr/cmr/publigen_cmr_v2.nsf/FrontOffice?OpenFrameset&Start=D:CAS_80-05-7 [base de données en ligne] consulté le 11/08/2012 (consultation en juillet 2012)
- INRS Indreds (2006b): Matières plastiques et adjuvants - Hygiène et sécurité, R. Fahri, C. Morel, C. Chéron,
- INSERM (2011): Reproduction et environnement, Inserm
- ISO18857-2:2009(E) (2009): Water Quality - Determination of selected alkylphenols - part 2 : Gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols, their ethoxylates and bisphenol A in non-filtered samples following solid-phase extraction and derivatisation. In: ISO (Hrsg.)
- ISO24293:2009(E) (2009): Water quality - Determination of individual isomers of nonylphenol - method using solid phase extraction (SPE) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)
- ISO 3534 (2006): Statistics-Vocabulary and Symbols. Part 1: General statistical terms and terms used in probability
- ISO 5725-1 (1994): Practical guide - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -part1: General principles and definitions
- ISO TC 69/SC 6 N (2011): Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and result - part 1 : Introduction and basic principle.
- Jardim WF, Montagner CC, Pescara IC, Umbuzeiro GA, Di Dea Bergamasco AM, Eldridge ML, Sodr  FF (2011): An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. Separation and Purification Technology 84, 3-8
- Jimenez-Diaz I, Zafra-Gomez A, Ballesteros O, Navea N, Navalon A, Fernandez MF, Olea N, Vilchez JL (2010): Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878, 3363-9
- Katase T, Okuda K, Kim YS, Eun H, Takada H, Uchiyama T, Saito H, Makino M, Fujimoto Y (2008): Estrogen equivalent concentration of 13 branched para-nonylphenols in three technical mixtures by isomer-specific determination using their synthetic standards in SIM mode with GC-MS and two new diastereomeric isomers. Chemosphere 70, 1961-72
- Kim YH, Kim CS, Park S, Han SY, Pyo MY, Yang M (2003): Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. Biochem Biophys Res Commun 312, 441-8
- Kim YS, Katase T, Sekine S, Inoue T, Makino M, Uchiyama T, Fujimoto Y, Yamashita N (2004): Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. Chemosphere 54, 1127-34
- Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W (2012): A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B 898, 90-4
- Kuch HM, Ballschmiter K (2001): Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environ Sci Pollut 35, 3201-6
- Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H (2003): Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30, 1743-9
- Kuruto-Niwa R, Terao Y, Nozawa R (2002): Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. Environ Toxicol Pharmacol 12, 27-35

- Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R (2007): Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66, 1160-4
- Langwaldt JH, Puhakka JA (2000): On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environmental Pollution* 107, 187-97
- Le Monde (2010): http://www.lemonde.fr/societe/article/2010/11/25/l-ue-interdit-le-bisphenol-a-pour-les-biberons_1445144_3224.html L'UE interdit le bisphénol A pour les biberons. (consultation en juillet 2012)
- Le Monde (2011): http://www.lemonde.fr/planete/article/2011/10/12/les-deputes-votent-l-interdiction-du-bisphenol-a-dans-les-emballages-alimentaires_1586413_3244.html (consultation en juillet 2012) Les députés votent l'interdiction du bisphénol A dans les emballages alimentaires
- Le Monde (2012): http://www.lemonde.fr/planete/article/2012/10/10/bisphenol-a-un-poids-de-litterature-enorme-dans-le-sens-de-la-toxicite_1773207_3244.html. Nous avons identifié 73 substituts possibles au bisphénol A.
- Li X, Ying GG, Su HC, Yang XB, Wang L (2010): Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environ Int* 36, 557-62
- Liao C, Kannan K (2012): Determination of free and conjugated forms of bisphenol a in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 46, 5003-9
- Lin CY, Fuh MR, Huang SD (2011): Application of liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of alkylphenols and bisphenol-A in water. *Journal of Separation Science* 34, 428-435
- Liu H, Zhao HM, Quan X, Zhang YB, Chen S (2009): Formation of Chlorinated Intermediate from Bisphenol A in Surface Saline Water under Simulated Solar Light Irradiation. *Environmental Science & Technology* 43, 7712-7
- Loos R, Locoro G, Contini S (2010): Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS(2) analysis. *Water Res* 44, 2325-35
- Lopez-Espinosa MJ, Freire C, Arrebola JP, Navea N, Taoufik J, Fernandez MF, Ballesteros O, Prada R, Olea N (2009): Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere* 76, 847-52
- Muncke J (2009): Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *Sci Total Environ* 407, 4549-59
- Mutou Y, Ibuki Y, Terao Y, Kojima S, Goto R (2006): Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol a after exposure to ultraviolet B. *Biological & pharmaceutical bulletin* 29, 2116-9
- Needham LL, Naiman DQ, Patterson DG, Jr., LaKind JS (2007): Assigning concentration values for dioxin and furan congeners in human serum when measurements are below limits of detection: an observational approach. *Chemosphere* 67, 439-47
- Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H (2010): Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus 118, 1196-1203
- NTP (2008): NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. NTP CERHR MON, i-III1
- OCDE (1998): ENV/MC/CHEM (98)17. Serie sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes. Numéro 1. Les principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997). [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem\(98\)17&docLanguage=fr](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem(98)17&docLanguage=fr), Paris
- Olea (2008): Alkylphenols and bisphenol A and its chlorinated derivatives in adipose tissue of children. *Transactions on ecology and the environment* 110

- Otaka H, Yasuhara A, Morita M (2003): Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction. *Anal Sci* 19, 1663-6
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K (2008): Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 28, 258-63
- Petrovic M, Diaz A, Ventura F, Barcelo D (2003): Occurrence and removal of estrogenic short-chain ethoxy nonylphenolic compounds and their halogenated derivatives during drinking water production. *Environ Sci Pollut* 37, 4442-8
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM (2000): The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences* 54, 3-18
- Preuss TG, Gehrhardt J, Schirmer K, Coors A, Rubach M, Russ A, Jones PD, Giesy JP, Ratte HT (2006): Nonylphenol Isomers Differ in Estrogenic Activity. *Environmental Science & Technology* 40, 5147-53
- Quevauviller P, Ghestem JP, Roy S (2012): Qualité et assurance qualité en chimie analytique appliquée à l'environnement, Les techniques de l'ingénieur
- Ranjit N, Siefert K, Padmanabhan V (2010): Bisphenol-A and disparities in birth outcomes: a review and directions for future research. *J Perinatol* 30, 2-9
- Riu A, Perdu E, Jamin E, Ty V, Bruel S, Hillenweck A, Zalko D (2010): In Vitro Biotransformations of Chlorinated Bisphenol A by Human and Rat Sub-Cellular Liver Fractions. *Drug Metab. Rev.* 42, 224-5
- Riu A, Grimaldi M, le Maire A, Bey G, Phillips K, Boulahtouf A, Perdu E, Zalko D, Bourguet W, Balaguer P (2011a): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Is a Target for Halogenated Analogs of Bisphenol A. *Environ Health Persp* 119, 1227-32
- Riu A, le Maire A, Grimaldi M, Audebert M, Hillenweck A, Bourguet W, Balaguer P, Zalko D (2011b): Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci* 122, 372-82
- Sajiki J, Miyamoto F, Fukata H, Mori C, Yonekubo J, Hayakawa K (2007): Bisphenol A (BPA) and its source in foods in Japanese markets. *Food Addit Contam* 24, 103-12
- Santé Canada (2001): Liste des substances d'intérêt prioritaire. rapport d'évaluation. Les nonylphénol et ses dérivés éthoxylés, Canada
- Santhi VA, Sakai N, Ahmad ED, Mustafa AM (2012): Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Sci Total Environ* 427-428, 332-8
- Savabieasfahani M, Kannan K, Astapova O, Evans NP, Padmanabhan V (2006): Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology* 147, 5956-66
- Schwesig D, Borchers U, Chancerelle L, Duffek A, Eriksson U, Goksøyr A, Lamoree M, Lepom PP, Leonards P, Leverett D, McLachlan M, Poulsen V, Robinson R, Silharova K, Tolgyessy P, Wegener J, Westwood D (2009): Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants. http://www.norman-network.net/public_docs/norman_v1_v2_v3_version_02_final_feb2009.pdf (consultation en juillet 2012)
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN (2008): Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34, 1033-49
- Sodre FF, Locatelli MAF, Jardim WF (2010): Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. *Water Air and Soil Pollution* 206, 57-67
- Stackelberg PE, Gibs J, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Lippincott RL (2007): Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Sci. Total Environ.* 377, 255-72

- Stahlhut RW, Welshons WV, H. SS (2009): Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Non-Food Exposure, or Both. *Environ Health* 117, 784-9
- Stottmeister E *et al.* (2009): Interlaboratory trial on the analysis of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, and bisphenol A in water samples according to ISO/CD 18857-2. *Analytical Chemistry* 81, 6765-73
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K (2004): Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 18, 501-7
- Tabata A, Watanabe N, Yamamoto I, Ohnishi Y, Itoh M, Kamei T, Magara Y, Terao Y (2004): The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci Technol* 50, 125-32
- Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K (2005): In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 207, 215-21
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM (2002): Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences* 68, 121-46
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, Seely JC, Dimond SS, Van Miller JP, Shiotsuka RN, Beyer D, Hentges SG, Waechter JM (2008): Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol a in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicological Sciences* 104, 362-384
- Uchiyama T, Makino M, Saito H, Katase T, Fujimoto Y (2008): Syntheses and estrogenic activity of 4-nonylphenol isomers. *Chemosphere* 73, S60-5
- UE (2003a): Stratégie européenne en matière d'environnement et de santé. Union Européenne, COM (2003) 338
- UE (2003b): Directive 2003/53/CE du parlement européen et du conseil du 18 juin 2003 portant vingt-sixième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil concernant la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (nonylphénol, éthoxylate de nonylphénol et ciment), pp. L178-24- L178-27
- US Department of Health and Human Services FDA, Center for Drug Evaluation and Research (2001): Guidance for industry, bioanalytical method validation. <http://www.fda.gov/downloads/drug/.../guidances/ucm070342.pdf> (consultation en juillet 2012)
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007): Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24, 139-77
- Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM (2009): Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30, 75-95
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, Vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP (2012): Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr Rev* 33, 378-455
- Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT (2005): Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific review. Applied Ecology and Environmental Research* 4, 1-25
- Vela-Soria F, Jimenez-Diaz I, Rodriguez-Gomez R, Zafra-Gomez A, Ballesteros O, Fernandez MF, Olea N, Navalon A (2011): A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC-MS/MS. *Anal methods* 3, 2073-81
- Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W (2002): Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15, 1281-7
- Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and Industrial Health* 14, 239-60

- Vom Saal FS, Welshons WV (2006): Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental Research* 100, 50-76
- Wang X, Diao CP, Zhao RS (2009): Rapid determination of bisphenol A in drinking water using dispersive liquid-phase microextraction with in situ derivatization prior to GC-MS. *J Sep Sci* 32, 154-9
- Wheeler TF, Heim JR, LaTorre MR, Janes AB (1997): Mass Spectral Characterization of p-Nonylphenol Isomers Using High-Resolution Capillary GC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 35, 19-30
- Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS (2005): Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Persp* 113, 431-9
- Yamamoto T, Yasuhara A (2002): Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 46, 1215-23
- Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM (2006): Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J chromatogr B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 831, 110-5

Analyse de traces de micropolluants dans l'eau et le lait maternel en vue d'évaluer leur impact sur la santé

L'exposition humaine au bisphénol A et aux nonylphénols constitue un problème majeur de santé publique, en conséquence du caractère ubiquitaire de ces molécules et de leur toxicité en tant que perturbateur endocrinien. Leurs dérivés chlorés, formés par chloration lors de l'étape de désinfection de l'eau potable, présentent un effet perturbateur endocrinien jusqu'à 100 fois plus important que les composés parents. Au cours de ce travail nous avons développé des méthodes de dosage sensibles et reproductibles par LC-MS/MS de ces polluants dans l'eau. Le choix de l'isomère 353NP a été discuté et retenu comme substance de référence des nonylphénols. Le bisphénol A et le 353NP ont été retrouvés dans l'eau de surface (en entrée) et dans l'eau traitée (en sortie) de 8 usines de traitement d'eau potable, à des concentrations comprises entre 2,0 et 29,7 ng.L⁻¹ et entre <4,1 et 124,9 ng.L⁻¹ respectivement. Par ailleurs, aucun dérivé chloré n'a été détecté. Des dosages du bisphénol A et de ses dérivés chlorés réalisés dans 14 eaux du robinet et 4 eaux embouteillées ont montré leur présence dans ces eaux de boisson.

Pour évaluer l'imprégnation de la population au bisphénol A et ses dérivés chlorés, nous avons mis au point un dosage ultrasensible de ces molécules par SPE-UPLC-MS/MS dans le lait maternel, validé selon les recommandations internationales. Ces composés ont été retrouvés dans le colostrum de 21 mères avec des concentrations comprises entre <0,40 et 6,12 ng.mL⁻¹. Ces résultats montrent que la non prise en compte de la formation de BPA chlorés dans l'eau sous estime le rôle du milieu aquatique dans la toxicité humaine du BPA.

Mots clefs : bisphénol A, nonylphénol, eau, lait maternel, biomonitoring, dérivés chlorés du bisphénol A, dérivés chlorés des nonylphénols, LC-MS/MS

Quantification of traces of micropollutants in water and breast milk in assessment impact on human health

Bisphenol A and nonylphenols are widespread industrial chemicals which over the past decade have demonstrated their toxicity as endocrine disruptors. Residual chlorine present in drinking water may react with these compounds to form chlorinated derivatives, which have demonstrated a heightened level of estrogenic activity. In this work, we have comprehensively validated accurate and reproducible methods of quantification measuring these target compounds in water using LC-MS/MS. We have discussed and selected 353NP as the reference material for the analysis of nonylphenols. Bisphenol A and 353NP were found in both surface and treated water samples extracted from eight French drinking water treatment plants, at a level ranging from 2.0 to 29.7 ng.L⁻¹ and from <4.1 to 124.9 ng.L⁻¹, respectively. Neither chlorinated BPA nor chlorinated 353NP was detected. Quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in 14 tap water samples and 4 bottled water samples showed that those pollutants are present in drinking water.

Exposure to bisphenol A and its chlorinated derivatives in the population was investigated through breast milk. We developed a method using on-line SPE-UPLC-MS/MS to quantify these chemicals in breast milk according to internationally accepted guidelines. The target compounds were found in the colostrum of 21 women at concentrations ranging from <0.40 to 6.12 ng.mL⁻¹. These results show that failure to take into account the production of BPA chlorinated derivatives in water may lead to underestimation of the relevance of an aquatic environment as a source of BPA toxicity detrimental to human health.

Keywords: bisphenol A, nonylphénol, water, human milk, biomonitoring, chlorinated derivatives of bisphenol A, chlorinated derivatives of nonylphenols, LC-MS/MS