Construction d'indicateurs de toxicites cumulees : cas des composes organiques semi volatils dans les environnements interieurs.

Kevin Fournier

▶ **To cite this version:**

Kevin Fournier. Construction d'indicateurs de toxicites cumulees : cas des composes organiques semi volatils dans les environnements interieurs.. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2015. Français. NNT : 2015REN1B019 . tel-01308535

HAL Id: tel-01308535

https://theses.hal.science/tel-01308535

Submitted on 28 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2015

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Kevin FOURNIER

Préparée à l'unité de mixte recherche INSERM 1085 - IRSET
Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail
Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique / UFR Médecine

Construction d'indicateurs de toxicité cumulés : Cas des composés organiques semi-volatils dans les environnements intérieurs

Thèse soutenue à Rennes
le 9 octobre 2015

devant le jury composé de :

Robert BAROUKI
Professeur des universités – Praticien hospitalier
Université Paris Descartes / *rapporteur*

Yvette BONVALOT
Professeur associée
Université de Montréal / *rapporteur*

Alexandre PERY
Directeur de l'école Doctoral ABIES
AgroParisTech / *examinateur*

Laurent VERNHET
Professeur des universités
Université de Rennes 1 / *examinateur*

Denis ZMIROU-NAVIER
Professeur des universités – Praticien hospitalier,
Université de Lorraine – EHESP / *directeur de thèse*

Nathalie BONVALLOT
Enseignant chercheur, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique / *co-directrice de thèse*

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été dirigée par Denis Zmirou-Navier, directeur du département Santé, Environnement, Travail et Génie Sanitaire de l'EHESP, que je remercie pour la qualité de son encadrement, de ses conseils, toujours d'une impressionnante pertinence et de l'autonomie qu'il m'a accordée. Nathalie Bonvallot, enseignant chercheur de ce même département a d'abord encadré puis codirigé cette thèse. Je tiens ici à lui faire part non seulement de mes remerciements mais également de mon infinie reconnaissance pour ces 3 ans et demi de soutien, de conseils, de bienveillance, de recadrage… Mais ce fût également 3 ans et demi durant lesquels Nathalie a su me supporter et faire avec nos différences.

Je remercie également Yvette Bonvalot et Robert Barouki d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse ainsi que Laurent Vernhet et Alexandre Pery d'avoir accepté de faire partie de mon jury afin d'évaluer de ce travail.

Merci à Sylvaine Cordier, Florence Zeman, Armelle Baeza, Jean-Ulrich Mullot, Philippe Glorennec et Christophe Rousselle, membres de mon comité de thèse pour m'avoir accompagné pendant ces trois années, pour leurs conseils et leurs commentaires plus que constructifs.

Je remercie également chaleureusement Pascal Sanders, aussi membre de mon comité de thèse et représentant de mon école doctorale, pour sa bienveillance, l'ensemble de ses remarques et conseils sur mes travaux mais également sur mes projets de vie.

Dans le cadre du projet général Ecos dans lequel cette thèse s'inscrit, j'ai eu l'occasion de présenter l'avancée de mes recherches aux membres du comité de pilotage Ecos. Merci à eux tous, merci à Barbara, Corinne, Fabien, Olivier et Jean-Paul. Merci pour tous vos conseils, votre écoute et certains autres moments de rigolades.

Merci également à Cléo pour tous ses conseils, son aide dans la modélisation de mes courbes et le temps qu'elle m'a accordé.

En trois ans, j'ai rencontré un grand nombre de personnes que ce soit dans le cadre de mes travaux de recherche ou par le biais de mes activités associatives. Je n'oublierai personne, tous nos moments resteront gravés dans ma mémoire, merci pour tout. En écrivant ces quelques lignes, mes pensées vont vers :

- Mes collègues du DSET (bas en haut), qui vont beaucoup me manquer. Ronan pour ses expressions bretonnes et sa bonne humeur, Michèle pour ses conseils, Véronique pour son aide les démarches administratives, Betty pour ses blagues, sa bonne humeur et ses demandes continues de M&M's… Je pense aussi à Olivier pour nos discussions enflammées (de pêche, de surf, de kite…), promis Olivier, un jour je te montrerai comment « kiter » ! Pierre pour son éternel soutien, ses conseils et son écoute dans des moments parfois difficiles. Merci également à toi Séverine pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tous les services rendu, ton soutien et l'intérêt que tu as porté à tous mes projets, même quand ils étaient farfelus ! Ce département a beaucoup de chance de pouvoir compter sur toi.
- Mes collègues de l'école pour leur soutien continu et leurs encouragements. Merci Martine, grâce à toi et à la confiance que tu m'as accordé pour les cours du MPH, mon anglais s'est amélioré. Merci à Emmanuelle et Christophe pour leur soutien et tous les moments passés à l'extérieur. Vous m'avez fait voir l'école sous un autre œil.
- Bernard (ou Berni), mon mentor en quelque sorte. Tu m'as fait confiance sur de nombreux sujets, tu m'as écouté et conseillé quand j'en avais besoin, tu as toujours été là et dès le début. J'ai eu beaucoup de chance de t'avoir rencontré. Nos caractères et nos

profils ayant quelques similitudes, j'espère qu'un jour ma carrière sera aussi brillante que la tienne.

- Les différentes personnes de l'ANSES Paris pour leur aide, leur soutien et leur accueil chaleureux. Merci Christophe pour ton accompagnement, tes conseils et ta bienveillance. Merci Aurélie pour ton accueil et ton accompagnement. Merci Laurent pour la formation que tu m'as accordé, pour tes conseils, ton œil critique et merci des bons moments à l'extérieur : Comment se placer au mieux lors d'un buffet de congrès, avec démo à l'appui ! Nos bières sirotées aux portes de Paris avant de commencer le weekend… Que de bons souvenirs !
- Les anciens doctorants de l'école : Yanis, Vincent et Youssef, qui m'ont aidé à me lancer dans ces trois années. Youssef merci pour ta bienveillance et nos longues soirées Montréalaises à refaire le monde sous -28°C, quelques litres de bières et la découverte d'une vie nocturne assez agitée... Ton accueil sur tes terres Canadienne m'a beaucoup touché et m'a reboosté pour la suite. Par contre la prochaine fois que j'arrive de Paris à chez toi à 22h30, préviens moi que le lendemain tu déménages. Ça m'évitera de me « coucher » à 7h30 du mat après une nuit à refaire le monde ! ☺
- Aux nombreux stagiaires qui sont passés par chez nous. Parmi eux, Maud et Emmanuel ont été géniaux. Emmanuel pour sa gentillesse, sa disponibilité et le travail qu'il a fourni lors de son stage. Tu m'as beaucoup aidé Manu, donc merci. Maud, la ptite stagiaire, Maud qui maintenant poursuit en thèse. Merci des pauses clopes volées où tu m'écoutais me plaindre et ronchonner. Merci de ton écoute et de ton soutien…
- A tous les étudiants de l'EHESP avec qui de nombreux moments de vie ont été partagés, notamment lors des séquoias (Oumou, Arianne et tellement d'autres).

REMERCIEMENTS

Dans les moments plus privées de la vie de doctorant, moments nécessaires à son équilibre, il y a ses amis, sa famille et ses amours.

Je suis obligé par commencer par ceux qui ont fait mon quotidien pendant cette période bretonne. Je pense à Yanis, à Malé, à Françoise, à Erwan et à Maxou, à Michael, Léa, Denis et Charlène. Merci à vous tous pour tous ces moments plus que géniaux. Erwan ta présence indéfectible, ta bienveillance, ton amitié, pour tout ce qui a été traversé, pour le ski, pour tous les bons moments. Malé, merci d'avoir toujours été là, des pauses clopes aux palets du soir en passant par les bonnes bouffes avec notre Fanfan, toujours aussi adorable. Maxou, tu es un type formidable que la vie m'a permis de rencontrer. Ma fin de thèse aurait été beaucoup plus difficile si tu n'avais pas été là. J'espère que l'on aura l'occasion de voir à Lyon ou ailleurs. Léa et Michael mes colloques de fin de parcours. Merci pour les bons moments passés ensemble. Je garderai ceux-là en tête. Denis, mon grand frère chauve Breton... Tellement de souvenirs, il serait déplacé de tous les citer ici mais tout se résume à un court-métrage primé lors d'un festival, et à une phrase d'un film culte : « on n'est pas bien là, à la fraiche, décontracté… ». Merci pour tout mon Denis. Enfin toi Charlène, tu arrives à la fin de cette période et pourtant, comme une graine, tu prends racine et aujourd'hui tu es ma fleur. Merci d'avoir été là ces dernières semaines. Tu as réussi à me faire penser à autre chose, à me faire découvrir et à me faire partager tellement… Merci du fond de mon cœur.

Pour les amis de plus longue date, malgré mon éloignement en venant vivre à Rennes, vous avez toujours été là. Chaque moment passé, individuel ou collectif avec vous a été d'un soutien et d'une aide majeure. Romain (Poivre et Sel ou la Grande sèche), Dac (le nain), Beb's (la sal***), Geo (Pinocchio) et Soun (Renoi ou Mamad), merci de m'avoir fait passé

tant de bons moments, tant de Bayonne, de château, de 4-21, de rigolades, de souvenirs… Merci aussi et surtout d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin car même si on se taquine et que l'on fait tous nos fières, je sais aussi que vous savez écouter. Merci de m'avoir permis de garder les pieds sur terre. L'imposteur (ou le roux qui pue) peut-il devenir docteur ?

Merci également à Anne, Elo, Xav', Marc et Vincent. Vous êtes mon socle, mon support, la base de ma vie. Anne et Vincent simplement parce que je vous aime sincèrement, vous êtes un modèle pour moi. Vincent, tu es un véritable ami, un frère, un type qui me manque et à qui j'aimerai ressembler. Ambre a beaucoup de chance de vous avoir pour parents. Marc, tu as été mon premier supporter, mon premier soutien, présent dès les premiers moments pour m'accompagner. Jamais quelqu'un d'extérieur à mes recherches ne s'est autant intéressé à ce que je faisais. Je suis fier d'être ton ami pour des milliers de raisons mais aussi car tu es une personne sur qui je peux compter (notamment pour me ramener 100 bouteilles de champagne de Paris à Rennes pour un gala !). Xav, on se connait depuis moins longtemps mais à chaque fois, te voir est un bonheur ! Ta sincérité et ton soutien m'ont beaucoup aidé. Je pense aussi à Yann, évidemment, ton intérêt, ton intelligence, ta curiosité ont donné place à tellement de discussions… Comme je te l'ai toujours dit, c'est toi le vrai chercheur ! Elo… Elo je ne sais pas trop quoi te dire ni par où commencer. Si il n'y avait qu'un mot, je dirai « merci », si il n'y avait qu'une phrase, je dirai que « sans toi, je ne serai pas arrivé à tout ça et je ne serai sûrement pas là aujourd'hui ». Merci pour tout, tu es une personne absolument extraordinaire.

Ma famille, ma chère famille. Ça n'a pas été facile pour vous de me comprendre ou de me supporter quand je parlais de « mes trucs pour lesquels on comprend rien ». Les débuts dans

cette aventure m'ont appris beaucoup sur moi-même, grâce à vous. Maman, t'as manière de faire mine de me comprendre quand je partais dans mes délires puis lire dans tes yeux « mince il me regarde, il a fini de parler, je dois dire un truc ? ». Toute l'attention d'une mère que tu as si bien su me donner, ton réconfort et ton soutien dans toutes les épreuves surmontées. Merci ma maman, je t'aime plus que tout. Nono et Floflo, j'ai envie de vous dire « comme maman quoi hein ? ». Non, merci à vous aussi de m'avoir supporté et encouragé quand il le fallait, vous êtes toute ma vie. Sousoune (oui mon frère), tu as toujours été là et j'espère que tu le seras toujours. Tout est parti d'une histoire de pont au-dessus du Morbras pour arriver à une pichenette sur la main pour expliquer le lien entre l'infiniment grand et l'infiniment petit (si ça c'est pas du private joke ! ☺). Papa, malgré nos débuts difficiles, nos incompréhensions, nos doutes, tu as toujours été là. Je t'en serai toujours reconnaissant. Tu sais, plus le temps passe, plus je m'avance dans la vie, plus je me dis que c'est de personnes comme toi que je voudrai être entouré pour le reste de ma vie. Je t'aime mon papa.

REMERCIEMENTS

Où que tu sois, merci Mamie Denise, je sais que tu veilles sur moi…

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

1. Contexte général 3
2. Le cas de l'environnement intérieur 7
3. Effets sanitaires des COSV 10
   3.1. Effets sur le système reproducteur 11
   3.2. Effets sur le système nerveux 13
   3.3. Effets sur les systèmes respiratoire et immunitaire 16
4. L'apport des approches mécanistiques 16
5. La problématique des mélanges aux faibles doses : Comment évaluer leurs impacts sur la santé ? 21
6. Données de contaminations françaises 45

HYPOTHESES DE RECHERCHE, OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE ET STRATEGIE GENERALE 51

1. Hypothèses de recherche 53
2. Objectif de la thèse et stratégie générale 55

METHODE 59

1. Regroupement des COSV 61
2. Choix de l'évènement clef 75
3. Calcul de Benchmark doses 77
   3.1. Sélection des jeux de données dose-réponse 77
   3.2. Choix de la benchmark response 78
   3.3. Modélisation de la relation dose-réponse et sélection du meilleur modèle mathématique . 79
4. Calcul de Relative potency factors 81

RESULTATS 83

1. Mise à jour du regroupement des COSV 85
2. Construction d'indicateurs de toxicité cumulés pour les effets reprotoxiques mâle des COSV..... 87
3. Construction d'indicateurs de toxicité cumulés pour les effets neurotoxiques des COSV 123

DISCUSSION GENERALE 167

1. Une approche novatrice et réaliste : les atouts de la méthode 169
2. Les limites de l'approche 171
   2.1. La disponibilité des données 171
   2.2. La comparabilité des données 172

2.3. Propriétés physico-chimiques des composés 173
2.4. Le calcul des benchmark doses 174
3. Analyses de sensibilité 177
3.1. Choix du logiciel pour le calcul de BMD 177
3.2. Influence de l'écart type sur le calcul de benchmark doses 179
3.3. Influence du choix du modèle 180
3.4. Choix de la fenêtre d'exposition : cas des données reprotoxiques 181
3.5. Choix du modèle d'étude : cas des composés neurotoxiques 185
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 189
1. Conclusion 191
2. Perspectives 192
2.1. Validation des hypothèses 192
2.2. Prise en compte des COSV précédemment exclus 193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE 195
ANNEXES 209
Publications scientifiques 211
Communications orales en congrès internationaux 211
Communications orales en congrès nationaux 212
Communications orales lors de journées de recherche 213
Communications par affiches en congrès internationaux 214
Communications par affiches en congrès nationaux 215
Récompense 216
Activités parallèles 216

Tableau 1 : Principaux COSV retrouvés dans les environnements intérieurs en Amérique du nord, en Europe et en Asie. 10

Tableau 2 : Synthèse des informations des différentes campagnes de prélèvements 46

Tableau 3 : Mise à jour des deux groupes de COSV retenus pour le calcul d'indicateurs de toxicité cumulés. 86

Tableau 4 : Comparaison des résultats des calculs de BMD et RPF entre PROAST et BMDS pour une diminution de 10% de la testostérone en utilisant le modèle de Hill. 177

Tableau 5 : Influence de l'écart-type sur le calcul de BMD et RPF : Exemple du BPA. 179

Tableau 6 : Comparaison des résultats des calculs de BMD_{10} et BMD_{50} en fonction des modèles de Hill ou exponentiels. 181

Tableau 7 : BMD_{10}, BMD_{50} et RPF correspondant pour 3 COSV agissant sur la testostérone fœtale et adulte. 182

Tableau 8 : BMD_{10} des 2 COSV agissant sur le comportement du rat adulte *in vivo* et la mort neuronale *in vitro* 187

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la production de produits chimiques dans l'Union Européenne des 28 de 2004 à 2013, en million de tonnes 6

Figure 2: Mécanisme de production de testostérone dans les cellules de Leydig 17

Figure 3 : Principaux mécanismes impliqués dans la mort neuronale 19

Figure 4 : Fréquences de quantification et de détection de 48 COSV dans les poussières déposées de 145 logements français 47

Figure 5 : Fréquences de quantification et de détection de 66 COSV dans les particules en suspension de l'air de 297 logements français 48

Figure 6 : Exemple de différences entre mécanismes et modes d'action de composés sur une cellule conduisant au même effet biologique 54

Figure 7 : Etapes de la stratégie mise en place pour le calcul d'indicateurs de toxicité cumulés pour les COSV ayant des effets communs 57

17β-HSD	17β-hydroxysteroid dehydrogenase
3β-HSD	3β-hydroxysteroid dehydrogenase
AP-1	Activator Protein 1
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
B[a]P	Benzo[a]pyrène
BADGE	Bisphenol A diglycidyl ether
BBP	Benzylbutylphtalate
BDE-X	Bromodiphényléthers
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BPA	Bisphenol A
Ca2+	Calcium
COSV	Composés organiques semi-volatils
CRA	Cumulative risk assessment
Cyto c	Cytochrome c
DBP	Di-n-butylphtalate
DDE ou 4,4'-DDE	
DDT ou 4,4'-DDT	Di-chlorodiphényltrichloroéthane
DEHP	Di-éthylhexylphtalate
DEP	Di-éthylphtalate
DiBP	Di-isobutylphtalate
DiNP	Di-isononylphtalate
DMEP	Di(2-methoxyethyl)phthalate
DMP	Di-méthylphtalate
DOP	Di-octylphtalate
EPA	Environmental Protection Agency
GD	Gestation day
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Reductase
GSSG	Glutathione disulfide
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
Insl3	Insulin-like factor-3
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IRAK	IL-1R1 associated kinase
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NQO1	NAD(P)H Quinone Oxoreductase
NRC	National Research Council
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORP	Observatoire des résidus de pesticides
P450c17 ou Cyp17a1	17α-hydroxylase
P450scc	Cytochrome P450 side-chain cleavage
pAkt	pAkt
PBDE	Polybromodiphényléthers

PCB	Polychlorobiphényles
PKC	Protein Kinase C
PND	Post natal day
PNSE	Plan National Santé Environnement
QI	Quotient intellectuel
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein

INTRODUCTION GENERALE

1. Contexte général

Le confort et la qualité de vie ont toujours été une des préoccupations majeures de l'espèce humaine. C'est peut être une des caractéristiques principales qui la différencie des autres espèces. Cette quête continuelle a permis d'augmenter considérablement notre espérance et notre qualité de vie. Depuis le début du 20^{ième} siècle, la technologie et les connaissances qui en découlent n'ont cessé de croitre, rendant ainsi notre vie plus confortable. Les substances chimiques, extraites de la nature ou synthétisées *de novo* par l'homme, ont beaucoup participé à cet état, même si nous sommes conscients des effets parfois néfastes de ces substances à la fois sur notre environnement et sur notre santé.

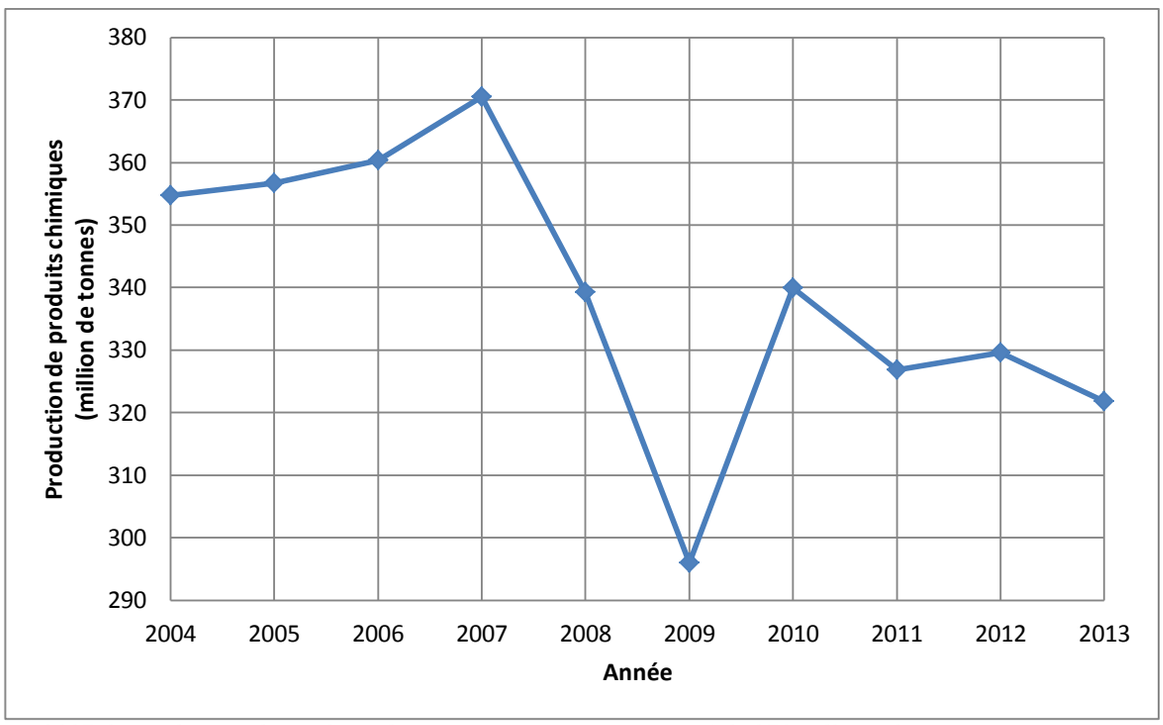
Depuis des millénaires, l'homme est conscient des dangers pour sa santé que constituent les substances chimiques. L'exemple le plus marquant est celui de l'utilisation des poisons (extraits de plantes ou d'animaux). Le plus connu d'entre eux et le plus utilisé par les Athéniens, était issu d'une plante herbacée, la Ciguë tachetée ou grande Ciguë (*Conium masculatum*). C'est d'ailleurs par ingestion de cet extrait de plante que Socrate se donna la mort en 399 avant J.C. (*Phédon*, Platon). Une autre figure historique Grecque, Mithridate VI, tenta également de se donner la mort en 63 avant J.C. par l'ingestion de Ciguë. Au 16^{ième} siècle, dans ce contexte de l'utilisation des substances chimiques, Paracelse, considéré comme le père de la toxicologie moderne, écrivit sa célèbre phrase « *Sola dosis facit venenum* » (seule la dose fait le poison). Paracelse s'était rendu compte que l'absorption de petites doses de toxiques pouvait ne pas avoir d'effet et que l'absorption de grandes quantités de substance « inoffensive », comme l'eau, pouvaient être mortelle. Il observa également qu'en fonction des quantités ingérées, des substances pouvaient avoir des effets différents. Il nota par exemple que le mercure, à faibles doses, peut soigner la syphilis mais qu'à plus fortes concentrations, il tue (O'Shea 1990). Cette idée que

l'environnement peut nous permettre d'améliorer notre confort et notre qualité de vie est aussi ancienne que celle du poison. Ainsi, également depuis des millénaires, l'homme a utilisé des colorants pour améliorer les apparences, permettant la teinture des vêtements grâce par exemple à l'indigo (Aillaud 1990), à la pourpre, au kermès ou au pastel (Lévi Strauss, Encyclopædia Universalis). Dans le chant XXII de l'Odyssée (8ième siècle avant J.C.), Homère décrivait déjà le soufre comme un désinfectant (Homero and Didot 1788; Mérat and Lens 1837). D'après l'observatoire des résidus de pesticides (ORP) (http://observatoire-pesticides.gouv.fr/, visitée le 10/07/2015), ce même soufre était utilisé à la même période (-1000 avant J.C.) comme pesticide en agriculture. Au 1er siècle, Pline recommandait l'arsenic. Au 16ième siècle, les produits arsenicaux sont également connus et utilisés en Chine, tout comme le tabac, les racines de Derris et de Lonchocarpus, pour les mêmes propriétés. Les progrès de la chimie minérale ont permis dès le 19ième siècle l'utilisation de sulfates de cuivre (dont est faite la bouillie bordelaise) et de mercure comme fongicides. Le développement de la chimie organique profite ensuite largement à l'agriculture (synthèse de pesticides tel que le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT en 1874), à l'industrie pharmaceutique (découverte de la morphine entre 1800 et 1820, synthèse de l'aspirine en 1859), comme à l'industrie chimique (synthèse du benzène et des hydrocarbures (1828-1850), des colorants synthétiques ou encore du caoutchouc). La révolution industrielle du début du 20ième siècle et la première guerre mondiale ont fortement favorisé la recherche et le développement de l'industrie chimique (synthèse d'explosifs et de gaz de combats, tristement célèbres pour leur usage pendant la première guerre mondiale). De 1945 à 1985, l'industrie chimique a connu un fort développement du aux progrès techniques, aux besoins de maitriser les ressources tout en produisant toujours plus (énergies, transports, agriculture, alimentation, médicaments…). Dans ces années par exemple, la consommation de pesticides a doublé tous les 10 ans (http://observatoire-pesticides.gouv.fr/, visitée le 10/07/2015). Parallèlement à ce

développement de l'industrie, un certain nombre de réglementations voient le jour. Pour les médicaments en France, le principe d'autorisation préalable à la mise sur le marché est mis en place en 1941 (loi du 11 septembre 1941). Le premier encadrement réglementaire pour les pesticides en France est apparu avec la loi du 2 novembre 1943, validé par une ordonnance du 13 avril 1945 relative à l'homologation des produits antiparasitaires à usage agricole. Pour les cosmétiques, il faudra attendre la mort de 36 enfants et l'intoxication de 168 autres par du talc dans les années 70 pour que les premières dispositions voient le jour en 1972. Ces dispositions seront mises en œuvres dans la loi du 10 juillet 1975 portant l'instauration de règles strictes sur la composition et l'identification des produits cosmétiques (listes des substances non autorisées) ou des contrôles qualités. Au fur et à mesure, les institutions nationales et internationales constatèrent que cette large utilisation des substances chimiques pouvait conduire à des problèmes majeurs de santé publique et commencèrent à mettre en œuvre un cadre réglementaire pour protéger la santé humaine et l'environnement (directive 67/548/CEE de 1967 sur la classification des substances chimiques ; directive 79/117/CEE de 1978 sur l'interdiction de mise sur le marché de certains pesticides).

Aujourd'hui, l'industrie chimique continue d'évoluer et de produire de nombreuses substances. Ainsi, l'Union Européenne a estimé à 322 millions de tonnes la production de produits chimiques dans l'Union des 28 en 2013 (Figure 1).

Figure 1 : Evolution de la production de produits chimiques dans l'Union Européenne des 28 de 2004 à 2013, en million de tonnes



En 2007, la production de produits chimiques a atteint un pic estimé de 371 millions de tonnes. La crise économique et financière a ensuite conduit à une chute de la production, jusqu'en 2009 (producion estimée à 296 millions de tonnes). Un rebond d'activité en 2010 a ensuite compensé cette chute. En 2011, l'UE observe une décroissance de la production puis une stabilisation jusqu'en 2013 autour d'une production annuelle oscillant de 320 à 330 millions de tonnes de produits chimiques.

Source : http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Chemicals_production_statistics, visitée le 10/07/2015

Ces substances chimiques, qui sont en Europe soumises à des obligations réglementaires[1] dépendant de leurs usages, sont donc aujourd'hui produites et mises sur le marché dans des

[1] REACH : règlement européen n°1907/2006, entré en vigueur en 2007 pour sécuriser la fabrication et l'utilisation des substances chimiques dans l'industrie européenne ; Règlementation des biocides : règlement européen n°528/2012, faisant suite à la directive européenne 98/8/CE visant à harmoniser la réglementation des Etats membres de l'Union européenne ; Convention de Rotterdam : règlement européen n°649/2012 du Parlement européen et du Conseil du 4 juillet 2012 concernant les exportations et importations de produits chimiques dangereux ; CLP (Classification, Labelling, Packaging) : règlement européen n°1272/2008, qui définit les obligations concernant la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges ; Convention de Stockholm du protocole POP (Persistent Organic Pollutants) : engagements mis en œuvre par le règlement européen n°850/2004 du 29 avril 2004 ; Règlement pour l'élimination des effluents phytosanitaires : encadré par l'arrêt interministériel du 12 septembre 2006, relatif à la mise sur le marché et à l'utilisation des produits visés à l'article L.253-1 du code rural, publié au Journal officiel de la République française du 21 septembre 2006.

situations contrôlées où les risques pour la santé de l'homme, entre autre, doivent être maîtrisés. Le principe de la plupart de ces réglementations repose sur la connaissance des usages des produits, des expositions induites par ces usages et sur l'évaluation des risques pour la santé au regard des données toxicologiques acquises. Ces données sont généralement acquises pour les substances et produits commerciaux étudiés de manière individuelle. Une fois mis sur le marché, l'usage de tous ces produits participe aux contaminations de l'environnement puis à la contamination de l'Homme, qui est à ce jour de mieux en mieux objectivée (CDC 2015; Fréry et al. 2013). C'est ainsi que de nombreuses mesures de gestion ont été mises en place au cours du 20ème siècle pour la surveillance de certains milieux de l'environnement. L''air urbain et l'eau en sont des exemples bien connus. Pour l'air, la loi LAURE du 30 décembre 1996 sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie a été mise en place afin de rationaliser l'utilisation de l'énergie et définir une politique publique intégrant l'air en matière de développement urbain. Pour l'eau, c'est la directive du 23 octobre 2000 qui a été adoptée par le Conseil et le Parlement européen afin de définir un cadre pour la gestion et la protection des eaux par grand bassin hydrographique au plan européen.

2. Le cas de l'environnement intérieur

Les contaminations environnementales sont donc aujourd'hui multiples et ubiquitaires et concernent tous les milieux : l'air que nous respirons, l'eau que nous buvons, les eaux de surface, les sols… L'un des environnements qui fait l'objet d'une préoccupation particulière et relativement récente des pouvoirs publics et pour lequel les travaux de recherche s'accroissent, est l'environnement intérieur. En effet, dans les pays occidentaux, nous passons près de 90 % de notre temps dans les environnements clos. Cette préoccupation a été soulignée dès le début des années 2000 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO working group 2000),

mettant principalement en avant le fait que la gestion de la qualité de l'air intérieur nécessite des approches différentes que celles applicables à l'air extérieur. En 2006, les recommandations de l'OMS portaient sur l'élaboration de valeurs guides spécifiques pour la qualité de l'air intérieur (WHO working group 2006). Ces recommandations ont été suivies par plusieurs pays comme en témoigne le Plan National Santé Environnement (PNSE) mis en place en France[2] ou le programme sur les environnements intérieurs (*Indoor environments program*) de l'Environmental Protection Agency (EPA) mis en place aux Etats-Unis[3].

En raison de l'intérêt porté à la pollution extérieure et à la compréhension de son impact sur la pollution intérieure, les premières investigations furent portées initialement sur les substances provenant de l'extérieur comme le dioxyde de soufre, les oxydes d'azote, l'ozone ou les particules en suspension. Plus tard, l'attention se tourna plus vers certains polluants particulièrement présents dans les environnements intérieurs dont on pouvait apprécier les usages ou qui disposaient déjà de techniques de mesure validées, comme le formaldéhyde, l'amiante ou encore les composants volatils de la fumée de tabac (Weschler 2009). Aujourd'hui, notamment en raison du développement de méthodes analytiques, ce sont les composés organiques semi-volatils (COSV) qui sont une source d'attention croissante à la fois de la communauté scientifique et des pouvoirs publics.

En effet, durant le 20^{ième} siècle, n'ont cessé d'être développés de nouveaux matériaux de construction et des produits de consommation utilisés en particulier dans les logements,

[2] « Structurer et coordonner la rechercher en santé environnement travail et renforcer les outils nécessaires » de l'action 49 du PNSE3 : « mettre en œuvre le plan de qualité de l'air intérieur anoncé par le gouvernement ».

[3] http://www.epa.gov/iaq/ (visitée le 10/07/2015) : « Création de partenariats avec des organismes du secteur public et privé pour encourager la population à prendre des mesures pour minimiser les risques pour leur santé et atténuer les problèmes de qualité de l'air intérieur »

parallèlement à l'amélioration de la performance énergétique des bâtiments. Cela a considérablement diversifié la contamination de nos logements par de nouveaux composés : par exemple des désinfectants, des biocides retrouvés dans les produits ménagers, des pesticides dans les produits de lutte contre les insectes, des plastifiants permettant la plus grande durabilité des matériaux, des ignifugeants pour lutter contre les risques d'incendie, ou encore des conservateurs. A cela viennent s'ajouter les contaminations liées aux usages des cosmétiques (désinfectants, parfums) ou à l'activité humaine (combustion) (Mercier et al., 2011; Weschler and Nazaroff, 2008; Weschler, 2009).

Les COSV peuvent être définis comme des composés organiques dont le point d'ébullition se situe entre 240-260 °C et 380-400 °C (Norme Française ISO 16000-6, 2006) et dont la pression de vapeur saturante se situe entre 10^{-2} et 10^{-8} kPa (Weschler and Nazaroff 2008). Ces particularités physico-chimiques les rendent potentiellement présents dans l'air (phase gazeuse et particules en suspension) et dans les poussières, conduisant à une exposition via les voies orale, cutanée et respiratoire. Parmi les COSV, de nombreuses familles chimiques sont représentées telles que les phtalates, les polybromodiphényléthers (PBDE), les polychlorobiphényles (PCB), certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les muscs, les pyréthrinoïdes ou les organosphophates (Mercier et al., 2011). Ce sont plus de 150 COSV qui ont été ainsi identifiés comme potentiellement présents dans les environnements intérieurs (spécifiquement dans les poussières déposées) à partir d'une revue de la littérature (Bonvallot et al. 2010). Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont été conduits pour mieux caractériser les contaminations des logements, principalement en Amérique du Nord et en Europe. Les COSV les plus souvent recherchés étaient des PBDE, pesticides, phtalates, HAP, et plus récemment des

alkylphénols, organophosphorés, parabènes et perfluorés. Les principales familles chimiques retrouvées dans les environnements intérieurs sont présentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Principaux COSV retrouvés dans les environnements intérieurs en Amérique du nord, en Europe et en Asie.

Familles chimiques	COSV
Phtalates (n=9)	di-méthylphtalate (DMP), di-éthylphtalate (DEP), di-n-butylphtalate (DBP), di-isobutylphtalate (DiBP), benzylbutylphtalate (BBP), di-éthylhexylphtalate (DEHP), di-isononylphtalate (DiNP), di(2-methoxyethyl)phthalate (DMEP), di-octylphtalate (DOP)
Polybromodiphényl-éthers (PBDE) (n=9)	BDE-28, BDE-47, BDE-85, BDE-99, BDE-100, BDE-119, BDE-153, BDE-154, BDE-209
Polychlorobiphényles (PCB) (n=11)	PCB-28, PCB-31, PCB-52, PCB-77, PCB-101, PCB-105, PCB-118, PCB 126, PCB-138, PCB-153, PCB-180
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (n=14)	acénaphtène, anthracène, benzo(a)pyrène, fluorène, phénanthrène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(k)fluoranthène, benzo(b)fluoranthène, indéno(1,2,3-cd)pyrène, benzo(g,h,i)pérylène, dibenzo(a,h)anthracène
Pesticides organochlorés (n=12)	4',4-DDE, 4,4'-DDT, dieldrine, α-endosulfan, lindane, cis-chlordane, trans-chlordane, heptachlore, aldrine, endrine, α-HCH, metolachlor
Pesticides pyréthrinoïdes (n=5)	cylfluthrine, cyperméthrine, deltaméthrine, perméthrine, tétraméthrine
Organophosphorés / phosphates (n=4)	Chlorpyrifos-éthyl, diazinon, tributylphosphate, dichlorvos
Bisphénols (3)	bisphénol A, bisphénol M, bisphénol BADGE (bisphenol A diglycidyl ether)
Alkylphénols (n=3)	4-tert-butylphénol, 4-tert-octylphénol, 4-n-nonylphénol
Muscs (n=2)	galaxolide, tonalide
Autres familles (n=2)	triclosan, oxadiazon

D'après (Mercier et al. 2011a)

3. Effets sanitaires des COSV

De nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques se sont intéressées aux effets des COSV sur la santé. Les effets observés sont de plusieurs ordres et concernent principalement le système reproducteur, le système nerveux et le système immunitaire.

La plupart des COSV sont considérés comme des perturbateurs endocriniens (Rudel and Perovich 2009). La notion de perturbateur endocrinien a été définie en 2002 par l'International Programme on Chemical Safety (IPCS), définition ensuite reprise par l'OMS comme suit : « un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange altérant les fonctions du système endocrinien et provoque par conséquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, sa descendance ou d'une (sous) population » (Bergman et al. 2013). Les perturbateurs endocriniens sont donc définis par leur capacité à interagir avec les fonctions endocriniennes de l'organisme, quel que soit les effets néfastes envisagés qui peuvent concerner à la fois le métabolisme, le système reproducteur, ou encore le système neurologique. Bien que la thématique des perturbateurs endocriniens fasse encore débat aujourd'hui, tant sur leur définition même que sur leur mode d'action ou leur prise en compte en évaluation des risques (Zoeller et al. 2014), ils seront considérés ici par rapport aux effets qu'ils induisent sur les organismes vivants.

De nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques se sont intéressées aux effets des COSV sur la santé. Les effets observés concernent principalement le système reproducteur, le système nerveux et le système immunitaire. Les effets décrits dans ce chapitre sont basés sur les études les plus récentes.

3.1.Effets sur le système reproducteur

Plusieurs études épidémiologiques ont observé des associations entre différents paramètres en lien avec la reproduction et l'exposition à certains COSV. La plupart de ces études se sont basées sur des expositions professionnelles.

Les phtalates sont principalement connus pour leurs propriétés de perturbateurs endocriniens. Ils sont retrouvés dans l'organisme de la quasi-totalité de la population (Zota et al. 2014). L'exposition prénatale à certains d'entre eux (DEP, DBP, DBP et DiBP) a été associée à une

diminution de la distance ano-génitale chez 134 garçons, âgés de 2 à 36 mois, ce qui pourrait suggèrer un effet anti-androgène (Swan et al. 2005). Une diminution des niveaux d'hormones stéroïdiennes circulantes a été corrélée à la concentration urinaire des métabolites du DEHP et du DBP dans une étude comprenant 137 hommes adultes dont 63 individus non exposés et 74 exposés en milieu professionnel par contact avec la peau et inhalation de poussières (Pan et al. 2006). Cette même association avec le DEHP mesuré dans les urines, fut retrouvée dans une étude regroupant 452 hommes adultes recrutés dans une clinique américaine d'infertilité (Meeker et al. 2009). Il a également été observé que les concentrations de métabolites de deux phtalates (BBP et de DEP) mesurées dans les urines étaient significativement plus élevées chez respectivement 168 et 463 hommes adultes infertiles (diminution de la concentration, mobilité et/ou motilité des spermatozoïdes) comparés à des individus fertiles (Duty et al. 2003; Hauser et al. 2006). Pour les retardateurs de flamme, les effets observés dépendent probablement de leur structure chimique car les résultats des études ne sont pas concordants. Par exemple, une association inverse a été retrouvée entre la concentration de PBDE (BDE-206, 207, 208 et 209) dans les poussières des logements de 62 hommes infertiles et les concentrations de testostérone circulante (Johnson et al., 2013). Une association inverse a également été observée entre les concentrations de BDE-47, BDE-99 et BDE-100 mesurées dans le plasma de 52 hommes adultes, recrutés dans une clinique spécialisée dans la fertilité, et la mobilité des spermatozoïdes (Abdelouahab et al. 2011). A l'inverse, une association positive entre la concentration de testostérone circulante et la concentration d'octa-BDE (BDE-183 et BDE-201) a été retrouvée (Johnson et al. 2013). Meeker et al, ont également observé une association entre l'exposition au bisphenol A (BPA) et l'infertilité masculine en liant les concentrations urinaires de BPA à une diminution de la concentration des spermatozoïdes, de leur motilité, une altération de leur morphologie et une augmentation des dommages à leur ADN chez 190 hommes adultes recrutés

dans une clinique spécialisée dans les problèmes de fertilité (Meeker et al. 2010). Dans une autre étude, a été observée une association inverse entre les plus fortes concentrations des métabolites de PCB (118, 138, 153 et 180) mesurées dans le sang de 65 hommes infertiles et le nombre de spermatozoïdes (Dallinga et al. 2002). Enfin, une récente étude basée sur une cohorte d'hommes consultant pour des problèmes de fertilité a montré une association entre la consommation de fruits et légumes fortement contaminés par des résidus de pesticides (pyréthrinoïdes, organophosphorés et organochlorés) et une diminution de la qualité du sperme (comparaison entre les individus les plus exposés et ceux les moins exposés) (Chiu et al. 2015).

Ces effets sont corroborés par des études expérimentales réalisées en grande partie sur des rongeurs. Sur le système reproducteur mâle, certains phtalates semblent responsables chez les rats exposés pendant la période prénatale, d'une inhibition de la stéroïdogénèse (Svechnikov et al. 2008), mais également d'une diminution de la distance ano-génitale, de la rétention mammaire et d'une augmentation de l'incidence des hypospadias et des cryptorchidies (Gray et al. 2000). Des effets similaires ont été observés lors de l'exposition de rongeurs à d'autres COSV. En particulier, il a été mis en évidence une diminution significative des niveaux de testostérone sérique après une exposition par voie orale au BDE-99 (adulte) (Alonso et al. 2010), au benzo[a]pyrène (B[a]P) et au BPA (période néonatale) (Liang et al. 2012; Salian et al. 2009; Della Seta et al. 2006)(Liang et al. 2012)(Liang et al. 2012)(Liang et al. 2012)(Liang et al. 2012) ou à la cyperméthrine (période pubertaire) (Jin et al. 2011).

3.2.Effets sur le système nerveux

Parmi les COSV, certains insecticides sont des neurotoxiques connus. Ces produits, comme les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthrinoïdes ont été créés pour agir directement sur le système nerveux des insectes par des mécanismes spécifiques, notamment, pour les

organophosphorés, par l'inhibition de l'acétylcholinestérase (Fukuto 1990), ou, pour les pyréthrinoïdes, par la dépolarisation membranaire de la cellule via l'ouverture prolongée des canaux sodium voltage-dépendant (Narahashi 1996). Ces mécanismes peuvent être associés à divers symptômes neurologiques (tremblements, désorientation …). La plupart d'entre eux ont été observés dans des situations d'intoxications professionnelles. Ces symptômes ont été synthétisés dans la revue de Kamel et Hoppin de 2004 (Kamel and Hoppin 2004). L'exposition à des pesticides peut également être liée à une augmentation des risques de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, comme résumé dans la revue de la littérature de Le Couteur et al (Le Couteur et al. 1999). Dans cette revue d'études publiées avant 1999, les auteurs montrent que dans 12 des 20 études référencées, une association positive entre l'exposition aux pesticides et l'augmentation des maladies de Parkinson est retrouvée (un risque multiplié par 1,6 à 7 selon les études). D'autres revues de la littérature plus récentes confirment ces résultats (Blanc-Lapierre et al. 2012; Kamel and Hoppin 2004). Bien que la majorité des études se soient focalisées sur les organochlorés et les organophosphorés, d'autres pesticides comme les carbamates, les fongicides et les fumigeants pourraient être neurotoxiques (Kamel and Hoppin 2004). L'impact des pesticides sur le développement neurologique de l'enfant lors d'une exposition prénatale a également été largement décrit dans la littérature et a fait l'objet de plusieurs revues de la littérature (Burns et al. 2013; González-Alzaga et al. 2014; London et al. 2012; Muñoz-Quezada et al. 2013; Polańska et al. 2013). Ainsi, une association négative a été mise en évidence entre des pesticides organophosphorés (comme le dialkylphosphate ou le chlorpyrifos) et le QI, le développement cognitif, le comportement des enfants en bas âge (déficit de l'attention et hyperactivité), la mémoire, l'acuité visuelle et la motricité fine. De même, une association négative a été mise en évidence entre l'exposition maternelle aux pyréthrinoïdes (mesures des métabolites urinaires) et le développement neurologique et mental de l'enfant à un

an (Xue et al. 2013). Cette même association a été retrouvée entre l'exposition d'enfants de 6 ans (mesures des métabolites urinaires des pyréthrinoïdes) et la compréhension verbale et la mémoire vive (Viel et al. 2015).

D'autres COSV ont été décrits comme neurotoxiques chez l'homme. C'est le cas notamment des PCB, décris par Korrick et Sagiv, dans leur revue de la littérature, comme pouvant agir sur le neurodéveloppement de l'enfant (Korrick and Sagiv 2008) ou des PBDE, potentiellement neurotoxiques chez l'homme (Dingemans et al. 2011). Des associations négatives ont été démontrées avec certains phtalates et le neurodéveloppement de l'enfant. En effet dans leur étude (1493 enfants de 6 à 15 ans), Chopra et al montrent un lien entre les concentrations urinaires de métabolites du DEHP mesurés chez ces enfants et des troubles de l'attention ou encore entre les concentrations urinaires de métabolites du DBP et la concomitance des troubles de l'attention et de l'apprentissage (Chopra et al. 2014).

Comme pour les effets reprotoxiques, de nombreuses études toxicologiques expérimentales chez les rongeurs permettent d'établir la toxicité neurologique potentielle de certains COSV. Ainsi chez les ratons, l'exposition quotidienne par voie orale au BDE-99, du 6^{ième} jour de gestation (GD) au 21^{ième} jour postnatal (PND) induirait un retard de l'apprentissage spatial (Blanco et al. 2013) ; une injection intrapéritonéale de BDE-153 chez le rat (PND10) induirait une diminution de la capacité d'apprentissage et de la mémoire dès le deuxième mois de vie (Zhang et al. 2013) ; le BDE-47 conduirait à une diminution de l'activité motrice chez les souriceaux de mères exposées durant la grossesse et exposés pendant la lactation (Ta et al. 2011) ; un mélange de 6 PCB (PCB-28, -52, -101, -138, -153 et -180) conduirait à une altération du développement neuronal chez des souris exposées dès la naissance durant la lactation via les mères exposées (Elnar et al. 2012). Des PCB, comme le PCB-153, peuvent aussi individuellement induire des

déficits de l'attention et une hyperactivité chez les rats exposés pendant la période prépubère (Johansen et al. 2014). Certains pesticides agissent également sur le système nerveux des rongeurs. La deltaméthrine, un pyréthrinoïde, pourrait induire par exemple des troubles de l'apprentissage spatial chez le rat exposé pendant 28 jours (Chen et al., 2012) ; la perméthrine et la cyperméthrine, induiraient des troubles de l'activité neurologique (comme l'activité locomotrice spontanée) chez les rat âgés de 35 jours lorsqu'ils ont été exposés par voie orale de PND8 à PND15 (Nasuti et al. 2007) ; une exposition à la cyfluthrine, du 14^{ième} jour de gestation (GD14) jusqu'au sevrage (PND21), induit chez les rats des modifications significatives de leur comportement (locomotion, exploration…) (Soni et al. 2011). Des troubles neurocomportementaux ont également été observés chez les rats et les souris après des expositions au B(a)P (C. Chen et al., 2012; S. Cheng et al., 2013; Qiu et al., 2011), au fluorène (Peiffer et al. 2013) et au BPA (Viberg and Lee 2012).

3.3.Effets sur les systèmes respiratoire et immunitaire

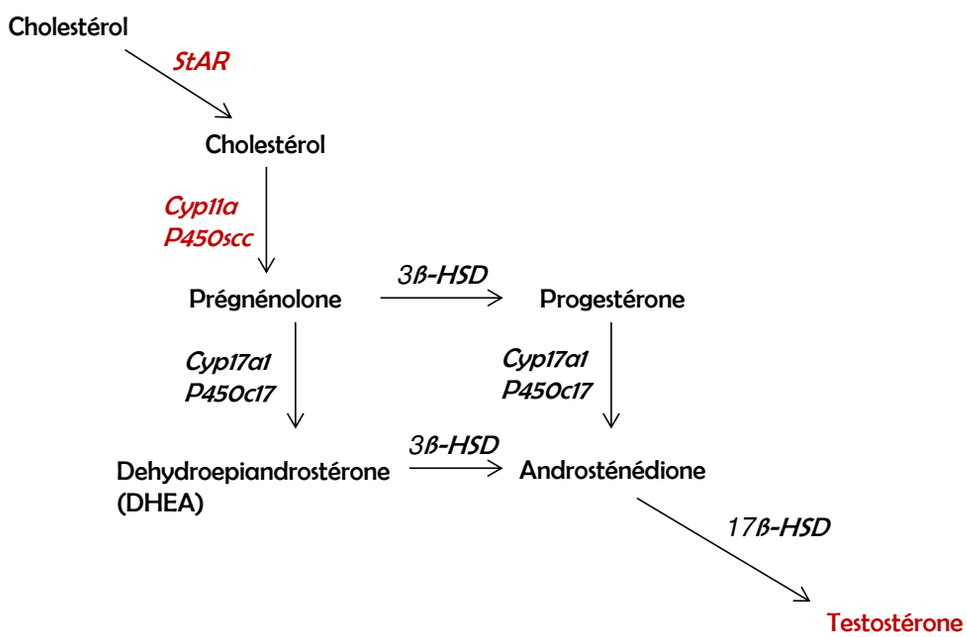
De plus en plus de données scientifiques font le lien entre des pathologies comme l'asthme et/ou des troubles immunoallergiques et certains produits contenant des COSV. La revue de la littérature conduite par Jaakkola et Knight met par exemple en évidence une possible relation entre l'exposition à des matériaux en PVC contenant des phtalates et des troubles de types asthme, rhinites allergiques, bronchites chez l'homme adulte et l'enfant (Jaakkola and Knight 2008). Ces mêmes troubles immunoallergiques ont été observés chez des souris exposées en période périnatale (Midoro-Horiuti et al. 2010) ou *in utero* (Nakajima et al. 2012) au BPA.

4. L'apport des approches mécanistiques

Les approches *in vitro* permettent de mieux comprendre les mécanismes ou modes d'action de ces composés sur notre organisme. Nous avons vu précédemment que la testostérone et les

enzymes de la stéroïdogénèse semblaient être des cibles privilégiées des COSV. La testostérone est produite par les cellules de Leydig via les enzymes de la stéroïdogénèse et des protéines de transports. Dans ces cellules, la production est d'abord initiée par le transfert du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne des mitochondries par la steroidogenic acute regulatory protein (StAR). Dans les mitochondries, l'enzyme cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) convertit le cholestérol en prégnénolone qui est ensuite transportée dans le réticulum endoplasmique lisse où il est transformé en progestérone par la 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD), en androsténédione par la 17α-hydroxylase (P450c17 ou Cyp17a1), puis en testostérone par la 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) (Figure 2).

Figure 2: Mécanisme de production de testostérone dans les cellules de Leydig



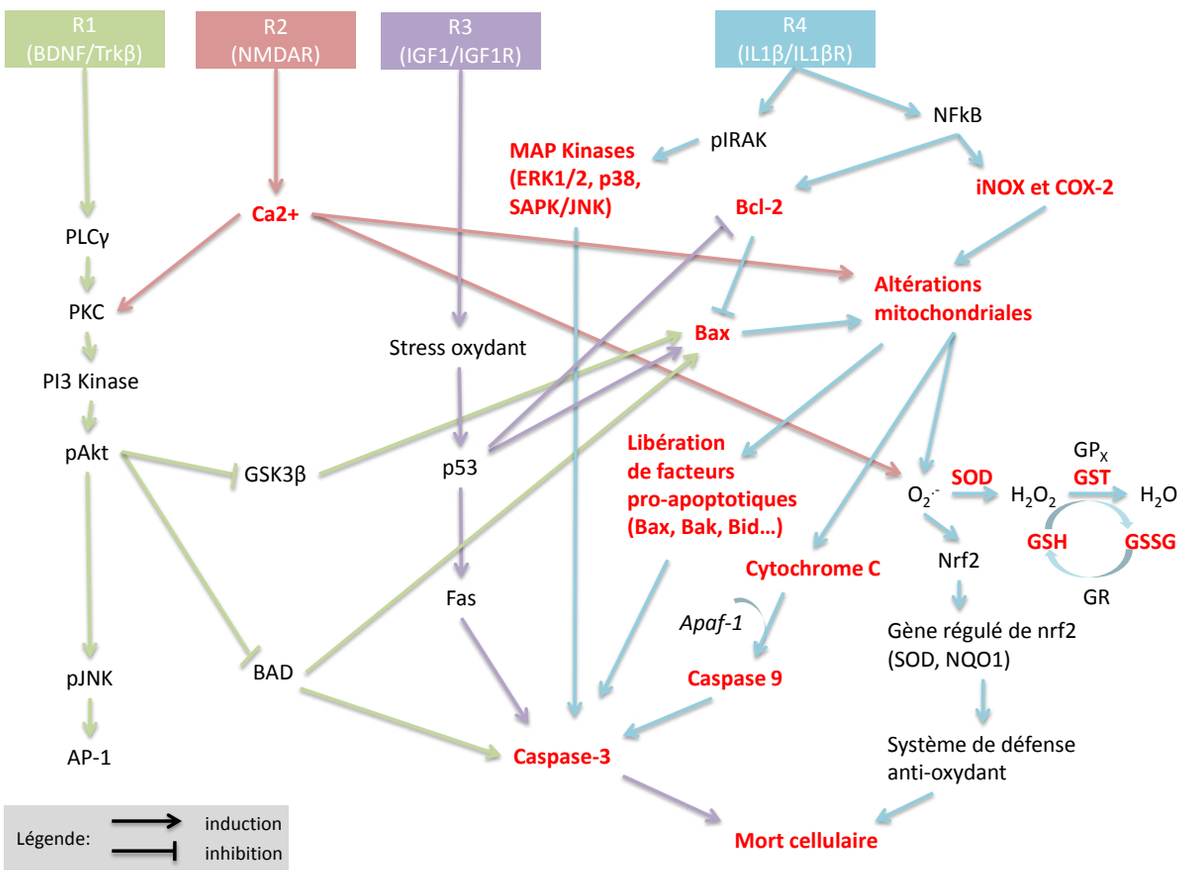
Sont surlignées en rouge les principales cibles documentées des COSV

Comme présentée précédemment, la synthèse de testostérone peut être inhibée par un grand nombre de COSV. Certains de ces composés semblent en effet capables d'inhiber la production d'enzymes clefs de la stéroïdogénèse (notamment la StAR et la P450scc), c'est le cas de certains

pesticides (Jin et al. 2011; Saradha et al. 2008; Wang et al. 2011; Zhang et al. 2007), de phtalates (Borch et al. 2004, 2006a, 2006b; Lehmann et al. 2004), du BPA (Akingbemi et al. 2004; Nakamura et al. 2010) ou encore du B[a]P (Chung et al. 2011; Liang et al. 2012). La synthèse d'autres protéines produites par les cellules de Leydig, comme l'insulin-like factor-3 (Insl3), semble également être inhibée par des COSV tels les phtalates (Borch et al. 2006b; Hannas et al. 2011, 2012; Howdeshell et al. 2007). La diminution de la synthèse de ces protéines est une des causes de nombreux troubles de la reproduction. Chez les individus mâles, une exposition pendant la période fœtale peut conduire à des malformations de types cryptorchidie (non descente testiculaire) ou hypospadias (fermeture incomplète de l'urètre). En période post-natale, cette diminution peut entrainer une altération de la qualité et de la quantité de spermatozoïdes et donc avoir une influence sur la fertilité future (Skakkebaek et al. 2001; Welsh et al. 2008).

Dans le cas des troubles du système nerveux, les données *in vitro* apportent également des éléments de compréhension quant aux mécanismes impliqués. La mort neuronale semblerait être un des évènements clefs de ces troubles neurologiques (Cheng et al., 2009; Zhang et al., 2013). Sur la base des données publiées dans la littérature (Kumar et al. 2013), la Figure 3 résume les principaux mécanismes responsables de la mort neuronale qu'empruntent les COSV.

Figure 3 : Principaux mécanismes impliqués dans la mort neuronale



Inspiré de Kumar et al, 2013 (Brain Sci. 2013, 3(2), 941-963; doi:10.3390/brainsci3020941)

Où R_x : Récepteur x ;BDNF : brain-derived neurotrophic factor ; NMDA : N-methyl-D-aspartate ; IGF-1 : insulin-like growth factor 1 ; PKC : Protein Kinase C ;pAkt : protein Kinase B ; AP-1 : Activator Protein 1 ; Ca2+ : calcium ; IRAK: IL-1R1 associated kinase ; COX-2 : cyclooxygenase-2 ; SOD : superoxide dismutase ; GSH : glutathione ; GST : Glutathione-S-Transferase ; GSSG : glutathione disulfide ; GP_X : Glutathione Peroxidase ; GR : Glutathione Reductase, Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1 ; NQO1 : NAD(P)H Quinone Oxoreductase ; Les principales voies mécanistiques des COSV documentées conduisant à la mort neuronale sont présentées en rouge. Inspirée de Kumar et al, 2013.

Plusieurs COSV ont été décrits comme agissant à différents niveaux de ces mécanismes. Comme décrit dans la figure 2, la mitochondrie semble être un des compartiments clefs dans l'apoptose cellulaire. Elle est la cible directe ou indirecte de nombreux COSV. En effet, un certain nombre d'entre eux sont décrits comme pouvant induire une augmentation de la concentration de calcium (Ca2+) intracellulaire, via par exemple l'activation de récepteurs NMDA (et/ou AMPA) conduisant à l'ouverture des canaux calciques. Cette augmentation des taux calciques va conduire

à une dépolarisation (puis une dégradation) de la membrane des mitochondries ainsi qu'à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La dégradation des mitochondries va induire la libération du cytochrome c (Cyto c), la libération de facteurs pro-apoptotiques mais également la production de ROS. Tous ces mécanismes vont conduire à la mort du neurone (via la dégradation directe de l'ADN ou par l'activation de protéines de mort, les caspases). Les BDE-209, 47, 99 et le BPA peuvent induire une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (J. Chen et al., 2010; S. Lee et al., 2008; Yu et al., 2008), entrainant une dégradation mitochondriale. Les mitochondries sont également la cible d'autres polluants comme les insecticides organochlorés dieldrine et lindane (Sharma et al. 2010) ou le B[a]P (Nie et al., 2014). Certains d'entre eux comme le PCB-52 (Lee et al. 2005), le chlorpyrifos (Ki et al. 2013) ou les précédents dieldrine, lindane, BDE-209 ou BPA induiraient la production de ROS. D'autres comme les PCB-77 et 153 (Sánchez-Alonso et al. 2003), le DEHP (Lin et al. 2011) ou les précédents B[a]P, BDE-47 et BDE-99 pourraient activer la voie des caspases. L'exposition à ces COSV, quel que soit le mécanisme d'action mis en œuvre, pourrait donc conduire à la mort neuronale.

Ces données toxicologiques *in vitro* permettent de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la toxicité de ces molécules. Il est cependant difficile d'établir des relations causales entre les mécanismes d'action issus des données *in vitro* et les effets observés dans les études épidémiologiques car les effets mesurés, les espèces, les doses et les durées d'exposition sont très différents, c'est pourquoi il subsiste encore de nombreuses incertitudes sur la connaissances des effets des COSV chez l'homme, nécessitant de mettre en œuvre des approches pour aider à la décision.

5. La problématique des mélanges aux faibles doses : Comment évaluer leurs impacts sur la santé ?

Si les effets de nombreux COSV sont manifestes chez l'animal, ils sont plus difficiles à mettre en évidence chez l'homme. En effet, dans le cas des expositions environnementales, l'homme est soumis à de faibles doses de mélanges[4] complexes. Dans le cas des faibles doses, les relations quantitatives exposition/effet ne sont pas toujours bien établies et la question du risque sanitaire n'est par conséquent pas élucidée. L'impact sanitaire des expositions cumulées est par conséquent peu connu et peu pris en compte dans les décisions de santé publique et le développement de stratégies d'évaluation des mélanges est devenu une priorité de recherche.

Dans ce type de situation d'incertitude portant sur la nature des mélanges dans des expositions environnementales et sur leur impact, l'approche d'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS) peut être un outil intéressant. Cette approche, codifiée au début des années 1980 par le National Research Council des Etats-Unis, comporte 4 étapes (NRC 1983) :

- Identification du danger (identification du ou des polluants responsables d'effets spécifiques)

[4] On entend par « mélange », la présence d'au moins deux substances. Un mélange de deux substances est un mélange simple qu'il est relativement aisé d'étudier. En revanche, lorsqu'on s'intéresse à de nombreuses substances, il s'agit de mélanges complexes. Il existe deux grands types de mélanges complexes : les mélanges complexes issus d'une source ou d'un procédé connu (par exemple, un processus de combustion va engendrer des HAP et/ou des dioxines) et les mélanges complexes qui proviennent des aléas des contaminations environnementales et des différents usages de produits chimiques. La difficulté de ces derniers est de les identifier afin de pouvoir évaluer leurs impacts sur notre santé. Le fait de disposer de données de contamination des logements représentatifs d'un territoire est intéressant pour identifier et étudier les substances auxquelles les populations sont exposées de manière concomitante. Le cas de l'environnement intérieur est donc intéressant en ce sens.

- Evaluation de la relation dose-réponse (évaluation de la relation entre l'ampleur de l'exposition et l'absence ou la probabilité d'apparition de l'effet). En routine, cette étape est le choix d'une valeur toxicologique de référence (VTR)[5]
- Evaluation de l'exposition (détermination de la mesure et de l'ampleur de l'exposition humaine)
- Caractérisation du risque (description de la nature et de l'ampleur du risque pour la santé humaine, incluant les incertitudes)

Ce type de démarche est applicable dans des situations et contextes où l'environnement est contaminé et a pour finalité d'apporter des éléments d'aide à la décision dans un contexte d'incertitude. Cela permet d'estimer l'ampleur d'un problème de santé publique et, pour le décideur, de mettre en place des mesures de gestion proportionnées. La démarche d'EQRS décrite par le NRC a largement été utilisée depuis les années 80 mais permettait surtout la gestion des risques substance par substance. La démarche a donc évolué vers l'évaluation des risques cumulés ou « cumulative risk assessment » (CRA). Cette approche CRA regroupe un certain nombre de méthodes d'évaluation des risques cumulés. L'article présenté dans ce chapitre, « Construction de valeurs toxicologiques de référence adaptées à la prise en compte des mélanges en évaluation des risques sanitaires : méthodes existantes et application récentes », publié en 2014 dans Environnement Risques et Santé, propose un historique de ces méthodes et présente à travers des exemples de la littérature, leurs applications actuelles. L'idée fût de faciliter l'accès à ces nombreuses approches, publiées ces dernières années, aux décideurs et aux évaluateurs de

[5] Le terme valeur toxicologique de référence (VTR) est l'appellation générique des valeurs qui permettent de calculer l'amplitude des risques pour la santé humaine liés à l'exposition à une substance donnée pour une durée et une voie d'exposition donnée. Ces VTR sont construites à partir d'études toxicologiques ou épidémiologiques établissant des relations quantifiées entre des niveaux d'exposition et des effets. Les lacunes scientifiques et la protection de la santé humaine sont intégrées dans leur élaboration. (Définition SFSE)

risques, car actuellement peu de recommandations institutionnelles permettent de prendre en compte les mélanges dans les démarches d'évaluation des risques cumulés, comme récemment signalé par la SFSE dans sa note sur les mélanges[6].

[6] http://www.sfse.org/userfiles/files/SFSE%20recommandation%20m%C3%A9langes.pdf

Construction de valeurs toxicologiques de référence adaptées à la prise en compte des mélanges en évaluation des risques sanitaires : méthodes existantes et applications récentes

Kevin Fournier
Philippe Glorennec
Nathalie Bonvallot

EHESP
Inserm U 1085
Avenue du Professeur
Léon Bernard
CS 74312
35043 Rennes cedex
France
<kevin.fournier@ehesp.fr>
<philippe.glorennec@ehesp.fr>
<nathalie.bonvallot@ehesp.fr>

Tirés à part :
K. Fournier

Article reçu le 25 octobre 2013, accepté le 16 janvier 2014

Résumé. L'homme est exposé dans son environnement à de multiples molécules. Afin d'estimer les risques liés à ces expositions, plusieurs approches d'évaluation quantitative des risques sanitaires ont été développées, de la somme des quotients de danger aux facteurs d'équivalence toxique (TEF, *Toxic Equivalent factors*) en passant par les « *Point of Departure Index* » (PODI). Leurs principes reposent sur l'hypothèse d'additivité des doses ou des effets. La finalité de ces démarches est d'apporter des éléments d'aide à la décision dans un contexte d'incertitude. Elles permettent également de souligner le manque de données adaptées, en particulier en termes de connaissances sur la toxicité des molécules. L'objectif de cet article est de proposer un historique de ces méthodes et de présenter, au travers des exemples de la littérature, leurs applications actuelles. Si peu de recommandations institutionnelles permettent de prendre en compte les mélanges dans les démarches d'évaluation des risques cumulés, de nombreuses approches ont été publiées ces dernières années. Si le développement de TEF nécessite des connaissances précises sur les mécanismes d'actions toxiques, d'autres approches moins exigeantes en termes de connaissances ont été développées et peuvent d'ores et déjà être utilisées. C'est le cas des facteurs de puissance relative pour les pyréthrinoïdes, les organophosphorés, les phtalates et des fongicides ; ou du PODI pour différents antiandrogènes.

Mots clés : évaluation des risques ; mélanges ; polluants environnementaux ; valeurs toxicologiques de référence.

Abstract

Derivation of toxicological reference values for taking mixtures into account in health risk assessment: Existing methods and recent applications

Human beings are exposed through their environment to numerous chemicals. Several approaches to cumulative risk assessment, including the sum of hazard quotients, toxic equivalent factors (TEF), and the point of departure index (PODI), have been developed to estimate the risks due to these exposures. Their principles are based on the assumption of effect or dose additivity, and their main purpose is to provide tools to help decision-makers in a context where uncertainty predominates. They also highlight the lack of adequate data, especially for toxicity data and dose-response relations. The objective of this article is to propose a brief history of these approaches and to describe their current applications through examples from the literature. While few institutional recommendations allow mixtures to be taken into account in cumulative risk assessment approaches, many approaches have been published in recent years. Although the development of TEFs requires precise knowledge about the toxic mechanisms of action, other approaches, less

Pour citer cet article : Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. Construction de valeurs toxicologiques de référence adaptées à la prise en compte des mélanges en évaluation des risques sanitaires : méthodes existantes et applications récentes. *Environ Risque Sante* 2014 ; 13 : 203-21. doi : 10.1684/ers.2014.0696

doi: 10.1684/ers.2014.0696

stringent in term of knowledge, have been developed and are already usable. This is the case for relative potency factors for pyrethroids, organophosphates, phthalates, and fungicides; or PODI for certain anti-androgens.

Key words: *environmental pollutants; mixtures; risk assessment; toxicological reference values.*

L'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS)[1] est une méthode permettant d'estimer ou comparer, par le calcul lorsque cela est possible, les risques pour la santé auxquels est soumise une population exposée à une pollution. L'EQRS a été proposée pour la première fois en 1983 par le *National Research Council* (NRC) aux États-Unis. Elle est fondée sur l'utilisation de faits scientifiques pour définir les effets sur la santé d'une exposition d'individus ou de populations à des matériaux ou à des situations dangereuses, dans un contexte d'incertitude [1]. Son principe repose sur la combinaison de données d'expositions (estimées à partir de contaminations environnementales) et d'indicateurs toxicologiques (estimés à partir des relations dose-réponse).

Dès lors que les données épidémiologiques sont insuffisantes pour établir des relations causales et calculer des risques attribuables directement chez l'homme, cette méthode permet de répondre aux pouvoirs publics à la question des risques sanitaires liés à la présence de contaminants environnementaux (souvent présents à faibles doses). La finalité d'une évaluation des risques sanitaires est d'apporter par une démarche transparente des éléments d'aide à la décision dans un contexte d'incertitude, en hiérarchisant des options de gestion ou en estimant, avec plus ou moins d'incertitude, les conséquences sanitaires potentielles d'une situation en termes, là aussi, de plausibilité et gravité des effets, de nombre de personnes exposées, de possibilité ou probabilité de survenue des effets [2].

Cette démarche permet également de souligner le manque de données adaptées, que ce soit tant sur la toxicité des agents dangereux que sur les expositions de la population, et permet ainsi de formuler des recommandations de recherche.

Elle comporte quatre étapes :

1. Identification du danger : grâce aux données de la littérature et en fonction du contexte, on identifie à la fois les agents dangereux concernés et leur potentiel toxique.
2. Identification des relations dose-réponse : cette étape consiste à rechercher les valeurs toxicologiques de référence (VTR) disponibles pour chacune des substances, pour chaque condition d'exposition pertinente. En outre, on détermine si l'effet est à seuil (effet déterministe où la gravité est proportionnelle à la dose) ou sans seuil (effet probabiliste où c'est la probabilité de survenue de l'effet qui est proportionnel à la dose).
3. Estimation de l'exposition : on identifie le ou les milieu(x) contaminé(s), voies d'exposition, les durées et niveaux d'exposition. Cette étape est souvent la plus difficile à renseigner car elle nécessite de connaître les habitudes de la population (habitudes alimentaires, budgets espace-temps, etc.).
4. Enfin, la dernière étape est la caractérisation du risque qui correspond à la mise en relation des deux étapes précédentes, par le calcul des indicateurs de risque, suivi d'une estimation des incertitudes.

Les résultats se présentent sous différentes formes. Pour les substances ayant des effets sans seuil, c'est-à-dire des substances ayant des effets néfastes sur l'organisme même à très faible dose, comme les substances génotoxiques cancérogènes, les résultats de l'EQRS se présentent sous forme d'excès de risque individuel (probabilité d'apparition de l'effet suite à l'exposition à l'agent dangereux). Cette probabilité est calculée en faisant le produit de l'exposition estimée par la VTR. Dans le cas de substances ayant des effets à seuil, c'est-à-dire que l'effet sanitaire n'apparaît qu'à partir d'une certaine dose, le risque s'exprime en quotient de danger. Ce quotient est calculé en faisant le rapport entre l'exposition estimée et la VTR.

Actuellement en France, les démarches d'EQRS réalisées en pratique ne prennent généralement en compte que des substances prises individuellement, c'est-à-dire qu'un quotient de danger et/ou un excès de risque individuel est fourni pour chaque substance étudiée. Si l'évaluation des risques sanitaires liés à des mélanges peut être courante pour certaines familles de substances, comme les dioxines ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (voir ci-après), il ne s'agit pas d'une approche systématique, alors même que nous sommes quotidiennement exposés à de nombreux polluants environnementaux, de nature et de famille chimique différentes, mais qui peuvent avoir des effets ou des mécanismes d'actions communs. C'est par exemple le cas de certains perturbateurs endocriniens (des phtalates, des fongicides…) qui peuvent agir sur la synthèse de la testostérone [3, 4]. Dans les guides méthodologiques de l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris) [5, 6], seules quelques recommandations sont proposées, en particulier l'addition des quotients de dangers.

Pourtant, depuis la publication de l'ouvrage du NRC en 1983 [1], les méthodes d'EQRS se sont beaucoup

[1] Le lecteur trouvera en fin d'article un tableau récapitulatif de tous les sigles utilisés.

développées et améliorées. La problématique des expositions à des mélanges plus ou moins complexes est à présent largement soulevée par l'ensemble des institutions internationales et nationales, comme en témoignent les nombreux travaux de réflexion depuis ces dix dernières années et toujours en cours [7-9]. Pour évaluer les risques liés aux mélanges de substances, des méthodes d'évaluation des risques sanitaires cumulés (ou « *Cumulative Risk Assessment* » [CRA]) ont été proposées. Leurs applications sont nombreuses et évolutives. Ainsi, l'objectif de cet article est de proposer un historique des méthodes CRA existantes et de présenter, au travers des exemples de la littérature, leurs applications actuelles.

Historique de la mise en œuvre des méthodes CRA

Les démarches de CRA existantes sont toutes fondées sur la notion d'additivité des doses initialement développée en 1926 par Loewe et Muischnek [10]. L'hypothèse est que les substances agissent de la même manière (d'un point de vue mécanistique), de sorte que la même réponse peut être obtenue en remplaçant un composé, totalement ou en partie, par un autre. Chaque composé d'un mélange est supposé contribuer à l'effet global observé en agissant en proportion de sa concentration. En outre, la notion d'additivité des doses implique que la réponse combinée des substances en mélange est plus grande que celle de chaque substance prise individuellement [11, 12]. Cette notion d'additivité ne prend pas en compte la possibilité d'interactions toxicologiques. Or, d'un point de vue biologique, des interactions de plusieurs ordres pourraient être attendues [13]. Elles peuvent être de type toxicocinétique, si par exemple plusieurs substances suivent la même voie métabolique (exemple de l'inhibition de la métabolisation du méthanol par le 4-méthylpyrazole [14], ou de type toxicodynamique, si la cible moléculaire est identique (exemple de l'augmentation synergique de la toxicité hépatique du chlordécone en présence de tétrachlorure de carbone [15]. Ces interactions pourraient conduire à des phénomènes d'antagonisme ou de potentialisation. Ceux-ci sont cependant *a priori* peu probables en santé environnementale. En effet, dans la plupart des cas documentés, ils reposent sur des mécanismes de saturation des systèmes biologiques. Or, ceux-ci ne sont pas, ou sont peu, attendus lorsqu'on s'intéresse à l'exposition à des faibles doses de substances [16, 17][2]. Ainsi, aujourd'hui, dans le cas des CRA la convention est de retenir l'hypothèse d'additivité (des doses ou des effets).

[2] Sont exclues *de facto* les coexpositions impliquant les fortes doses (expositions médicamenteuses...).

Historiquement, une des premières méthodes à avoir été décrite est la *Toxic Unit Summation* (TUS) [18] qui est l'application directe du concept d'additivité des doses pour l'évaluation du risque environnemental. Sprague a suggéré que la force d'un polluant dans un système aquatique pouvait être exprimée comme une fraction de sa concentration létale chez le poisson. Ainsi, dans un mélange, les TU (*toxic units)* de chaque polluant pourraient être calculées puis additionnées afin d'estimer la toxicité globale du mélange. Ces TU représentent le rapport entre la concentration d'exposition et la concentration efficace d'une substance pour un effet donné (ici, la mortalité chez le poisson), comme indiqué dans l'équation 1.

$$\mathrm{TUS} = \sum_{i=1}^{n} TU_i = \sum_{i=1}^{n} \frac{\exp_i}{EC_i} \qquad (1)$$

avec :
- TUS : *Toxic Unit Summation* ;
- TU : *Toxic Units* ;
- exp : exposition ;
- EC : concentration efficace.

EC est traditionnellement l'EC_{50}, c'est-à-dire la dose responsable de 50 % de l'effet observé. L'indicateur TUS doit être inférieur à 1 pour que les concentrations du mélange en toxiques n'engendrent pas l'effet pris en compte dans l'évaluation.

Dans son ouvrage de 1983, l'Académie des sciences américaine émet des recommandations afin d'aider les organismes fédéraux qui font de l'évaluation de risques, à présenter « clairement et de manière convaincante », la base scientifique de leur décision réglementaire. Elle y souligne notamment le caractère incomplet des données dans l'évaluation des risques [1]. Pour répondre à ces recommandations, l'US EPA a travaillé dès janvier 1984 sur des lignes directrices à mettre en place dans le cadre de l'évaluation des risques pour la santé liés à l'exposition à des mélanges de produits chimiques. Ces lignes directrices seront publiées deux ans plus tard [12]. Dans ce document, l'US EPA y a développé la méthode du « *Hazard Index* » (HI) sur les mêmes bases que le TUS (une approche au cas par cas). Cette approche est également fondée sur l'additivité des doses. Elle consiste à additionner les quotients de danger de chaque substance du mélange selon l'équation 2 :

$$HI = \sum_{i=1}^{n} QD_i = \sum_{i=1}^{n} \frac{\exp_i}{VTR_i} \qquad (2)$$

avec :
- HI : *Hazard Index* ; QD : quotient de danger ;
- exp : exposition ;
- VTR : valeur toxicologique de référence.

Si le HI est supérieur à 1, l'exposition totale aux composés du mélange dépasse le niveau considéré comme acceptable.

L'avantage de cette démarche est qu'elle est transparente et facile à utiliser. L'inconvénient est qu'elle souffre d'importantes limites méthodologiques liées à l'hétérogénéité de la construction des indicateurs de toxicité. En effet, ces indicateurs ne sont pas forcément construits de la même manière, notamment car ils ne sont pas nécessairement fondés sur les mêmes types d'effets (les différentes substances n'ont pas forcément les mêmes effets critiques documentés). Cette démarche est donc avant tout un moyen de gestion à n'utiliser que quand les informations concernant les substances à évaluer sont parcellaires. C'est une démarche qui d'ailleurs est souvent utilisée dans la réglementation française relative aux évaluations des risques dans les études d'impacts, puisque recommandée dans le guide de l'Ineris à destination des évaluateurs de risques [5, 6].

À la même époque (fin 1970, début des années 1980), de nombreux chercheurs de différents pays se sont intéressés à l'évaluation des risques des dioxines (polychlorodibenzodioxines, PCDD) et furanes (polychlorodibenzofuranes, PCDF). Compte tenu de l'existence de nombreux congénères et donc de contaminations environnementales complexes et hétérogènes d'un endroit à l'autre, le concept de facteurs d'équivalence toxique (TEF, *Toxic Equivalency Factor*) a été introduit pour simplifier la démarche d'évaluation du risque. Par la suite, de nombreux pays ont publié des TEF pour ces molécules (la Suisse en 1982, le Danemark en 1984, l'Ontario en 1985, l'US EPA en 1987, etc.) [19]. Cette démarche consiste à appliquer, pour chaque molécule d'un mélange, un facteur de pondération proportionnel à sa toxicité au regard du toxique de « référence » (souvent celui qui est le plus documenté). Cette méthode est fondée sur les données mécanistiques disponibles des molécules d'intérêts. Dans le cas des dioxines, l'un des principaux mécanismes engendrant une réponse toxique est la liaison au récepteur cytosolique arylhydrocarbone AhR [20, 21]. Cette liaison expliquerait la majeure partie des effets qui sont induits par l'exposition aux dioxines (effets immunitaires, cancérigènes, reprotoxiques. . .). En effet, le complexe ligand/AhR migre du cytoplasme des cellules au noyau où il interagit avec certaines séquences de l'ADN (les éléments de réponse aux dioxines) responsables de la transcription des enzymes détoxifiantes de phase 1 et 2, dont les cytochromes P450 [22] (responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène) et des époxydases, responsables de la formation d'époxydes qui sont, tout comme les espèces réactives de l'oxygène, des métabolites cancérogènes très réactifs [23] (*figure 1*, adaptée de King-Heiden *et al.* [24]).

Les TEF sont construits en faisant le rapport, pour un mécanisme d'action déterminé, entre l'indicateur de toxicité du toxique de référence et celui d'un autre toxique présent dans le mélange, selon l'équation 3. Ces indicateurs sont ensuite utilisés pour pondérer la valeur de l'exposition de chaque polluant avant leur addition en une quantité équivalente totale (TEQ, *Total Equivalent Quantity*) (équation 4). On obtient une concentration d'exposition en toxique de « référence ». Ainsi, on peut calculer un QD en faisant le rapport entre la concentration en toxique de référence obtenue et la VTR de ce dernier (équation 5).

$$TEF_i = \frac{\text{Indicateur de toxicité}_{TR}}{\text{Indicateur de toxicité}_i} \tag{3}$$

$$\text{TEQ} = \sum_{i=1}^{n} (\exp_i \times \text{TEF}_i) \tag{4}$$

$$\text{QD} = \frac{\sum_{i=1}^{n} (\exp_i \times \text{TEF}_i)}{\text{VTR}_{\text{TR}}} = \frac{\text{TEQ}}{\text{VTR}_{\text{TR}}} \tag{5}$$

avec :
– TR, le toxique de référence et i le composé du mélange ;
– $\exp_i$, l'exposition du composé i et TEFi son facteur d'équivalence toxique ;
– TEQ, la quantité toxique équivalente du mélange ;
– VTR_{TR}, la VTR du toxique de référence.

La première utilisation de la démarche de l'équivalence toxique pour une évaluation des risques a été décrite en 1986 par Eadon et ses collaborateurs dans le cas d'une évaluation des risques sanitaires liés à une exposition à un mélange de PCDD, PCDF et PCB, retrouvés dans la suie d'un incendie de transformateur à New York [25]. Bien que le terme de TEF n'ait pas été évoqué, les auteurs ont utilisé la dose létale 50 (DL_{50}) pour évaluer la puissance relative des composés du mélange à partir d'études *in vivo* réalisées chez le cochon d'Inde. De nombreux TEF ont ensuite été proposés dans la littérature dans les années 1980, avec comme composé de référence la 2,3,7,8-TCDD, dioxine la plus toxique et la plus étudiée à l'époque. Différents indicateurs de toxicité étaient utilisés, de l'interpolation linéaire des courbes log (doses)-réponses réalisée par des techniques de rééchantillonnage (*bootstrap*) [26] aux ratios des DL_{50}, des doses efficaces responsables de 50 % de l'effet (ED_{50}), des LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Levels*) ou NOAEL (*No Observed Adverse Effect Levels*) issus des études expérimentales *in vivo*, à l'utilisation de la constante d'affinité au récepteur AhR issue d'études *in vitro*, conduisant à des résultats parfois très différents. L'Organisation du traité de l'Atlantique Nord (Otan), en 1989, a été la première institution à publier des TEF pour les PCDD et PCDF à une échelle internationale (on parle souvent des I-TEF de l'Otan). Lors du développement initial des TEF, de nombreux chercheurs examinèrent aussi les relations structure-activités des polychlorobiphényles (PCB), dont certains, dits PCB *dioxin-like*, furent ajoutés à la liste dès 1991 [27]. Compte tenu de l'évaluation des connaissances toxicologiques relatives aux PCDD, PCDF et PCB, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) conjointement avec le Programme international sur les

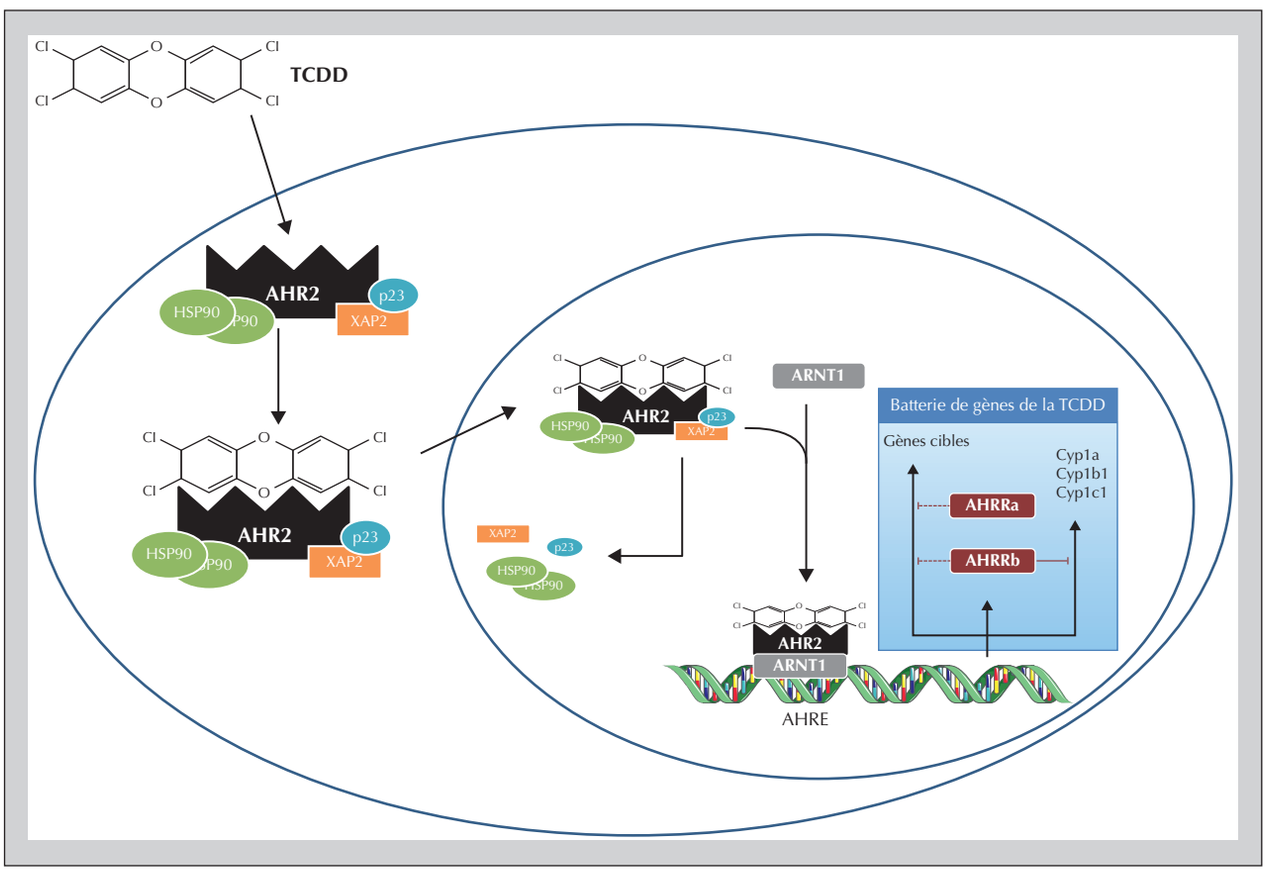


Figure 1. Un des mécanismes d'action des dioxines : activation du récepteur AhR et cascade de signalisation (d'après King-Heiden *et al.* [24]).

Figure 1. One of the mechanisms of action of dioxins activation of AhR receptor and signalling cascade (adapted from King-Heiden *et al.* [24]).

substances chimiques (IPCS), adoptèrent une liste de TEF harmonisés en 1994, nommée WHO_{94}-TEF. D'autres consultations de groupes d'experts conduisirent à l'extension de ces TEF pour 7 PCDD, 10 PCDF et 12 PCB en 1998 (WHO_{98}-TEF) et à la mise à jour et l'homogénéisation de ceux-ci en 2005 (WHO_{05}-TEF) [28, 29]. La dernière version de ces TEF, présentée dans le *tableau 1*, et largement utilisée en évaluation des risques sanitaires à l'heure actuelle, est considérée comme plus solide compte tenu d'une meilleure comparabilité des données utilisées pour le calcul. Pour cette mise à jour, les critères d'inclusion des molécules retenues comprenaient une structure chimique proche de celles des PCDD et PCDF, une liaison à l'AhR, une réponse toxique médiée principalement par cette liaison, et une persistance et accumulation dans la chaîne alimentaire. Une seule base de données toxicologique a été retenue [30] en privilégiant les données *in vivo*.

Toujours sur la base de l'additivité des doses et de l'équivalence toxique, Albert et son équipe ont introduit la notion de facteur de puissance relative (appelée plus tard *Relative Potency Factor* ou RPF) dès 1983 [31]. Dans leur étude, ils ont comparé le potentiel cancérogène d'émissions diesels de différents véhicules à partir de la comparaison des excès de risque unitaires calculés par exploitation de relations dose-réponse provenant d'études de cancérogenèse cutanée chez la souris exposée 2 ans. Ici, on ne parle plus de TEF mais plus généralement de facteurs de puissance relative car on n'associe pas l'effet observé (l'apparition d'une tumeur) à un seul mécanisme moléculaire précis, comme cela était le cas avec la liaison au récepteur AhR et les dioxines. La même approche a été utilisée par l'US EPA en 1993 pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). La réponse retenue pour le calcul des RPF était l'apparition de cancer de la peau à partir d'études où des souris ont été exposées par voie cutanée pendant 2 ans [32]. Les facteurs de puissance relative de 7 HAP avaient ainsi été déterminés et sont présentés dans le *tableau 2* (à noter que ces RPF ont été étendus et mis à jour pour 24 HAP

Tableau 1. Résumé des valeurs de TEF (*Toxic Equivalency Factor*) adoptées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2005 et fondées à la fois sur des données *in vivo* ou *in vitro* à partir de la base de données toxicologiques de Haws *et al.* [30] (valeurs les plus récentes).

Table 1. Summary of TEF (Toxic Equivalency Factor) values adopted by WHO in 2005 and based on in vivo *or* in vitro *data from the toxicological database of Haws* et al. *[30] (most recent values).*

Composé	WHO 2005 TEF
Polycholorodibenzo-p-dioxines (PCDD)	
2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8,-tétrachlorodibenzo-para-dioxine)	1
1,2,3,7,8-PeCDD (1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-para-dioxine)	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD (1,2,3,4,7,8-héxachlorodibenzo-para-dioxine)	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD (1,2,3,6,7,8-héxachlorodibenzo-para-dioxine)	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD (1,2,3,7,8,9-héxachlorodibenzo-para-dioxine)	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (heoptachlorodibenzo-para-dioxine)	0,01
OCDD (octachlorodibenzodioxine)	0,0003
Polychlorodibenzofuranes (PCDF)	
2,3,7,8-TCDF (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-para-furane)	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF (1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-para-furane)	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF (2,3,4,7,8-pentachlorodibenzo-para-furane)	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF (1,2,3,4,7,8-héxachlorodibenzo-para-furane)	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF (1,2,3,6,7,8-héxachlorodibenzo-para-furane)	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF (1,2,3,7,8,9-héxachlorodibenzo-para-furane)	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF (2,3,4,6,7,8-héxachlorodibenzo-para-furane)	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-para-furane)	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF (1,2,3,4,7,8,9-heptachlorodibenzo-para-furane)	0,01
OCDF (octachlorodibenzofurane)	0,0003
Polychlorobiphényles (PCB)	
PCB-77	0,0001
PCB-81	0,0003
PCB-126	0,1
PCB-169	0,03
PCB-105	0,0003
PCB-114	0,0003
PCB-118	0,0003
PCB-123	0,0003
PCB-156	0,0003
PCB-157	0,0003
PCB-167	0,0003
PCB-189	0,0003

dans un *draft* de l'US EPA mis en ligne en 2010 mais aucun document définitif n'a à ce jour été publié).

Si le RPF est une méthode plus généralisable que le TEF (les effets néfastes des substances sont toujours mieux renseignés que les mécanismes d'action moléculaires), la formule reste identique (équation 6).

$$RPF_i = \frac{\text{Indicateur de toxicité}_{TR}}{\text{Indicateur de toxicité}_i} \quad (6)$$

avec :

– TR, le toxique de référence et i le composé du mélange ;

– RPF, le *Relative Potency Factor*.

Puis comme pour le TEF, les produits de la concentration et du RPF obtenus pour chaque substance du mélange sont additionnés pour obtenir une concentration en toxique de référence, qui sera ensuite divisée par la VTR de ce toxique afin d'obtenir le quotient de danger.

En 2000, la section « Évaluations des risques » de l'US EPA publie un document sur la prise en compte des risques liés aux mélanges de produits chimiques où est décrite, entre autre et pour la première fois par une agence réglementaire, cette démarche RPF ainsi que ses conditions d'utilisation et le choix du toxique de référence [33]. L'agence insiste entre autre sur la qualité

Tableau 2. Valeurs de RPF (*Relative Potency Factor*) proposées pour 7 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par l'*United States Environmental Protection Agency* (US EPA) en 1993 [32], fondées sur des études *in vivo* de cancérogenèse cutanée chez la souris.

Table 2. RPF (Relative Potency Factor) values proposed for 7 PAHs by the US EPA in 1993 [32], based on in vivo *studies of cutaneous carcinogenesis in mice.*

Composé	RPF
Benzo[a]pyrène	1
Dibenzo[a,h]anthracène	1
Benzo[a]anthracène	0,1
Benzo[b]fluoranthène	0,1
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	0,1
Benzo[k]fluoranthène	0,01
Chrysène	0,001

des données des relations dose-réponse nécessaires et sur la disponibilité des profils toxicologiques pour un même effet. De plus, l'US EPA considère que la démarche RPF ne devrait être utilisée qu'après avoir recueilli un minimum d'informations telles que : l'identification d'un mode d'action commun aux substances en mélanges (mode d'action défini comme un continuum décrivant les événements clés de l'interaction cellule-toxique jusqu'à l'apparition de l'effet ; une évaluation quantitative de la relation dose-réponse pour le composé de référence ; et des données scientifiques pertinentes qui permettent aux autres substances d'être significativement comparées au toxique de référence. L'agence souligne néanmoins que les données disponibles peuvent être moins nombreuses et moins précises pour le calcul de TEF). En outre, l'US EPA considère que la démarche RPF repose principalement sur le jugement et l'interprétation de données scientifiques et donc que la pluridisciplinarité dans cette expertise est nécessaire.

La démarche fut appliquée par l'US EPA au début des années 2000 [34] à la suite de la promulgation de la loi sur la protection de la qualité des aliments [35] qui imposa des changements majeurs dans la réglementation des pesticides, notamment pour l'évaluation des risques et la prise en compte de l'exposition cumulée. Dans ce cadre, les travaux de l'US EPA concernaient les insecticides organophosphorés et carbamates, sur la base de l'inhibition de l'acétylcholinestérase, considérée comme événement clé de leur mécanisme de toxicité. Vingt-quatre pesticides organophosphorés ont fait l'objet de cette évaluation [36, 37]. Dans l'analyse des relations dose-réponse, les auteurs ont émis plusieurs principes clés tels que :
– la plausibilité de l'additivité des doses ;
– la nécessité d'avoir un mécanisme d'action commun pour les substances prises en compte ;
– la nécessité que les courbes dose-réponse des différents polluants d'un groupe soient parallèles (existence d'une constante de proportionnalité entre les courbes).

Dans cette étude pilote, la réponse retenue pour ces 24 pesticides était l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le système nerveux central et périphérique, le cerveau, les globules rouges et le plasma. Les auteurs ont recherché les études sources et en ont extrait les informations concernant les animaux testés (espèces, sexe, souche et âge) et les méthodes utilisées (mesures de l'inhibition de l'AChE, moment de la mesure, compartiment mesuré). Les auteurs ont particulièrement privilégié les études subchroniques (90 jours) et chroniques (2 ans) chez le rat exposé par voie orale, subchroniques (90 jours) chez le rat exposé par inhalation et les études de cancérogénicité chez le rat exposé par voie orale. Tous compartiments confondus, 96 études d'exposition par voie orale et 24 études pour les autres voies (cutanée ou respiratoire) ont été examinées. Dans le cas de l'inhibition de l'acétylcholinestérase dans le plasma après une exposition par voie orale, des informations étaient disponibles pour tous les organophosphorés chez le mâle et pour 23 sur 24 chez la femelle. C'est donc sur ce compartiment que les auteurs se sont focalisés. Afin de calculer les RPF, les auteurs ont choisi de se baser sur le calcul de l'ED_{50} (dose à laquelle on observe une diminution de 50 % de la réponse maximale (activité de l'acétylcholine estérase) pour chaque étude et pour les deux sexes. Quand l'ED_{50} n'était pas calculable, les auteurs ont utilisé le NOAEL de l'étude source (dose maximale testée dans l'étude sans effets néfastes observés, c'est-à-dire sans inhibition statistiquement significative de l'acétylcholine estérase).

Ces travaux ont été poursuivis et mis à jour pour 33 organophosphorés par le Bureau du programme pesticide de l'US EPA. La réponse d'inhibition de l'acétylcholine estérase dans le cerveau a été exploitée à partir des études chez le rat femelle exposé par voie orale sur 21 jours ou plus. Les RPF ont été calculés sur la base de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % des *benchmark doses* équivalant à une réponse de 10 % ($BMDL_{10}$) pour chaque composé (diminution de 10 % de l'activité de l'enzyme). Pour l'évaluation du risque, c'est le métamidophos qui a été considéré comme le toxique de référence. Le *tableau 3* présente les différents RPF calculés [38].

On constate au travers de ces exemples que les démarches TEF et RPF sont aujourd'hui peu différenciées. De manière générale, le RPF s'utilise quand on évalue les puissances de substances d'un groupe ayant un mode d'action commun (plus généralement un effet commun), sans forcément qu'il soit relié à un mécanisme d'action moléculaire spécifique, ou sans que les mécanismes sous-jacents soient connus (effets physiologiques, tels qu'apparition de cancers du poumon comme l'avait décrit Albert) et le TEF s'utilise quand on évalue les puissances de substances dont l'effet peut être médié par un

Tableau 3. Valeurs de RPF (*Relative Potency Factor*) proposées en 2006 par l'*United States Environmental Protection Agency* (US EPA) pour 33 insecticides organophosphorés, fondées sur la comparaison d'une diminution de 10 % de l'acétylcholinestérase dans des études *in vivo* subchroniques ou chroniques par voie orale chez le rat femelle (adapté de US EPA, 2006 [38]).

Table 3. RPF (Relative Potency Factor) values proposed for 33 organophosphorous insecticides by the US EPA in 2006, based on the comparison of a 10% reduction of acetylcholinesterase in in vivo *studies of subchronic or chronic oral ingestion in female rats (adapted from the US EPA, 2006 [38]).*

Composé	RPF
Dicrotophos	1,91
Disulfoton	1,26
Methamidophos	1,00
Omethoate	0,93
Oxydéméthon-méthyle	0,86
Terbufos	0,85
Mevinphos	0,76
Phorate	0,39
Fenthion	0,33
Diméthoate	0,32
Méthidathion	0,32
Phostebupirim	0,22
Chlorethoxyfos	0,13
Méthyl-parathion	0,12
Azinphos-méthyle	0,10
Acéphate	0,08
Naled	0,08
Fosthiazate	0,07
Chlopyrifos	0,06
Ethoprop	0,06
Fenamiphos	0,04
Pirimiphos-méthyle	0,04
DDVP	0,03
Phosmet	0,02
Tribufos	0,02
Diazinon	0,01
Phosalone	0,01
Chlorpyrifos-méthyle	0,005
Profenofos	0,004
Trichlorfon	0,003
Bensulide	0,003
Tétrachlorvinphos	0,001
Malathion	0,0003

mécanisme d'action principal, commun à toutes les substances du mélange, et bien identifié (exemple de la liaison au récepteur AhR des dioxines, furanes et PCB décrit par Safe en 1985 [21]). L'US EPA avait d'ailleurs fait l'exercice de distinction entre ces deux méthodes où la démarche TEF avait été définie comme une application spécifique du RPF [33].

Plus récemment, avec le développement de ces méthodes d'évaluations des risques, les plus anciennes se sont vues améliorées afin de mieux tenir compte des données disponibles. Ainsi, sur les mêmes bases méthodologiques que le HI, le *Point Of Departure Index* (PODI) a été proposé pour éviter en particulier les inconvénients du HI qui amenait à comparer des ratios souvent difficilement comparables [39]. En effet, dans le cas du PODI, l'exposition à un polluant n'est plus rapportée à la VTR (qui peut ne pas être fondée sur le même effet critique pour toutes les substances du mélange) mais directement aux doses critiques (nommées *Point of Departure*, POD), qui sont le NOAEL, le LOAEL ou la BMD [40] et qui peuvent ainsi être spécifiques, pour chaque polluant du mélange étudié, de l'effet qu'ils ont en commun (équation 7).

$$\mathrm{PODI} = \sum_{i=1}^{n} \frac{\exp_i}{\mathrm{POD}_i} \qquad (7)$$

avec :
- $\exp_i$, l'exposition du composé i ;
- POD, la dose critique du composé i ;
- PODI, le *Point Of Departure Index*.

L'utilisation des BMD dans le cadre de cette démarche permet de réduire l'incertitude liée à l'hétérogénéité des données mais des relations dose-réponse de haute qualité doivent être disponibles pour estimer ces BMD avec de faibles intervalles de confiance [9]. Pour évaluer le risque potentiel d'un mélange de polluants sur la santé, le rapport entre l'exposition et le POD obtenu est multiplié par un facteur de sécurité (souvent de 100), qui représente le facteur d'incertitude global que l'on aurait appliqué en cas d'utilisation d'une VTR. Le PODI résultant doit être inférieur à 1.

Cet historique montre qu'actuellement c'est surtout le HI, le RPF, le TEF et le PODI qui ont été décrits dans la littérature et pour lesquels des lignes directrices ont été proposées.

En revanche, il existe aussi d'autres démarches moins développées. Ainsi la démarche de l'indice de risque cumulé (CRI, *Cumulative Risk Index*) peut être comparée au HI précédemment décrit puisqu'on y compare un indicateur de toxicité à l'exposition. À la différence du HI, le rapport entre les deux est inversé [9] (équation 8).

$$\mathrm{CRI} = \sum_{i=1}^{n} \frac{\mathrm{NOAEL}_i}{\exp_i \cdot \mathrm{UF}_i} = \sum_{i=1}^{n} \frac{\mathrm{VTR}_i}{\exp_i} \qquad (8)$$

avec :
- CRI, l'indice de risque cumulé ;
- $\exp_i$, l'exposition du composé i ;
- VTR, la valeur toxicologique de référence construite en faisant le ratio entre le NOAEL et les facteurs d'incertitude (UF).

L'intérêt de cette approche est qu'on s'affranchit des inconvénients du HI puisque les VTR sont calculées *de novo* par l'évaluateur de risques pour le même effet critique pour toutes les substances du mélange. L'intérêt d'appliquer un facteur d'incertitude à chaque molécule permet de prendre en compte les différences existantes en particulier dans la disponibilité des données et donc d'affecter des facteurs d'incertitude différents à chaque substance. L'inconvénient de cette démarche est, comme pour le HI, la mauvaise comparabilité des données, notamment si on se base sur le NOAEL, qui est très dépendant des doses testées expérimentalement [9].

Une autre démarche très similaire au CRI existe, il s'agit de la MOE_{mix} telle que présentée dans l'équation 9. Elle reprend exactement le même principe que le PODI, où les facteurs d'incertitude ne sont pas utilisés, mais le rapport entre l'exposition et le POD est inversé [41].

$$MOE_{mix} = \sum_{i=1}^{n} MOE_i = \sum_{i=1}^{n} \frac{POD_i}{exp_i} = \frac{1}{PODI} \quad (9)$$

avec :
– MOE_{mix}, la marge d'exposition calculée pour le mélange ;
– MOE_i, la marge d'exposition pour le composé i ;
– exp_i, l'exposition du composé i ;
– POD, la dose critique retenue.

De la même façon que lors du calcul du PODI, un facteur d'incertitude global est appliqué à la MOE_{mix}. Elle doit donc être cette fois-ci supérieure à 1.

Rappelons en conclusion de cet historique que toutes ces méthodes ne tiennent pas compte des interactions toxicologiques [42], qui sont, dans le domaine des expositions environnementales (faibles doses), considérées comme négligeables.

Actuellement, les plus couramment utilisées sont présentées dans le *tableau 4*.

Exemples d'applications actuelles des méthodes CRA

Aujourd'hui, ces méthodes sont utilisées par la communauté scientifique et par les évaluateurs de risques. Parmi elles, on retrouve le HI, le PODI, le RPF et le TEF. Nous avons donc cherché à décrire leurs applications les plus récentes au travers d'une revue bibliographique exhaustive.

Hazard Index (HI)

Bien que la plus ancienne, la méthode TUS n'est pas utilisée. En revanche, le HI est toujours appliqué dans certaines conditions. Par exemple en France, dans le cas des évaluations des risques sanitaires dans les études d'impact pour les installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), les QD se rapportant aux mêmes effets toxiques et concernant le même organe cibles peuvent être additionnés. Même, en première approche, s'il n'y a pas d'information dose-réponse pertinente pour l'effet commun considéré, les QD de différentes voies d'exposition peuvent être additionnés sur la base de VTR n'ayant pas les mêmes effets critiques [6].

En 2010, Kortenkamp et Faust ont adapté la démarche de l'HI à la qualité des informations disponibles dans la littérature afin d'évaluer les risques cumulés liés à l'exposition de la femme enceinte à 15 antiandrogènes communément retrouvés dans l'environnement [43]. Ils ont construit des VTR spécifiques relatives à l'effet anti-androgène et ont ainsi pu tenir compte de la différence dans la qualité des données grâce à l'application de facteurs d'incertitude (variant de 100 à 500 selon les informations disponibles). Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés à 5 phtalates (di-n-butylphtalate [DBP], di-iso-butylphtalate [DiBP], benzylbutylphtalate [BBP], di-iso-nonylphtalate [DiNP] et di-éthylhexylphtalate [DEHP]), 6 pesticides (vinclozoline, prochloraz, procymidone, linuron, fenitrothion, p,p'-DDE), 2 parabènes (butyl-parabène et propyl-parabène), un polybromodiphényléther (le BDE-99) et le bisphénol A. Ces substances ont été groupées en fonction de leur capacité à induire une insuffisance androgénique. Plusieurs effets tels que la diminution de la synthèse de la testostérone foetale, la diminution de la distance anogénitale, la rétention des mamelons, la modification du poids d'organes sexuels secondaires sous le contrôle d'androgènes ou la diminution de la qualité du sperme ont donc été retenus. Sur cette base, 11 de leurs 15 polluants étaient des antiandrogéniques avérés *in vivo* chez les rats

Tableau 4. Principales méthodes d'évaluation des risques sanitaires cumulés.

Table 4. Principal methods for cumulative health risk assessment.

Hazard Index	Point of Departure Index	Relative Potency Factor, ou Toxic Equivalent Factor
$HI = \sum_{i=1}^{n} QD_i = \sum_{i=1}^{n} \frac{Exposition_i}{VTR_i}$	$PODI = \sum_{i=1}^{n} \frac{exp_i}{POD_i}$	$RPF_i = \frac{Indicateur\ de\ toxicité_{TR}}{Indicateur\ de\ toxicité_i}$
Somme des quotients de dangers basés sur le rapport entre l'exposition et la VTR de chaque substance d'un mélange	PODI = somme des rapports entre l'exposition et un indicateur de toxicité (POD) de chaque substance d'un mélange.	Somme des rapports entre l'exposition, à laquelle on applique un facteur de puissance relative au toxique de référence, et la VTR de ce toxique de référence

(perturbations de la différenciation de l'appareil sexuel mâle). Ils comprenaient les 5 phtalates et les 6 pesticides. Pour les 4 autres, les preuves de l'anti-androgénicité étaient surtout évaluées *in vitro*. Selon la nature des données ou la qualité des études sources, les auteurs ont ensuite appliqué des facteurs d'incertitude propres à chaque substance. Par exemple, un facteur de 200 a été appliqué au NOAEL des DBP, DiBP et BBP (même étude source) en raison du faible nombre d'animaux testés dans l'étude critique (3 à 5 [44]). Pour le DiNP, seul le LOAEL était disponible : ainsi, les auteurs ont appliqué un facteur de 500. Le *tableau 5* présente les VTR spécifiques construites pour les effets antiandrogènes.

En 2012, d'autres auteurs ont comparé les quotients de dangers obtenus pour 4 phtalates (le DBP, le DEHP, le BBP et le DiNP) en utilisant la démarche HI [45]. Leurs évaluations ont été basées sur des valeurs de référence déterminées soit par l'EFSA (*European Food Safety Authority*, Autorité européenne de sécurité alimentaire), soit par celles de Kortenkamp, mais toutes sur les effets antiandrogéniques de ces polluants. Les deux approches donnent des résultats différents puisque c'est le DBP qui apparaît comme le plus toxique avec les VTR de l'EFSA alors que c'est le DEHP qui est associé au plus grand risque avec les VTR de Kortenkamp. Cette différence est expliquée par le fait que l'EFSA utilise, pour le DBP, une dose critique 10 fois plus faible que celle qu'utilisent Kortenkamp et Faust (10 µg/kg/j contre 100 µg/kg/j respectivement). Ainsi, on souligne ici l'importance d'homogénéiser les études sources (même effet critique ou réponse ; même population ; même voie d'exposition. . .) et donc les valeurs de références à utiliser, pour chaque polluant et pour chaque type d'effet considéré comme critique.

La démarche du HI amélioré a également été utilisée par Borg et son équipe en 2013 [46] pour évaluer, entre autres, les risques cumulés de 15 perfluoroalkyles en Suède suite à une exposition environnementale. Les auteurs ont utilisé des POD équivalents aux concentrations sériques des substances correspondant la plupart du temps aux NOAEL, parfois au LOAEL (pour les effets hépatotoxiques des PFDoDA et PFNA) ou à une BMDL (pour les effets reprotoxiques du PFOA uniquement). Au regard des informations disponibles dans la littérature, tous les polluants n'étaient pas égaux. En effet, certains des perfluoroalkyles ne possédaient pas d'information toxicologique (effets ou cinétiques) suffisante. Pour ceux-ci, ils ont procédé à une extrapolation simple en appliquant les données du congénère le plus toxique. Ils ont ensuite construit des VTR pour chacun des polluants en y appliquant des facteurs d'incertitude adaptés à chaque situation. Le *tableau 6* présente les VTR spécifiques construites pour les effets hépatotoxiques et les effets sur la reproduction de ces 15 perfuloroalkyles.

Cette démarche d'*Hazard Index* améliorée apporte plusieurs évolutions au HI traditionnel et en particulier la

Tableau 5. VTR (valeurs toxicologiques de référence) fondées sur des effets antiandrogènes, construites par Kortenkamp et Faust, de l'évaluation des risques cumulés de 15 substances selon la démarche du *Hazard Index*.

Table 5. TRVs (Toxicity Reference Values) based on anti-androgenic effects and constructed by Kortenkamp and Faust from the cumulative risk assessment of 15 substances according to the hazard index procedure.

Composés	Effet critique retenu chez le mâle exposé *in utero* et nature de la dose critique	Facteur d'incertitude	VTR antiandrogénique (µg/kg/j)
DBP	↘ testostérone, BMDL	200	100
DiBP	↘ testostérone, BMDL	200	200
BBP	↘ testostérone, BMDL	200	330
DiNP	↘ testostérone, LOAEL	500	1 500
DEHP	Rétention de mamelons, NOAEL	100	30
Vinclozoline	Rétention de mamelons, NOAEL	100	50
Prochloraz	Rétention de mamelons, NOAEL	100	50
Procymidone	Rétention de mamelons, NOAEL	100	100
Linuron	Rétention de mamelons, LOAEL	500	100
p,p'-DDE	Rétention de mamelons, NOAEL	100	100
Fenitrothion	↘ de la distance anogénitale, LOAEL	100	200
BDE-99	↘ testostérone et distance anogénitale, NOAEL	100	10
Bisphénol A	↘ testostérone, NOAEL	100	12,5
Butyl-parabène	↘ testostérone, poids des épididymes et production spermatique, NOAEL	100	100
Propyl-parabène	↘ testostérone, poids des épididymes et production spermatique, NOAEL	100	1 000

BMDL : *Benchmark Dose Limit*/limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la *benchmark dose* ; LOAEL : *Lowest Observed Adverse Effect Level*/dose minimale avec effet néfaste observé ; NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level*/dose maximale sans effet néfaste observable.

Tableau 6. VTR (valeurs toxicologiques de référence) construites par Borg *et al.* [46] pour l'évaluation des risques cumulés liés à l'exposition environnementale de 15 perfluoroalkyles selon la démarche du Hazard Index.

Table 6. TRVs (Toxicity Reference Values) constructed by Borg et al. *[46] for assessment of the cumulative risks associated with environmental exposure to 15 perfluoroalkyls according to the hazard index procedure.*

Composés	Dose critique/foie (ng/mL de sérum)	Facteur d'incertitude[a]	VTR/foie (ng/mL de sérum)	Dose critique/ reproduction (ng/mL de sérum)	Facteur d'incertitude[a]	VTR/reproduction (ng/mL de sérum)
PFBS	66 754[b]	50	1 335	> 45 000[b]	25	> 1 800
PFHxS	89 000	50	1 780	> 60 000 [c]	25	> 2 400
PFOS	4 040	25	162	4 900	25	196
PFOSA	4 032[d]	25	161	4 890[d]	25	196
PFDS	4 848[d]	75	65	5 880[d]	75	78
PFPxA	5 385[e]	50	108	11 908[e]	25	476
PFHpA	6 245[e]	50	125	13 804[e]	25	552
PFOA	7 100	50	142	15 700	25	628
PFNA	28 500	150	190	8 900	25	356
PFDA	31 571[f]	450	70	9 859[f]	75	263
PFUnDA	34 642[f]	450	77	10 818[f]	75	144
PFDoDA	37 713[f]	450	84	11 777[f]	75	157
PFTrDA	40 784[f]	450	91	12 736[f]	75	170
PFTeDA	43 855[f]	450	97	13 695[f]	75	183
6:2 FTS	3 451[d]	25	138	4 185[d]	25	167

[a] Les facteurs d'incertitude appliqués l'ont été comme suit : 2 pour l'extrapolation d'une durée subaiguë ou subchronique à chronique pour les effets hépatotoxiques ; 3 et 6 pour l'extrapolation subchronique à chronique et subaiguë à chronique respectivement pour les effets reprotoxiques ; 3 pour l'extrapolation du LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*/dose minimale avec effet néfaste observé) au NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*/ dose maximale sans effet néfaste observable) ; 2,5 pour l'extrapolation de l'animal à l'homme ; 10 pour la variabilité interindividuelle au sein de l'espèce humaine ; [b] Extrapolation à partir du PFHxS ; [c] Dans l'étude toxicologique, la plus haute dose testée n'a pas entraîné d'effet significativement différent du témoin, le NOAEL est donc considéré comme supérieur à cette dose ; [d] Extrapolation à partir du PFOS ; [e] Extrapolation à partir du PFOA ; [f] Extrapolation à partir du PFNA.

[a] *Uncertainty factors have been applied as follows: 2 for extrapolation from subacute or subchronic to chronic duration for hepatotoxicity; 3 and 6, respectively, for extrapolation from subchronic to chronic and from subacute to chronic for reproductive effects; 3 for extrapolation from LOAEL to NOAEL; 2.5 for extrapolation from animal to humans, 10 for inter-individual variability in humans;* [b] *Extrapolation from PFHxS;* [c] *In the toxicological study, the highest tested dose did not lead to effects significantly different from those in the control; the NOAEL is therefore considered superior to this dose;* [d] *Extrapolation from PFOS;* [e] *Extrapolation from PFOA;* [f] *Extrapolation from PFNA.*

possibilité de ne retenir qu'un seul effet critique commun à toutes les substances du mélanges (cela ne veut pas pour autant dire qu'une évaluation du risque substance par substance ne doit pas être faite sur la base de l'effet critique le plus sensible pour chacune des substances).

Toxic Equivalency Factor (TEF)

Dans le but d'harmoniser les démarches concernant l'évaluation des risques liés aux HAP, et à l'instar de ce qui a été fait sur les dioxines, compte tenu du fait que les HAP sont capables de se lier au récepteur AhR, l'Ineris a, en 2003, adopté des TEF pour 19 d'entre eux sur la base de nombreux travaux antérieurs, et en particulier ceux de Nisbet et Lagoy [47]. Les indicateurs toxicologiques utilisés pour le calcul des TEF provenaient de la comparaison des relations dose-réponse (modalisations, excès de risques unitaires) obtenues dans des études de cancérogenèse chez le rat exposé de manière intratrachéale ou par implants pulmonaires, et chez la souris exposée par voie cutanée. Le composé de référence est le benzo[a]pyrène car c'est l'un des HAP les mieux étudiés et il est toujours présent dans les mélanges représentant les contaminations environnementales. Les TEF recommandés par l'Ineris sont présentés dans le *tableau 7* [48].

Comme pour les dioxines, l'une des principales limites de l'application de ces TEF pour les HAP est que les indicateurs toxicologiques qui ont été comparés entre eux ne provenaient pas d'études toxicologiques comparables : espèces testées différentes (rats et souris, parfois même études *in vitro*), voies d'administration différentes (cutanée, intratrachéale, pulmonaire), types de tumeurs différentes (carcinomes pulmonaires, papillomes et carcinomes cutanés, par exemple). Ainsi, plus récemment et toujours pour les HAP, des chercheurs ont proposé des TEF sur la base d'une génotoxicité évaluée *in vitro* sur des lignées d'hépatomes cellulaires humains HepG2 et intestinales LS-174T (Test H2AX) [49] qu'ils ont nommés *Genotoxic Equivalent Factor* (GEF) (*tableau 8*). Ils ont analysé la phosphorylation des histones H2AX (marqueur d'altérations de l'ADN type adduits ou lésions oxydatives) de 13 HAP à faibles doses (concentrations testées de 10^{-8} à 10^{-5}) sur ces cellules exposées 24 heures.

Tableau 7. TEF (*Toxic Equivalence Factors*) recommandés par l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris) pour l'évaluation des risques cancérigènes des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) [48].

Table 7. TEF (Toxic Equivalence Factors) recommended by INERIS for carcinogenic risk assessment of PAHs [48].

Composés	TEF
Benzo[a]pyrène	1
Dibenz[a,h]anthracène	1
Benz[a]anthracène	0,1
Benzo[b]fluoranthène	0,1
Benzo[k]fluoranthène	0,1
Cyclopenta[c,d]pyrène	0,1
Dibenz[a,c]anthracène	0,1
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	0,1
Anthracène	0,01
Benzo[g,h,i]perylène	0,01
Chrysène	0,01
Acénapthène	0,001
Acénaphtylène	0,001
Coronène	0,001
Fluoranthène	0,001
Fluorène	0,001
Naphtalène	0,001
Phénanthrène	0,001
Pyrène	0,001

Tableau 8. GEF (*Genotoxic Equivalent Factors*) proposés pour 13 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur la base de la phosphorylation des histones H2AX *in vitro* (Audebert *et al.* [49]).

Table 8. GEF (Genotoxic Equivalence Factors) proposed for 13 PAHs based on in vitro *phosphorylation of histones H2AX (Audebert* et al. [49]).

Composés	GEF
Dibenzo[a,l]pyrène	25
Diméthyl-benz[a]anthracène	10
Dibenz[a,h]anthracène	2,0
Benzo[b]fluoranthène	1,5
Benzo[a]pyrène	1,0
Benzo[k]fluoranthène	1,0
Benz[a]anthracène	0,5
Benzo[c]fluorène	0,5
Chrysène	0,3
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	0,2
Benzo[ghi]pérylène	0,1
Pyrène	0,001
Fluoranthène	0,001

On voit que les GEF ainsi proposés sont très différents et globalement plus élevés que les TEF adoptés par l'Ineris. Outre la réponse observée qui diffère (mesure globale de génotoxicité liée à diverses altérations de l'ADN comme la formation d'adduits à l'ADN ou les lésions oxydatives, *versus* apparition de tumeurs), les différences peuvent également être liées à l'utilisation de cellules humaines cancérisées, de très faibles doses de HAP, et une méthode de modélisation différente.

Si le développement des méthodes de calcul de TEF permet de réaliser des évaluations cumulées des risques sanitaires et donc de mieux répondre à la réalité des expositions humaines, et si les mécanismes d'action des substances sont de mieux en mieux documentés, ces illustrations montrent que la mise en place de méthodes de calculs standardisées semble nécessaire (utilisation de protocoles identiques, mêmes espèces ou mêmes lignées cellulaires, mêmes voies et durées d'exposition, mêmes indicateurs toxicologiques...).

D'ailleurs, l'OMS proposait dans son meeting de 2005 un protocole « idéal » pour les études devant servir au calcul de TEF liés aux dioxines, mais qui peut être étendu à d'autres molécules [28] :

– l'administration du congénère et de la 2,3,7,8-TCDD (composé index) selon la même voie d'exposition, à la même espèce animale, de même souche, sexe et âge, maintenue dans des conditions expérimentales identiques (éclairage, alimentation...) dans le même laboratoire ;

– de préférence un protocole *in vivo*, qui prend en compte de manière globale les aspects toxicocinétiques et toxicodynamiques (bien que les études *in vitro* soient nécessaires pour établir le mécanisme d'action de la substance) ;

– un protocole permettant de modéliser une relation dose-réponse complète à la fois pour le congénère et pour le composé index ;

– la réponse maximale observée devrait être la même à la fois pour le congénère et le composé index, avec si possible une relation parallèle ;

– l'utilisation du ratio des ED_{50}, à défaut BMD ou LOAEL.

Relative Potency Factor (RPF)

La démarche RPF est aujourd'hui très largement utilisée par les auteurs car elle permet d'évaluer la puissance relative d'un polluant dans un groupe et donc de hiérarchiser l'intérêt et la part de responsabilité des substances pour un type d'effet particulier, sans se préoccuper des mécanismes d'action moléculaires sous-jacents (ceux-ci peuvent être différents tant que le mode d'action reste similaire, ou inconnus).

En 2005, Wolansky et ses collaborateurs ont calculé des RPF pour 11 insecticides pyréthrinoïdes couramment utilisés. Ils se sont fondés sur une diminution, *in vivo*, de 30 % de l'activité motrice (ED_{30}) chez le rat mâle adulte Long Evans exposé par voie orale à dose unique (8 à 18 rats

par groupes de doses, 6 à 11 groupes de doses en fonction des molécules). Il s'agit donc de l'évaluation de la toxicité aiguë chez l'adulte. Le mode d'action implique la prolongation de l'ouverture des canaux sodium dans les tissus nerveux, ce qui entraîne une dépolarisation prolongée des neurones. Les mécanismes en cause ne sont pas tous élucidés. La deltaméthrine a été retenue comme toxique de référence. Le but de l'étude étant d'avoir au moins trois doses sans effets par polluant (les doses à toxicité trop importante, induisant par exemple la mortalité, n'ont pas été inclues dans l'analyse de données). Leurs résultats montrent par exemple que l'esfenvalerate et la delta-cyhalothrine sont les plus toxiques pour cet effet (RPF de 2,092 et 1,902 respectivement) et que la resméthrine est la moins toxique pour cet effet (RPF = 0,009) (*tableau 9*) [50].

À partir d'une inhibition de 20 % de l'AChE, et sur les mêmes données que l'US EPA en 2006, Bosgra *et al.* ont calculé des RPF pour l'évaluation des risques cumulés liés à l'exposition à 31 pesticides organophosphorés retrouvés sur le marché néerlandais en 2005 et 2006 [51]. L'approche s'est basée sur la comparaison des BMD équivalant à une diminution de 20 % de l'AChE (*tableau 10*). Pour 16 de ces 31 molécules, les auteurs se sont fondés sur les études conduites par l'US EPA au début des années 2000, sur les rats mâles et femelles, où ils ont mesuré l'activité de l'AChE dans le cerveau, les globules rouges et le sérum. Pour les 15 autres molécules, les relations dose-réponse n'étant pas disponibles, les auteurs ont déterminé une dose correspondante à une inhibition de 20 % de l'AChE, en se basant sur la relation dose-réponse du composé de référence (le méthamidophos) et sur les recommandations de l'OMS [52].

Si Bosgra *et al.* se sont fondés sur les études de l'US EPA de 2001 (réévaluées en 2006) pour calculer leurs RPF, les valeurs qu'ils obtiennent sont différentes de celles de l'US EPA car ils partent d'une diminution de 20 % de l'activité de l'AChE et non pas d'une diminution de 10 % comme l'avait envisagé l'US EPA. La réponse critique choisie n'étant pas la même, il est donc normal de trouver des valeurs de RPF différentes.

Toujours en 2009, Müller et son équipe ont cherché à évaluer les puissances toxiques de trois pesticides antiandrogènes – la vinclozoline, la procymidone et le prochloraz – pour trois indicateurs différents : la distance

Tableau 9. RPF (*Relative Potency Factor*) de 11 pyréthrinoïdes basés sur l'inhibition de l'activité motrice lors d'une exposition aiguë unique chez le rat adulte mâle (adapté de Wolansky *et al.* [50]).

Table 9. RPF (Relative Potency Factor) of 11 pyrethroids based on motor activity inhibition during a single acute exposure of adult male rats (adapted from Wolansky et al. *[50]).*

Composés	RPF
Lambda-cyhalothrine	1,902
Bêta-cyfluthrine	1,136
Tefluthrine	1,111
Deltaméthrine	1,000
Bifenthrine	0,782
Fenpropathrine	0,326
Cyperméthrine	0,235
Perméthrine	0,059
s-Bioallethrine	0,028
Resméthrine	0,009

Tableau 10. Valeurs de RPF (*Relative Potency Factor*) proposées pour 31 insecticides organophosphorés par Bosgra *et al.* en 2009 [51], fondées sur la comparaison d'une diminution de 20 % de l'acétylcholinestérase dans des études *in vivo* subchroniques ou chroniques par voie orale chez le rat femelle.

Table 10. RPF (Relative Potency Factor) values proposed for 31 organophosphorous insecticides by Bosgra et al. *in 2009 [51], based on the comparison of a 20 % reduction of acetylcholinesterase in* in vivo *studies of subchronic or chronic oral ingestion in female rats.*

Composé	RPF
Monocrotophos	5,4
Omethoate	1,5
Ethion	1,1
Methamidophos	1,00
Mevinphos	0,98
Primiphos-éthyle	0,98
Mecarbam	0,37
Azinphos-méthyle	0,35
Fenthion	0,33
Chlorfenvenfos	0,32
Méthyl-parathion	0,20
Parathion	0,19
Méthidathion	0,16
Heptenofos	0,16
Diméthoate	0,13
Fenitrothion	0,11
Phosmet	0,073
Chlopyrifos	0,065
Pirimiphos-méthyle	0,047
Pyrazophos	0,042
Acéphate	0,038
Dichlorvos	0,036
Diazinon	0,032
Phosalone	0,028
Bromophos-éthyle	0,026
Quinalphos	0,026
Chlorpyrifos-méthyle	0,010
Triazophos	0,0060
Profenofos	0,0039
Malathion	0,00082
Toclofos-méthyle	0,00011

Tableau 11. RPF (*Relative Potency Factors*) calculés par Müller *et al.* [53] pour trois pesticides antiandrogéniques lors d'expositions pendant la gestation et la période post-natale.

Table 11. RPF (Relative Potency Factors) calculated by Müller et al. *[53] for 3 anti-androgenic pesticides during prenatal and postnatal exposure.*

Composé/effets	RPF		
	Diminution de la distance anogénitale	Diminution du poids des vésicules séminales	Diminution du poids des muscles releveurs de l'anus
Vinclozoline	1	1	1
Procymidone	1,17	0,88	1,65
Prochloraz	0,20	n.d.	0,62

n.d. = non défini/*not defined*.

anogénitale, le poids des vésicules séminales, et le poids des muscles releveurs de l'anus chez les fœtus de rats mâles exposés *in utero* et après la naissance jusqu'au sevrage (*tableau 11*) [53]. Pour chacun de ces effets, les RPF ont été construits à partir de relations dose-réponse disponibles dans la littérature. Par ailleurs, dans leur méthode, les auteurs soulignent le fait que la démarche RPF ne peut être appliquée que si trois critères sont remplis pour le groupe de polluants d'intérêt : i) un mode d'action commun ; ii) une absence d'interaction entre les polluants ; et iii) des courbes dose-réponse parallèles.

On voit très clairement dans le *tableau 11* que la valeur des RPF est extrêmement dépendante de l'effet critique retenu. En effet, la procymidone est par exemple considérée comme plus toxique que la vinclozoline si on s'intéresse à la diminution de la distance anogénitale, mais l'est moins pour la diminution du poids des vésicules séminales. Il est donc très important dans ce genre d'étude de bien définir l'effet critique avant d'entreprendre le calcul de RPF.

Tableau 12. RPF (*Relative Potency Factors*) calculés par Benson en 2009 [54] pour 6 phtalates, fondés sur la comparaison de leurs valeurs toxicologiques de référence (VTR) basée sur les effets antiandrogéniques.

Table 12. RPF (Relative Potency Factors) calculated by Benson in 2009 [54] for 6 phthalates, based on a comparison of their TRVs (Toxicity Reference Values) for their anti-androgenic effects.

Composé	Dose critique/facteur d'incertitude	RPF
DPP	$BMDL_{1SD}$ /100	1,26
DEHP	$BMDL_{10}$ /100	1,00
DBP	NOAEL/100	0,64
DiNP	LOAEL/1 000	0,39
DiBP	$BMDL_{1SD}$ /100	0,24
BBP	$BMDL_{1SD}$ /100	0,21

BMDL : *Benchmark Dose Limit*/limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la benchmark dose ; LOAEL : *Lowest Observed Adverse Effect Level*/dose minimale avec effet néfaste observé ; NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level*/dose maximale sans effet néfaste observable.

En 2009, Benson a cherché à évaluer les risques pour le développement du système reproducteur mâle lors d'une exposition *in utero* cumulée à des phtalates (DBP, DiBP, BBP, DEHP, DPP, DiNP) selon une approche RPF fondée sur la comparaison de VTR [54]. Des VTR ont donc été calculées en appliquant aux indicateurs de toxicité disponibles (NOAEL, LOAEL ou BMDL correspondant à un écart type, soit $BMDL_{1SD}$) des facteurs d'incertitude (10 pour la variabilité interespèce, 10 pour la transposition intra-espèce et 10 lors de l'utilisation d'un LOAEL). Ces VTR ont ensuite été comparées à celle du DEHP, considéré comme le toxique de référence pour fournir des RPF, ce qui n'est pas habituel. Ces RPF sont présentés dans le *tableau 12*. L'effet critique retenu était la diminution de la production de testostérone fœtale pour tous les phtalates, excepté pour le DEHP, pour lequel la petite taille des organes de reproduction mâle a été sélectionnée car équivalent à la dose critique la plus faible dans les études disponibles. Cette différence d'effet critique est une limite pouvant conduire à situer de manière incorrecte la toxicité du DEHP au regard des autres phtalates (on a effectivement montré au travers de cette revue que le choix de l'effet et de la réponse critiques conditionnait la toxicité relative des substances). En effet, en se basant sur une BMD relative à la diminution de la testostérone pour le DEHP, le potentiel toxique des 6 phtalates aurait été différent (DPP>DBP>DEHP>DiNP>DiBP>BBP). Une autre limite concerne la non-comparabilité des doses critiques utilisées, en particulier pour le DBP et le DiNP (NOAEL et LOAEL), pouvant conduire à sur- ou sous-évaluer leur toxicité au regard des autres composés.

En 2011, l'équipe de Hannas [3] a également cherché à caractériser les puissances respectives de différents

[3] Les protéines concernées sont la « *Chlolesterol Side Chain Cleavage Enzyme* » ou P450scc ou Cyp11a (enzyme impliquée dans la biosynthèse d'hormones stéroïdes), la « *Steroidogenic Acute Regulatory Protein* » ou StAR (protéine de transport du cholestérol dans les mitochondries pour la biosynthèse des hormones stéroïdes) et l'« *Insulin-Like Factor 3* » ou insl3 (hormone responsable, entre autre, de la descente testiculaire). Les Cyp11a et StAR sont directement impliquées dans la production de testostérone.

Tableau 13. Valeurs de RPF (*Relative Potency Factors*) adaptées de l'étude d'Hannas *et al.* [3] pour cinq phtalates, fondées sur leurs effets antiandrogéniques (diminution de la testostérone fœtale, inhibition de l'expression de certaines protéines impliquées dans la stéroïdogenèse).

Table 13. RPF (Relative Potency Factor) values adapted from the study by Hannas et al. *[3] for 5 phthalates, based on their anti-androgenic effects (reduction of fetal testosterone and inhibition of the expression of some proteins involved in steroidogenesis).*

Composé	RPF			
	Diminution de l'expression de la testostérone foetale	**Diminution de l'expression de StAR***	**Diminution de l'expression de CYP11A***	**Diminution de l'expression de INSL3***
DPP	1	1	1	1
DiBP	0,15	0,24	0,84	n.d.
DiHP	0,11	n.d.	n.d.	n.d.
DEHP	0,11	0,10	0,25	0,15
DiNP	0,06	0,05	0,11	n.d.

*StAR: *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*; CYP11A: *Chlolesterol Side Chain Cleavage Enzyme*; INSL3: *Insulin-Like Factor 3*.
n.d. = non défini/*not defined*.

phtalates et leur contribution, quand ils sont en mélange, sur la production fœtale de testostérone et l'expression de protéines impliquées dans la stéroïdogenèse ou responsables du développement de l'appareil sexuel mâle[3]. À l'inverse de l'étude de Benson de 2009, ils ont eux-mêmes fait les tests *in vivo*. Ils ont exposé des rates gestantes aux phtalates pris individuellement, par voie orale, entre le 14e et le 18e jour de gestation, à des doses allant de 100 à 1 500 mg/kg/jour (variant selon les phtalates testés). À partir des relations dose-réponse obtenues, les auteurs ont calculé les ED_{50} de chaque phtalate pour la production de testostérone et l'expression des protéines chez les fœtus euthanasiés au 18e jour de la gestation. Le *tableau 13* montre les facteurs de puissance relative des phtalates en fonction de l'effet retenu, à savoir la diminution de l'expression de la testostérone (DPP > DiBP > DiHP > DEHP > DiNP), l'expression de StAR (DPP > DiBP = DEHP > DiNP) ou de Cyp11a (DPP = DiBP > DEHP > DiNP). On remarque que l'ordre des puissances relatives obtenues par Benson, sur la base de la diminution de testostérone, est différent de celui qui est obtenu par Hannas, pour les phtalates d'intérêt. Comme l'explique Benson dans son article, il s'est basé sur des données de la littérature. Les relations dose-réponse obtenues ne proviennent donc pas d'une même étude, ni d'un même laboratoire, ce qui engendre une incertitude sur la comparabilité des données.

Plus récemment, Jensen et ses collaborateurs ont calculé des RPF pour 4 fongicides perturbateurs endocriniens (epoxiconazole, prochloraz, procymidone et tebuconazole). Le composé index retenu était le prochloraz, qui est le plus étudié [4]. Les RPF ont été construits à partir de relations dose-réponse (comparaison des BMDL, niveau de réponse non précisé) pour l'augmentation de la durée de gestation de la femelle gestante et la rétention des mamelons chez la descendance mâle après exposition par gavage de rates du 7e au 21e jour de gestation puis du 1er au 21e jour post-natal (*tableau 14*).

Tableau 14. RPF (*Relative Potency Factors*) calculés sur la base de la comparaison des BMDL (*Bench Mark Dose Limits*) lors d'expositions orales pendant la gestation et la période pré-sevrage pour 4 fongicides perturbateurs endocriniens (Jensen *et al.* [4]).

Table 14. RPFs (Relative Potency Factors) calculated on the basis of the comparison of the BMDL (Bench Mark Dose Limits) during oral exposures during gestation and the preweaning period for 4 endocrine-disrupting fungicides (Jensen et al. *[4]).*

Composé	RPF pour l'augmentation de la durée de gestation	RPF pour la rétention des mamelons
Prochloraz	1	1
Tébuconazole	0,5	0,6
Époxiconazole	4,9	0,7
Procymidone	n.d.	3,5

n.d. = non défini/*not defined*.

Tableau 15. Estimation d'un PODI (*Point Of Departure Index*) pour 13 perturbateurs endocriniens à partir de données de la littérature (adapté de Christiansen *et al.* [55]).

Table 15. Estimation of a PODI (Point Of Departure Index) for 13 endocrine disrupters from data in the literature (adapted from Christiansen et al. *[55]).*

Composé	Expositions (mg/kg/jr)	Doses critiques (diminution de la distance anogénitale ou absence de rétention des mamelons) (mg/kg/jr)	Ratio expositions/ doses critiques
DBP	0,01	50	0,0002
DEHP	0,02	3	0,0067
Vinclozoline	0,009	5	0,0018
Prochloraz	0,014	5	0,0028
Procymidone	0,015	10	0,0015
Linuron	0,0006	25	0,000024
Époxiconazole	0,01	15	0,0007
4-méthyl-benzylidene	0,06	n.d.*	n.d.*
Octyl méthoxycinnamate	0,12	n.d.*	n.d.*
p,p'-DDE	0,001	10	0,0001
Bisphénol A	0,0015	n.d.*	n.d.*
Butyl parabène	0,06	n.d.*	n.d.*
Paracétamol	0,8	350	0,0023
PODI estimé			0,016

* n.d. = non défini/*not defined.*

Si les RPF sont relativement similaires pour le tébuconazole comparé au prochloraz quelle que soit la réponse observée, le potentiel toxique de l'époxiconazole est très différent en fonction de l'indicateur retenu, puisqu'il passe d'un potentiel toxique environ 5 fois plus élevé que le prochloraz pour l'allongement de la durée de gestation, à un potentiel toxique équivalent à 70 % de celui du prochloraz pour la rétention des mamelons. Là encore, cette étude montre l'importance de la comparabilité des indicateurs retenus pour la construction des équivalents toxiques, qu'ils soient TEF ou RPF, et surtout l'importance, dans l'évaluation du risque, de retenir une VTR du composé index basée sur le même type d'effet et le même type d'indicateur, et obtenu dans des conditions expérimentales similaires (il peut donc être nécessaire d'utiliser plusieurs VTR pour un même composé index en fonction des TEF ou des RPF proposés dans la littérature). Par exemple, si les TEF (ou RPF) sont basés sur la comparaison des DL_{50}, alors la VTR du composé index retenue pour l'évaluation des risques cumulés doit être fondée sur une étude de toxicité aiguë ayant permis d'obtenir une DL_{50} (l'effet retenu sera donc la mortalité). Si des $BMDL_{50}$ sont comparées, la VTR du composé index devrait être calculée à partir de la $BMDL_{50}$ plutôt que de la $BMDL_{10}$, etc.

Pour conclure, il est donc important pour l'évaluateur de risque de vérifier :
– les conditions expérimentales (voie, durée, espèces) ;
– l'effet retenu (mortalité, apparition de tumeurs, activité motrice, diminution de la qualité du sperme, etc.) ;
– la mesure de la réponse (inhibition de l'acétylcholinestérase, génotoxicité, distance anogénitale, etc.) ;
– l'indicateur retenu pour le calcul du TEF ou du RPF (NOAEL ou BMD par exemple).

Point of Departure Index (PODI)

Dans leur étude de 2012, Christiansen et ses collaborateurs ont utilisé la démarche PODI, dans une première étape, afin d'évaluer les risques d'une exposition à un mélange de 13 perturbateurs endocriniens sur la rétention des mamelons ou la diminution de la distance anogénitale [55]. Les doses induisant ces effets critiques (NOAEL ou LOAEL) ont été obtenues à partir des données de la littérature, tout comme l'estimation des valeurs d'exposition humaine. À partir de ces données, ils ont fait le rapport entre les valeurs d'exposition (adaptées pour l'étude) et les POD correspondants afin d'estimer un PODI théorique (décrivant le risque aux doses testées) (*tableau 15*).

Conclusion

Depuis les hypothèses de dose additivité de début du XX^{e} siècle, de nombreuses méthodes d'évaluation des risques ont vu le jour. Même si la plupart d'entre elles ont largement été décrites, elles sont en constante évolution

afin d'appréhender au mieux le risque lié à l'exposition multipolluants. Certaines ne sont plus utilisées et d'autres ne le sont que très peu car trop récentes ou pas assez décrites.

Aujourd'hui, l'EQRS en mélange repose essentiellement sur : la démarche TEF lorsque les modes d'action des polluants sont suffisamment documentés ; la démarche RPF qui permet de hiérarchiser et de donner une puissance relative à chaque polluant et qui est moins dépendante des mécanismes d'actions ; enfin, la démarche dite de l'HI « amélioré » qui est l'exemple même de l'évolution d'une méthode obsolète (le HI standard), se rapprochant et s'adaptant à une démarche plus récente qu'est le PODI.

Ces démarches sont toutes fondées sur l'hypothèse d'additivité des doses qui néglige les interactions possibles interpolluants. Or, certaines études, comme celle de Christiansen de 2009, montrent que les interactions entre polluants ne doivent pas être négligées car elles peuvent conduire à une sous-estimation du risque. Les auteurs y décrivent le cas de polluants ayant des effets communs sur l'organisme (antiandrogéniques) sans passer par le même mécanisme d'action [56]. Des recherches sur les effets non additifs et leur prise en compte en évaluation des risques sanitaires sont nécessaires.

Dans l'immédiat, l'hypothèse d'additivité des doses peut cependant être utilisée par défaut, et l'application des méthodes décrites dans cet article est recommandée. ■

Remerciements et autres mentions

Financement : ce travail a été financé par le ministère de l'Écologie et du Développement durable dans le cadre du programme PRIMEQUAL (12-MRES-PRIMEQUAL-1-CVS-06) ; **liens d'intérêts** : aucun.

Liste des acronymes

AChE	Acétylcholinestérase	ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	*Arylhydrocarbon Receptor* (récepteur arylhydrocarbone)	BBP	Benzylbutylphtalate
BMD	*Benchmark Dose*	BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la *benchmark dose*
CED	*Critical Effect Dose* (dose critique pour un effet donné, équivaut à la BMD)	CRA	*Cumulative Risk Assessment* (évaluation des risques cumulés)
CRI	*Cumulative Risk Index* (index de risque cumulé)	DBP	Di-n-butylphtalate
DEHP	Di-éthylhexylphtalate	DiBP	Di-iso-butylphtalate
DiNP	Di-iso-nonylphtalate	DL_{50}	Dose létale 50 (dose qui entraîne 50 % de mortalité chez les animaux exposés)
DPP	Dipentylphtalate	EC/ED	*Effective Concentration/Dose* (concentration ou dose efficace)
EFSA	*European Food Safety Authority* (Autorité européenne de sécurité alimentaire)	EQRS	Évaluation quantitative des risques sanitaires
GEF	*Genotoxic Equivalent Factors* (facteurs d'équivalence pour la génotoxicité)	HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HI	*Hazard Index*	IPCS	*International Programme On Chemical Safety*
INERIS	Institut national de l'environnement industriel et des risques	LOAEL	*Lowest Observed Adverse Effect Level* (dose minimale avec effet néfaste observé)
MOE	*Margin Of Exposure* (marge d'exposition)	NOAEL	*No Observed Adverse Effect Level* (dose maximale sans effet néfaste observable)
NRC	*National Research Council*	OMS	Organisation mondiale de la santé
OTAN	Organisation du traité de l'Atlantique Nord	PCB	Polychlorobyphényles
PCDD	Polycholorodibenzodioxines	PCDF	Polychlorodibenzofuranes
POD/PODIQD	*Point Of Departure/Point Of Departure Index*	QD	Quotient de danger
RfD	*Reference Dose* (VTR de l'US EPA pour la voie orale)	RPF	*Relative Potency Factor* (facteur de toxicité relative)
TEF/TEQ	*Toxic Equivalent Factor/Quantity*	TU/TUS	*Toxic Unit/Summation*
US EPA	*United States Environmental Protection Agency*	VTR	Valeur toxicologique de référence

Références

1. NRC. *Risk assessment in the federal government: managing the process*. Washington (DC) : National Academy Press, 1983.

2. Glorennec P, Ismert M, Ronga-Pezeret S, *et al*. Objectifs et résultats attendus d'une évaluation des risques sanitaires. *Environ Risque Sante* 2012 ; 11 : 240-2. doi: 10.1684/ers.2012.0541.

3. Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. *Toxicol Sci* 2011 ; 123 : 206-16.

4. Jensen BH, Petersen A, Christiansen S, *et al*. Probabilistic assessment of the cumulative dietary exposure of the population of Denmark to endocrine disrupting pesticides. *Food Chem Toxicol* 2013 ; 55 : 113-20.

5. Ineris. *Évaluation de l'état des milieux et des risques sanitaires. Démarche intégrée pour la gestion des émissions de substances chimiques par les installations classées*. Verneuil-en-Halatte : Ineris, 2013. www.ineris.fr/

6. Ineris. *Évaluation des risques sanitaires dans les études d'impact des ICPE*. Verneuil-en-Halatte : Ineris, 2003. www.ineris.fr/

7. SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks). *Opinion on risk assessment on indoor air quality Indoor air RA*. Brussels : SCHER, 2007. http://ec.europa.eu/

8. RIVM, ICPS, Anses. *Toxicological data analysis to support grouping of pesticide active substances for cumulative risk assessment of effects on liver, on the nervous system and on reproduction and development*. Supporting Publications: EN-392; 2013. www.efsa.europa.eu/publications

9. EFSA. *Cumulative risk assessment of pesticides to human health: the way forward*. Parma (Italy) : EFSA, 2006. www.efsa.europa.eu

10. Loewe S, Muischnek H. Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1926 ; 114 : 313-26.

11. Kortenkamp A, Altenburger R. Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants. *Sci Total Environ* 1999 ; 233 : 131-40.

12. US EPA. *Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures*. Vol. 51. Washington (DC) : US EPA, 1986.

13. Haddad S, Tardif R, Viau C, Krishnan K. A modeling approach to account for toxicokinetic interactions in the calculation of biological hazard index for chemical mixtures. *Toxicol Lett* 1999 ; 108 : 303-8.

14. Lee SL, Shih HT, Chi YC, Li YP, Yin SJ. Oxidation of methanol, ethylene glycol, and isopropanol with human alcohol dehydrogenases and the inhibition by ethanol and 4-methylpyrazole. *Chem Biol Interact* 2011 ; 191 : 26-31.

15. Soni M, Mehendale H. Hepatic failure leads to lethality of chlordecone-amplified hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Fundam Appl Toxicol* 1993 ; 21 : 442-50.

16. ATSDR. *Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures*. Atlanta : ATSDR, 2004. www.atsdr.cdc.gov/

17. Kortenkamp A, Faust M, Backhaus T. *State of the art report on mixture toxicity*. Brussels : European Commission, 2009. http://ec.europa.eu/environment/index_fr.htm

18. Sprague JB. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res* 1970 ; 4 : 3-32.

19. Ahlborg U, Becking G, Birnbaum L, *et al*. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* 1994 ; 28 : 1049-67.

20. Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism of action. *Crit Rev Toxicol* 1984 ; 13 : 319-95.

21. Safe S, Bandiera S, Sawyer T, *et al*. PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect* 1985 ; 60 : 47-56.

22. CalEPA. *Technical support document. report on chlorinated dioxins and dibenzofurans. part b - health effects of chlorinated dioxins and dibenzofurans*. Berkeley (California) : CalEPA, 1986.

23. US EPA. *Health assessment document for polychlorinated dibenzo-p-dioxins*. Washington (DC) : US EPA, 1985.

24. King-Heiden TC, Mehta V, Xiong KM, *et al*. Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Mol Cell Endocrinol* 2012 ; 354 : 121-38.

25. Eadon G, Kaminsky L, Silkworth J, *et al*. Calculation of 2,3,7,8-TCDD equivalent concentrations of complex environmental contaminant mixtures. *Environ Health Perspect* 1986 ; 70 : 221-7.

26. US EPA. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4th edition. Cincinnati (Ohio) : US EPA, 1993.

27. Barnes D, Alford-Stevens A, Birnbaum L, Kutz FW, Wood W, Patton D. Toxicity equivalency factors for PCBs? *Qual Assur* 1991 ; 1 : 70-81.

28. Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, *et al*. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006 ; 93 : 223-41.

29. Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld T, *et al*. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 1998 ; 106 : 775-92.

30. Haws LC, Su SH, Harris M, *et al*. Development of a refined database of mammalian relative potency estimates for dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006 ; 89 : 4-30.

31. Albert RE, Lewtas J, Nesnow S, Thorslund TW, Anderson E. Comparative potency method for cancer risk assessment: application to diesel particulate emissions. *Risk Anal* 1983 ; 3 : 101-17.

32. US EPA. *Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Washington (DC) : US EPA, 1993.

33. US EPA. *Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures*. Washington (DC) : US EPA, 2000.

34. US EPA. *Office of Pesticide Programs Science Policy on the use of data on cholinesterase inhibition for risk assessments of organophosphorous and carbamate pesticides*. Washington (DC) : US EPA, 2000.

35. US EPA. *1996 Food quality protection act: draft implementation plan. Prevention, pesticides and toxic substances (7506C)*. Washington (DC) : US EPA, 1997.

36. FIFRA. *A case study of the cumulative risk of 24 organophosphate pesticides*. Arlington (Virginia) : FIFRA, 2000. www.epa.gov/

37. OPP-US EPA. *Health Effects Division (7509C). Cumulative risk: A case study of the estimation of risk from 24 organophospate pesticides*. Washington (DC) : OPP-US EPA, 2000.

38. US EPA. *Organophosphorus cumulative risk assessment - 2006 Update*. Washington (DC) : US EPA, 2006.

39. Wilkinson CF, Christoph GR, Julien E, *et al*. Assessing the risks of exposures to multiple chemicals with a common mechanism of toxicity: how to cumulate? *Regul Toxicol Pharmacol* 2000 ; 31 : 30-43.

40. US EPA Risk Assessment Forum. *Benchmark dose technical guidance document*. Washington (DC) : US EPA, 2000.

41. WHO/IPCS. *Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment*. Geneva : WHO, 2009.

42. Sarigiannis D, Hansen U. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals - a challenge for policy makers. *Environmental health: a global access science source* 2012 ; 11 (S1) : S18.

43. Kortenkamp A, Faust M. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. *Int J Androl* 2010 ; 33 : 463-74.

44. Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, *et al*. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci* 2008 ; 105 : 153-65.

45. Søeborg T, Frederiksen H, Andersson M. Cumulative risk assessment of phthalate exposure of Danish children and adolescents using the hazard index approach. *Int J Androl* 2012 ; 35 : 245-52.

46. Borg D, Lund BO, Lindquist NG, Håkansson H. Cumulative health risk assessment of 17 perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated substances (PFASs) in the Swedish population. *Environ Int* 2013 ; 59 : 112-23.

47. Nisbet IC, LaGoy PK. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol* 1992 ; 16 : 290-300.

48. Ineris. *Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérigènes : Approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique - FET) et approche par mélanges. Évaluation de la relation dose-réponse*. Verneuil-en-Halatte : Ineris, 2003. www.ineris.fr

49. Audebert M, Zeman F, Beaudoin R, Péry A, Cravedi JP. Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012 ; 260 : 58-64.

50. Wolansky MJ, Gennings C, Crofton KM. Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicol Sci* 2005 ; 89 : 271-7.

51. Bosgra S, Van der Voet H, Boon PE, Slob W. An integrated probabilistic framework for cumulative risk assessment of common mechanism chemicals in food: an example with organophosphorus pesticides. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009 ; 54 : 124-33.

52. JMPR. *Monographs of toxicological evaluations. Joint Meeting on Pesticide Residues*. Geneva : World Health Organisation, 2007. www.inchem.org/pages/jmpr.html

53. Müller AK, Marvin HJP, Hart A, *et al*. Probabilistic cumulative risk assessment of anti-androgenic pesticides in food. *Food Chem Toxicol* 2009 ; 47 : 2951-62.

54. Benson R. Hazard to the developing male reproductive system from cumulative exposure to phthalate esters–dibutyl phthalate, diisobutyl phthalate, butylbenzyl phthalate, diethylhexyl phthalate, dipentyl phthalate, and diisononyl phthalate. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009 ; 53 : 90-101.

55. Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, *et al*. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl* 2012 ; 35 : 303-16.

[56]. Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, *et al*. *Environ Health Perspect* 2009 ; 117 : 1839-46.

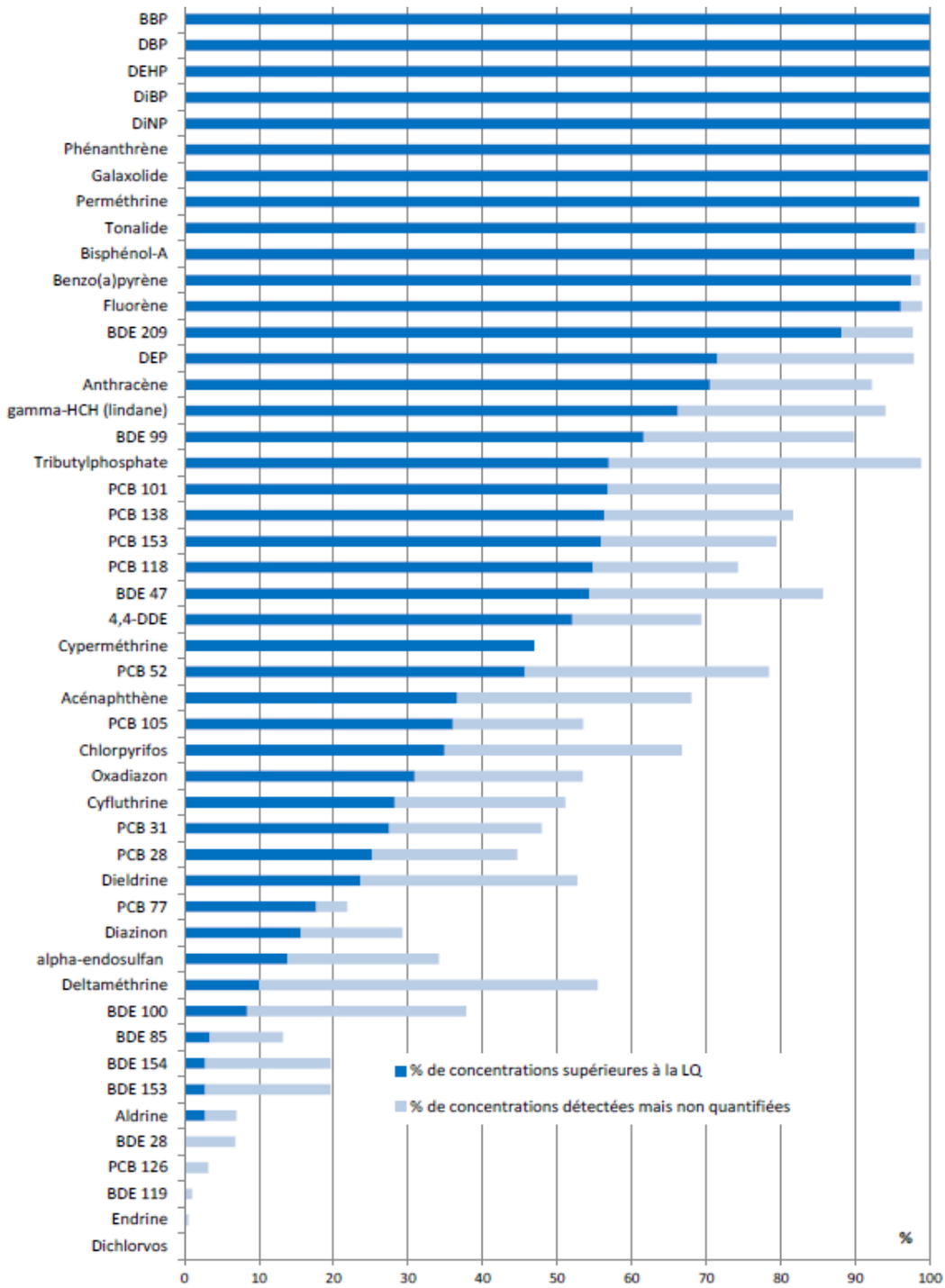
6. Données de contaminations françaises

Le travail présenté ici est basé sur des données de contamination des logements français en COSV qui ont été caractérisées récemment. C'est ainsi qu'ont été mesurées les concentrations de 48 COSV dans les poussières déposées (prélevées entre 2008 et 2009) de 145 logements représentatifs des logements de France métropolitaine dans lesquels vivaient des enfants de 6 mois à 6 ans (Mandin et al. 2014a) (**Error! Reference source not found.**). De plus, 66 COSV ont également été mesurés dans les particules de l'air (prélevées entre 2003 et 2005) de 297 logements représentatifs du parc d'habitation français (Mandin et al. 2014b) (**Error! Reference source not found.**). Le **Tableau 2** synthétise les informations de ces deux campagnes de prélèvements.

Tableau 1 : Synthèse des informations des différentes campagnes de prélèvements

	ECOS- POUSS	**ECOS-PM**
Echantillonnage des logements		
Nombre de COSV recherchés	48	66
Echantillon	n = 145 logements	n = 297 logements
Source	Campagne nationale Plomb-habitat 2008-2009	Campagne nationale OQAI « Logements » 2003-2005
Analyse chimique	GC/MS/MS	TD/GC/MS/MS
Extrapolation des concentrations à l'échelle des logements français		
Population des logements français	N= 3 581 991 Données de contamination des poussières déposées au sol représentatives des logements d'enfants de 6 mois à 6 ans	N = 24 672 136 Données de contaminations des particules PM10 représentatives des logements de France métropolitaine

Figure 4 : Fréquences de quantification et de détection de 48 COSV dans les poussières déposées de 145 logements français



Source : Figure communiquée par Corinne Mandin, CSTB (Mandin et al. 2014a)

Figure 5 : Fréquences de quantification et de détection de 66 COSV dans les particules en suspension de l'air de 297 logements français

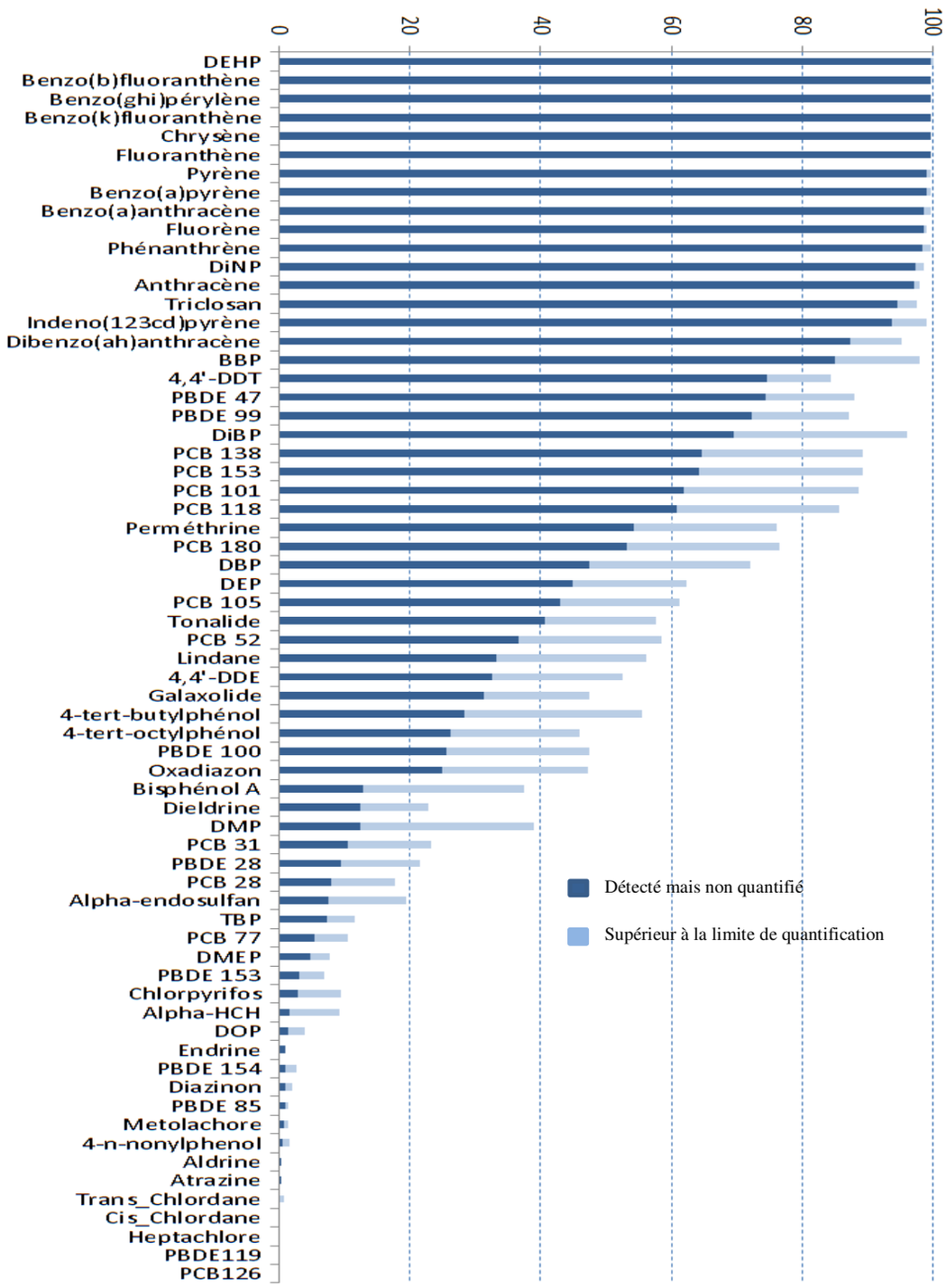


Figure communiquée par Corinne Mandin, CSTB (Mandin et al. 2014b)

Grâce à ces données de contaminations des COSV dans les poussières déposées et dans l'air de logements français, nous avons pu observer que la quasi-totalité des COSV recherchés étaient détectés dans au moins 10% des poussières et de l'air des logements investigués et plus de la moitié d'entre eux l'étaient dans la moitié de ces logements (figures 4 et 5). On a également pu observer que les COSV pouvaient être retrouvés de manière ubiquitaire dans ces logements mais à des niveaux de concentrations très variables en fonction du média investigué (et ce, principalement en raison de leur caractéristiques physico-chimique) (Blanchard et al., 2014). Il est donc important de prendre en compte ces différentes phases dans l'estimation de l'exposition et dans la sélection de nos COSV. De plus, dans le cadre de ces travaux, seule la fréquence de détection dans les différentes phases sera prise en compte. En effet, même si certains composés sont détectés à de très faibles concentrations, ils peuvent l'être dans la totalité des logements et leur toxicité peut être bien supérieure à celle d'un composé voisin, retrouvé à de plus fortes concentrations, dans très peu de logements.

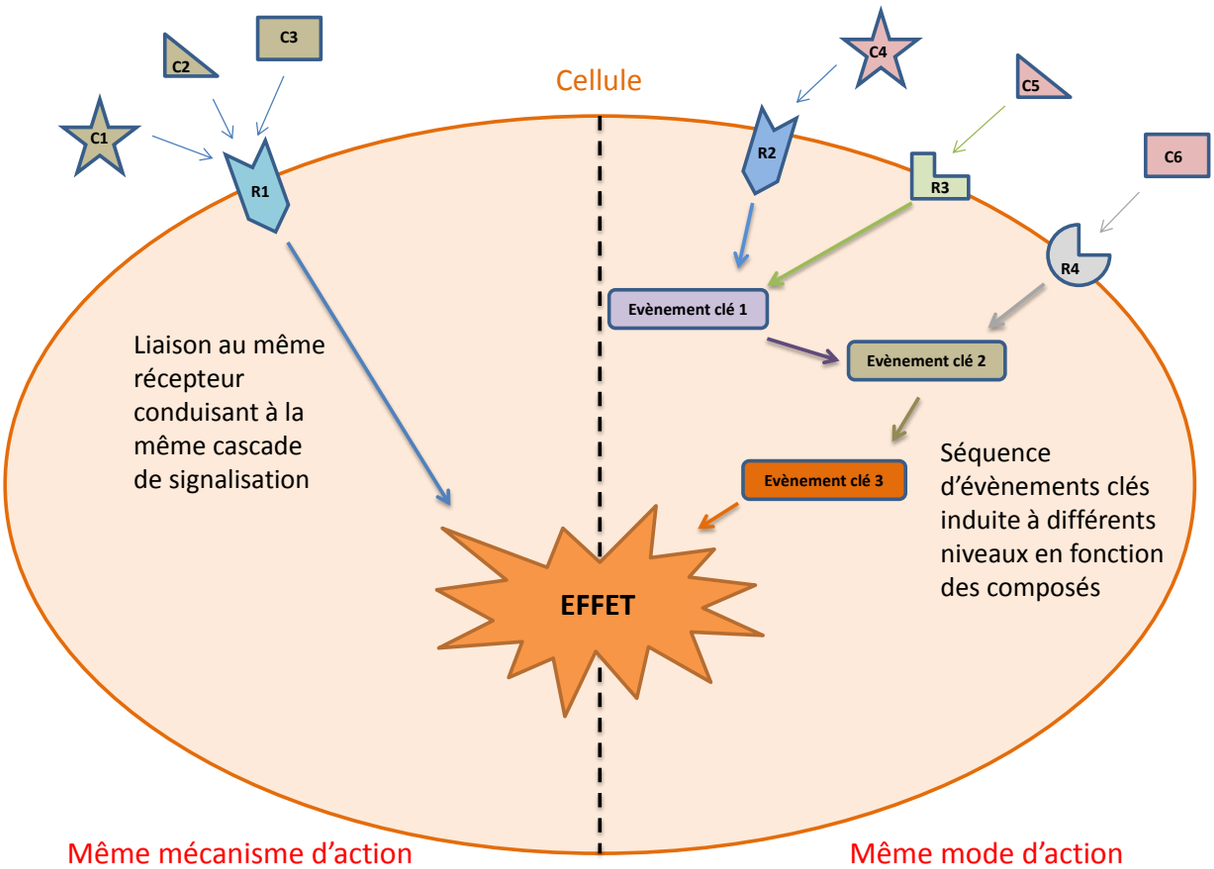
HYPOTHESES DE RECHERCHE, OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE ET STRATEGIE GENERALE

1. Hypothèses de recherche

Toutes les démarches d'évaluation des risques cumulés sont fondées sur l'hypothèse d'additivité des doses ou des réponses. Cette hypothèse est parue dans un article scientifique pour la première fois en 1926 (Loewe and Muischnek 1926). Dans ce papier, les auteurs expliquent qu'il n'y a pas d'interaction entre deux molécules si la réponse produite par la dose « A » plus la réponse produite par la dose « B » est égale à la réponse produite par « A » et « B » donnée ensemble, soit l'équation : $R(a) + R(b) = R(a + b)$. En d'autres termes, l'hypothèse d'additivité des doses permet de considérer que les composés d'un même mélange se comportent comme des concentrations ou des dilutions d'un autre, ne différant que par leurs puissances (US EPA 1986). En 1995, Drescher et Boedeker précisent l'hypothèse d'additivité des doses en soulignant que l'effet d'un mélange dépend de nombreux facteurs comme le nombre de composés dans un mélange, leurs concentrations et leurs puissances respectives (Drescher and Boedeker 1995).

Dans un mélange, on peut imaginer que des composés peuvent agir soit par le même mécanisme d'action (fixation au même récepteur conduisant à la même cascade de signalisation moléculaire, produisant le même effet biologique), soit par le même mode d'action (pouvant emprunter différents mécanismes d'action mais conduisant au même effet biologique) (Figure 6). Ce dernier est défini comme une séquence d'évènements clés conduisant au même effet biologique (Kortenkamp et al., 2009; Meek and Bucher, 2003). En d'autres termes, on pose l'hypothèse que les composés d'un mélange peuvent avoir le même mode d'action mais pas nécessairement le même mécanisme d'action.

Figure 6 : Exemple de différences entre mécanismes et modes d'action de composés sur une cellule conduisant au même effet biologique



R_x : Récepteur d'une cellule ; C_x : Composé exogène

2. Objectif de la thèse et stratégie générale

Aujourd'hui, nous connaissons certains des effets de COSV sur la santé humaine ou sur celle des animaux de laboratoire et même certains de leurs mécanismes d'action. Cependant, dans la démarche d'évaluation des risques, quand les VTR sont établies, elles le sont substance par substance et pour un seul type d'effet (le plus sensible pour chaque substance, c'est-à-dire se manifestant à la dose la plus faible). Or nous avons vu précédemment que des substances pouvaient emprunter les mêmes mécanismes et les mêmes modes d'action pouvant conduire au même effet. L'évaluation des risques cumulés pour des mélanges existe déjà, elle a été appliquée pour certaines familles de substances comme les dioxines (Van den Berg et al. 1998, 2006; Eadon et al. 1986), les HAP à potentiel cancérogène (US EPA 1993) ou encore pour des pesticides (US EPA 2000), comme en témoigne la revue de la littérature présentée dans l'introduction (Fournier et al. 2014). D'autres études plus récentes se sont intéressées à l'impact cumulé de composés ayant individuellement les mêmes propriétés (anti-androgéniques par exemple) (Kortenkamp and Faust, 2010). Les démarches d' « hazard index » (HI), de « point of departure index » (PODI) ou de « relative potency factors » (RPF) sont les plus communément utilisées. Elles sont basées sur l'hypothèse d'additivité des doses reposant sur le fait qu'à faibles doses, la synergie entre les composés d'un mélanges sont moins probables (Kortenkamp et al. 2009; US EPA 2006). Mais actuellement, aucune étude n'a pris en compte les contaminations (et donc potentiellement les expositions) réelles lors du choix des mélanges de composés. Ces mélanges sont composés de substances de nature et de familles chimiques très différentes pouvant cependant avoir des effets communs sur notre santé. De plus, les RPF actuellement développés ne peuvent être utilisés dans la même évaluation des risques cumulés car nous avons vu qu'ils n'étaient pas basés sur le même

mécanisme ou mode d'action (propriétés anti-androgéniques, génotoxicité, inhibition de l'acétylcholine estérase…).

Dans ce contexte, le projet général ECOS, dans lequel s'intègre ces travaux de thèse, vise à évaluer l'exposition cumulée aux COSV des environnements intérieurs des logements français ainsi que les risques associés (Glorennec et al. 2011) bénéficiant de l'existence de données de contaminations dans les poussières et les phases particulaire et gazeuse de l'air. Pour se faire, ce projet comporte plusieurs étapes dont certaines sont abouties : 1) la sélection des composés (Bonvallot et al. 2010) ; 2) le développement de méthodes d'analyses multi-résidus dans les particules de l'air (Mercier et al. 2012) et dans les poussières (Mercier et al. 2014) ; 3) la quantification des COSV dans les différents milieux (air et poussières) (Mandin 2014a, 2014b) ; 4) la modélisation de la concentration en phase gazeuse à partir des concentrations dans les poussières et les particules de l'air (Blanchard et al. 2014) ; 5) l'évaluation de l'exposition agrégée ; 6) le calcul d'indicateurs de toxicité cumulés ; et enfin 7) l'évaluation des risques cumulés.

Ainsi, l'objectif de ces travaux de thèse, est de proposer des indicateurs de toxicité cumulée pour des COSV ayant des modes d'action communs (étape 6 du projet général ECOS).

Pour répondre à cet objectif, la stratégie choisie comporte trois grandes étapes, présentées en Figure 1 :

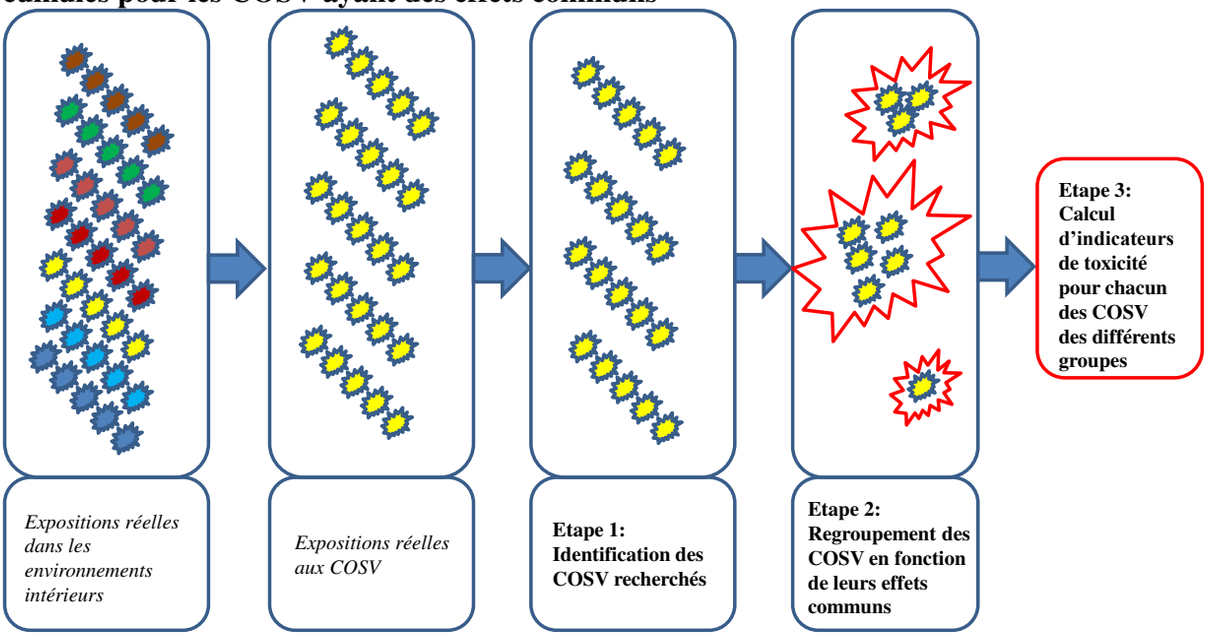
1) Identification des COSV à partir des expositions réelles, quelles que soient leurs familles chimiques ;

2) Regroupement des COSV en fonction de leurs mécanismes ou modes d'actions communs ;

3) Calcul d'indicateurs de toxicité comparables pour des COSV ayant des effets communs.

Ces indicateurs de toxicité seront ensuite utilisés pour identifier la toxicité relative des COSV les uns par rapport aux autres ce qui permettra, à partir des données d'expositions, de réaliser l'évaluation des risques cumulés prévue dans le cadre du projet général ECOS.

Figure 1 : Etapes de la stratégie mise en place pour le calcul d'indicateurs de toxicité cumulés pour les COSV ayant des effets communs



Ainsi, dans la suite de ce manuscrit, sera d'abord décrite la méthodologie mise en place pour répondre à notre objectif : le regroupement des COSV, le choix de l'évènement clef et le calcul de benchmark doses et de relative potency factors. Une mise à jour de nos regroupements sera ensuite présentée, puis les résultats de l'application de cette méthode pour deux types d'effets : les effets des COSV sur le système reproducteur puis leurs effets sur le système nerveux. Ces résultats seront discutés en présentant les atouts de cette méthode, ses limites, puis plusieurs

analyses de sensibilités seront réalisées pour les paramètres les plus influant sur le calcul des indicateurs de toxicité. Enfin, une conclusion générale et la mise en perspective de ces travaux clôtureront ce manuscrit.

METHODE

1. Regroupement des COSV

Le regroupement de composés n'est pas nouveau. Dès 1997, l'US EPA publiait un document sur le regroupement de pesticides en fonction de leur mécanisme de toxicité (US EPA 1997). Dans son rapport de 2007, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OECD) référençait plusieurs exemples d'application du principe de regroupement de substances chimiques de l'industrie chimique dont l'un des plus ancien était sur le regroupement de substances pétrolières (OECD 2007). Dans la mise à jour de ce rapport, en 2014, l'OECD listait les différentes approches existantes de regroupement de composés : en fonction de groupes fonctionnels, de modes ou mécanismes d'action communs, de nombre de carbones, des voies métaboliques, ou en fonction de leur catégorie (longueur de chaine par exemple) (OECD 2014). L'European Food Safety Authority (EFSA) a travaillé en ce sens sur le regroupement de composés en fonction de leurs effets communs sur l'organisme. En 2013, l'EFSA publiait un document illustrant le regroupement de pesticides en fonction de leurs effets sur le système nerveux via l'identification de Cumulative Assessment Groups (CAG) (EFSA 2013a). Bien que cette approche constitue une évolution dans la démarche CRA (prise en compte d'effets communs), elle ne se base pas sur les expositions réelles. En 2013, Crepet et al ont ainsi créé plusieurs groupes de pesticides en se basant sur des données de contaminations réelles de produits de consommation (Crépet et al. 2013). Si la démarche mise en place par ces auteurs représente là aussi une réelle amélioration de la démarche CRA, elle n'est basée que sur un seul type de composés, les pesticides, et ne prend pas en compte la multitude de familles chimiques auxquelles nous sommes réellement exposés. Ainsi, pour atteindre l'objectif fixé, la première étape de notre méthodologie a été d'adapter les démarches CRA proposées dans la littérature afin

d'y ajouter une étape de regroupement en lien avec notre problématique de prise en compte des contaminations réelles (multi-polluants) dans le cadre d'une évaluation des risques cumulés.

En ce sens, l'article « An exposure-based framework for grouping pollutants for a cumulative risk assessment approach: Case study of indoor semi-volatile organic compounds", publié en 2014 dans Environmental Research, présente la méthodologie que nous avons mise en place. Nous nous sommes basés sur les 4 étapes de l'approche traditionnelle d'évaluation des risques cumulés proposée par le NRC en 1983 (identification du danger, évaluation de la relation dose-réponse, évaluation de l'exposition, caractérisation du risque), en adaptant les deux premières étapes à notre situation. La première étape a été découpée en trois parties : 1a) identification des composés auxquels nous sommes réellement exposés ; 1b) identification des effets et mécanismes/modes d'actions de chacun de ces composés ; et 1c) regroupement en fonction de leurs effets, mécanismes et/ou modes d'action communs. La deuxième étape a été le calcul d'indicateurs de toxicité comparables, de type benchmark dose (BMD), à partir des relations dose-réponse publiées dans la littérature, pour chaque substance d'un même groupe. Les effets des COSV retenus sur le système reproducteur et sur le système nerveux ont été présentés à différentes échelles de l'organisme. Les principaux groupes de COSV ont été identifiés et, en fonction de la précision des données recueillies, différentes méthodes de construction d'indicateurs de toxicité cumulés ont été proposées (RPF, PODI…). Les groupes de COSV les plus important en nombre et décrivant les effets les plus précis ont été préférés. Pour le système reproducteur, un des principaux groupes était celui induisant une diminution de la synthèse de testostérone. Pour ce groupe, où il existait un mode d'action commun, la démarche RPF a été proposée. Pour le système nerveux, un des groupes retenus a été l'altération des cellules neuronales. Pour ce

groupe, où une multitude de mécanismes et modes d'action conduisaient à l'effet retenu, c'est la démarche PODI qui a été proposée dans le cadre d'une CRA.

Environmental Research 130 (2014) 20–28

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

An exposure-based framework for grouping pollutants for a cumulative risk assessment approach: Case study of indoor semi-volatile organic compounds ☆

Kevin Fournier [a,b], Philippe Glorennec [a,b], Nathalie Bonvallot [a,b,*]

[a] EHESP School of Public Health, Sorbonne Paris Cité, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France
[b] INSERM UMR1085 IRSET (Research Institute in Environmental and Occupational Health), Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 May 2013
Received in revised form
22 November 2013
Accepted 15 January 2014

Keywords:
Cumulative exposures
Risk assessment
Toxicity reference values
Toxic equivalent factors
Hazard index

ABSTRACT

Humans are exposed to a large number of contaminants, many of which may have similar health effects. This paper presents a framework for identifying pollutants to be included in a cumulative risk assessment approach. To account for the possibility of simultaneous exposure to chemicals with common toxic modes of action, the first step of the traditional risk assessment process, i.e. hazard identification, is structured in three sub-steps: (1a) Identification of pollutants people are exposed to, (1b) identification of effects and mechanisms of action of these pollutants, (1c) grouping of pollutants according to similarity of their mechanism of action and health effects. Based on this exposure-based grouping we can derive "multi-pollutant" toxicity reference values, in the "dose–response assessment" step. The approach proposed in this work is original in that it is based on real exposures instead of a limited number of pollutants from a unique chemical family, as traditionally performed. This framework is illustrated by the case study of semi-volatile organic compounds in French dwellings, providing insights into practical considerations regarding the accuracy of the available toxicological information. This case study illustrates the value of the exposure-based approach as opposed to the traditional cumulative framework, in which chemicals with similar health effects were not always included in the same chemical class.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Human beings use many chemicals in various circumstances, such as: manufacturing and use of products and articles, industrial processing, agriculture, etc. These chemicals and their by-products are likely to be found in the environment and are the source of diffuse and multiple contaminations of the different compartments: pesticides in soils, water, diet or air, persistent organic pollutants in the food chain, urban air pollution, volatile and semi-volatile organic compounds in indoor and outdoor environments, etc. As a consequence, human beings are exposed through oral, respiratory or dermal routes to a large variety of chemicals present in food, air, water and dust, generally at low doses. The presence of such pollutants and their metabolites in human biological fluids has confirmed this hypothesis. For example, the National Health and Nutrition Examination Survey – designed to assess the health and nutritional status of adults and children in the United States – included biomonitoring surveys that showed the presence of detectable levels of a large variety of chemicals and their metabolites in blood or urine of human people, such as metals, phthalates or pesticides' metabolites (NHANES, 2013).

Regulations related to the chemicals entering in European market, both for domestic and professional uses, are based on risk assessment and management (European Union, 2009, 2006). However, the laws on the use of chemicals (cosmetics, biocides, pesticides, medicines, food additives and more) do not allow a comprehensive and global risk analysis. Standard toxicological tools, in particular studies on laboratory mammals, are not suitable for studying the effects induced by complex and low-dose chemical mixtures. Little knowledge is routinely generated on the hazards of these chemical mixtures. The real impact of dietary and environmental contamination is not known and therefore not fully taken into account in public health decisions. The implementation of cumulative risk assessment strategies for complex mixtures is therefore of high concern as stated by Sarigiannis and Hansen (2012).

A variety of cumulative risk assessment (CRA) methodologies have already been suggested to improve risk management decision-making.

☆*Grant information*: We should like to thank the EHESP – School of Public Health for funding.

* Corresponding author at: INSERM UMR 1085 School of Public Health, Avenue du Professeur Léon Bernard, CS74312, 35043 Rennes Cedex, France. Fax: +332 99 02 26 75.
E-mail address: nathalie.bonvallot@ehesp.fr (N. Bonvallot).

0013-9351/$ - see front matter © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.01.007

For example, toxic equivalent factors have been defined for dioxins, furans, dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB-dl) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), on the basis of their ability to bind the Aryl hydrocarbon receptor (Safe, 1990; Van den Berg et al., 2006, 1998). Similarly, the U.S. Environmental Protection Agency suggested using an approach based on relative potency factors (RPF) for organophosphate and carbamate pesticides on the basis of their ability to inhibit the acetylcholinesterase enzyme (US EPA, 2006, 2002). More recently, these approaches were extended to other molecules, such as pyrethroid pesticides (Wolansky et al., 2005) and phthalates (Hannas et al., 2011). However, these approaches generally take into account only one chemical family. Taking into account pollutants from different chemical families would undoubtedly better reflect actual environmental human exposures. This issue was first addressed by Kortenkamp and Faust (2010) who proposed a CRA based on the anti-androgenic abilities of 15 substances including pesticides (fungicides, insecticides), as well as phthalates, brominated compounds and parabens. The hazard index method was then chosen to afford more flexibility in dealing with various data quality issues by using varying uncertainty factors. However, the use of different critical doses (no observed adverse effect level versus lowest observed adverse effect level for example) led to difficulties in the interpretation of results. In addition, this pioneering study was based on the mechanism of toxicity of substances that people are not typically exposed to. It seems therefore necessary to pursue the improvement of the CRA methodology.

The objective of this work is to propose an additional step in the CRA approach, based on grouping pollutants people are actually exposed to. Only the threshold method will be developed (for non-carcinogenic or non-genotoxic compounds). We illustrate this exposure-based CRA framework with a case study based on exposure to semi volatile organic compounds (SVOCs) in French indoor environments.

2. A brief review of cumulative risk assessment methods

The risk assessment process was initially defined by the NRC in 1983 (National Research Council U.S. Committee on the Institutional Means for Assessment of Risks to Public 1983). In the traditional approach, four steps are used and described as follows: (1) Hazard identification, to determine whether a chemical is linked to one or more specific health effects, (2) dose–response assessment, to identify the relation between the magnitude of exposure and the likelihood or occurrence of health effects in a population. In its simplest form, this step is the choice of a toxicity reference value (a reference dose for example) according to an exposure route and duration, (3) exposure assessment, to determine the extent and the magnitude of human exposure, and (4) risk characterization, to describe the nature and magnitude of human health risk, including uncertainties. This last step is the combination of the previous ones. It generally compares the estimated human exposure with the selected toxicity reference value. It results in a hazard quotient (exposure/toxicity reference value) if the threshold assumption is used, or an excess risk (exposure $\times$ toxicity reference value) in the case of a non-threshold assumption.

A dose-additivity assumption has been used for forty years (Sprague 1970) in the cumulative risk assessment process, where a threshold hypothesis is used. The simplest approach is to sum the hazard quotient obtained for each chemical (US EPA, 2000, 1986) to obtain a hazard index. The main limitation is the lack of comparability of the ratio obtained for each pollutant when, for example, the reference doses are not defined based on the same critical effect. This method could be used to identify the chemical of most concern in the mixture but cannot predict the effect of the mixture. This method takes into account the most sensitive critical effect induced by each pollutant. The risk could be considered as negligible when the hazard index is less than one. If not, a more in-depth approach should be used. An improvement of this approach was proposed using the point of departure index which directly compares the exposure to a critical dose, or "point of departure", in which the same effect is selected for all substances, even if the point of departures are different: no observed adverse effect level, lowest observed adverse effect level or benchmark dose). The point of departure index is then compared to human exposure, leading to a margin of exposure that is interpreted keeping in mind the uncertainties of the toxicological data used to derive the point of departure. Another approach is directly derived and extrapolated from the toxic equivalent factor for dioxins, furans, PCB-dl and PAHs, based on their affinity to the arylhydrocarbon receptor. The RPF approach first described by US EPA (2002) is based on the assumptions of a similar mechanism/mode of action and parallel dose–response curves. The toxic potency of each chemical is normalized relative to the best-known compound. These RPFs can be constructed by comparing the toxicity indicators (benchmark doses based on the same mechanism for example, or an effective dose corresponding to a percentage of response or affinity). They are then used to weight the exposure of the different compounds, then added together to determine a hazard quotient based on the toxicity reference value of the index compound. This approach requires more accurate mechanistic information and can therefore be applied only to the most widely studied pollutants. Several reviews with a more in depth description of these approaches are available (Fournier et al., 2014; Kortenkamp and Faust, 2010; Sarigiannis and Hansen, 2012). These CRA methodologies have been used in various contexts. For example, Wolansky et al. (2005) derived relative potency factors for 11 pyrethroids after an acute exposure in rats, based on the prolongation of the open state of sodium channels. Similarly, US EPA (2006, 2002) proposed a CRA approach for 30 organophosphate pesticides based on brain cholinesterase inhibition in rats after exposure of 21 days or longer via oral, dermal or respiratory routes. RPFs were determined according to their respective benchmark dose. In 2011 the same approach was suggested to assess the risk related to exposure to a mixture of phthalates during pregnancy, based on a decrease in testosterone production and alteration of gene expression by fetal testes (Hannas et al., 2011). Jensen et al. (2013) published a cumulative risk assessment for 4 anti-androgenic fungicides belonging to different chemical classes (triazoles, imidazoles, dicarboximides). They used the RPF approach based on benchmark dose calculation to assess two effects (increased gestation period in pregnant females and increased nipple retention in male offspring) (Jensen et al., 2013).

In the case of situations where toxicological data are complete, with a deeper understanding of mechanisms and modes of action, it is possible to refine CRA by using toxicokinetic interactions and internal doses at the target site of action (Haddad et al., 2001). Taking into account the toxicokinetic interactions was also developed by Sarigiannis et al. They used a physiologically-based pharmacokinetic model to assess the internal dose of benzene following a co-exposure to four volatile organic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene). These authors showed that benzene cancer risk estimate calculated from the combined exposure was lower than risk from benzene exposure alone. This was due to a metabolic competition (Sarigiannis and Gotti, 2008).

If these methods should be developed in the future, as it was suggested by the authors (Sarigiannis et al., 2009), these situations where mechanistic data are understood are unfortunately still too rare and it is not possible to develop this type of approach in all cases.

3. An exposure-based conceptual framework

3.1. Initial assumptions

3.1.1. The concept of dose addition

The concept of dose addition is a long-established concept suggested in the risk assessment process to take into account chemicals with a common mode of action, in which it is assumed that each component in the mixture acts as if it were a simple dilution of another one. The fundamental assumption is that each chemical in a mixture exhibits a common toxic mode of action. Typically, it would be necessary to know all toxicokinetic data and biochemical and molecular pathways for each compound in order to verify this concept. But biochemical interactions (absorption, compounds–cell interactions) cannot be known for all possible mixtures and all given situation, which is why a pragmatic approach was finally recommended for risk assessment. This concept is recommended for CRA processes by several organizations as a default approach for decision making when no data prove the contrary (European Commission, 2012; US EPA, 2010, 2002, 2000, 1986; WHO/IPCS, 2009), based on the fact that interactions between chemicals are unlikely to occur at environmentally relevant concentration (European Commission, 2007). The dose addition concept has also been observed for some mixtures. Howdeshell et al. (2008) validated this concept for a mixture of five phthalate esters able to inhibit fetal testicular testosterone production in rats. In 2009, other authors validated the same hypothesis, finding that the combined effects of a mixture of four antiandrogens from different chemical families were dose additive (for changes in ano-genital distance, retained nipples and sex organ weights). Nevertheless, they also observed synergistic effects on malformations of external sex organs (Christiansen et al., 2009). Christen et al. (2012) showed that this dose-additivity concept is appropriate to assess the mixture effect of antiandrogenic phthalates and bisphenol A. They also showed a tendency to synergism at high concentrations and antagonism at low concentrations according to the model and the compound mixtures selected The authors explain these deviations from the dose-additivity by the mechanism of interaction at the androgen receptor (binding site and strength) rather than a toxicokinetic interaction. According to Evans et al. (2012), these deviations can be explained by the type of chemical tested, the number of compounds in the mixture, and the design of the study. The authors designed experiments using mixtures of pollutants (plasticizers, phthalates, metals, PCBs, phytoestrogens, PAHs, heterocyclic amines, antioxidants, UV filters, musks, PBDEs and parabens) that address these factors. The first one was a "balanced" mixture with components present in proportion to a common effect concentration. The second one was a "non-balanced" mixture with components in proportion to potential human tissue concentrations. The second part of their study consisted of testing the individual and simultaneous ability of 16 potential modulator chemicals to influence the assay outcome produced by a reference mixture of chemicals. They concluded that the dose-additivity concept commonly provides a good prediction of mixture effects.

3.1.2. A trans-family multi-pollutant approach

The selection of compounds is a critical step of in CRA. It would make sense to group chemicals on the basis of chemical similarities because of dose additivity, but in real life situations, people are exposed to a variety of pollutants from different chemical families. This issue needs to be addressed, as pointed out by Sexton and Hattis (2007). In the framework we propose, the chemicals to be included in the CRA should not be limited to one chemical family (e.g. phthalates) or one chemical use (e.g. fungicides) but should be selected based on observed exposures or environmental contaminations.

3.1.3. Data availability

The risk assessment approach is currently used to address health risk policy issues related to environmental contaminants when epidemiological data are insufficient to establish causal relationships and calculate attributable risks to humans. The process has been defined by the US General Accounting Office as "a systematic, scientific description of potential adverse effects of exposures to hazardous substances or situations" and "a complex but valuable set of tools helping agencies to identify issues of potential concern, select regulatory options and estimate the range of a forthcoming regulation's benefit" (US GAO, 2001). Thus the main objective of a risk assessment approach is to assist policymakers in the decision-making process. Because the risk assessment process is implemented even if scientific data are lacking, a number of default assumptions are usually applied. A default option has been defined by the NRC as "the option chosen on the basis of risk assessment policy that appears to be the best choice in the absence of data to the contrary" (National Research Council, 1983). The main assumptions involve the value of using animal data to assess the risk in humans (same types of effects expected in both species), the use of a threshold approach for non-carcinogenic or non-genotoxic carcinogenic chemicals and the idea that humans are more vulnerable than laboratory animals. In the case of a CRA with a threshold approach, dose-additivity is also a default assumption. If new data becomes available, the default assumptions are not taken into account and the risk assessment process should be more accurate leading to less conservative conclusions.

3.2. Structuring the hazard identification of the CRA

For a given situation, using actual exposures for a CRA requires a comprehensive view of pollutants, i.e. selecting pollutants from a large variety. This is the first sub-step of hazard identification in exposure-based CRA. In the second sub-step, the effects, modes and mechanisms of action of all the detected compounds are identified. In the last sub-step, the pollutants are grouped according to their similarity of action on the organism. At the end of these three sub-steps, the dose response assessment consists in deriving multi-pollutant toxicity reference values for each exposure situation, leading to the last two steps of the conventional approach, i.e. exposure assessment and risk characterization. The framework is presented in Table 1. Each of the 3 sub-steps is described below.

3.2.1. Identification of pollutants to which people are exposed

This identification of pollutants people are exposed to can rely on human biological monitoring and/or on environmental monitoring. These data can originate from biomonitoring programs (NHANES, 2013; Schulz et al., 2007), from total diet studies (Arnich et al., 2012) or from environmental studies in general, indoor or particular environment (Lucas et al., 2012; Mompelat et al., 2011; Rudel and Perovich, 2010). Main limitations at this step are related to false negative (a pollutant is not identified although it should be). The presence of false negatives may be due to high limits of detection or by the transformation of the parent compound into unknown metabolites—in the environment or in the body.

3.2.2. Identification of effects, modes and mechanisms of action

From a biological point of view, an effect due to exposure to one or more pollutants is caused by a series of mechanisms of action or "key-events", defined by Boobis et al. (2008, 2006) as measurable events that are critical to the induction of the effect as shown in Fig. 1. On the basis of this statement, several levels of effects can be defined:

- *Clinical effect*, which corresponds to an alteration of a body function observable by a clinical diagnosis. For example, alteration

Table 1
Comparison of the proposed exposure-based cumulative risk assessment framework with the conventional cumulative risk assessment.

Conventional CRA approach	Exposure-based CRA approach
1. Hazard identification	1a. Identification of pollutants to which people are exposed 1b. Hazard identification: effects and mechanisms of action of each pollutant 1c. Grouping of pollutants with similar effects and/or mechanisms of action
2. Selection of toxicity reference values	2. Derivation of "multi-pollutant" toxicity reference values
3. Exposure assessment	
4. Risk characterization	

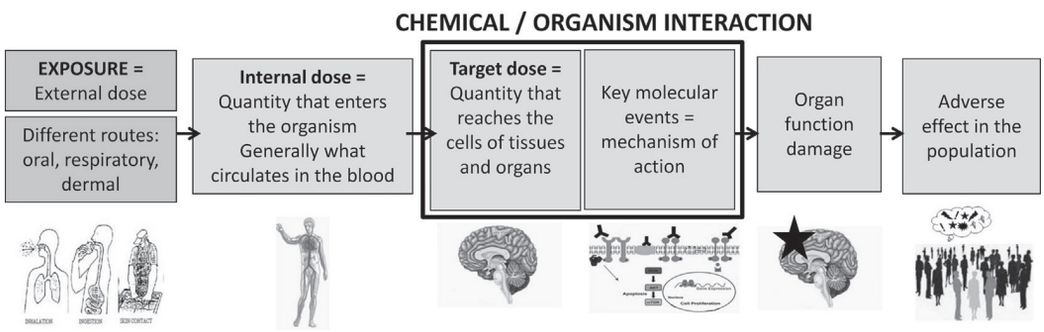


Fig. 1. Effect of pollutants at different body scales. We are exposed, via different routes, to a number of pollutants which penetrate the body and reach the cells of target tissues and organs. Key molecular events are responsible for organic dysfunction affecting the exposed population.

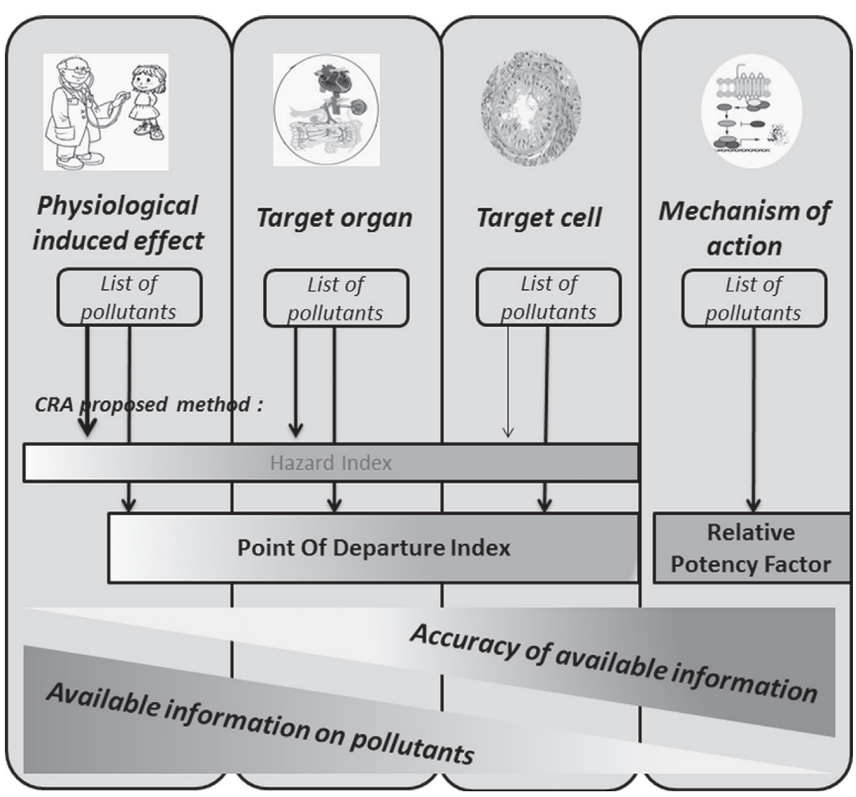


Fig. 2. Suggested way of presenting toxicological information in a cumulative risk assessment. Traditionally, the hazard index approach is used to assess the health risk of a substance. The point of departure index approach is used when more accurate information (physiological effect, target organ or target cells) is available. The relative potency factor (RPF) approach is used when even more accurate information (mode or mechanism of action) is available.

of cognitive or behavioral functions, such as hyperactivity or attention-deficit, could be diagnosed based on standardized tests like the behavior assessment systems for children;

- *Impairment of the target organ*. The clinical effect previously described is usually induced by an effect on an organ. For example, in the case of behavioral impairment, the effect on a target organ could be an alteration of the thyroid or the brain;
- *Effect at a cellular level*: at this scale, cell damage can cause alteration of the target organ. These effects can be observed directly in exposed laboratory animals (after autopsy, microscopic observations) or by in vitro tests (cell cultures). Examples include swelling, necrosis or cell death, including changes in the dendritic morphology of hippocampal neurons or abnormal plasticity of the synaptic junctions.

- *Effect at a molecular level*, which corresponds to the direct interaction between the macromolecules responsible for cell function (proteins, amino acids, lipids, nucleic acids) and the chemicals (or metabolites). A variety of intracellular mechanisms of action can be disrupted. These effects are observable by in vitro tests or with high-throughput techniques such as transcriptomics or proteomics. Examples include phosphorylation of the *N*-methyl-D-aspartate receptor or a direct interaction with the estrogen receptors. These types of effects are rarely elucidated. Nevertheless, the molecular consequences of these interactions can be identified, such as changes in *N*-methyl-D-aspartate receptor expression, a decrease in neurotransmitters or enzymes levels (dopamine, etc.) or over-expression of a specific gene. In our framework, we consider the molecular consequence of direct interactions as an effect at a molecular level.

In this step, it is important to address the biological plausibility of the effects. The mode of action observed in animals must be plausible to humans and higher plausibility is associated with a higher confidence level (Meek and Bucher, 2003). Thus, it is important to take into account the species tested (in vivo, in vitro), the window, route and duration of exposure, etc. Moreover, as pointed out by Borgert et al. (2004), a detailed characterization of the pharmacodynamics, pharmacokinetics and slope of dose response curves may be important criteria in evaluating whether the toxicity of a mixture can be predicted by the mode of action of its component chemicals.

3.2.3. Grouping pollutants based on similar action

The available information on effects, modes and mechanisms of action for each pollutant can be gathered into a unique dendrogram recapitulating the 4 levels of effects (clinical, organic, cellular, and molecular). Fig. 2 describes this framework that groups information according to these levels. Pollutants inducing the same effects on organisms or having the same mechanism of action at a cellular and molecular level can be identified and grouped. This grouping is also a way to classify pollutants according to the availability of data. It drives the choice of a CRA method: hazard index, point of departure index, or RPF. According to the available information, the hazard index or the point of departure index approaches can be used when we have information only on a clinical effect (e.g. reduced fertility, behavioral changes) or a target organ or cell, depending on the application of uncertainty factors (for each pollutant or for the mixture). When the mechanism of action is known (e.g. binding to a receptor) or the consequence of this mechanism of action is known (e.g. decreased protein synthesis), an RPF approach can be used.

This exposure-based CRA framework was tested on a case study presented below.

4. Case study: Semi-volatile organic compounds in French indoor environments

4.1. Context

Semi-volatile organic compounds (SVOCs) such as phthalates, PBDEs and PCBs are ubiquitous in indoor environments because of the increasing use of new materials and substances (pesticides, plasticizers, flame retardants, preservatives) (Mercier et al., 2011) and most of them are considered as endocrine disruptors (Rudel and Perovich, 2010). Due to their physicochemical properties, SVOCs partition between air, airborne particles, surface and settled dust, making them easily bioaccessible, whether via respiratory, oral or dermal routes. Children are particularly vulnerable to exposure (vulnerable biological systems and vulnerable behavior with hand-to-mouth activity).

4.2. Step 1a: Pollutant identification based on real exposures

A list of SVOCs was prioritized on the basis of their contamination and toxicity levels (Bonvallot et al., 2010). Nationwide sampling campaigns were carried out in French dwellings to characterize the contamination of indoor air and settled dust by more than 55 SVOCs (Blanchard et al., 2011; Glorennec et al., 2011) measured together in a specific multi-residue analysis (Mercier et al., 2012; Mercier et al., accepted). For CRA, we selected the SVOCs with concentrations in air or settled dust above the limit of quantification in more than 25% of dwellings, on the basis of preliminary results ($n=235$). We identified 21 SVOCs out of 55 measured including 8 phthalates (di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP), di-isononyl-phthalate (DiNP), di-isobutyl-phthalate (DiBP), bentyl benzyl phthalate (BBP), di-ethyl phthalate (DEP), bis(2-methoxyethyl)phthalate (DMEP) and di-methyl phthalate (DMP)), 4 PBDEs (BDE-47,-99, -100 and -209), 3 pesticides (lindane, permethrin and cypermethrin), 3 PCBs (PCB-101, -138 and -153), 2 musks (galaxolide and tolanide) and bisphenol A (BPA).

4.3. Step 1b: Hazard identification, effects and mechanisms of action

Hazard identification of the 21 SVOCs was performed by means of a literature review focusing on two well-documented systems: the reproductive and nervous systems. Selection criteria included the description of mechanism of action of these SVOCs, and the description of the target organs/cells. When there were a great many articles, priority was given to the most recent ones.

4.3.1. Reprotoxic effects

According to the time of exposure (pre or post-natal), some SVOCs may induce malformations of the genital tract or reduced fertility (alteration of sperm production) in mammals due to their impact on Leydig and Sertoli cells. Different mechanisms of action have been suggested: inhibition of insulin-like 3 (INSL3) synthesis; decreased steroidogenic enzyme levels (StAR, P450scc), leading to decreased testosterone synthesis; inhibition of follicle-stimulating hormone (FSH) action, leading to inhibition of androgen binding protein (ABP) and/or inhibin α (INHα) synthesis and stopping Sertoli cell proliferation; induction of ROS production, leading to the death of Sertoli cells; inhibition of connexin 43 (protein acting as a link between Sertoli and germ cells) with a release of Fas-L death signal. Reduced female fertility due to lower aromatase activity, and higher testosterone, androstenedione and progesterone secretion was also observed (see Supplemental material, Fig. 3).

4.3.2. Neurotoxic effects

Twelve of the 21 selected SVOCs act on the nervous system and are able to interfere with neuronal development (DEHP, BDE -47, -99, -209, BPA, PCB-101, -138, -153, lindane, permethrin and cypermethrin). Different modes of action were suggested: an increase in intracellular calcium which induces an increase of the frequency of the postsynaptic current and promotes the release of neurotransmitters; oxidative stress inducing neuronal apoptosis and a decrease in dopamine levels, inducing neurodegeneration. The selected SVOCs are also able to act on the thyroid in females and newborns, by inhibiting synthesis of T3 and T4 (thyroid hormones), which are strongly involved in the nervous system and brain development (see Supplemental material, Fig. 4).

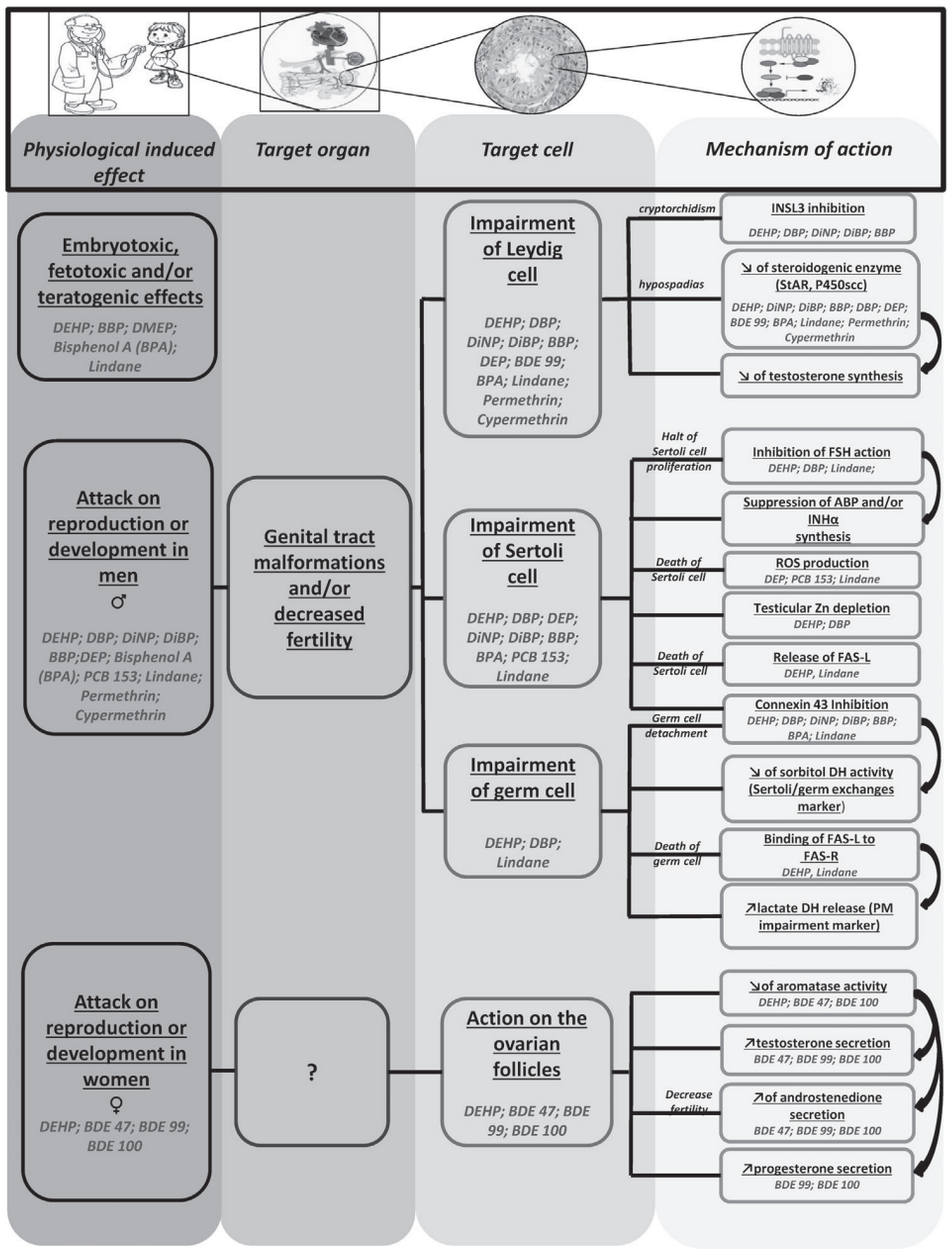


Fig. 3. Mechanisms of action and toxic effects of selected indoor semi volatile organic compounds (SVOCs) on the reproductive system. Fifteen pollutants act at different levels of the reproductive system. This dendrogram shows the accuracy of the information for each one. It allows us to identify those acting together at different scales of this system, which can be grouped to determine toxicity reference values.

4.4. Step 1c: Grouping pollutants

Toxicological data were tabulated in dendrograms to visualize groups of pollutants according to their effects or mechanisms of action for each system (reproductive and nervous) (Figs. 3 and 4). This also shows the accuracy of the available toxicological information (from target organ to molecular level). Five groups of pollutants were identified (Table 2) with a common molecular consequence of their mechanisms of action (decrease of testosterone synthesis, INSL3 or connexin 43 inhibition, decrease of T4 or dopamine levels). The data are accurate enough to support a hypothesis on the consequence of the molecular interaction between the SVOC and the organism. For these groups, a RPF approach could be suggested. Most of these groups contain different chemical families such as phthalates, pesticides, PCBs and PBDEs.

Two other groups of pollutants described in Table 3 have common cellular or clinical effects (neuronal cell impairment and embryotoxic effects). The data are not accurate enough to elucidate the mechanism of action. For these groups, a Point of Departure Index could be suggested.

In all, considering indoor SVOCs and the reproductive and nervous systems, 7 groups of pollutants can be considered for a cumulative risk assessment: 5 groups for a RPF approach, and 2 for a point of departure index approach. They are composed of 5 to 12 pollutants from different chemical families in most cases.

5. Discussion–conclusion

This framework adapted the traditional CRA approach to a trans-family multi-pollutant approach by taking into account data

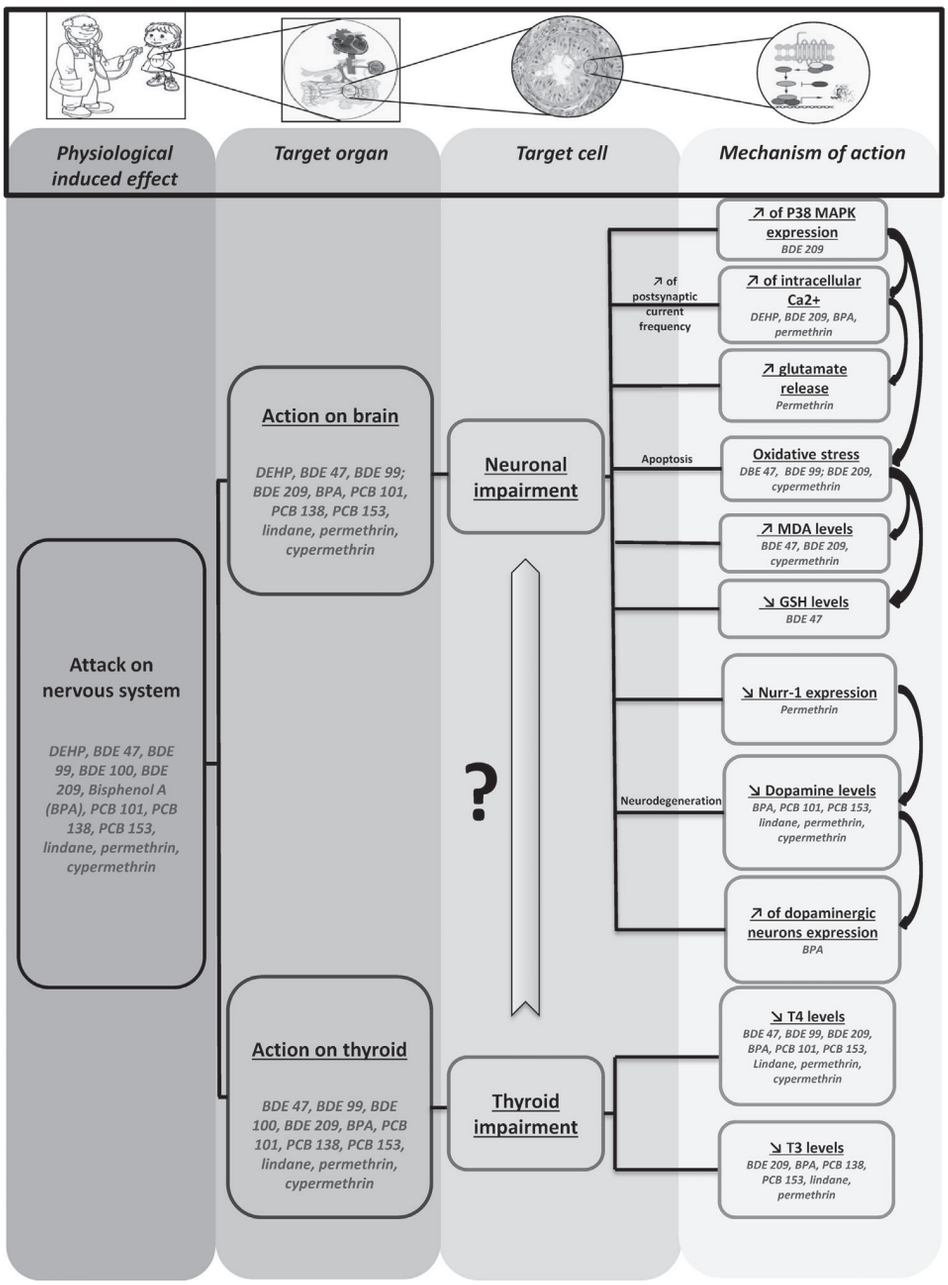


Fig. 4. Mechanisms of action and toxic effects of selected indoor semi volatile organic compounds (SVOCs) on the nervous system. Twelve pollutants act at different levels of the nervous system. This dendrogram shows the accuracy of the information for each one. It allows us to identify those acting together at different scales of this system, which can be grouped to determine toxicity reference values.

Table 2
Groups of semi volatile organic compounds (SVOCs) for which the relative potency approach is suggested.

Groups of SVOCs	Description	Clinical effects	Cellular effects	Mechanisms
Group A	**DEHP, DiNP, DiBP, BBP, DEP, BDE 47, BDE 99, BDE 100, BPA, lindane, permethrin, cypermethrin**	Reproduction impairment: Depending on the window of exposure: decrease in sperm quality or hypospadias	Leydig cell impairment	Decrease of testosterone synthesis by decrease of steroidogenic enzymes levels
Group B	**DEHP, DBP, DiNP, DiBP, BBP**	Reproduction impairment:Cryptorchodism only if prenatal exposure	Leydig cell impairment	INSL3 inhibition
Group C	**DEHP, DBP, DiNP, DiBP, BBP, BPA, lindane, dieldrin**	Reproduction impairment: Decrease in sperm quality	Sertoli and germ cell detachment	Connexin 43 inhibition
Group D	**BDE 47, BDE 99, BDE 209, BPA, PCB 101, PCB 153, lindane, permethrin, cypermethrin**	Nervous system: possible neurodegeneration	Thyrocyte cell impairment	Decrease of thyroxine (T4) levels
Group E	**BPA, PCB 101, PCB 153, lindane, permethrin, cypermethrin**	Nervous system: possible neurodegeneration	Neuronal cell impairment	Decrease of dopamine levels

Table 3
Groups of semi volatile organic compounds (SVOCs) for which the point of departure index approach is suggested.

Group of SVOCs	Description	Clinical effects	Cellular effects	Mechanisms
Group F	**BDE 47, BDE 99, BDE 100, BDE 209, BPA, PCB 101, PCB 138, PCB 153, lindane, permethrin, cypermethrin**	Nervous system: Neurodegeneration	Neuronal cell impairment	?
Group G	**DEHP, DBP, DMEP, BPA, lindane**	Reproduction: Embryotoxic, fetotoxic and/or teratogenic effects	?	?

availability and actual exposures. Our proposed conceptual framework consists of adding a step to the traditional cumulative risk assessment approach. Based on actual exposures, it groups pollutants according to their effect, on the basis of their mode or mechanism of action. Applying the concept to a real case allowed us to identify issues and to assess the value of the approach.

This approach involves a number of important methodological issues. First, selection of pollutants must be based on criteria of interest previously defined to achieve the objective (frequency of quantification in our case study). During this step, we eliminated a number of chemicals. Second, the available information varies according to the body system studied, since there is more mechanistic information on pollutants affecting reproduction than for other systems. The RPF approach would therefore be easier to implement for reproductive effects. From a mechanistic point of view, the system for which there is the least information is the immune system. For this system, a point of departure index approach is likely to be promoted, emphasizing effects rather than mechanisms. The case study also illustrated that there is a trade-off between the number of pollutants we wish to consider and the accuracy level for dose-additivity. Indeed, because of the accuracy of available information, the more pollutants we want to include, the less likely it is that the RPF approach can be used. Third, uncertainty plays an important role in risk assessment. In the case of pollutants grouping for CRA approaches, the main sources of uncertainty include the selection of compounds (no pollutant must be neglected) and the knowledge of mechanisms or modes of action, which is fragmented. Nevertheless, the use of this approach provides a wider perspective on human health risks and results in a lower uncertainty than the traditional risk assessment.

Finally, this case study demonstrated the value of an exposure-based CRA, as we determined that pollutants with similar effects or mechanisms of action do not all belong to the same chemical family. The approach has also been shown to be feasible although the greatest limitation is its dependence on the availability of toxicological data.

In conclusion, the proposed methodology for creating groups of substances with the same targets and modes or mechanisms of action can form the basis for exposure-based cumulative risk assessment for many situations with complex exposures. The main challenge is still to generate toxicological – or epidemiological – data on the largest possible number of pollutants that are relevant to human exposure.

Acknowledgments

We would like to thank the EHESP – School of Public Health and its LERES Laboratory for having provided SVOC contamination data.

Appendix A. Supplementary meterial

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.01.007.

References

Arnich, N., Sirot, V., Rivière, G., Jean, J., Noël, L., Guérin, T., Leblanc, J.-C., 2012. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study. Food Chem. Toxicol. An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association 50, 2432–2449.

Blanchard, O., Glorennec, P., Mercier, F., Ramalho, O., Mandin, C., Bonvallot, N., 2011. Cumulative indoor exposures to semi-volatile organic compounds (SVOCs) in France: measurements of endocrine disruptors in 30 French dwellings. In: Indoor Air Conference.

Bonvallot, N., Mandin, C., Mercier, F., Le Bot, B., Glorennec, P., 2010. Health ranking of ingested semi-volatile organic compounds in house dust: an application to France. Indoor Air 20, 458–472.

Boobis, A.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M.E.B., Vickers, C., Willcocks, D., Farland, W., 2006. IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. Crit. Rev. Toxicol. 36, 781–792.

Boobis, A.R., Doe, J.E., Heinrich-Hirsch, B., Meek, M.E.B., Munn, S., Ruchirawat, M., Schlatter, J., Seed, J., Vickers, C., 2008. IPCS framework for analyzing the relevance of a noncancer mode of action for humans. Crit. Rev. Toxicol. 38, 87–96.

Borgert, C.J., Quill, T.F., McCarty, L.S., Mason, A.M., 2004. Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? Toxicol. Appl. Pharmacol. 201 (2), 85–96.

Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrämmli, A., Fent, K., 2012. Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: validity of concentration addition. Toxicol. Appl. Pharmacol. 259, 169–176.

Christiansen, S., Scholze, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Axelstad, M., Kortenkamp, A., Hass, U., 2009. Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. Environ. Health Perspect. 117, 1839–1846.

European Commission, 2007. Opinion on Risk Assessment on Indoor Air Quality. Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER). Directorate general for Health and Consumer Protection. 1–33.

European Commission, 2012. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Scientific Committees SCHER, SCENIHR, SCCS. Directorate general for Health and Consumers. 1–50.

European Union, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 Concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Establishing a European Chemicals Agency, Amending Directive 1999/45/EC and Repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Available at ⟨http://eur-lex.europa.eu⟩.

European Union, 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market and Repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Available at ⟨http://eur-lex.europa.eu⟩.

Evans, R.M., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2012. Additive mixture effects of estrogenic chemicals in human cell-based assays can be influenced by inclusion of chemicals with differing effect profiles. PLoS One 7, e43606.

Fournier K., Glorennec P., Bonvallot N. Derivation of toxicological reference values for taking into account mixtures in health risk assessment: existing methods and recent applications. Env. Risque Sante 2014, In press.

Glorennec, P., Mercier, F., Blanchard, O., Bonvallot, N., Ramalho, O., Mandin, C., 2011. Cumulative indoor exposures to semi-volatile organic compounds (SVOCs) in France: the ECOS project. In: Indoor Air Conference Proceeding, Austin, TX, United States. Available at ⟨http://hal.inria.fr/docs/00/68/80/91/PDF/a509_4.pdf⟩.

Haddad, S., Béliveau, M., Tardif, R., Krishnan, K., 2001. PBPK modeling-based approach to account for interactions in the health risk assessment of chemical mixtures. Toxicol. Sci. 63, 125–135.

Hannas, B.R., Lambright, C.S., Furr, J., Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2011. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene

expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. Toxicol. Sci. 123, 206–216.
Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V, Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., Gray, L.E., 2008. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. Toxicol. Sci. 105, 153–165.
Jensen, B.H., Petersen, A., Christiansen, S., Boberg, J., Axelstad, M., Herrmann, S.S., Poulsen, M.E., Hass, U., 2013. Probabilistic assessment of the cumulative dietary exposure of the population of Denmark to endocrine disrupting pesticides. Food Chem. Toxicol. 55C, 113–120.
Kortenkamp, A, Faust, M., 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. Int. J Androl. 33, 463–474.
Lucas, J.-P., Le Bot, B., Glorennec, P., Etchevers, A., Bretin, P., Douay, F., Sébille, V., Bellanger, L., Mandin, C., 2012. Lead contamination in French children's homes and environment. Environ. Res. 116, 58–65.
Meek, M., Bucher, J., 2003. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. Crit. Rev. Toxicol. 33, 591–653.
Mercier F., Gilles E., Saramito G., Glorennec P., Le Bot B. A Multi-residue method for the simultaneous analysis in indoor dust of several classes of semi-volatile organic compounds by pressurized liquid extraction and gas chromatography / tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A. Accepted.
Mercier, F., Glorennec, P., Blanchard, O., Le Bot, B., 2012. Analysis of semi-volatile organic compounds in indoor suspended particulate matter by thermal desorption coupled with gas chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1254, 107–114.
Mercier, F., Glorennec, P., Thomas, O., Le Bot, B., 2011. Organic contamination of settled house dust, a review for exposure assessment purposes. Environ. Sci. Technol. 45, 6716–6727.
Mompelat, S., Thomas, O, Le Bot, B, 2011. Contamination levels of human pharmaceutical compounds in French surface and drinking water. J. Environ. Monit. 13, 2929–2939.
National Research Council, 1983. Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. U.S. Committee on the Institutional Means for Assessment of Risks to Public Health, Commission on Life Sciences. National Academy Press, Washington D.C.
NHANES, 2013. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Updated tables, September 2013. US Department of Health and Human and Service. Center for Disease Control and Prevention.
Rudel, R.A., Perovich, L.J., 2010. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. Atmos. Environ. 43, 170–181.
Safe, S, 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). Crit. Rev. Toxicol. 21, 51–88.
Sarigiannis, D., Hansen, U., 2012. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals—a challenge for policy makers. Environ. Health 11 (1), S18.
Sarigiannis, D., Gotti, A., Cimino Real, G., Marafante, E., 2009. Reflections on new directions for risk assessment of environmental chemical mixtures. Int. J. Risk Assess. Manage. 13 (3/4), 216–241.
Sarigiannis, D.A., Gotti, A., 2008. Biology-based dose–response models for health risk assessment of chemical mixtures. Fresenius Environ. Bull. 17, 1439–1451.
Schulz, C., Conrad, A., Becker, K., Kolossa-Gehring, M., Seiwert, M., Seifert, B., 2007. Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring—temporal and spatial (West Germany/East Germany) differences in population exposure. Int. J. Hyg. Environ. Health 210, 271–297.
Sexton, K., Hattis, D., 2007. Assessing cumulative health risks from exposure to environmental mixtures—three fundamental questions. Environ. Health Perspect. 115, 825–832.
Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. Water Res. 4, 3–32.
US EPA, 1986. Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures.
US EPA, 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures.
US EPA, 2002. Guidance on Cumulative Risk Assessment of Pesticide Chemicals That Have a Common Mechanism of Toxicity. Office of Pesticide Programs.
US EPA, 2006. Organophosphorus Cumulative Risk Assessment—2006 Update. Office of Pesticide Programs.
US EPA, 2010. Development of a Relative Potency Factor (RPF) Approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Mixtures. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS).
US GAO, 2001. Report to Congressional Requesters. Chemical Risk Assessment, Selected Federal Agencies' Procedures, Assumptions, and Policies. GAO 01810. 1–234.
Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Van Leeuwen, F.X., Liem, a K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environ. Health Perspect. 106, 775–792.
Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, Mark, Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, Annika, Haws, L., Rose, M., Safe, Stephen, Schrenk, Dieter, Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, Mats, Walker, N., Peterson, Richard E, 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Toxicol. Sci. 93, 223–241.
WHO/IPCS, 2009. Assessment of Combined Exposures to Multiple Chemicals: Report of a WHO/IPCS International Workshop on Aggregate/Cumulative Risk Assessment. Geneva.
Wolansky, M.J., Gennings, C., Crofton, K.M., 2005. Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. Toxicol. Sci. 89, 271–277.

2. Choix de l'évènement clef

Une des majeures parties de notre méthodologie est le choix de l'évènement clef. Ces évènements ont été définis par l'IPCS comme des étapes mesurables dans une voie essentielle au développement de l'effet toxique. Nous avons vu précédemment la structure que prenaient nos regroupements. Pour chacun d'entre eux, de nombreux groupes d'évènements clefs sont identifiés en fonction du nombre de composés qu'ils incluent et de leur degré de précision dans la description de l'effet. Plus le groupe choisi ciblera un évènement clef précis, plus les indicateurs toxicologiques calculés permettront une évaluation des risques cumulés ciblée. Cependant, comme souligné dans l'article précédent, plus l'évènement clé choisi sera précis, moins il y a aura d'informations disponibles dans la littérature, réduisant ainsi le nombre de substances traitées en mélange pour l'évaluation des risques. L'objectif de ces travaux étant de fournir des indicateurs de toxicité pour un maximum de COSV auxquels nous sommes exposés et ayant des effets communs, un compromis est donc nécessaire entre le choix des évènements-clés à retenir et le nombre de COSV dans chacun de ces groupes. Ainsi, la stratégie a consisté à retenir les groupes d'évènements clefs décrivant le plus précisément possible les mécanismes ou modes d'action induisant un effet clinique tout en comprenant le plus de COSV possible.

3. Calcul de Benchmark doses

Des indicateurs de toxicité, de type BMD, ont été ensuite calculés pour chacun des COSV du groupe retenu. Les BMD peuvent être définies comme des doses (ou des concentrations) d'un composé produisant un effet équivalent à une réponse déterminée (=benchmark response ou BMR). Ces BMD sont des indicateurs quantitatifs de la toxicité d'un composé basée sur la modélisation complète de sa relation dose-réponse. Ils ont été calculés en plusieurs étapes (Bonvallot et al. 2009) :

- Sélection de données permettant l'obtention d'une relation dose-réponse appropriée ;
- Choix de la BMR ;
- Modélisation de la relation dose-réponse en fonction de différentes modèles mathématiques ;
- Sélection du modèle mathématique le plus approprié aux données disponibles.

Compte tenu des critères de sélection et de comparabilité retenus, chaque BMD calculée n'a été basée sur la sélection que d'une seule étude, notamment dû au manque de disponibilité des données. Quand nous avions le choix, l'étude décrivant la relation doses réponse la plus robuste (en termes de protocole expérimental, de nombre d'animaux testés, de qualité et de disponibilité des données brutes) a été retenue.

3.1.Sélection des jeux de données dose-réponse

Dans un même groupe, les relations dose-réponse pour chaque composé devaient être comparables et mesurer la même réponse. Pour être retenues, les études devaient :

1) Tester au minimum trois niveaux de doses en plus du contrôle ;

2) Tester les même espèces (mais pas nécessairement les mêmes souches d'animaux) ;

3) Tester les mêmes fenêtres de susceptibilités (mais pas nécessairement exactement le même temps d'exposition) ;

4) Exposer les animaux via les mêmes voies ;

5) Fournir ou permettre une estimation des données brutes ou moyennées ainsi que des écarts-types de chaque réponse mesurée (estimation graphique des données réalisée comme le propose l'US EPA dans ce type de situation (US EPA 2005)).

3.2.Choix de la benchmark response

Une benchmark response (BMR) devrait être dans l'idéal une valeur numérique à partir de laquelle on considère la réponse observée comme anormale (réponse continue), ou induisant une augmentation observable de l'incidence de la réponse observée par rapport au témoin (réponse dichotomique) (Bonvallot et al. 2009). La réponse peut être continue (par exemple le taux de variation de l'expression d'une protéine) ou dichotomique (par exemple l'apparition de cancer dans une population). Dans le cas de réponses continues, afin de faciliter la comparaison entre les réponses induites par les différents composés, les taux de réponse de chaque jeu de données ont été exprimées en pourcentage de la réponse contrôle (réponse contrôle=1). Dans le cas d'une réponse dichotomique, la BMR recommandée par l'US EPA est de 10% (US EPA 2012). Dans le cas d'une réponse continue (généralement à l'échelle de l'organisme), si le seuil de réponse néfaste est connu, il peut être retenu. Dans le cas contraire, l'US EPA recommande l'utilisation d'une BMR équivalente à une variation d'un écart-type du contrôle (US EPA 2012). Dans le cas du groupe de COSV reprotoxiques, la réponse mesurée est le niveau de testostérone sérique, la réponse est donc considérée comme continue. Le niveau en dessous duquel les concentrations de

testostérone sont telles qu'elles conduiraient à un effet néfaste sur la reproduction (par exemple une altération de la fertilité) n'étant pas connu, deux BMR ont été retenues : 50% (considérée comme une diminution significative, correspondant à l'écart-type le plus élevé par rapport au contrôle) et 10% d'inhibition (pour comparer la toxicité des COSV à plus faibles doses). Dans le cas du groupe de COSV neurotoxiques, la réponse mesurée est la mort neuronale. Les cellules (dont les neurones) interagissant ensembles, la réponse mesurée à partir de données *in vitro* peut également être considérée comme continue. La BMR choisie pour cet effet a été de 10%, valeur recommandée par l'US EPA, correspondant à la limite de sensitivité pour la plupart des effets biologiques (US EPA 2002).

3.3.Modélisation de la relation dose-réponse et sélection du meilleur modèle mathématique

En collaboration avec l'INERIS, nous avons choisi de retenir le logiciel PROAST (développé par le RIVM: www.rivm.nl/proast) pour nos calculs car il offrait une plus grande flexibilité dans la modélisation des courbes dose-réponse que le logiciel BMDS (développé par l'US EPA). Les réponses mesurées dans les différentes études étant considérées comme continues, la modélisation des données a été basée sur les modèles de Hill à 2, 3 ou 4 paramètres selon les équations suivantes :

$$y = a\left(1 - \frac{x}{b + x}\right) \qquad (1)$$

$$y = a\left(1 - \frac{x^d}{b^d + x^d}\right) \qquad (2)$$

$$y = a\left(1 + \frac{(c-1)x}{b + x}\right) \qquad (3)$$

$$y = a\left(1 + \frac{(c-1)x^d}{b^d + x^d}\right) \quad (4)$$

Où x est la concentration du composé d'intérêt ; a est la réponse contrôle ; b est la concentration du composé induisant 50% de l'effet ; d est la pente ; $a*c$ est la réponse à une dose infinie. La sélection du meilleur modèle s'est faite par le test des rapports de vraisemblance. Cette procédure a été décrite par Slob en 2002 (Slob 2002) et permet de vérifier si l'ajout d'un ou plusieurs paramètres améliore, ou pas, l'ajustement des courbes tracées en fonction des données brutes. Les modèles avec le moins de paramètres sont préférés car la précision des prévisions des modèles est inversement proportionnelle au nombre de paramètres qu'ils utilisent (Slob 2002).

4. Calcul de Relative potency factors

Les RPF ont été estimés à partir des BMD selon l'équation ci-dessous :

$$RPF_i = \frac{BMD_{ref}}{BMD_i}$$

Où RPF_i est le RPF du composé « i » ; BMD_i est la BMD du composé « i » ; BMD_{ref} est la BMD du composé de référence.

Les RPF expriment la puissance d'un composé « i » en fonction d'un composé de référence. Ce composé de référence peut être le composé le plus toxique dans un groupe de composés ou le plus documenté pour l'effet retenu (Nisbet and LaGoy 1992). Souvent ces deux paramètres sont liés car un composé très toxique est souvent le plus étudié. L'importance du choix du toxique de référence ne réside pas dans l'ordre des puissances de ces composés qui en résulte (qui ne changera pas) mais sur la connaissance de l'effet d'intérêt.

RESULTATS

1. Mise à jour du regroupement des COSV

L'article présenté dans la partie méthode "An exposure-based framework for grouping pollutants for a cumulative risk assessment approach: Case study of indoor semi-volatile organic compounds" a été publié en 2014 et prenait en compte dans les regroupements, les COSV quantifiés dans plus de 25% des logements investigués. Suite à l'obtention de nouveaux résultats des campagnes de prélèvements du projet général ECOS, une mise à jour des groupes de COSV a été réalisée en 2014. Ainsi, 20 COSV de plus ont été recherchés dans les particules en suspensions (9 HAP, 5 pesticides, 3 phénols, 1 PCB et 2 phtalates). De plus, dans le cadre d'une évaluation des risques future, nous avons fait le choix de retenir pour la suite de nos travaux, les COSV détectés dans plus de 10 % des logements investigués afin de prendre en compte une population plus large. Ainsi, nous sommes passés de 21 COSV quantifiés dans plus de 25 % des logements, à 58 détectés dans plus de 10% des logements investigués.

Les deux groupes retenus dans la suite de ce travail ont été le groupe « diminution de la synthèse de testostérone » pour les effets reprotoxiques et « mort neuronale » pour les effets neurotoxiques. La mise à jour de ces groupes est présentée dans le **Tableau 33** (la mise à jour bibliographique est décrite dans les deux articles présentés dans la partie « résultats », traitant respectivement du groupe de COSV reprotoxiques et du groupe de COSV neurotoxiques).

Tableau 3 : Mise à jour des deux groupes de COSV retenus pour le calcul d'indicateurs de toxicité cumulés.

Groupe de SVOC	Effet Clinique	Effet cellulaire	Mécanisme ou mode d'action
DEHP, DBP, DiNP, DiBP, BBP, DEP, BDE-99, BDE-47, BPA, B[a]P, lindane, perméthrine, cyperméthrine, α-endosulfan, dieldrine, chlorpyrifos, deltamethrin, triclosan, 4-tert-octylphenol	Dépendant de la fenêtre d'exposition: malformation du tractus génital et /ou diminution de la fertilité	Altération des cellules de Leydig	Diminution de la synthèse de testostérone
DEHP, DiBP, DBP, BDE-47, BDE-99, BDE-153, BDE-209, PCB-52, PCB-77, PCB-118, PCB-153, B(a)P, BPA, dieldrine, lindane, diazinon, chlorpyrifos, deltaméthrine, perméthrine, triclosan, 4,4'-DDT	Effets comportementaux, dépendant de la fenêtre d'exposition	Mort neuronale	Augmentation calcium intracellulaire, induction de caspases, production de ROS

2. Construction d'indicateurs de toxicité cumulés pour les effets reprotoxiques mâle des COSV

L'article présenté dans ce chapitre est la mise en application de la méthodologie précédemment décrite, construite pour répondre aux objectifs de ces travaux de recherche. Cet article, « Multiple Exposures to Indoor contaminants: Derivation of Benchmark Doses and Relative Potency Factors based on male reprotoxic effects", soumis en 2015 dans Regulatory Toxicology and Pharmacology, se focalise sur les effets reprotoxiques des 58 COSV détectés dans plus de 10% des logements français, et plus particulièrement sur leurs effets sur le système reproducteur mâle de rats de laboratoire. Parmi eux, 23 étaient documentés comme altérant le bon fonctionnement ou le développement de l'appareil reproducteur mâle. Deux grands types cellulaires présents dans les testicules furent particulièrement ciblés, les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli. Les cellules de Sertoli ont une fonction de barrière hémato-testiculaire et de nutrition des futurs spermatozoïdes. Les cellules de Leydig quant à elles, ont pour rôle principal la synthèse de la testostérone. Cette hormone, nous l'avons vu, a un rôle essentiel dans la croissance et le bon développement de l'organisme, notamment la mise en place et le fonctionnement de l'appareil reproducteur mâle. L'impact des COSV sur la synthèse de testostérone a justement été le mode d'action le plus documenté de ceux que nous avions retenus (19/23 COSV). Les calculs de BMD ont donc été basés sur ce dernier. Sur les 19 COSV induisant la diminution de la synthèse de cette hormone, 6 avaient suffisamment d'informations comparables pour le calcul de nos indicateurs de toxicité (le benzo[a]pyrène, le bisphénol A, le DEHP, le DEP, le BBP et la cyperméthrine). Deux niveaux de réponses ont été choisis : une diminution de 10 % et une diminution de 50 % des niveaux sériques de testostérone. Ces niveaux correspondaient aux écarts-types (EC) des réponses contrôles les plus et les moins importants (respectivement BBP, EC=46 %, arrondi à

50 % et BPA, EC=10 %). Ils ont également permis la comparaison des effets de ces composés à différents niveaux de doses. En prenant la cyperméthrine comme toxique de référence, le bisphénol A est apparu le plus toxique à faibles doses, pour une diminution de 10 % de la testostérone sérique (BMD_{10}= 7.72E-07 mg/kg/j et RPF_{10}= 7033679). En revanche, à plus fortes doses, pour une diminution de 50 % de la testostérone, c'est le benzo[a]pyrène qui est apparu le plus toxique (BMD_{50}= 0.030 mg/kg/j et RPF_{50}= 1630 contre BMD_{50}= 0.27 mg/kg/j et RPF_{50}= 181 pour le bisphénol A). Pour les deux réponses choisies, le BBP apparaissait quant à lui le moins toxique de notre groupe (BMD_{10}= 57.34 mg/kg/j, BMD_{50}= 520 mg/kg/j, RPF_{10}=RPF_{50}= 0.095). Cette étude de cas a permis de mettre en avant le manque de données toxicologiques disponibles et comparables dans la littérature scientifique en terme de relations dose-réponse.

Multiple exposures to indoor contaminants: derivation of Benchmark Doses and Relative Potency Factors based on male reprotoxic effects

FOURNIER K,*’ † TEBBY C, ‡ ZEMAN F, ‡ GLORENNEC P, *’ † ZMIROU-NAVIER D, ,*’ †’§ BONVALLOT N *’ †

* EHESP School of Public Health, Sorbonne Paris Cité, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France

† INSERM UMR1085 IRSET (Research Institute in Environmental and Occupational Health), Rennes, France

‡ INERIS, Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie (METO), Verneuil-en-Halatte, France

§ Lorraine University Medical School, Nancy

Kevin Fournier: kevin.fournier@ehesp.fr , tel : +33 (0) 2 99 02 26 65 ; fax : +33 (0) 2 99 02 26 75

Cléo Tebby: cleo.tebby@ineris.fr

Florence Zeman: florence.zeman@ineris.fr

Philippe Glorennec: philippe.glorennec@ehesp.fr

Denis Zmirou-Navier: denis.zmirou@ehesp.fr

Nathalie Bonvallot: nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Working title: Toxicity Indicators for Reprotoxic contaminants

Abstract

Semi-Volatile Organic Compounds (SVOCs) are commonly present in dwellings and several are suspected of having effects on male reproductive function mediated by an endocrine disruption mode of action. To improve knowledge of the health impact of these compounds, cumulative toxicity indicators are needed. This work derives Benchmark Doses (BMD) and Relative Potency Factors (RPF) for SVOCs acting on the male reproductive system through the same mode of action.

We included SVOCs fulfilling the following conditions: detection frequency (>10%) in French dwellings, availability of data on the mechanism / mode of action for male reproductive toxicity, and availability of comparable dose-response relationships.

Of 58 SVOCs selected, 18 induce a decrease in serum testosterone levels. Six have sufficient and comparable data to derive BMDs based on 10 or 50% of the response. The SVOCs inducing the largest decrease in serum testosterone concentration are: for 10%, bisphenol A (BMD_{10}= 7.72E-07 mg/kg bw/d; RPF_{10}= 7033679); for 50%, benzo[a]pyrene (BMD_{50}= 0.030 mg/kg bw/d; RPF_{50}= 1630), and the one inducing the smallest one is benzyl butyl phthalate (RPF_{10} and RPF_{50}= 0.095).

This approach encompasses contaminants from diverse chemical families acting through similar modes of action, and makes possible a cumulative risk assessment in indoor environments. The main limitation remains the lack of comparable toxicological data.

Keywords: semi-volatile organic compounds; benchmark doses; cumulative risk assessment; reproduction; mixture; toxicity

1. Introduction

Semi-volatile organic compounds (SVOCs) include numerous molecules belonging to different chemical families such as phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), musks, polybromodiphenyl ethers (PBDEs), polychlorobiphenyls (PCBs) or pyrethroid insecticides (Weschler and Nazaroff, 2008). They can be defined as "organic compounds with vapour pressures between 10^{-14} and 10^{-4}atm (10^{-9} to 10Pa)" and whose boiling point is between (240 to 260°C) and (380 to 400°C) (NF ISO 16000-6, 2006) (Weschler and Nazaroff, 2008). They are used for their technical properties in a large variety of building materials and consumer products (plastics, paints, cleaning agents, biocides, furniture, etc.), and are also emitted by combustion processes. Due to their widespread usage and chemical properties, their presence is ubiquitous in indoor environments, in both settled dust and air (gaseous phase and particulate matter) (Mercier et al., 2011, Blanchard et al., 2014). Many SVOCs are suspected of having endocrine disruption mechanisms, leading to potential effects on male reproduction. Among them, phthalates are considered anti-androgenic compounds, responsible for an inhibition of steroidogenesis (Svechnikov et al., 2008), leading to a decrease in anogenital distance and nipple retention, as well as an increase in the incidence of hypospadias and cryptorchidism in rats exposed during the prenatal period (Gray et al., 2000). A significant decrease in serum testosterone levels was observed in rodents following oral exposure to BDE-99 (Alonso et al., 2010), benzo[a]pyrene (B(a)P) (Liang et al., 2012) or cypermethrin (Jin et al., 2011). In addition, in rats, cypermethrin decreases expression of the androgen receptor after 2 weeks of oral exposure (Liu et al., 2010). The effects of bisphenol A (BPA) on testosterone synthesis may be controversial, yet further studies have shown BPA to have negative effects on this hormone. For example, Salian et al. observed a significant decrease in testosterone concentration in rats pre and postnatally exposed

66 (Salian et al., 2009). Della Seta et al. observed the same phenomenon following exposure from
67 postnatal day 23 to postnatal day 30 (Della Seta et al., 2006).
68 In humans, authors have demonstrated in vitro endocrine disruption properties for a mixture
69 including phthalates and BPA (Christen et al., 2012) and also for DEHP and MEHP alone
70 (Desdoits-Lethimonier et al., 2012).
71 SVOC endocrine properties have also been suggested through epidemiological studies. Hauser et
72 al. observed a dose-dependent negative association between monobutyl phthalate (MBP) and
73 sperm concentration and motility in a population of 463 male partners of subfertile couples
74 (Hauser et al., 2006). Others groups found similar results between MBP and MEP exposure, and
75 sperm mobility / concentration (Duty et al., 2003); metabolites of long-chained phthalates
76 (MEHP and MiNP) and testosterone production (Meeker et al., 2009); MBP and MEHP and
77 serum-free testosterone (Pan et al., 2006); flame retardant (PBDEs) and serum testosterone
78 concentration (Johnson et al., 2013), and sperm quality (Abdelouahab et al., 2011); BPA and
79 male sexual function (Li et al., 2010) or semen quality (Meeker et al., 2010). Alteration of protein
80 expression can represent important key events in a modes of action (MOAs), or molecular
81 initiating event in an adverse outcome pathways (AOPs), leading to an adverse outcome
82 (Chepelev et al., 2014). Sonich-Mullin defined MOA as a “biologically plausible series of key
83 events leading to an effect” (Sonich-Mullin et al., 2001). An AOP is conceptually similar to a
84 MOA but includes an initial point of interaction of a chemical with biological systems (Meek et
85 al., 2014). It is difficult to know and understand the entire MOA/AOP leading to reprotoxic
86 effects but with a view of the preview information, we can consider the alteration of protein
87 synthesis (e.g. testosterone) as a potential early key event leading to reprotoxic effects.
88 As underline by Chepelev, protein expression analysis could contributed in health risk assessment
89 (Chepelev et al., 2014). Thus, Cumulative Risk Assessment (CRA) could be used to address this

concern, with a view to assessing whether environmental exposure levels to SVOCs pose a risk, and to help set maximum exposure levels not to be exceeded in indoor environments. A variety of CRA methodologies have already been suggested and recently reviewed (Fournier et al., 2014a). Some of them, including toxic equivalency factors (TEF) and relative potency factors (RPF) approaches have been used to identify relative toxic potencies on various chemical mixtures. This is the case of dioxins and PCBs (Ahlborg et al., 1994); polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) (OME, 1985); pesticides (Jensen et al., 2013) and PAHs (Nisbet and LaGoy, 1992). These approaches are based on the dose additivity assumption (Loewe and Muischnek, 1926) as suggested by the US EPA (US EPA, 2002) and consider a common mode of action (US EPA, 2000). This assumption does not take into account the possibility of toxicological interactions that are not, or are rarely expected with exposure to low doses of contaminants(ATSDR, 2004). These approaches were extended to other SVOCs including phthalates, fungicides or pyrethroids (Christiansen et al., 2012; Hannas et al., 2011; Kortenkamp and Faust, 2010; Wolansky et al., 2005), but none of them is based on real exposure, where a variety of chemical families are encountered.

The aim of this work is to estimate RPFs based on comparable benchmark doses (BMDs) for multiple reprotoxic contaminants present in indoor environments. The choice of the BMD rather than the NOAEL/LOAEL as an indicator of the toxicity was decided to reduce uncertainty due to data heterogeneity (EFSA, 2006).

2. Material and Method

2.1. Selection and grouping of indoor SVOCs

112 The selection of chemicals was made on the basis of different measurement campaigns in French
113 dwellings (Mandin et al., 2014a, 2014b ; Blanchard et al., 2014), where 66 compounds selected
114 from a previous ranking (Bonvallot et al., 2010) were simultaneously analysed in a range of
115 environmental media (air, gas phase or particle matter, settled dust) using a multi-residue method
116 (Mercier et al., 2012, 2014). SVOCs were selected where they were detected in more than 10% of
117 the investigated houses (from 30 to 285 according to the campaign).
118 SVOC grouping was based on our previously described approach (Fournier et al., 2014b).
119 Briefly, hazard identification, for each chemical, was performed by means of a literature review
120 on its reprotoxic effects. To be eligible, the toxicological studies (in vivo or in vitro) should
121 describe the target organs or cells, or the mechanisms of action on the male reproductive system
122 or organs. SVOCs were then grouped by common effect, mode and/or mechanism of action. The
123 entire MOAs might be viewed as an adverse outcome pathway (AOP) (figure 1). According to
124 the data, and in order to estimate RPFs, we chose to select the group including the largest number
125 of SVOCs, and for which a biological pathway is known.

126 **2.2. Benchmark doses derivation**

127 The BMD is defined as a dose (or concentration) producing a predetermined change in the
128 response rate of an effect (known as the benchmark response or BMR) compared with the
129 background response rate of this effect (US EPA, glossary:
130 http://www.epa.gov/risk_assessment/glossary.htm). It provides a quantitative indicator of the
131 toxicity of a compound based on the modelling of the entire dose-response relationship. BMDs
132 were derived by means of the following steps: i) selection of suitable dose-response datasets, ii)
133 choice of BMR, iii) fitting models using experimental data, and iv) selection of the best fitting
134 model.

135 For each compound, we based our BMD calculation on one selected study, describing the most
136 robust dose-response dataset. This kind of approach was also applied recently by Chepelev in
137 order to derive BMDs for the protein expression involved in testicular toxicity (Chepelev et al.,
138 2014).
139
140 **2.3. Selecting dose-response datasets**
141 For each SVOC, available dose-response datasets were collected and selected on the basis of a
142 compromise between the amount of data available and comparability of the data between
143 compounds. The following criteria were used: i) availability of data for at least 3 dose levels and
144 1 control group; ii) same species (though not necessarily the same strain); iii) same window of
145 susceptibility (but not necessarily the same exposure duration); iv) same exposure route; v)
146 availability of raw data or means and standard errors of the means (SEM) or standard deviations
147 (SD) for each selected response. Where SDs were not provided in the publication and could not
148 be collected from the authors, a graphical estimation was made as described by the US EPA (US
149 EPA, 2005). If only SEMs were given, these were converted to SDs using the following equation:
150 $SD = SEM \times \sqrt{n}$, where n is the sample size.
151
152 **2.4. Choice of BMR for a common effect**
153 The response chosen should be linked to a reproductive effect and related to a maximum number
154 of SVOCs in order to consider a CRA. In case of RPF derivation, the response should either be
155 linked to a specific mechanism of action or a consequence of a common mode of action (a
156 biological pathway leading to an adverse effect on the reproductive system). Because this
157 response occurs at organism or cellular scale, it is a continuous response. Response rates in each

158 dataset were expressed as a proportion of the background response rate (i.e. background=1).
159 Where the adverse effect threshold is unknown, the BMRs used in this study will be default
160 values recommended by the US EPA (e.g., a decrease of 1 control SD for continuous datasets) or
161 a response level that would be qualified as adverse.
162
163 **2.5. Selection of the best fitting model**
164 BMDs were computed using the PROAST software (www.rivm.nl/proast v32.2). The data was
165 continuous summary data (raw data was rarely available) and the Hill family of models was
166 selected for modelling the dose-response relationships, as follow in equations 1 to 4 (2 to 4
167 parameters):

168 $$y = a\left(1 - \frac{x}{b + x}\right) \quad (1)$$

169 $$y = a\left(1 - \frac{x^d}{b^d + x^d}\right) \quad (2)$$

170 $$y = a\left(1 + \frac{(c-1)x}{b + x}\right) \quad (3)$$

171 $$y = a\left(1 + \frac{(c-1)x^d}{b^d + x^d}\right) \quad (4)$$

172 Where x is toxic compound concentration, a is the background response, b is the concentration of
173 the compound inducing 50% of the effect, d is the slope, and $a*c$ is the response to an infinite
174 dose. The best fitting model from the Hill family was selected according to the procedure
175 described by Slob (Slob, 2002) with the likelihood ratio test. This tests whether increasing the
176 number of parameters in a model results in a statistically significant improvement to fit.
177
178 **2.6. RPF estimation**

RPFs were estimated using the previously-derived BMDs, according to the equation below:

$$RPF_i = \frac{BMD_{ref}}{BMD_i}$$

Where RPF_i is the RPF of the compound "i"; BMD_i is the BMD of the compound "i"; BMD_{ref} is the BMD of the reference compound.

RPFs express the potency of a compound "i" according to the reference compound. This reference compound can be the most toxic compound within a group of compounds, or the most documented for the selected effect.

3. Results

Fifty-eight SVOCs were selected based on the criteria described in the previous section, and are presented in table 1. Of these, 23 were documented as having male reprotoxic properties regardless of the mode or mechanism of action. A more precise description lead to the identification of 3 groups having different modes of action and potentially acting via different biological pathways. These pathways are summarized in figure 2 (adapted from Fournier et al. 2014a).

The group including the largest number of SVOCs - and for which the biological pathway is known - is the group whose effect is described as decreasing the concentration of steroidogenesis enzymes, resulting in a lower testosterone level; 18 SVOCs were concerned.

3.1. Benchmark Doses Derivation

3.1.1. Selection of Dose-Response Datasets

Dose-response datasets meeting our selection criteria were available for just 6 of the 18 compounds acting on steroidogenesis enzymes. The response measured in the toxicological

201 studies was the serum concentration of testosterone after oral-route exposure of adult male
202 rodents.
203 Lindane, dieldrin, alpha-endosulfan, chlorpyrifos-ethyl, deltamethrin, triclosan, 4-*tert*-
204 octylphenol and BDE-99 were excluded because there was no available dose-response
205 relationship for this effect (only one- and two- tested doses, respectively). Four other SVOCs
206 were excluded (permethrin, DBP, DiBP, DiNP) due to lack of comparable data (exposure of
207 rodents during different windows of susceptibility, i.e. pre- or post- natal).
208 The central estimation (BMD) was used as the basis for calculation of RPFs rather than the
209 BMDL (Benchmark Dose Lower Bound = lower limit of a one-sided confidence interval on the
210 BMD) which integrates uncertainty to experimental data, as suggested by the US EPA in 2010
211 (US EPA, 2010).
212 Table 2 briefly summarizes the selected study protocols and the decrease in serum testosterone
213 relative to control results. In each case, dose-response data was obtained in adult rats orally
214 exposed through sub-chronic to chronic exposure (15 to 150 days). There are 9 orders of
215 magnitude between the highest dose tested (for DEHP) and the lowest one (for BPA).

216 **3.1.2. Choice of Response and BMR**

217 Serum testosterone concentration was measured in all studies. A decrease in this response was
218 observed according to dose. It is reasonable to consider that this decrease may be linked to
219 adverse effects such as cryptorchidism, hypospadias or male fertility impairment, depending on
220 the window of susceptibility, as as suggested by a group of experts of the United Nations
221 Environment Programme (UNEP) and WHO (WHO/UNEP, 2013). Two different BMRs were
222 chosen: a 10% and a 50% decrease compared to control serum testosterone. We consider a
223 decrease of 50% of the serum testosterone to be significant (equivalent to the highest documented
224 standard deviation in our selected SVOCs). The use of a BMR equivalent to 1 control standard

deviation from the control mean is recommended by the US EPA (US EPA, 2012). The use of 10% as a BMR is intended to compare contaminants' toxicity at lower doses, though authors consider this effect size not meaningful. Eisenberg and colleagues observed a 10% difference in testosterone concentration between fertile and infertile men (Eisenberg et al., 2011). Furthermore, a 10% decrease in serum testosterone corresponds to the lowest documented standard deviation in our selected SVOCs.

3.1.3. BMD Estimations

The corresponding BMD_{10} and BMD_{50} are shown in table 3 (associated graphs are shown in supplementary data). Equation 2, with 3 estimated parameters and a null response at infinite doses, was selected for BPA. Equation 3, with 3 estimated parameters, slope equal to 1 and a non-null response at infinite doses, was selected for DEHP. Equation 1, with 2 free parameters, slope equal to 1 and a null response at infinite doses, was selected for the other four SVOCs. Since the response at infinite doses is equal to 0, BMD_{50} is the dose resulting in a 50% decrease relative to the background response. Resulting RPFs for a 10% (RPF_{10}) and 50% (RPF_{50}) decrease are shown in table 4. The control values were included in the BMD calculations.

4. Discussion and Conclusion

In this study, we derived BMDs for 6 SVOCs pertaining to different chemical families to which people are exposed in indoor environments, leading to RPF for BBP, BPA, B[a]P, DEP, DEHP and cypermethrin. We have adapted the traditional risk assessment approach (NRC, 1983) by adding a grouping step, depending on SVOCs' effects, as suggested in our previous work

247 (Fournier et al, 2014b). This was done on the basis of their mode of action. In a second step, we
248 calculated BMDs for the 6 SVOCs for which we were able to obtain sufficient information,
249 which in turn allowed RPFs to be derived.

250 The RPFs calculation is based on the dose additivity assumption because it seems to best describe
251 the reality of mixture toxicity. In fact, the toxic equivalency and dose additivity models have
252 already proved their potency in the mixture effects prediction. For example, Rider et al., in 2008,
253 tested different hypotheses for predicting mixture reproductive effects in male offspring rats
254 exposed during the period of sexual differentiation (Rider et al., 2008). They compared the
255 observed responses from a mixture of 4 pesticides and 3 phthalates with predicted responses
256 generated using a toxic equivalency approach and dose addition, response addition or integrated
257 addition models. They validated the dose additivity assumption and showed that toxic
258 equivalency and dose addition models provide the best fit to their observed responses even for
259 chemicals from different families which do not necessarily act via the same cellular mechanism
260 of action. There were several reasons for basing our RPF calculation on a 10% and 50% decrease
261 in testosterone synthesis (BMD_{10} and BMD_{50}), defined respectively as RPF_{10} and RPF_{50}. First of
262 all, as mentioned above, we do not know which level of inhibition of testosterone is harmful to
263 human health. In this case, the US EPA recommends the use of an endpoint that is equivalent to a
264 decrease of 1 control SD (US EPA, 2012). In our case, we have chosen to apply respectively the
265 smallest and the largest of the documented control SDs (near 50% for BBP and 10% for BPA) for
266 the choice of BMR.

267 We chose cypermethin as the index compound because its range of tested doses is intermediate
268 among those tested for the other SVOCs. The difference in ranges of tested doses and toxicity
269 between contaminants yields a large range of RPF values (a factor of 10^9 between BPA and BBP

for RPF_{10}, a factor of 10^6 between B[a]P and BBP). The choice of the reference compound, however, modifies neither the toxicity of each contaminant nor the order of their potency for the effect of interset.

According to the RPF_{10}, BPA shows the most toxic among the considered SVOCs (7,033,679 times more potent than cypermethrin for this effect) and BBP the least toxic (10.5 times less potent than cypermethrin). According to the RPF_{50}, B(a)P seems to be the most toxic (1,630 times more potent than cypermethrin for this effect) and BBP the least one (10.5 times less potent than cypermethrin).

For a 50% reduction in testosterone levels, we can observe that B(a)P is more toxic than BPA, while this latter is most potent at 10% of the effect. According to our data, BPA is the most potent of of the study SVOCs at low doses. This is due to the difference between BPA and the other SVOCs in terms of the slope of the curves (inclusion of the "d" parameter, see equation 2).

Our data does not allow to derive a BMD_{50} (and RPF_{50}) for DEHP because, according to the Hill equation used by PROAST, when the DEHP concentration is infinite, the response (decrease in serum testosterone concentration) only approaches 0.43 (=BMD_{43}). The derivation of a BMD_{50} for the DEHP could be performed with other data which investigated the same response, but specifically in pubertal rats (Noriega et al., 2009). According to this data, the BMD_{10} would be 102.45 mg/kg bw/day and the BMD_{50} 922.07 mg/kg bw/day.

We see here that the BMD_{10} based on adult data from Tonk et al is 20 times lower than the BMD_{10} based on pubertal rat from Noriega et al. This comparison shows that the toxic potency of DEHP compared to other compounds could be modified regarding to the window of exposure, leading difficult the extrapolation of the "pubertal" BMD_{50} to an "adult" BMD_{50}.

292 The main limitation of this work in a perspective of CRA for chemicals humans are exposed to, is
293 the lack of available and comparable data in the scientific literature. Among the 58 SVOCs that
294 were considered, others than the one we could include might be reprotoxic, but no study has been
295 published to date. Only 23 have been documented as having reprotoxic properties. Of these, 18
296 are able to decrease testosterone synthesis. At the final step, the literature provided sufficient
297 comparable information for BMD calculation only for 6.

298 This limitation of the available information was recently underlined by Wignall et al. in their
299 standardization of BMD calculations (Wignall et al., 2014). Another impediment is the lack of
300 comparability of the data in terms of the range of tested doses, windows of exposure, animal
301 strain, time of exposure, etc. The most striking example is the tested doses range, from 0.000005
302 mg/kg bw/day for BPA, to 1000 mg/kg bw/day for DEHP, suggesting that BPA is the most
303 potent toxic SVOC of our group for the study effect (abatement of serum testosterone
304 concentration); however, its action remains a subject of controversy in the literature. Our
305 requirements in term of data comparability (same species, same window of exposure, etc.) and
306 obviously the lack of data availability limit the datasets for our RPF computations. The more
307 precise and comparable we require our data to be, the less such data is available.

308 There is no data to compare with in the literature regarding RPFs derived from a variety of
309 chemical families. Among phthalates, RPFs were derived for DEHP and BBP acting on
310 testosterone synthesis (Benson, 2009; Hannas et al., 2011). In his CRA, Benson derived RPF for
311 6 phthalates including DEHP and BBP. For DEHP, the endpoint was smallness - or absence of -
312 male reproductive organs. For BBP (and the 4 other phthalates), the endpoint was decrease in
313 foetal testosterone production. The resulting RPFs were 1 and 0.21, based on the IC95 lower
314 bound of the BMD_{10} or the IC95 lower bound of the BMD corresponding to one standard

315 deviation for DEHP and BBP respectively. According to this method, DEHP appears to be 5
316 times more potent than BBP, which is in line with our findings (10 times more potent according
317 to BMD_{10}). This difference in potency might be explained by the use of different toxicity
318 indicators (BMDL versus BMD), the use of two different endpoints (small or absent male
319 reproductive organs for DEHP and a decrease in testosterone production for BBP), and a different
320 window of exposure (prenatal period for Benson, adult age for our work).

321 More recently, Hannas et al. have calculated RPFs for 5 phthalates. In contrast to Benson, they
322 undertook the *in vivo* tests on the same endpoint (decrease of foetal testosterone production) in
323 their own laboratory, making their data more comparable. They measured foetal testosterone
324 production and the expression of steroidogenesis enzymes after 5 days of *in utero* exposure for
325 each phthalate. The potency estimations were based on the derived effective doses 50 (ED_{50}),
326 corresponding to the dose responsible for 50% decrease of the foetal testosterone, equivalent to a
327 BMD_{50}. In this case, DEHP appears to be one of the least potent phthalates for this effect, in
328 contrast to our data. This could be explained by the level of response associated with the chosen
329 indicators (10% versus 50%) or by the difference of window of exposure. In this case, only
330 DEHP is similar to the compounds included in our study so no potency comparison can be made.

331 While Benson concludes that DEHP is one of the most toxic phthalates within its chemical group
332 (2.5 and 4 times more potent than DiNP and DiBP respectively) using different endpoints,
333 Hannas finds that DEHP is approximately equipotent with DiBP and DiNP (RPFs of 0.06, 0.11
334 and 0.15 for DiNP, DEHP and DiBP respectively) for the same endpoint.

335 For RPF calculations, it is very important to use comparable data and the same endpoint in order
336 to conduct a robust CRA. Also, future experiments should strive to standardise protocols (animals

337 tested, time of exposure, etc.) as well as the ranges and number of doses tested, which should be
338 as close as possible to human real exposures, allowing us to establish a dose-response curve.

339 Our approach takes into account actual population exposures, compounds from different
340 chemical families, and common effects and modes of action of SVOCs. For these reasons, we
341 think it is realistic and useful for future CRA studies. Research must continue in this direction to
342 improve the consideration of actual exposures in CRA.

343

344 **Funding information**

345 This work was supported by the French Ministry of Ecology: Primequal [Environnement
346 Intérieur et Approches Innovantes], programme 190, THUR-BSAF action 13, sub-action 08

347

348 **Acknowledgements**

349 The authors acknowledge Laurent Bodin, Christophe Rousselle (ANSES, France) for their
350 helpful advice, Elisa C. M. Tonk and Aldert H. Piersma for providing the raw data from
351 experiments on DEHP and The French Ministry of Environment for the funding.

352

353 **References**

354 Abdelouahab, N., Ainmelk, Y., Takser, L., 2011. Polybrominated diphenyl ethers and sperm
355 quality. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 31, 546–50.

356 Ahlborg, U., Becking, G., Birnbaum, L., Brouwer, A., Derks, H., Feeley, M., Golor, G., Hanberg,
357 A., Larsen, J., Liem, A., Safe, S., Schlatter, C., Waern, F., Younes, M., Yrjänheikki, E.,
358 1994. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Chemosphere 28, 1049–1067.

359 Alonso, V., Linares, V., Bellés, M., Albina, M.L., Pujol, A., Domingo, J.L., Sánchez, D.J., 2010.
360 Effects of BDE-99 on hormone homeostasis and biochemical parameters in adult male rats.
361 Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial
362 Biological Research Association 48, 2206–11.

363 ATSDR, 2004. Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures.
364 Atlanta.

365 Benson, R., 2009. Hazard to the developing male reproductive system from cumulative exposure
366 to phthalate esters--dibutyl phthalate, diisobutyl phthalate, butylbenzyl phthalate,
367 diethylhexyl phthalate, dipentyl phthalate, and diisononyl phthalate. Regulatory toxicology
368 and pharmacology : RTP 53, 90–101.

369 Bergman, A., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., 2013. State of the Science of
370 Endocrine Disrupting Chemicals - 2012.

371 Blanchard, O., Glorennec, Philippe, Mercier, Fablien, Bonvallot, Nathalie, Chevrier, C.,
372 Ramalho, O., Mandin, Corinne, Le Bot, Barbara, 2014. Semivolatile Organic Compounds in
373 Indoor Air and Settled Dust in 30 French Dwellings. Environmental science & technology
374 48, 3959–3969.

375 Bonvallot, N, Mandin, C, Mercier, F, Le Bot, B, Glorennec, P, 2010. Health ranking of ingested
376 semi-volatile organic compounds in house dust: an application to France. Indoor air 20,
377 458–72.

378 Borch, J., Axelstad, Marta, Vinggaard, A.M., Dalgaard, M., 2006. Diisobutyl phthalate has
379 comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis. Toxicology
380 letters 163, 183–90.

381 Borch, J., Ladefoged, O., Hass, Ulla, Vinggaard, A.M., 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is
382 reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in
383 fetal, prepubertal and adult male rats. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 18, 53–61.

384 Chepelev, N.L., Meek, M.E.B., Yauk, C.L., 2014. Application of benchmark dose modeling to
385 protein expression data in the development and analysis of mode of action/adverse outcome
386 pathways for testicular toxicity. Journal of applied toxicology : JAT 34, 1115–21.

387 Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrämmli, A., Fent, K., 2012. Antiandrogenic activity of
388 phthalate mixtures: validity of concentration addition. Toxicology and applied
389 pharmacology 259, 169–76.

390 Christiansen, S, Kortenkamp, A., Axelstad, M, Boberg, J, Scholze, M., Jacobsen, P.R., Faust, M.,
391 Lichtensteiger, W., Schlumpf, M., Burdorf, A., Hass, U, 2012. Mixtures of endocrine
392 disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in
393 rats. International journal of andrology 35, 303–16.

394 Chung, J.-Y., Kim, Y.-J., Kim, J.Y., Lee, S.G., Park, J.-E., Kim, W.R., Yoon, Y.-D., Yoo, K.S.,
395 Yoo, Y.H., Kim, J.-M., 2011. Benzo[a]pyrene reduces testosterone production in rat Leydig
396 cells via a direct disturbance of testicular steroidogenic machinery. Environmental health
397 perspectives 119, 1569–74.

398 D'Cruz, S.C., Jubendradass, R., Jayakanthan, M., Rani, S.J.A., Mathur, Premendu Prakash, 2012.
399 Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases
400 steroidogenesis in rat testis: an in vivo and in silico study. Food and chemical toxicology :
401 an international journal published for the British Industrial Biological Research Association
402 50, 1124–33.

403 Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., Aloisi, A.M., Dessì-Fulgheri, F., Farabollini, F., 2006.
404 Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats.
405 Hormones and behavior 50, 301–7.

406 Desdoits-Lethimonier, C., Albert, O., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Courant, F., Lesné, L.,
407 Guillé, F., Dejucq-Rainsford, N., Jégou, B., 2012. Human testis steroidogenesis is inhibited
408 by phthalates. Human reproduction (Oxford, England) 27, 1451–9.

409 Duty, S.M., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Chen, Z., Herrick, R.F., Christiani,
410 D.C., Hauser, R., 2003. Phthalate exposure and human semen parameters. Epidemiology
411 (Cambridge, Mass.) 14, 269–77.

412 EFSA, 2006. Cumulative risk assessment of pesticides to human health: the way forward.

413 Eisenberg, M.L., Hsieh, M.H., Walters, R.C., Krasnow, R., Lipshultz, L.I., 2011. The relationship
414 between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. PloS one 6, e18973.

415 Farag, A.T., Radwan, A.H., Sorour, F., El Okazy, A., El-Agamy, E.-S., El-Sebae, A.E.-K., 2010.
416 Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. Reproductive toxicology
417 (Elmsford, N.Y.) 29, 80–5.

418 Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., Pointis, G., 2004. Sertoli cell junctional
419 proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. Reproductive
420 toxicology (Elmsford, N.Y.) 18, 413–21.

421 Fournier, K., Glorennec, Philippe, Bonvallot, Nathalie, 2014a. Derivation of toxicological
422 reference values for taking mixtures into account in health risk assessment: Existing
423 methods and recent applications. Environnement, Risques & Santé 13, 203–221.

424 Fournier, K., Glorennec, Philippe, Bonvallot, Nathalie, 2014b. An exposure-based framework for
425 grouping pollutants for a cumulative risk assessment approach: Case study of indoor semi-
426 volatile organic compounds. Environmental research 130, 20–8.

427 Gray, L E, Ostby, J, Furr, J, Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L., 2000. Perinatal
428 exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters
429 sexual differentiation of the male rat. Toxicological sciences : an official journal of the
430 Society of Toxicology 58, 350–65.

431 Hannas, B.R., Lambright, C.S., Furr, Johnathan, Evans, N., Foster, P.M.D., Gray, E.L., Wilson,
432 V.S., 2012. Genomic biomarkers of phthalate-induced male reproductive developmental
433 toxicity: a targeted RT-PCR array approach for defining relative potency. Toxicological
434 sciences : an official journal of the Society of Toxicology 125, 544–57.

435 Hannas, B.R., Lambright, C.S., Furr, Johnathan, Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Gray, Leon E,
436 2011. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels
437 in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate,
438 diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. Toxicological sciences : an official journal
439 of the Society of Toxicology 123, 206–16.

440 Hauser, R., Meeker, J.D., Duty, S., Silva, M.J., Calafat, A.M., 2006. Altered semen quality in
441 relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites.
442 Epidemiology (Cambridge, Mass.) 17, 682–91.

443 Hu, J.-X., Li, Y.-F., Li, J., Pan, C., He, Z., Dong, H.-Y., Xu, L.-C., 2011. Toxic effects of
444 cypermethrin on the male reproductive system: with emphasis on the androgen receptor.
445 Journal of applied toxicology : JAT.

446 Ismail, M.F., Mohamed, H.M., 2012. Deltamethrin-induced genotoxicity and testicular injury in
447 rats: comparison with biopesticide. Food and chemical toxicology : an international journal
448 published for the British Industrial Biological Research Association 50, 3421–5.

449 Jayachandra, S., D'Souza, U.J.A., 2014. Prenatal and postnatal exposure to diazinon and its effect
450 on spermatogram and pituitary gonadal hormones in male offspring of rats at puberty and
451 adulthood. Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food
452 contaminants, and agricultural wastes 49, 271–8.

453 Jensen, B.H., Petersen, A., Christiansen, Sofie, Boberg, Julie, Axelstad, Marta, Herrmann, S.S.,
454 Poulsen, M.E., Hass, Ulla, 2013. Probabilistic assessment of the cumulative dietary
455 exposure of the population of Denmark to endocrine disrupting pesticides. Food and
456 chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological
457 Research Association 55, 113–20.

458 Jiang, J., Ma, L., Yuan, L., Wang, X., Zhang, W., 2007. Study on developmental abnormalities in
459 hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP).
460 Toxicology 232, 286–93.

461 Jin, Y., Wang, L., Ruan, M., Liu, J., Yang, Y., Zhou, C., Xu, B., Fu, Z., 2011. Cypermethrin
462 exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice.
463 Chemosphere 84, 124–30.

464 Johnson, P.I., Stapleton, H.M., Mukherjee, B., Hauser, R., Meeker, J.D., 2013. Associations
465 between brominated flame retardants in house dust and hormone levels in men. The Science
466 of the total environment 445-446, 177–84.

467 Kortenkamp, A., Faust, M., 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps
468 towards cumulative risk assessment. International journal of andrology 33, 463–74.

469 Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M.R., Roy, P., 2009. Alteration of testicular steroidogenesis
470 and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. Reproductive
471 toxicology (Elmsford, N.Y.) 27, 177–85.

472 Kuriyama, S.N., Chahoud, I., 2004. In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-
473 pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat
474 offspring. Toxicology 202, 185–97.

475 Li, D., Zhou, Z, Qing, D., He, Y., Wu, T., Miao, M., Wang, J., Weng, X., Ferber, J.R., Herrinton,
476 L.J., Zhu, Q., Gao, E., Checkoway, H., Yuan, W., 2010. Occupational exposure to
477 bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. Human
478 reproduction (Oxford, England) 25, 519–27.

479 Liang, J., Zhu, H., Li, Cuizhen, Ding, Y., Zhou, Zhijun, Wu, Q., 2012. Neonatal exposure to
480 benzo[a]pyrene decreases the levels of serum testosterone and histone H3K14 acetylation of
481 the StAR promoter in the testes of SD rats. Toxicology 302, 285–29.

482 Liu, K., Lehmann, K.P., Sar, M., Young, S.S., Gaido, K.W., 2005. Gene expression profiling
483 following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of
484 testicular dysgenesis. Biology of reproduction 73, 180–92.

485 Liu, L., Hu, J.-X., Wang, H., Chen, B.-J., He, Z., Xu, L.-C., 2010. Effects of beta-cypermethrin
486 on male rat reproductive system. Environmental toxicology and pharmacology 30, 251–6.

487 Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Effect of combinations: mathematical basis of problem. Archiv
488 für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 114, 313–326.

489 Mandin C, Mercier F, Lucas J-P, Ramalho O, Gilles E, Blanchard O, Bonvallot N, Glorennec P,
490 Le Bot B, 2014a. ECOS-PM: A Nationwide Survey of Semi-Volatile Organic Compounds in
491 Indoor Air. Indoor Air conference, Hong-Kong,
492

493 Mandin C., Mercier F., Lucas J-P., Ramalho O., Blanchard O., Bonvallot N., Raffy G., Gilles E.,
494 Glorennec P., Le Bot B, 2014b.ECOS-POUSS: A Nationwide Survey of Semi-Volatile
495 Organic Compounds in Home Settled Dust. Indoor Air conference, Hong-Kong.

496 Meek, M.E., Boobis, A., Cote, I., Dellarco, V., Fotakis, G., Munn, S., Seed, J., Vickers, C., 2014.
497 New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode
498 of action/species concordance analysis. Journal of applied toxicology : JAT 34, 1–18.

499 Meeker, J.D., Calafat, A.M., Hauser, R., 2009. Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate
500 are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. Journal of andrology 30,
501 287–97.

502 Meeker, J.D., Ehrlich, S., Toth, T.L., Wright, D.L., Calafat, A.M., Trisini, A.T., Ye, X., Hauser,
503 R., 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among
504 men from an infertility clinic. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 30, 532–9.

505 Mercier, Fabien, Gilles, E., Saramito, G., 2014. A multi-residue method for the simultaneous
506 analysis in indoor dust of several classes of semi-volatile organic compounds by pressurized
507 liquid extraction and gas chromatography / tandem mass spectrometry. Journal of
508 chromatography. A 1336, 101–111.

509 Mercier, Fabien, Glorennec, Philippe, Blanchard, O., Le Bot, Barbara, 2012. Analysis of semi-
510 volatile organic compounds in indoor suspended particulate matter by thermal desorption
511 coupled with gas chromatography/mass spectrometry. Journal of chromatography. A 1254,
512 107–14.

513 Mograbi, B., Corcelle, E., Defamie, N., Samson, M., Nebout, M., Segretain, D., Fénichel, P.,
514 Pointis, G., 2003. Aberrant Connexin 43 endocytosis by the carcinogen lindane involves
515 activation of the ERK/mitogen-activated protein kinase pathway. Carcinogenesis 24, 1415–
516 23.

517 Nagao, T., Ohta, R., Marumo, H., Shindo, T., Yoshimura, S., Ono, H., 2000. Effect of butyl
518 benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation
519 reproductive study. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 14, 513–32.

520 Nisbet, I.C., LaGoy, P.K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic
521 hydrocarbons (PAHs). Regulatory toxicology and pharmacology : RTP 16, 290–300.

522 Noriega, N.C., Howdeshell, K.L., Furr, Jonathan, Lambright, C.R., Wilson, V.S., Gray, L Earl,
523 2009. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production,
524 and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats.
525 Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 111, 163–78.

526 NRC, 1983. Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process.

527 OME, 1985. Scientific criteria document for standard development, No. 4-84. Polychlorinated
528 Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs) and Polychlorinated DibenzoFurans (PCDFs). Toronto.

529 Pan, G., Hanaoka, T., Yoshimura, M., Zhang, S., Wang, P., Tsukino, H., Inoue, K., Nakazawa,
530 H., Tsugane, S., Takahashi, K., 2006. Decreased Serum Free Testosterone in Workers
531 Exposed to High Levels of Di-n-butyl Phthalate (DBP) and Di-2-ethylhexyl Phthalate
532 (DEHP), A Cross-Sectional Study in China. Environmental Health Perspectives 114, 1643–
533 1648.

534 Pereira, C., Mapuskar, K., Rao, C.V., 2008. Effect of diethyl phthalate on rat testicular
535 antioxidant system: A dose-dependent toxicity study. Pesticide Biochemistry and
536 Physiology 90, 52–57.

537 Posnack, N.G., Idrees, R., Ding, H., Jaimes Iii, R., Stybayeva, G., Karabekian, Z., Laflamme,
538 M.A., Sarvazyan, N., 2015. Exposure to phthalates affects calcium handling and
539 intercellular connectivity of human stem cell-derived cardiomyocytes. PloS one 10,
540 e0121927.

541 Rider, C. V, Furr, Johnathan, Wilson, V.S., Gray, L Earl, 2008. A mixture of seven antiandrogens
542 induces reproductive malformations in rats. International journal of andrology 31, 249–62.

543 Ronco, a M., Valdés, K., Marcus, D., Llanos, M., 2001. The mechanism for lindane-induced
544 inhibition of steroidogenesis in cultured rat Leydig cells. Toxicology 159, 99–106.

545 Sainath, S.B., Meena, R., Kumar, C.H.V.S., Kalapana, P., Swetha, K.N., Devi, N.S., Reddy, P.S.,
546 2011. Embryonic exposure to octylphenol induces changes in testosterone levels and
547 disrupts reproductive efficiency in rats at their adulthood. Food and chemical toxicology : an
548 international journal published for the British Industrial Biological Research Association 49,
549 983–90.

550 Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the
551 fertility of male offspring. Life sciences 85, 742–52.

552 Saradha, B., Vaithinathan, S., Mathur, P P, 2009. Lindane induces testicular apoptosis in adult
553 Wistar rats through the involvement of Fas-FasL and mitochondria-dependent pathways.
554 Toxicology 255, 131–9.

555 Schein, L.G., Thomas, J.A., 1975. Effects of dieldrin on the uptake and metabolism of
556 testosterone-1,2-3H by rodent sex accessory organs. Environmental Research 9, 26–31.

557 Shi, Y.-Q., Wang, Y.-P., Song, Y., Li, H.-W., Liu, C.-J., Wu, Z.-G., Yang, K.-D., 2010. p,p′-
558 DDE induces testicular apoptosis in prepubertal rats via the Fas/FasL pathway. Toxicology
559 Letters 193, 79–85.

560 Singh, S.K., Pandey, R.S., 1990. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma
561 gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis
562 in rat. Indian journal of experimental biology 28, 953–6.

563 Slob, W., 2002. Dose-response modeling of continuous endpoints. Toxicological sciences : an
564 official journal of the Society of Toxicology 66, 298–312.

565 Sonich-Mullin, C., Fielder, R., Wiltse, J., Baetcke, K., Dempsey, J., Fenner-Crisp, P., Grant, D.,
566 Hartley, M., Knaap, A., Kroese, D., Mangelsdorf, I., Meek, E., Rice, J.M., Younes, M.,
567 2001. IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical
568 carcinogenesis. Regulatory toxicology and pharmacology : RTP 34, 146–52.

569 Svechnikov, K., Svechnikova, I., Söder, O., 2008. Inhibitory effects of mono-ethylhexyl
570 phthalate on steroidogenesis in immature and adult rat Leydig cells in vitro. Reproductive
571 toxicology (Elmsford, N.Y.) 25, 485–90.

572 Tonk, E.C.M., Verhoef, A., Gremmer, E.R., Van Loveren, H., Piersma, A.H., 2012. Relative
573 sensitivity of developmental and immune parameters in juvenile versus adult male rats after
574 exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate. Toxicology and applied pharmacology 260, 48–57.

575 US EPA, 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical
576 Mixtures.

577 US EPA, 2002. Guidance on Cumulative Risk Assessment of Pesticide Chemicals That Have a
578 Common Mechanism of Toxicity. Washington, D.C. 20460.

579 US EPA, 2005. Toxicological review of n-hexane. In support of summary information on the
580 integrated risk information (IRIS). Washington, DC.

581 US EPA, 2012. Benchmark Dose Technical Guidance.

582 Weschler, C.J., Nazaroff, W.W., 2008. Semivolatile organic compounds in indoor environments.
583 Atmospheric Environment 42, 9018–9040.

584 Wignall, J. a, Shapiro, A.J., Wright, F. a, Woodruff, T.J., Chiu, W. a, Guyton, K.Z., Rusyn, I.,
585 2014. Standardizing benchmark dose calculations to improve science-based decisions in
586 human health assessments. Environmental health perspectives 122, 499–505.

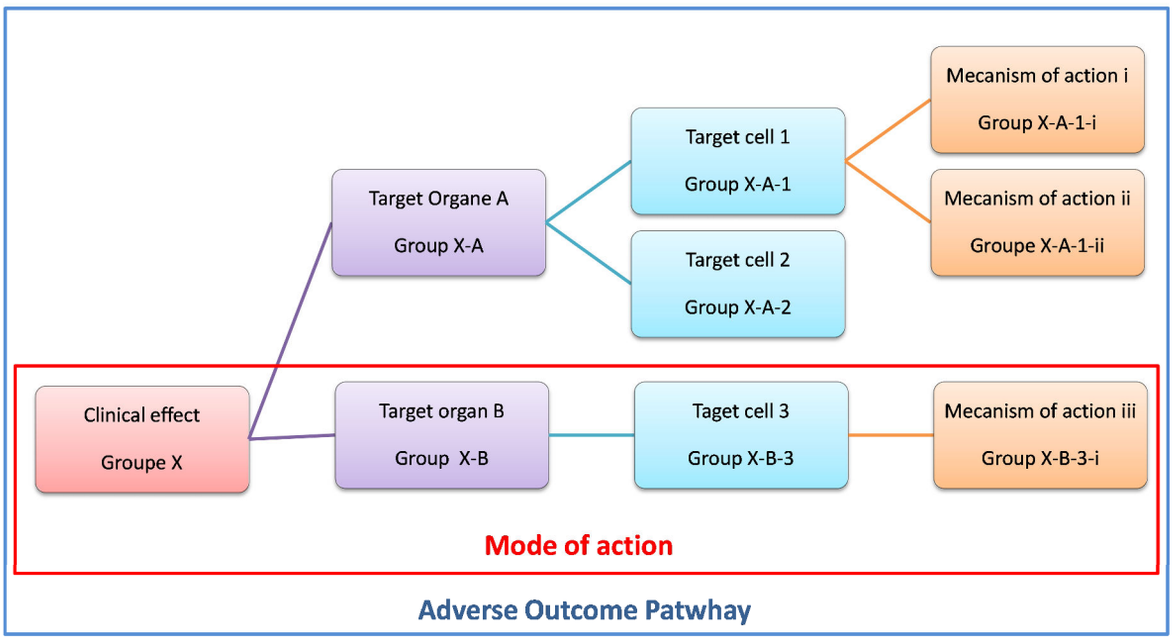
587 Wilson, V.S., Lambright, C., Furr, Johnathan, Ostby, Joseph, Wood, C., Held, G., Gray, L.Earl,
588 2004. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene
589 expression in the fetal rat testis. Toxicology Letters 146, 207–215.

590 Wolansky, M.J., Gennings, C., Crofton, K.M., 2005. Relative potencies for acute effects of
591 pyrethroids on motor function in rats. Toxicological sciences : an official journal of the
592 Society of Toxicology 89, 271–7.

593 Zhang, S.-Y., Ito, Y., Yamanoshita, O., Yanagiba, Y., Kobayashi, M., Taya, K., Li, ChunMei,
594 Okamura, A., Miyata, M., Ueyama, J., Lee, C.-H., Kamijima, M., Nakajima, T., 2007.
595 Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of
596 Leydig cells in adult male mouse. Endocrinology 148, 3941–9.

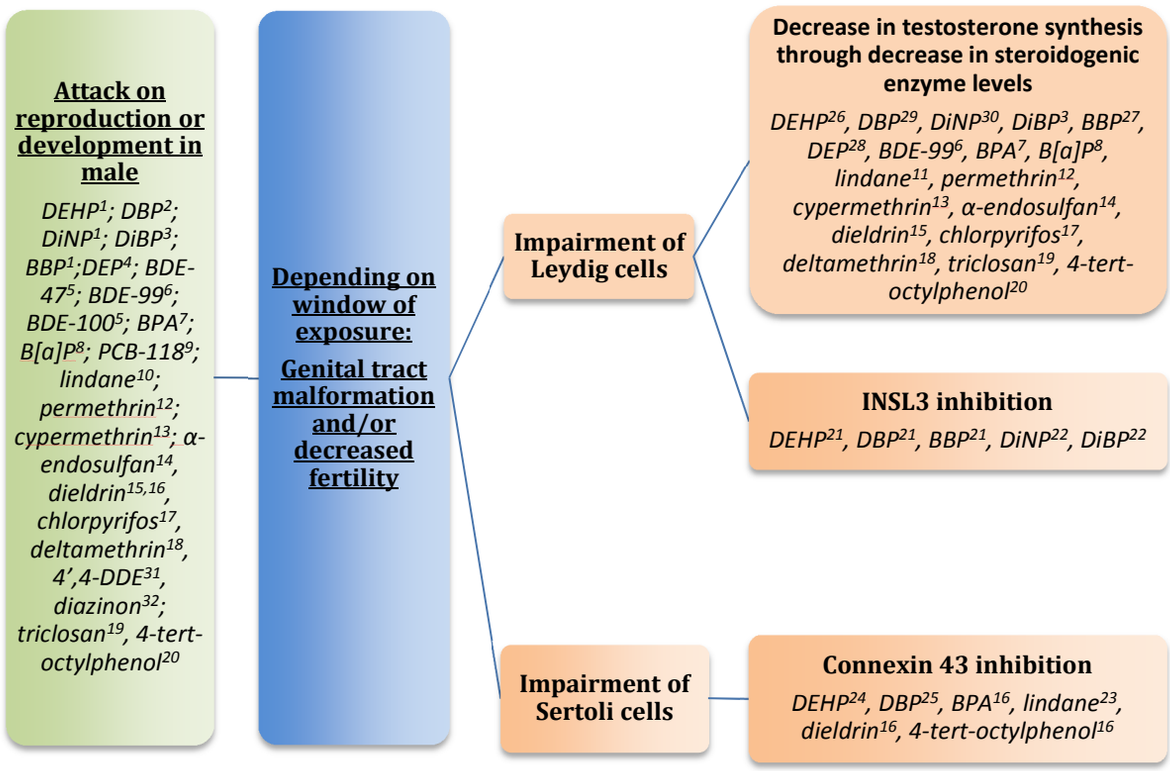
597

Figure 1: Modes of action (MOAs) structured in adverse outcome pathway (AOP)



Each group represents a key event. In AOP, the clinical effect is the adverse outcome.

Figure 2: Adverse outcome pathway of 23 indoor semi volatile organic compounds (SVOCs) on the reproductive, adapted from (Fournier et al., 2014b).



[1](Gray et al., 2000); [2](Pan et al., 2006); [3](Borch et al., 2006); [4](Pereira et al., 2008); [5](Abdelouahab et al., 2011); [6](Alonso et al., 2010); [7](D'Cruz et al., 2012); [8](Chung et al., 2011); [9](Kuriyama and Chahoud, 2004); [10](Saradha et al., 2009); [11](Ronco et al., 2001); [12](Zhang et al., 2007); [13](Hu et al., 2011); [14](Singh and Pandey, 1990); [15](Schein and Thomas, 1975); [16](Fiorini et al., 2004); [17](Farag et al., 2010); [18](Ismail and Mohamed, 2012); [19](Kumar et al., 2009); [20](Sainath et al., 2011); [21](Wilson et al., 2004); [22](Hannas et al., 2012); [23](Mograbi et al., 2003); [24](Posnack et al., 2015); [25](Liu et al., 2005); [26](Tonk et al., 2012); [27](Nagao et al., 2000); [28](Pereira et al., 2008); [29](Jiang et al., 2007); [30](Borch et al., 2004); [31](Shi et al., 2010); [32](Jayachandra and D'Souza, 2014)

Table 1: Selected Semi Volatile Organic Compounds as candidates for grouping (detected in more than 10% of the French dwellings investigated)

Chemical families	Name
Phthalates	DEHP, DEP, DBP, BBP, DiBP, DiNP, DMP
Polybromodiphenyl ethers (PBDEs)	BDE-28, BDE-47, BDE-85, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, BDE-209
Polychlorobiphenyls (PCBs)	PCB-28, PCB-31, PCB-52, PCB-77, PCB-101, PCB-105, PCB-118, PCB-138, PCB-153, PCB-180
Polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs)	acenaphtene, anthracene, benzo(a)pyrene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(k)fluoranthene, benzo(b)fluoranthene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, dibenzo(a,h)anthracene
Pesticides	4',4-DDE, 4',4-DDT, dieldrine, alpha-endosulfan, lindane, chlorpyrifos-ethyl, diazinon, cyfluthrine, cypermethrine, deltamethrine, permethrine, oxadiazon, tributylphosphate
Others	4-tert-butylphenol, 4-tert-octylphenol, bisphenol A, galaxolide, tonalide, triclosan

Based on (Mandin et al., 2014a) ; (Mandin et al., 2014b); (Blanchard et al., 2014)

Table 2: Available information in the literature on reproductive effects for the 6 Semi Volatile Organic Compounds retained for BenchMark Dose calculation

SVOC	Tested animals	Number of animals	Time of exposure	Route of exposure	Tested doses (mg/kg bw/day)	Response (standard deviation) (relative to control)	Reference
BBP	Adult SD rats	25	105 days	Oral	0 20 100 500	1 (0.46) 1.03 (0.54) 0.77 (0.37) 0.54 (0.31)	Nagao et al., 2000
BPA	Adult Wistar rats	6	45 days	Oral	0 0.000005 0.00005 0.05 0.5	1 (0.1) 0.84 (0.05) 0.74 (0.05) 0.62 (0.04) 0.44 (0.06)	D'Cruz et al., 2012
B[a]P	Adult SD rats	9	90 days	Oral	0 0.001 0.01 0.1	1 (0.31) 1 (0.29) 0.64 (0.17) 0.25 (0.12)	Chung et al., 2011
DEP	Adult Wistar rats	6	150 days	Oral	0 0.57 1.425 2.85	1 (0.13) 0.69 (0.11) 0.63 (0.056) 0.41 (0.025)	Pereira et al., 2008
DEHP	Adult Wistar rats	5	40 days	Oral	0 1 3 10 30 100 300 1000	1 (0.42) 0.79 (0.17) 0.70 (0.27) 1.15 (0.50) 0.52 (0.30) 0.62 (0.32) 0.47 (0.16) 0.48 (0.18)	Tonk et al., 2012
Cyper-methrin	Adult SD rats	12	15 days	Oral	0 6.25 12.5 25 50	1 (0.35) 0.84 (0.35) 0.79 (0.19) 0.65 (0.33) 0.49 (0.16)	Hu et al., 2011

SVOCs: Semi Volatile Organic Compounds; SD: Sprague Dawley

Table 3: Benchmark dose 10 and benchmark dose 50 for the 6 selected SVOCs

SVOC	Number of Hill parameters	BMD10 (mg/kg bw/day)	BMD50 (mg/kg bw/day)
B[a]P	2	0.0034	0.030
BPA	3	7.72E-07	0.27
DEP	2	0.24	2.18
DEHP	3	5.04	/
Cypermethrin	2	5.43	48.90
BBP	2	57.34	520

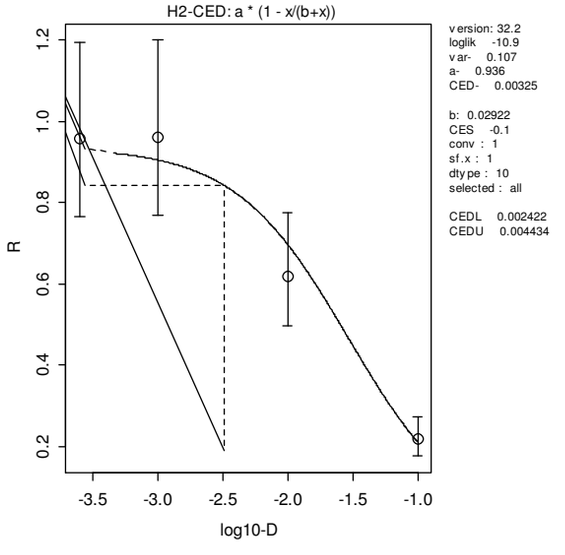
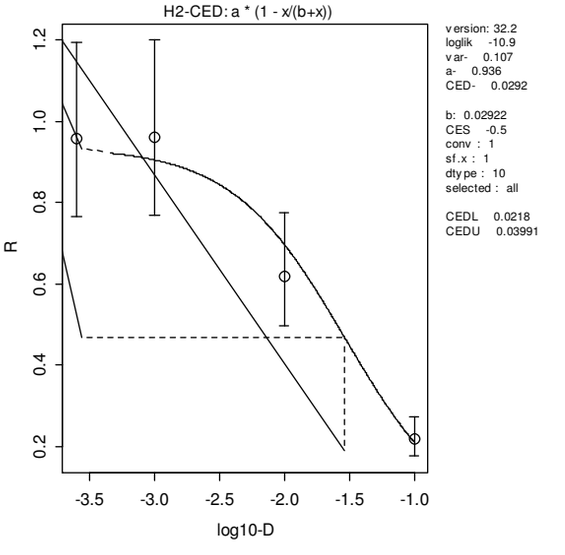
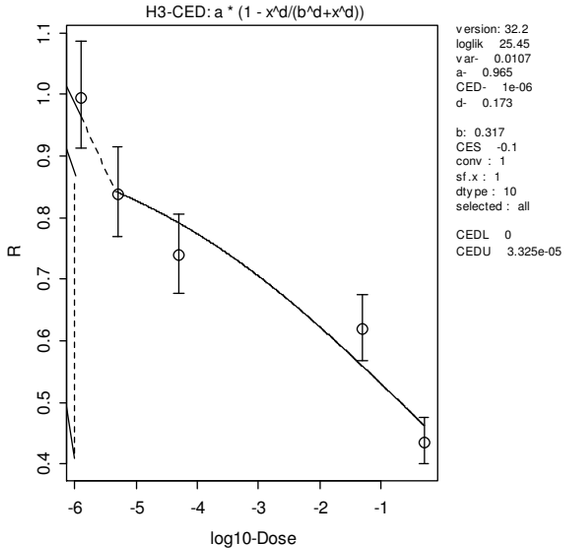
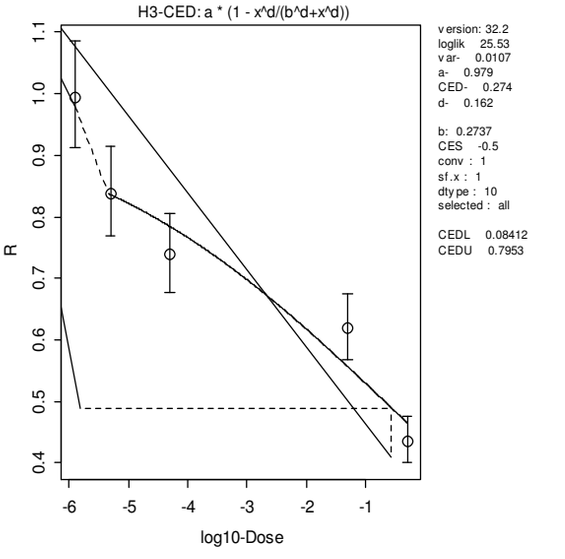
SVOCs: Semi Volatile Organic Compounds; BMD_{10}: Benchmark Doses responsible of 10% of the selected effect

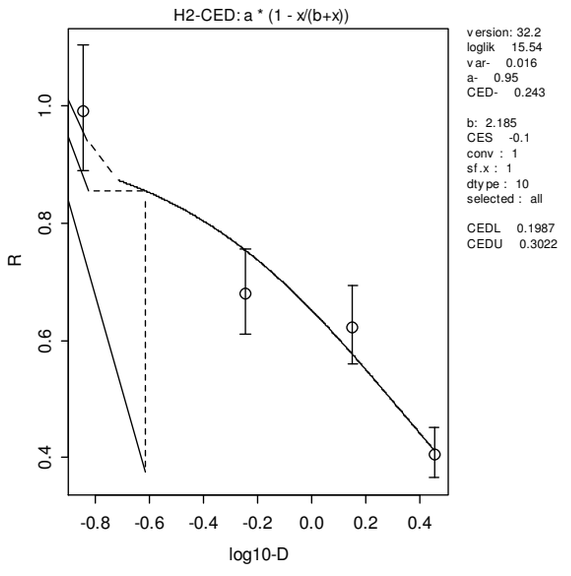
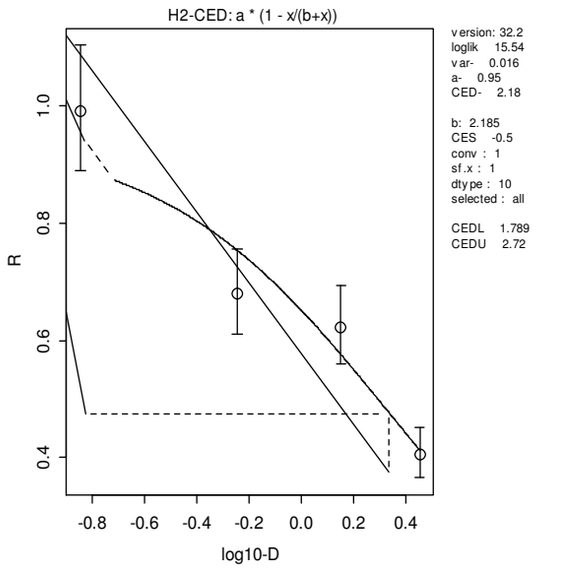
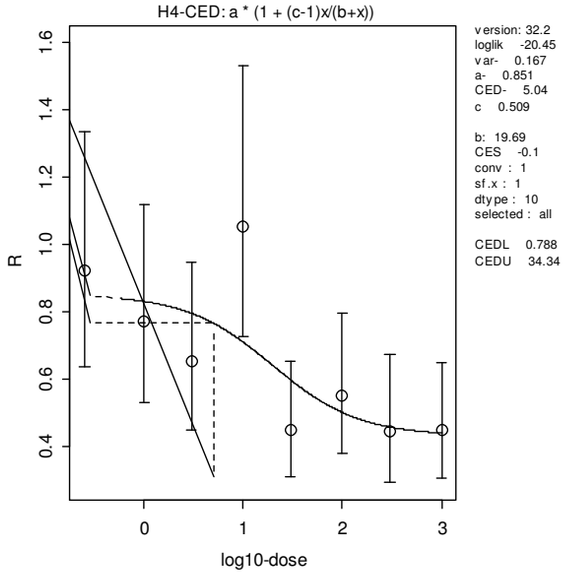
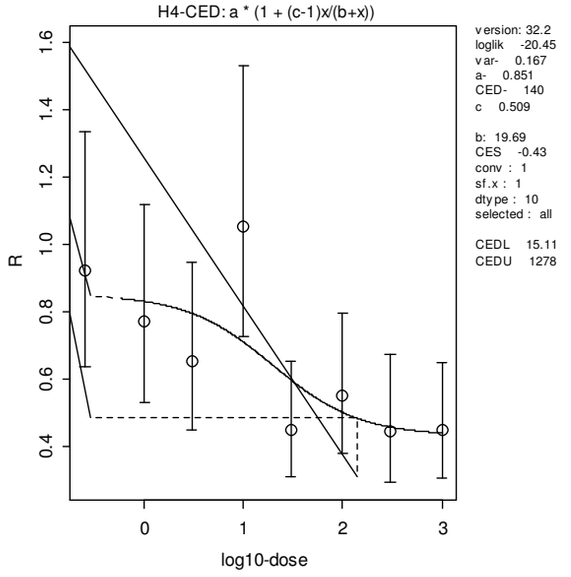
Table 4: Relative Potency Factor 10 and Relative Potency Factor 50 calculations from BenchMark Doses for 6 Semi Volatile Organic Compounds detected in more than 10% of French dwellings and acting on testosterone synthesis in adult male rats

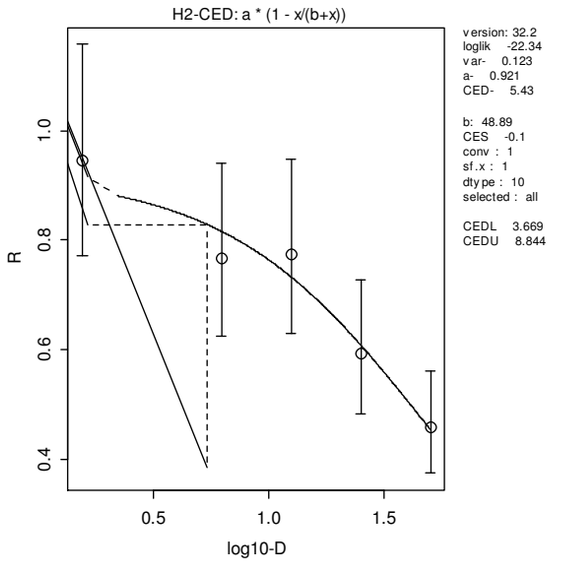
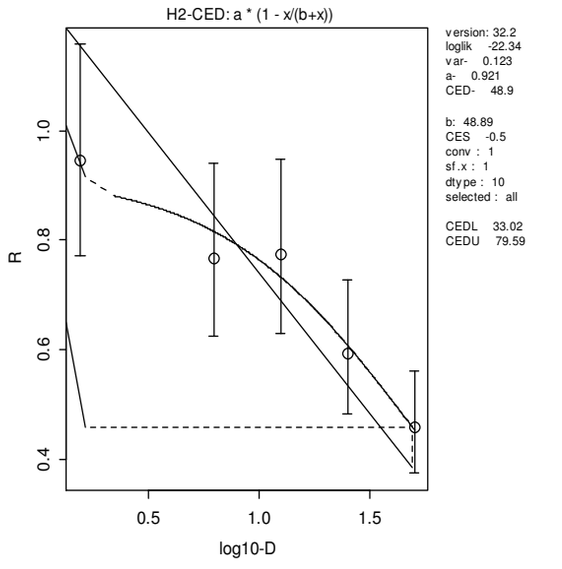
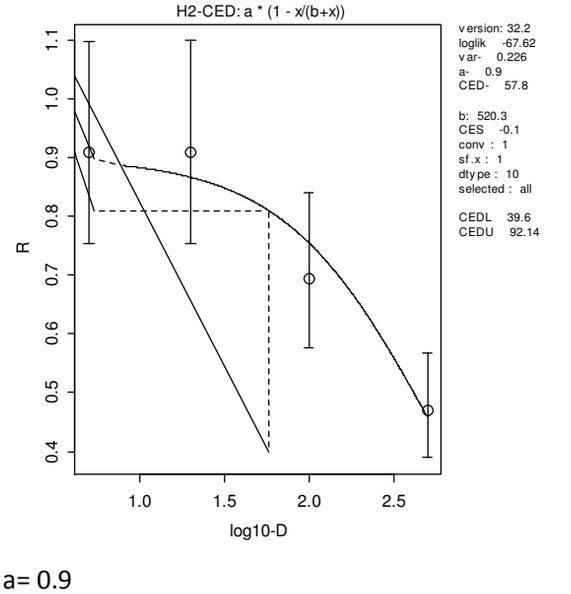
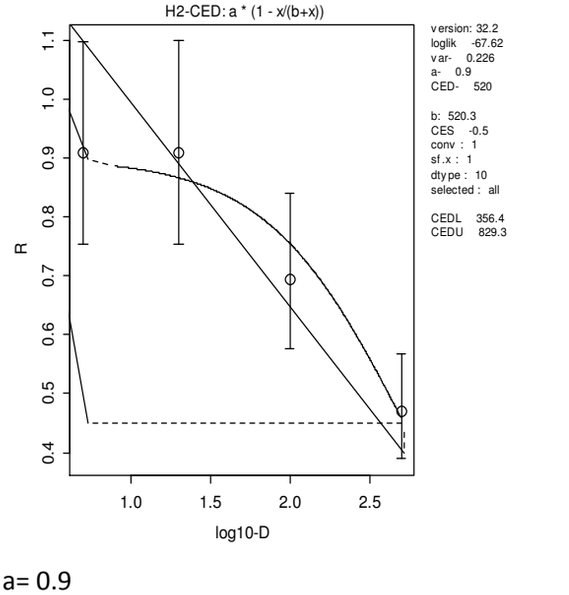
SVOC	RPF_{10}	RPF_{50}
B[a]P	1597	1630
BPA	7033679	181
DEP	22.63	22
DEHP	1.08	/
Cypermethrin	1	1
BBP	0.095	0.095

SVOCs: Semi Volatile Organic Compounds; RPF_{10}: Relative Potency Factors for 10% of the selected effect

Supplementary data

B[a]P (BMD_{10})	B[a]P (BMD_{50})
	
a= 0.936	a= 0.936
BPA (BMD_{10})	BPA (BMD_{50})
	
a= 0.965	a= 0.965

DEP (BMD_{10})	DEP (BMD_{50})
	
a= 0.95	a= 0.95
DEHP (BMD_{10})	DEHP (BMD_{43})
	
a= 0.851	a= 0.851

Cyperméthrine (BMD_{10})	Cyperméthrine (BMD_{50})
	
a= 0.921	a= 0.921
BBP (BMD_{10})	BBP (BMD_{50})
	
a= 0.9	a= 0.9

Where “a” is the graphical control value.

3. Construction d'indicateurs de toxicité cumulés pour les effets neurotoxiques des COSV

Après l'étude des effets reprotoxiques, notre deuxième étude de cas s'est focalisée sur les effets neurotoxiques des COSV. Ainsi, l'article "Multiple exposures to indoor contaminants: derivation of benchmark doses based on neurotoxic effects", soumis en 2015 dans Environmental Health, se focalise sur les effets des COSV sur le système nerveux, en utilisant la même méthodologie que précédemment. Sur les 58 COSV détectés dans plus de 10 % des logements français, 29 avaient été décrits comme pouvant induire des modifications du comportement chez les individus exposés. Le lien entre des altérations du comportement et la mort neuronale ayant déjà été établi dans différentes études, ont été cherchés parmi eux combien étaient responsables d'une mort neuronale. Sur les 29 COSV, 21 étaient décrit dans la littérature comme pouvant induire la mort neuronale de manière dose-dépendante. De nombreuses cibles de ces COSV furent mis en évidence dont les mitochondries présentes dans les neurones (via l'augmentation des taux calciques intracellulaire, l'augmentation du stress oxydant), cette dégradation conduisant à la libération de facteurs pro-apoptotiques. Parmi les principaux groupes de COSV identifiés, le groupe « augmentation des taux de calcium intracellulaire » comprenait par exemple 8 COSV, le groupe « augmentation du stress oxydant » 11 COSV et le groupe « activation de la caspase 3 » 10 COSV. Afin de prendre en compte le maximum de COSV dans nos calculs d'indicateurs de toxicité, le groupe « mort neuronale » (induite en partie par les mécanismes et modes d'action précédemment cités) a été retenu. Ce groupe comprenait 21 COSV dont 13 (PCB-153, delthaméthrine, benzo[a]pyrène, BDE-47, BDE-209, BDE-99, PCB-88, DEHP, dieldrine, chlorpyrifos, lindane, PCB-52, diazinon) avaient suffisamment d'informations publiées dans la littérature scientifique en termes de relations dose-réponse pour le calcul de BMD basées sur une

diminution de 10 % de la viabilité neuronale *in vitro* appréciée par l'activité mitochondriale. Pour cet effet, le PCB-153 est apparu le plus toxique (BMD_{10}=0,072µM) et le diazinon le moins toxique (BMD_{10}=94,35µM). Dans cette étude de cas, les mêmes difficultés ont été rencontrées que précédemment, notamment sur le manque de données toxicologiques disponibles et comparables publiées dans la littérature scientifique en terme de relations dose-réponse. D'autres limites ici ont pu être évoquées, en particulier l'absence de prise en compte des propriétés physico-chimiques (persistants/non persistants) et des métabolites des COSV testés dans les études *in vitro*.

Complex indoor chemical exposures: derivation of comparative benchmark doses based on neurotoxic effects

FOURNIER K,[*,†] **BAUMONT E,** [*,†] **GLORENNEC P,** [*,†] **ZMIROU-NAVIER D,**[*,†,§] **BONVALLOT N** [*,†]

* EHESP School of Public Health, Sorbonne Paris Cité, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France

† INSERM UMR1085 IRSET (Research Institute in Environmental and Occupational Health), Rennes, France

§ Lorraine University Medical School, Nancy

Kevin Fournier (corresponding author): kevin.fournier@ehesp.fr

Emmanuel Baumont: emmanuel.baumont@ehesp.fr

Philippe Glorennec: philippe.glorennec@ehesp.fr

Denis Zmirou-Navier: denis.zmirou@ehesp.fr

Nathalie Bonvallot: nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Abstract

Background: Semi-Volatile Organic Compounds (SVOCs) are pollutants commonly found in French dwellings due to their use as plasticizers, flame retardants, or pesticides in building materials and consumer products. Many have neurotoxic properties and indoor exposures might thus result in neurobehavioral disorders in human beings. The aim of this work is to derive comparable benchmark doses (BMDs) for an array of neurotoxic SVOCs in order to estimate their relative toxicity.

Method: SVOCs fulfilling the following conditions are included: detection frequency (>10%) in French dwellings, availability of data on the mechanism/mode of action for neurotoxic effects, and availability of comparable dose-response relationships.

Results: Of the 58 SVOCs selected, 21 have been documented to induce neuronal death in vitro. Thirteen have at least one dose-response relationship that can be exploited to derive a BMD, based on a 10% decrease in neuronal viability. PCB-153 appears to be the most toxic compound with the lowest BMD (BMD_{10}: 0.072 µM) and diazinon as the least toxic compound with the highest BMD (BMD_{10}: 94.35 µM).

Conclusion: This approach encompasses pollutants from different chemical families, allowing cumulative risk assessment of indoor exposures.

Keywords: Semi-Volatile Organic Compounds, BenchMark Doses, mixture, cumulative risk assessment.

Background

For 50 years now, the emergence of new building materials coupled with increased use of consumer products and electrical and electronic equipment has led to the emission of SVOCs indoors. These compounds are defined as "organic compounds with vapor pressures of between 10^{-14} and 10^{-4}atm (10^{-9} to 10Pa)", whose boiling point is between (240° to 260°C) and (380° to 400°C) (NF ISO 16000-6, 2006) (Weschler and Nazaroff 2008). They include phthalates, polybromodiphenyl ethers (PBDEs), polychlorobiphenyls (PCBs) and pesticides (Weschler and Nazaroff 2008). The widespread use of products containing SVOCs, associated with their physicochemical characteristics, leads to their omnipresence (and sometimes persistence) in both air and settled dust (Mercier et al., 2011). Numerous SVOCs are known to be neurotoxic in both experimental mammals and humans. Those most studied are organochlorine, organophosphorous and pyrethroid pesticides, since these are produced for their neurotoxic properties on insects. High to moderate levels of occupational exposure to these pesticides have been associated with deficits in neurobehavioral performance and abnormalities in human nerve function (Kamel and Hoppin 2004), though whether chronic exposure to low (environmental) levels is also neurotoxic is still a matter of controversy. Several comprehensive reviews have shown the broad spectrum of recent epidemiologic data generated to test the hypothesis that exposure to pesticides during pregnancy and/or early childhood is associated with neurodevelopmental outcomes in children. These show an association between prenatal exposure and negative effects on child mental development (González-Alzaga et al. 2014) and neurobehavioral development (London et al. 2012; Muñoz-Quezada et al. 2013). PCBs are also known for their negative impact on child neurodevelopment (Boucher et al. 2009; Polańska et al. 2013; Quinete et al. 2014). Although less well known for their neurotoxic properties, 2 pollutants used in plastic materials have recently been studied: Harley et al. showed an association between prenatal exposure to

bisphenol A (BPA) and anxiety and depression at age 7 in boys (Harley et al., 2013). An association has also been shown between exposure to DEHP in children aged 6-15 years, and attention and learning disorders (Chopra et al. 2014). Experimental data confirms the neurotoxic potency of these SVOCs, especially on the developing brain. Pre and/or post-natal exposures in rodents lead to a delay in spatial learning for BDE-99 (Blanco et al. 2013), decreased learning ability and memory for BDE-153 (Zhang et al., 2013) and Benzo[a]pyrene (B[a]P) (Cheng et al. 2013), decreased motor activity for BDE-47 (Ta et al. 2011), behavioral disturbance for a mixture of 6 PCBs (Elnar et al. 2012), BPA (Viberg and Lee, 2012) and fluorene (Peiffer et al. 2013), and an attention deficit and hyperactivity for PCB-153 (Johansen et al. 2014).

These neurobehavioral changes can be linked to neuronal death (Zhang et al., 2013) due to different mechanisms or Modes Of Action (MOA) such as oxidative stress (Cheng et al., 2009), disruption of calcium signaling in neurons (Elnar et al. 2012), alteration of the level of protein involved in brain development (Viberg and Lee, 2012) or alteration of the cholinergic system (Johansson et al. 2008).

Neuronal death involves different pathways mainly linked to mitochondria (Davis and Williams 2012; Green and Kroemer 2004; Niizuma et al. 2009). Mechanistic studies allow improved understanding of these pathways. Figure 1 shows the main mitochondria pathways for neuronal death. These apoptosis pathways induce activation of the different proteins involved in neuronal death, such as the cell surface death receptor, Bcl2, BH3 (a proapototic Bcl2 family member), Bax (proapoptotic Bcl2 associated X protein), caspases, AIF (apoptosis-inducing factor) or cytochrome C (Cyt C) (Davis and Williams 2012).

Some SVOCs could induce the activation of (pro) apoptotic proteins and thus induce neuronal apoptosis via these pathways.

These observations raise the question of the public health impact of SVOCs – which are most often present in mixtures, in indoor environments. In this context, Cumulative Risk Assessment (CRA) could be used. A variety of CRA methodologies have already been applied and recently reviewed (Fournier et al. 2014b). The 'Hazard Index' (HI), the 'Point Of Departure Index' (PODI) and the 'Relative Potency Factor' (RPF) approaches are the most commonly used. These mehtodologies assume dose-additivity, based on the principle that synergism is less likely to occur at environmentally relevant low doses (ATSDR 2004; Kortenkamp et al. 2009). PODI and RPF have already been proposed for certain SVOCs, such as pyrethroids, organophosphorous, phthalates, fungicides and perfluorinated compounds (Borg et al. 2013; Kortenkamp and Faust 2010; US EPA 2006; Wolansky et al. 2005). Nevertheless, these groups of SVOCs are based on chemical families rather than actual exposures. Furthermore, RPFs cannot be used together in a single CRA because they are not based on the same endpoints (mechanism or mode of action).

The aim of this work is to derive comparable toxicity indicators, based on the same MOA, for multiple neurotoxic contaminants present in indoor environments, in order to estimate their relative toxicity.

Material and Method

Selection and grouping of indoor SVOCs

The selection of chemicals was based on different measurement campaigns in French dwellings, where 66 compounds selected from a previous ranking (Bonvallot et al., 2010) were measured in a range of environmental media (air, gas phase or particle matter and settled dust) (Mandin et al., 2014a, 2014b; Blanchard et al., 2014). SVOCs were selected where they were detected in more than 10% of the dwellings investigated (from 30 to 285 according to the campaign). SVOC grouping was based on an approach previously described (Fournier et

al. 2014a). In short, the hazard identification for each chemical was performed by means of a literature review on its neurotoxic effects. To be eligible, the toxicological studies (in vivo or in vitro) should describe the clinical effect, the target organ or cells, or the mechanisms of action on the neurologic system. SVOCs were then grouped by common effect and mode/mechanism of action. In compliance with European Food Safety Authority (EFSA) recommendations, the present work takes into account pollutants from different chemical families, with a variety of MOA, provided they produce a common adverse outcome on the same target cell or system (EFSA 2013). EFSA considers this approach to be the default approach for the purpose of assessing the cumulative risk of pesticide residues in food.

Choice of key event

We took into account the MOAs structured in Adverse Outcome Pathways (AOPs) (figure 2), where each group of pollutants represents a key event. We chose groups having both the largest number of SVOCs and the most precise key event. A compromise was made between the number of SVOCs and the level of detail in the MOA.

BenchMark Dose (BMD) derivation

BMDs were derived according to the following steps: i) Selection of suitable dose-response datasets; ii) choice of the level of response associated with the BMD; iii) fitting a model in with experimental data, and iv) selection of the best fitting model.

Selection of suitable dose-response datasets: For each SVOC, available dose-response datasets were collected and selected on the basis of a compromise between the amount of available data (at least 3 dose-levels and 1 control, availability of raw data with standard deviation) and comparability (same species, exposure duration, etc.) of the data between compounds. Raw data and Standard Deviations (SDs) were obtained using a graphical

estimation, as described by the US EPA (US EPA 2005) when not provided by the authors. Where only Standard Errors of the Means (SEMs) were given, these were converted to SDs using the following equation: $SD = SEM \times \sqrt{n}$, where n is the sample size. The response chosen should be linked to a neurotoxic effect and related to a suitable number of SVOCs in order to be considered in a CRA.

Choice of the level of response associated with the BMD: The BenchMark Responses (BMRs) or the response rates of an effect used are default values recommended by the US EPA (e.g., a decrease of 1 control SD or a 10% response).

Fitting model in with experimental data: BMDs were computed using PROAST software (www.rivm.nl/proast_v38.9). According to the suggested link between neurologic effects and impairment of neuronal cells, we selected cell-scale data as an interesting way to assess the relative potency of SVOCs in indoor environments. Cells are considered to be mutually dependent, therefore, responses measured from *in vitro* data could be considered continuous. Thus, the Hill family models were selected for modeling the dose-response relationships, as suggested by Levasseur (Levasseur et al. 1998). The Hill models family is presented below in equation 1 to 4 (2 to 4 parameters):

$$y = a\left(1 - \frac{x}{b + x}\right) \quad (1)$$

$$y = a\left(1 - \frac{x^d}{b^d + x^d}\right) \quad (2)$$

$$y = a\left(1 + \frac{(c-1)x}{b + x}\right) \quad (3)$$

$$y = a\left(1 + \frac{(c-1)x^d}{b^d + x^d}\right) \quad (4)$$

Where *x* is toxic compound concentration, *a* is the background response, *b* is the concentration of the compound inducing 50% of the effect, *d* is the slope, and *a*c* is the response to an infinite dose.

Selection of the best fitting model: The best fitting model from the Hill family was selected according to the procedure described by Slob (Slob 2002), with the likelihood ratio test. In order to compare contaminant toxicity, the central estimation (BMD) was used in preference over the BMDL (Benchmark Dose Lower Bound = lower limit of a one-sided confidence interval on the BMD) which integrates uncertainty to experimental data, as suggested by the US EPA in 2010 (US EPA 2010).

Results

58 SVOCs were selected, since these were detected in at least 10% of dwellings (Table I). Of these, 29 are documented as having neurotoxic properties, inducing behavioral effects, probably due to neuronal death in 21 cases. These effects are caused by different mechanisms of action, acting through different biological pathways (figure 3). Mitochondria are very active in neuronal death induced by SVOCs. Mitochondria alteration is caused by an increase of intracellular calcium in relation to a variety of SVOCs (BDE-209 (Chen et al., 2010), BPA (Lee et al., 2008a), DE-71 (a mixture of BDE-47 and BDE-99) (Yu et al., 2008)), leading to depolarization and deterioration of the mitochondria membranes (dieldrin, lindane (Sharma et al. 2010), B(a)P (Nie et al., 2014)) and the production of reactive oxygene species (ROS) (PCB-52 (Lee et al., 2005), chlorpyrifos (Ki et al. 2013), dieldrin, lindane (Sharma et al. 2010), BDE-209 (Chen et al., 2010), BPA (Lee et al., 2008a)). This mitochondria deterioration induces the liberation of cytochrome C and proapoptotic factors activating the caspase pathway. The caspase pathway is also activated

by PCB-77 and 153 (Sánchez-Alonso et al. 2003), DEHP (Lin et al. 2011), B(a)P (Nie et al., 2014), BDE-47 and BDE-99 (Yu et al. 2008).

All of these mechanisms lead to neuronal death. This endpoint (or key event) is also the group including the greatest number of SVOCs (Fournier et al. 2014a). It is thus retained for the derivation of BMDs.

Benchmark dose derivation

Dose-response relationships fulfilling our criteria were available for 15 of the 21 SVOCs inducing a neuronal death. Six pollutants (triclosan, 4,4'-DDT, DBP, DiBP, BDE-153 and permethrin) were excluded because there was no available dose-response relationship for neuronal death. Table II briefly summarizes the dose-response data for each compound. Each response and standard deviation was converted into percentage of control. Dose-response data were obtained from different species: rats (6/15), mice (4/15) or human (5/15); for different durations of exposure: 5 hours (1/15), 24 hours (10/15), 40 hours (1/15) or 48 hours (3/15); in different exposure windows: prenatal, neonatal, and adult.

The response measured in the toxicological studies was a decrease in cell viability estimated by 5 different tests: the Trypan Blue assay assesses neuronal membrane integrity, the resazurin (CellTiter-Blue kit), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) and CCK-8 (Cell Counting Kit-8) assays assess mitochondrial functionality. Mitochondrial functionality was measured in more than 90% of cases (14/15 SVOCs).

BMD_{10}, corresponding to a decrease of 10% in neuronal viability, were presented in Table III. The number of parameters used for Hill equations ranged from 2 to 4. Resulting $BMDs_{10}$ range from 0.072 to 94.35 µM, corresponding to approximatively 4 orders of magnitude. It was

impossible to model the BMD_{10} of BPA and PCB-118 because no dose-response models fit their dataset. In fact, BPA had a non-monotonic curve and PCB-118 had a response decreasing by more than 30% from the first tested dose.

Figure 4 shows the relative toxicity of the 13 different SVOCs based on the central estimation (BMD), the lower and upper 95%-confidence bounds (BMDL and BMDU respectively). PCB-153 appears to be the most toxic of the SVOCs for neuronal death, with diazinon appearing to be the least toxic.

Discussion and conclusion

We derived BMDs for 13 pollutants pertaining to the various chemical families to which people are exposed in indoor environments. We were able to rank 3 PCBs, 5 pesticides, 3 PBDEs, 1 phthalate, and 1 Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH), according to their ability to decrease neuronal cell viability observed *in vitro*. BMDs were modeled from published dose-response relationships. The raw data differ in various aspects: 8 different cell lines, 3 different species strains, 3 distinct windows of exposure, 5 neuronal viability assays and 4 different durations of exposure.

In our work, studies based on human cells were preferred, but the choice was limited by the presence of exploitable and reliable studies in the literature. Hence, different human, rats and mice cell lines were used (table II). However, the tested species seemed not to affect the BMD calculation, as shown by Goldoni et al. after testing the same toxicants on different cell lines from both rats and humans (Goldoni et al. 2003). But for these same species, the cell lines do seem to affect the BMD calculation. Goldoni et al. show that for rats and humans, different cell lines from the same species can react differently to the same compound, using the same neuronal viability

test (here the MTT test). For rats, they show that C6 cells were more resistant to styrene oxide than PC12 cells. Similarly, in humans, D384 cells were more resistant to styrene oxide than SK-N-MC cells. In our work, the cells came from different strains (mice, rats and humans) and were from different cell lines for mice (hypothalamic and neuroblastoma cells, named GT1-7 and Neuro-2a respectively), rats (dopaminergic and pheochromocytoma cell, named N27 and PC-12 respectively or hippocampal and cortical neurons taken directly from the exposed animals), or humans (neuroblastoma cell from SK-N-MC and SH-SY5Y cell lines). Thus, potency ranking can be affected by the different cell lines used in these experiments.

As with the cell lines and species, the selected studies also vary in their use of different neuronal viability assays. The MTT assay estimates cellular viability through measurement of mitochondrial dehydrogenase activity. This is the most widely used assay (more than 50% of our study SVOCs). We chose to include studies using other kinds of neuronal viability assays: MTS (also known as CCK-8), rezasurin assays (known as CellTiter-Blue assays) and the Trypan Blue assay which assesses neuronal membrane integrity. The Trypan Blue method is based on the principle that live (viable) cells do not take up certain dyes, whereas dead (non-viable) cells do (Strober 2001). Thus, the colored cells will be the death cells because their membrane alterations allowed to the dyes to color intracellular space. It is the least sensitive assay. MTS assay appears easier to use, faster and slightly more sensitive than MTT. The resazurin assay appears to be more sensitive than the tetrazolium assays (MTS and MTT) (Riss et al. 2013).

We can consider a sensitivity order for the various assays: Trypan Blue < MTT ≈ MTS (CCK-8) < resazurin (CellTiter-Blue). This difference in sensitivity could also affect the rank of potency of our SVOCs. The most toxic SVOC of our group was the PCB-153, which was tested using the resazurin test. Similarly, the PCB-52, the second least toxic compound in our group, was tested using Trypan Blue. Without testing the neuronal toxicity of these compounds using other tests

(MTT or MTS), it is difficult to be sure whether their toxicity relative to the others is due to the sensitivity of the assays used or their real capacity to induce neuronal death. Nevertheless, this parameter could only change the order of potencies for this group of contaminants. We have maintained the PCB-153 and PCB-52 exposures resulting in neuronal death within our BMD calculation.

As underlined by Deshpande et al., duration of exposure could also influence the calculated BMDs. These show a linear and time-dependent increase in neuronal cell death linked to extracellular calcium entering cells through the N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor channel (Deshpande et al. 2008). The studies retained in our work are also based on various exposure durations (5 hours to 48 hours). According to Deshpande's conclusion, one might expect longer exposure of cells to be more lethal, yet this was not confirmed in our data. In fact, dieldrin, lindane and diazinon appeared to be the least toxic compounds in spite of longer cell exposure. On the other hand, PCB-77 appeared to be 10 times more potent than diazinon after 5 hours of exposure (as against 48 hours for diazinon). In our study, duration of exposure seems unrelated to toxic potency.

Of the 13 remaining SVOCs, 9 are considered persistent in the human body (PCB-153, B[a]P, BDE-47, BDE-99, BDE-209, PCB-77, dieldrin, lindane, PCB-52). Chronic exposure makes them more toxic, because they are bio-accumulative. Prolonged exposure can result in long- term chronic toxicity (Mohamed and Antia 1998). Hence, within the context of indoor exposure to low doses of multiple persistent pollutants, their 'chronic BMDs' could be lower than those calculated in the present study.

As previously underlined by other authors, metabolic conversions can lead to more toxic metabolites (Macherey and Dansette 2008). Since it is often the case that some metabolites of a compound are unknown, most *in vitro* studies test parent compounds. In our work, only B(a)P

was tested using the S9 fraction in order to be metabolized. In this case, estimated relative potency should be interpreted with caution, particularly within a CRA context.

The most important limitation of this work is the lack of available and comparable data in the scientific literature: of the initial 58 SVOCs detected in more than 10% of the French dwellings investigated, 50% are documented as neurotoxic (Figure 3). And of these, 28% were excluded because no study focused on neuronal death, 20% because there was no dose-response relationship, and 7% because there was no suitable dose-response model. This was also recently underlined by Wignall et al. in their standardization of BMD calculations (Wignall et al. 2014), who sought to apply a standardized process for conducting BMD modeling so as to reduce inconsistencies in model fitting and selection. They identified 1260 chemicals with at least one toxicity value and applied a curation of chemicals and data in order to remove mixtures, chemicals missing structural information, and inorganic, organometallic, and duplicate structures. 374 chemicals were dropped during this curation. Of the 886 remaining chemicals, only 352 had available dose-response data. This corresponds to 28% of the initial chemicals.

Despite these limitations, in a situation of uncertainty, this approach using BMD calculation improves traditional CRA. It is based on real exposures, encompassing compounds from different chemical families and grouping them according to their common health effects. This work reveals the need to develop similar protocols in terms of exposure context, experimental models and endpoints (or response measures) in order to make useful toxicity data available for CRA.

Funding information

This work was supported by the French Ministry of Ecology: Primequal [Environnement Intérieur et Approches Innovantes], programme 190, THUR-BSAF action 13, sub-action 08

Abbreviations

AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AOP	Adverse Outcome Pathway
B[a]P	Benzo[a]pyrene
Bax	Bcl2 associated X protein
BBP	Benzylbutylphtalate
BDE-X	Bromodiphényléthers
BMD	Benchmark dose
BMDL	Benchmark Dose Lower Bound
BMDU	Benchmark Dose Upper Bound
BMR	BenchMark Response
BPA	Bisphenol A
Ca2+	Calcium
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CRA	Cumulative risk assessment
Cyto c	Cytochrome c
DBP	Di-n-butylphtalate
DDE ou 4,4'-DDE	Di-chlorodiphenyldichloroethylene
DDT ou 4,4'-DDT	Di-chlorodiphenyltrichloroethane
DEHP	Di-ethylhexylphtalate
DEP	Di-ethylphtalate
DiBP	Di-isobutylphtalate
DiNP	Di-isononylphtalate
DMEP	Di(2-methoxyethyl)phthalate
DMP	Di-methylphtalate
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	Environmental Protection Agency
GD	Gestation day
HI	Hazard Index
MOA	Mode Of Action
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PBDE	polybromodiphenyl ethers
PCB	polychlorobiphenyls
PND	Post natal day

PODI	Point Of Departure Index
ROS	reactive oxygene species
RPF	Relative Potency Factor
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Errors of the Means
SVOC	Semi-Volatile Organic Compound

Author's contributions

KF developed the first study outline which was extended in collaboration with EB. The results were discussed and interpreted by KF and NB. PG and DZ reviewed and contributed to the final version of the manuscript. All authors approved the final version.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

ATSDR. 2004. Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures.

Bahrami F, Hashemi M, Khalili F, Hashemi J, Asgari A. 2013. Stimulation of CB1 Cannabinoid and NMDA Receptors Increases Neuroprotective Effect against Diazinon-Induced Neurotoxicity. Neurophysiology 45:433–440; doi:10.1007/s11062-013-9390-5.

Blanco J, Mulero M, Heredia L, Pujol A, Domingo JL, Sánchez DJ. 2013. Perinatal exposure to BDE-99 causes learning disorders and decreases serum thyroid hormone levels and BDNF gene expression in hippocampus in rat offspring. Toxicology 308:122–8; doi:10.1016/j.tox.2013.03.010.

Bonvallot N, Mandin C, Mercier F, Bot B Le, Glorennec P. 2010. Health ranking of ingested semi-volatile organic compounds in house dust: an application to France. Indoor air 20:458–72; doi:10.1111/j.1600-0668.2010.00667.x.

Borg D, Lund B-O, Lindquist N-G, Håkansson H. 2013. Cumulative health risk assessment of 17 perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated substances (PFASs) in the Swedish population. Environment international 59:112–23; doi:10.1016/j.envint.2013.05.009.

Boucher O, Muckle G, Bastien CH. 2009. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: a neuropsychologic analysis. Environmental health perspectives 117:7–16; doi:10.1289/ehp.11294.

Burns CJ, McIntosh LJ, Mink PJ, Jurek AM, Li AA. 2013. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews 16:127–283; doi:10.1080/10937404.2013.783383.

Chen J, Liufu C, Sun W, Sun X, Chen D. 2010. Assessment of the neurotoxic mechanisms of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in primary cultured neonatal rat hippocampal neurons includes alterations in second messenger signaling and oxidative stress. Toxicology letters 192:431–9; doi:10.1016/j.toxlet.2009.11.020.

Chen N-N, Luo D-J, Yao X-Q, Yu C, Wang Y, Wang Q, et al. 2012. Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats. Journal of Alzheimer's disease : JAD 30:585–94; doi:10.3233/JAD-2012-111946.

Cheng J, Gu J, Ma J, Chen X, Zhang M, Wang W. 2009. Neurobehavioural effects, redox responses and tissue distribution in rat offspring developmental exposure to BDE-99. Chemosphere 75:963–8; doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.004.

Cheng S, Xia Y, He J, Liu X, Chen X, Ding Y, et al. 2013. Neurotoxic effect of subacute benzo(a)pyrene exposure on gene and protein expression in Sprague-Dawley rats. Environmental toxicology and pharmacology 36:648–58; doi:10.1016/j.etap.2013.06.008.

Chopra V, Harley K, Lahiff M, Eskenazi B. 2014. Association between phthalates and attention deficit disorder and learning disability in U.S. children, 6-15 years. Environmental research 128:64–9; doi:10.1016/j.envres.2013.10.004.

Davis RE, Williams M. 2012. Mitochondrial function and dysfunction: an update. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 342:598–607; doi:10.1124/jpet.112.192104.

Deshpande LS, Lou JK, Mian A, Blair RE, Sombati S, Attkisson E, et al. 2008. Time course and mechanism of hippocampal neuronal death in an in vitro model of status epilepticus: role of NMDA receptor activation and NMDA dependent calcium entry. European journal of pharmacology 583:73–83; doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.025.

Dickerson SM, Guevara E, Woller MJ, Gore AC. 2009. Cell death mechanisms in GT1-7 GnRH cells exposed to polychlorinated biphenyls PCB74, PCB118, and PCB153. Toxicology and applied pharmacology 237:237–45; doi:10.1016/j.taap.2009.04.001.

Dingemans MML, Berg M van den, Westerink RHS. 2011. Neurotoxicity of brominated flame retardants: (in)direct effects of parent and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers on the (developing) nervous system. Environmental health perspectives 119:900–7; doi:10.1289/ehp.1003035.

EFSA. 2013. Scientific Opinion on the relevance of dissimilar mode of action and its appropriate application for cumulative risk assessment of pesticides. 11; doi:10.2903/j.efsa.2013.3472.

Elnar AA, Diesel B, Desor F, Feidt C, Bouayed J, Kiemer AK, et al. 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (∑6 NDL-PCBs) in mice. Toxicology 299:44–54; doi:10.1016/j.tox.2012.05.004.

Elwan MA, Richardson JR, Guillot TS, Caudle WM, Miller GW. 2006. Pyrethroid pesticide-induced alterations in dopamine transporter function. Toxicology and applied pharmacology 211:188–97; doi:10.1016/j.taap.2005.06.003.

Eshleman AJ, Murray TF. 1991. Pyrethroid insecticides indirectly inhibit GABA-dependent 36Cl− influx in synaptoneurosomes from the trout brain. Neuropharmacology 30:1333–1341; doi:10.1016/0028-3908(91)90031-6.

Fan Y, Ding S, Ye X, Manyande A, He D, Zhao N, et al. 2013. Does preconception paternal exposure to a physiologically relevant level of bisphenol A alter spatial memory in an adult rat? Hormones and Behavior 64:598–604; doi:10.1016/j.yhbeh.2013.08.014.

Farag AT, Radwan AH, Sorour F, Okazy A El, El-Agamy E-S, El-Sebae AE-K. 2010. Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 29:80–5; doi:10.1016/j.reprotox.2009.10.003.

Faro LRF, Alfonso M, Cervantes R, Durán R. 2009. Comparative effects of pesticides on in vivo dopamine release in freely moving rats. Basic & clinical pharmacology & toxicology 105:395–400; doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00468.x.

Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. 2014a. An exposure-based framework for grouping pollutants for a cumulative risk assessment approach: Case study of indoor semi-volatile organic compounds. Environmental research 130:20–8; doi:10.1016/j.envres.2014.01.007.

Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. 2014b. Derivation of toxicological reference values for taking mixtures into account in health risk assessment: Existing methods and recent applications. Environnement, Risques & Santé 13:203–221; doi:10.1684/ers.2014.0696.

Goldoni M, Vettori MV, Alinovi R, Caglieri A, Ceccatelli S, Mutti A. 2003. Models of neurotoxicity: extrapolation of benchmark doses in vitro. Risk analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis 23: 505–514.

González-Alzaga B, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Rodríguez-Barranco M, Ballester F, Rebagliato M, et al. 2014. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. Toxicology letters 230:104–21; doi:10.1016/j.toxlet.2013.11.019.

Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science (New York, N.Y.) 305:626–9; doi:10.1126/science.1099320.

Harley KG, Gunier RB, Kogut K, Johnson C, Bradman A, Calafat AM, et al. 2013. Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. Environmental research 126:43–50; doi:10.1016/j.envres.2013.06.004.

He W, He P, Wang A, Xia T, Xu B, Chen X. 2008. Effects of PBDE-47 on cytotoxicity and genotoxicity in human neuroblastoma cells in vitro. Mutation research 649:62–70; doi:10.1016/j.mrgentox.2007.08.001.

Holahan MR, Smith CA. 2015. Phthalates and neurotoxic effects on hippocampal network plasticity. Neurotoxicology 48:21–34; doi:10.1016/j.neuro.2015.02.008.

Jin Y, Liu Z, Peng T, Fu Z. 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. Fish & shellfish immunology 43:405–414; doi:10.1016/j.fsi.2015.01.010.

Johansen EB, Fonnum F, Lausund PL, Walaas SI, Bærland NE, Wøien G, et al. 2014. Behavioral changes following PCB 153 exposure in the spontaneously hypertensive rat - an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Behavioral and brain functions : BBF 10:1; doi:10.1186/1744-9081-10-1.

Johansson N, Viberg H, Fredriksson a, Eriksson P. 2008. Neonatal exposure to deca-brominated diphenyl ether (PBDE 209) causes dose-response changes in spontaneous behaviour and cholinergic susceptibility in adult mice. Neurotoxicology 29:911–9; doi:10.1016/j.neuro.2008.09.008.

Johri A, Yadav S, Dhawan A, Parmar D. 2008. Responsiveness of cerebral and hepatic cytochrome P450s in rat offspring prenatally exposed to lindane. Toxicology and applied pharmacology 231:10–6; doi:10.1016/j.taap.2008.03.019.

Kajta M, Litwa E, Rzemieniec J, Wnuk A, Lason W, Zelek-Molik A, et al. 2014. Isomer-nonspecific action of dichlorodiphenyltrichloroethane on aryl hydrocarbon receptor and G-protein-coupled receptor 30 intracellular signaling in apoptotic neuronal cells. Molecular and cellular endocrinology 392:90–105; doi:10.1016/j.mce.2014.05.008.

Kamel F, Hoppin JA. 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. Environmental health perspectives 112: 950–8.

Karen DJ, Li W, Harp PR, Gillette JS, Bloomquist JR. 2001. Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides permethrin and chlorpyrifos. Neurotoxicology 22: 811–7.

Ki Y-W, Park JH, Lee JE, Shin IC, Koh HC. 2013. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. Toxicology letters 218:235–45; doi:10.1016/j.toxlet.2013.02.003.

Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. 2001. Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptopic cell death in dopaminergic cells. Free radical biology & medicine 31: 1473–85.

Kortenkamp A, Faust M. 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. International journal of andrology 33:463–74; doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01047.x.

Kortenkamp A, Faust M, Backhaus T. 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity.

Kuriyama SN, Chahoud I. 2004. In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. Toxicology 202:185–97; doi:10.1016/j.tox.2004.05.006.

Lakshmana MK, Raju TR. 1994. Endosulfan induces small but significant changes in the levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the developing rat brain and deficits in the operant learning performance. Toxicology 91: 139–50.

Lee J-Y, Kim J-W, Lim H-S, Joo W-H, Cho Y-K, Moon J-Y. 2005. Changes in antioxidant defense systems by 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl exposure in neuronal SK-N-MC cells. Toxicology letters 157:139–49; doi:10.1016/j.toxlet.2005.01.013.

Lee S, Suk K, Kim IK, Jang I-S, Park J-W, Johnson VJ, et al. 2008a. Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB. Journal of neuroscience research 86:2932–42; doi:10.1002/jnr.21739.

Lee S, Suk K, Kim IK, Jang I-S, Park J-W, Johnson VJ, et al. 2008b. Signaling pathways of bisphenol A–induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: Role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor–κB. Journal of Neuroscience Research 86:2932–2942; doi:10.1002/jnr.21739.

Levasseur LM, Slocum HK, Rustum YM, Greco WR. 1998. Modeling of the time-dependency of in vitro drug cytotoxicity and resistance. Cancer Research 58: 5749–5761.

Li X-J, Jiang L, Chen L, Chen H-S, Li X. 2013. Neurotoxicity of dibutyl phthalate in brain development following perinatal exposure: A study in rats. Environmental Toxicology and Pharmacology; doi:10.1016/j.etap.2013.05.001.

Lin C-H, Chen T-J, Chen S-S, Hsiao P-C, Yang R-C. 2011. Activation of Trim17 by PPARγ is involved in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis on Neuro-2a cells. Toxicology letters 206:245–51; doi:10.1016/j.toxlet.2011.08.002.

London L, Beseler C, Bouchard MF, Bellinger DC, Colosio C, Grandjean P, et al. 2012. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. Neurotoxicology 33:887–96; doi:10.1016/j.neuro.2012.01.004.

Lynch CD, Jackson LW, Kostyniak PJ, McGuinness BM, Buck Louis GM. 2012. The effect of prenatal and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls and child neurodevelopment at age twenty four months. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 34:451–6; doi:10.1016/j.reprotox.2012.04.013.

Ma N, Liu S, Gao P, Cao P, Xu H. 2013. [Effect of diisobutyl phthalate on learning and memory behavior and apoptosis of hippocampus cells in mice]. Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research 42: 57–60.

Macherey A, Dansette PM. 2008. Biotransformations Leading to Toxic Metabolites : Chemical Aspect. The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition) 674–696.

Mandin C, Mercier F, Lucas J-P, Ramalho O, Gilles E, Blanchard O, Bonvallot N, Glorennec P, Le Bot B, 2014a. ECOS-PM: A Nationwide Survey of Semi-Volatile Organic Compounds in Indoor Air. Indoor Air conference, Hong-Kong,

Mandin C., Mercier F., Lucas J-P., Ramalho O., Blanchard O., Bonvallot N., Raffy G., Gilles E., Glorennec P., Le Bot B, 2014b.ECOS-POUSS: A Nationwide Survey of Semi-Volatile Organic Compounds in Home Settled Dust. Indoor Air conference, Hong-Kong.

Mercier F, Glorennec P, Thomas O, Bot B Le. 2011. Organic contamination of settled house dust, a review for exposure assessment purposes. Environmental science & technology 45:6716–27; doi:10.1021/es200925h.

Meyer D a, Shafer TJ. 2006. Permethrin, but not deltamethrin, increases spontaneous glutamate release from hippocampal neurons in culture. Neurotoxicology 27:594–603; doi:10.1016/j.neuro.2006.03.016.

Mohamed AMO, Antia HE. 1998. *Geoenvironmental Engineering*. Elsevier.

Muñoz-Quezada MT, Lucero BA, Barr DB, Steenland K, Levy K, Ryan PB, et al. 2013. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. Neurotoxicology 39:158–68; doi:10.1016/j.neuro.2013.09.003.

Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni ML, Stefano A Di, Sozio P, Cantalamessa F. 2007. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after

neonatal administration of pyrethroids. Toxicology 229:194–205; doi:10.1016/j.tox.2006.10.015.

Nasuti C, Manuel C, Donatella F, Rosita G, Antonio DS, Serafina CL, et al. 2012. Effects of early life permethrin exposure on spatial working memory and on monoamine levels in different brain areas of pre-senescent rats. Toxicology 303:162–168; doi:10.1016/j.tox.2012.09.016.

Nie J-S, Zhang H-M, Zhao J, Liu H-J, Niu Q. 2014. Involvement of mitochondrial pathway in benzo[a]pyrene-induced neuron apoptosis. Human & experimental toxicology 33:240–50; doi:10.1177/0960327113493301.

Niizuma K, Endo H, Chan PH. 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. Journal of neurochemistry 109 Suppl :133–8; doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05897.x.

Peiffer J, Cosnier F, Grova N, Nunge H, Salquèbre G, Decret M-J, et al. 2013. Neurobehavioral toxicity of a repeated exposure (14 days) to the airborne polycyclic aromatic hydrocarbon fluorene in adult Wistar male rats. PloS one 8:e71413; doi:10.1371/journal.pone.0071413.

Polańska K, Jurewicz J, Hanke W. 2013. Review of current evidence on the impact of pesticides, polychlorinated biphenyls and selected metals on attention deficit / hyperactivity disorder in children. International journal of occupational medicine and environmental health 26:16–38; doi:10.2478/s13382-013-0073-7.

Quinete N, Schettgen T, Bertram J, Kraus T. 2014. Occurrence and distribution of PCB metabolites in blood and their potential health effects in humans: a review. Environmental science and pollution research international 21:11951–72; doi:10.1007/s11356-014-3136-9.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. 2013. Cell Viability Assays.

Romero A, Ramos E, Castellano V, Martínez MA, Ares I, Martínez M, et al. 2012a. Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. Toxicology in Vitro 26:823–830; doi:10.1016/j.tiv.2012.05.004.

Romero A, Ramos E, Castellano V, Martínez MA, Ares I, Martínez M, et al. 2012b. Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 26:823–30; doi:10.1016/j.tiv.2012.05.004.

Sánchez-Alonso JA, López-Aparicio P, Recio MN, Pérez-Albarsanz MA. 2003. Apoptosis-mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. Toxicology letters 144: 337–49.

Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME. 2003. Fluoranthene-induced neurobehavioral toxicity in F-344 rats. International journal of toxicology 22: 263–76.

Sharma H, Zhang P, Barber DS, Liu B. 2010. Organochlorine pesticides dieldrin and lindane induce cooperative toxicity in dopaminergic neurons: role of oxidative stress. Neurotoxicology 31:215–22; doi:10.1016/j.neuro.2009.12.007.

Slob W. 2002. Dose-response modeling of continuous endpoints. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 66: 298–312.

Soni I, Syed F, Bhatnagar P, Mathur R. 2011. Perinatal toxicity of cyfluthrin in mice: developmental and behavioral effects. Human & experimental toxicology 30:1096–105; doi:10.1177/0960327110391386.

Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.] Appendix 3:Appendix 3B; doi:10.1002/0471142735.ima03bs21.

Szychowski KA, Sitarz AM, Wojtowicz AK. 2015. Triclosan induces Fas receptor-dependent apoptosis in mouse neocortical neurons in vitro. Neuroscience 284:192–201; doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.001.

Ta TA, Koenig CM, Golub MS, Pessah IN, Qi L, Aronov PA, et al. 2011. Bioaccumulation and behavioral effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in perinatally exposed mice. Neurotoxicology and teratology 33:393–404; doi:10.1016/j.ntt.2011.02.003.

Tagliaferri S, Caglieri A, Goldoni M, Pinelli S, Alinovi R, Poli D, et al. 2010. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 24:116–22; doi:10.1016/j.tiv.2009.08.020.

Tully K, Kupfer D, Dopico a M, Treistman SN. 2000. A plasticizer released from IV drip chambers elevates calcium levels in neurosecretory terminals. Toxicology and applied pharmacology 168:183–8; doi:10.1006/taap.2000.9036.

US EPA. 2010. Development of a relative potency factor (RPF) approach for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. In support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS).

US EPA. 2006. Organophosphorus Cumulative Risk Assessment - 2006 Update.

US EPA. 2005. Toxicological review of n-hexane. In support of summary information on the integrated risk information (IRIS). EPA/635/R–03/012.

Vale C, Fonfra E, Bujons J, Messeguer A, Rodrguez-Farr E, Suol C. 2003. The organochlorine pesticides γ-hexachlorocyclohexane (lindane), α-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABAA and glycine-gated chloride channels in primary

cultures of cerebellar granule cells. Neuroscience 117:397–403; doi:10.1016/S0306-4522(02)00875-8.

Viberg H, Lee I. 2012. A single exposure to bisphenol A alters the levels of important neuroproteins in adult male and female mice. Neurotoxicology 33:1390–5; doi:10.1016/j.neuro.2012.09.002.

Weschler CJ, Nazaroff WW. 2008. Semivolatile organic compounds in indoor environments. Atmospheric Environment 42:9018–9040; doi:10.1016/j.atmosenv.2008.09.052.

Wignall J a, Shapiro AJ, Wright F a, Woodruff TJ, Chiu W a, Guyton KZ, et al. 2014. Standardizing benchmark dose calculations to improve science-based decisions in human health assessments. Environmental health perspectives 122:499–505; doi:10.1289/ehp.1307539.

Wolansky MJ, Gennings C, Crofton KM. 2005. Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 89:271–7; doi:10.1093/toxsci/kfj020.

Yoneda T, Hiroi T, Osada M, Asada A, Funae Y. 2003. Non-genomic modulation of dopamine release by bisphenol-A in PC12 cells. Journal of Neurochemistry 87:1499–1508; doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02131.x.

Yu K, He Y, Yeung LWY, Lam PKS, Wu RSS, Zhou B. 2008. DE-71-induced apoptosis involving intracellular calcium and the Bax-mitochondria-caspase protease pathway in human neuroblastoma cells in vitro. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 104:341–51; doi:10.1093/toxsci/kfn088.

Zhang H, Li X, Nie J, Niu Q. 2013. Lactation exposure to BDE-153 damages learning and memory, disrupts spontaneous behavior and induces hippocampus neuron death in adult rats. Brain research 1517:44–56; doi:10.1016/j.brainres.2013.04.014.

Table I - Indoor Semi Volatile Organic Compounds (SVOCs) candidates for grouping (detected in more than 10% of the French dwellings investigated).

Chemical Family	Name
Phthalates	DEHP, DEP, DBP, BBP, DiBP, DiNP, DMP
Polybromodiphenyl ethers (PBDEs)	BDE-28, BDE-47, BDE-85, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, BDE-209
Polychlorobiphenyls (PCBs)	PCB-28, PCB-31, PCB-52, PCB-77, PCB-101, PCB-105, PCB-118, PCB-138, PCB-153, PCB-180
Polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs)	acenaphtene, anthracene, benzo(a)pyrene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(k)fluoranthene, benzo(b)fluoranthene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, dibenzo(a,h)anthracene
Pesticides	4',4-DDE, 4',4-DDT, dieldrine, alpha-endosulfan, lindane, chlorpyrifos-ethyl, diazinon, cyfluthrine, cypermethrine, deltamethrine, permethrine, oxadiazon, tributylphosphate
Others	4-tert-butylphenol, 4-tert-octylphenol, bisphenol A, galaxolide, tonalide, triclosan

Based on Mandin et al., 2014a; Mandin et al., 2014b; Blanchard et al., 2014

Table II - Available data on in vitro neurotoxic effect for the 15 Semi Volatile Organic Compounds (SVOCs) retained for BMD calculations

SVOC	Cell line	Duration of exposure (hours)	Test	Tested doses (µM)	Response (standard deviation) (%)	Reference
DEHP[#]	Neuro-2a	24	MTT	0 0.1 1 10 40 80	100 (0) 101.54 (2.67) 103.08 (8) 92.31 (5.33) 56.15* (21.3) 42.31* (5.33)	(Lin et al. 2011)
BDE-47[#]	SK-N-MC	24	MTT	0 1 2.5 5 10 15 25 50	100 (6.25) 95 (3.75) 100 (5) 78.75* (5) 53.75* (8.125) 35.25* (7.5) 12.5* (3.125) 5* (1.25)	(Tagliaferri et al. 2010)
BDE-99[#]	SK-N-MC	24	MTT	0 1 5 10 20 30 40 50 100	100 (9.375) 97.5 (6.25) 95 (8.75) 85* (6.25) 72.5* (10) 52.5* (12.5) 45* (7.5) 30* (6.25) 17.5* (4.375)	(Tagliaferri et al. 2010)
BDE-209[#]	Neonatal hippocampal neurons of SD rats (PND1)	24	MTT	0 10.43 31.28 52.13	100 (13.78) 81.03* (11.72) 58.62* (9.31) 45.17* (3,45)	(Chen et al. 2010)

PCB-52[#]	SK-N-MC	24	Trypan Blue	0 17.12 34.25 51.37 68.49 85.62	100 (0) 93.15 (1.61) 68.55* (3.63) 54.03* (4.03) 18.15* (2.02) 12.10* (0.46)	(Lee et al. 2005)
PCB-77[#]	Primary cortical cells of Wistar rats (GD 17-18)	5	MTT	0 30 50 100	100 (5.61) 72.95* (9.80) 60.38* (8.87) 46.86* (7.94)	(Sánchez-Alonso et al. 2003)
PCB-118[#]	GT1-7	24	CellTiter -Blue	0 0.1 1 10 100	100 (2,31) 67.47* (1.03) 69.27* (0.77) 69.88* (0.26) 63.26* (1.03)	(Dickerson et al. 2009)
PCB-153[#]	GT1-7	24	CellTiter -Blue	0 0.1 1 10 100	100 (1.54) 74.84* (1.03) 84.54* (0.77) 61.20* (0.51) 43.03* (2.05)	(Dickerson et al. 2009)
B(a)P[&]	Primary cortical cells of SD rats (PND 0-3)	40	CCK-8	0 0.5 1 2 5 10 20 40 80	100 (2.43) 94.77 (4.05) 94.25 (3.51) 90.29* (2.70) 86.46* (3.24) 80.48* (2.70) 74.56* (6.49) 67.37* (5.41) 59.58* (6.76)	(Nie et al. 2014)
BPA[#]	HT-22	24	MTT	0 1 10 50 100 500	100 (12.59) 154.55 (48.81) 210 (124.40) 308.18* (70.86) 217.27* (29.91) 27.27* (15.74)	(Lee et al. 2008b)

Dieldrin[#]	N27	48	MTT	0 10 25 50 75 100	100 (5.33) 82.75 (5.77) 65.26* (9.77) 37.30* (8.00) 23.55* (7.10) 12.12* (10.22)	(Sharma et al. 2010)
Lindane[#]	N27	48	MTT	0 10 25 50 75 100	100 (1.33) 99.49 (2.67) 92.05 (4.00) 87.95 (7.10) 81.03* (3.55) 79.49* (8.44)	(Sharma et al. 2010)
Diazinon[#]	PC12	48	MTS	0 100 200 300 400	100 (1.84) 91.32* (2.77) 79.62* (2.77) 75.47* (0.47) 67.92* (0.93)	(Bahrami et al. 2013)
Chlorpyrifos-ethyl[#]	SH-SY5Y	24	MTS	0 25 50 100 200	100 (0) 91.25* (7.27) 72.50* (10.62) 54.50* (10.62) 32.75* (10.06)	(Ki et al. 2013)
Deltamethrine[#]	SH-SY5Y	24	MTT	0 0.01 0.1 1 10 100 1000	100 (9.26) 105.10 (1.99) 99.38 (7.94) 93.13 (11.25) 76.57* (9.93) 62.19* (7.27) 43.13* (5.95)	(Romero et al. 2012a)

** Results differ significantly from the control*

[#] Data was obtained by manual measures conducted on the graphics directly

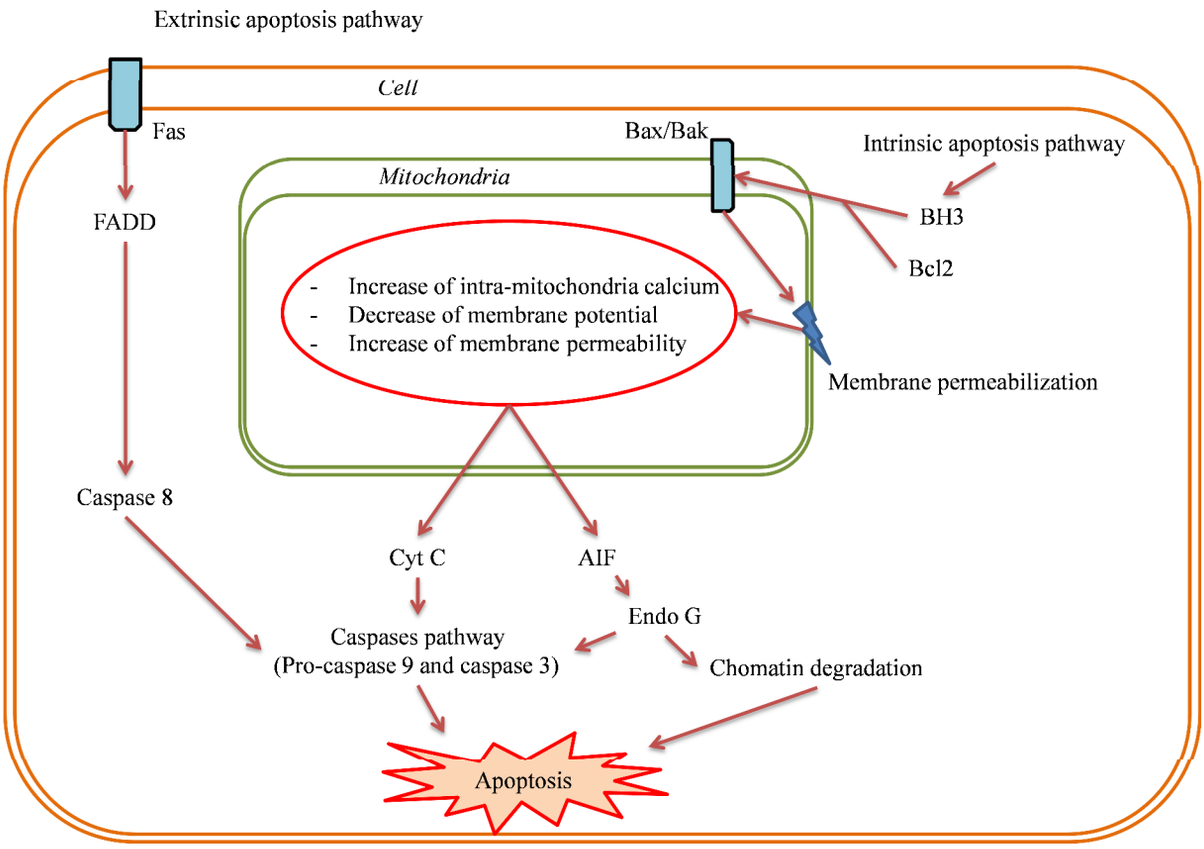
[&] Treated with S9 in order to metabolize the parent compound

MTT: Mitochondrial functionality test based on formazan product formation insoluble in water; MTS: Mitochondrial functionality test based on formazan product formation soluble in water; CCK-8: Commercial kit of the MTS test; CellTiter-Blue: Commercial kit of the resazurin test; Trypan Blue: Membrane integrity test; SD: Sprague Dawley; GD: Gestational day; PND: Post-natal day; GT1-7: Hypothalamic cells of mice; HT-22: Hippocampal cells of mice; N27:Dopaminergic cells of rats; Neuro-2a: Neuroblastoma cells of mice; PC12: Pheochromocytoma cells of rats; SH-SY5Y: Human neuroblastoma cells; SK-N-MC: Human neuroblastoma cell

Table III - BMD_{10} of the 13 Semi Volatile Organic Compounds (SVOCs) ultimately selected, on the basis of in vitro neuronal death

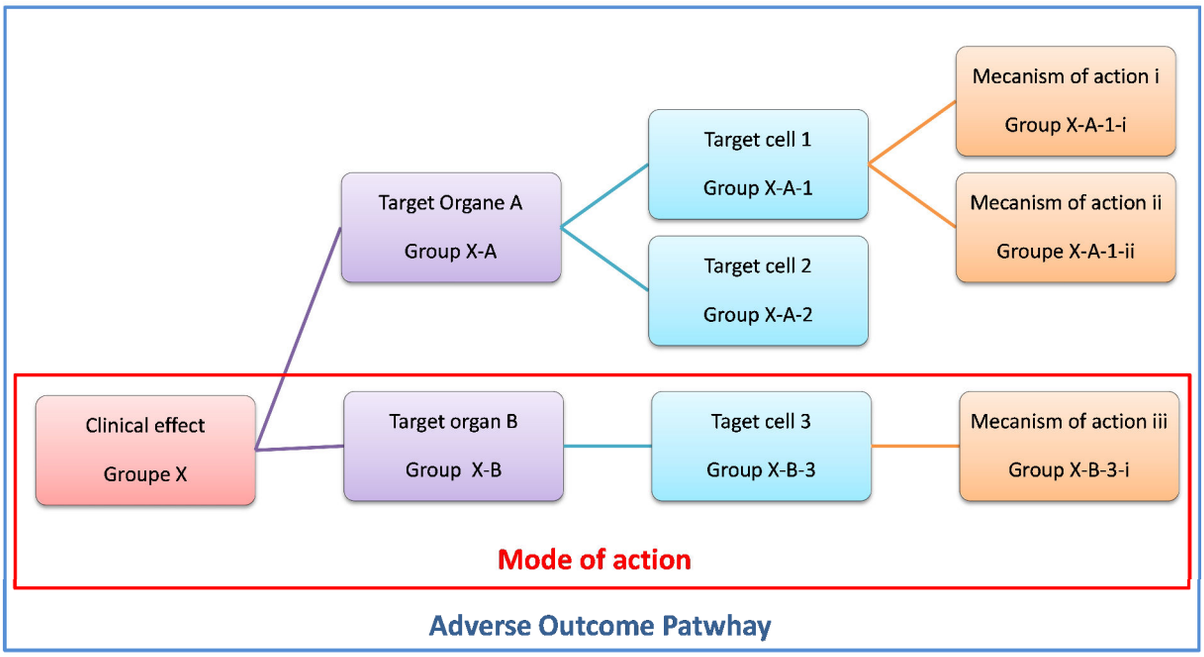
SVOC	Number of Hill parameters	BMD_{10} (μM)
PCB-153	3	0.072
Deltamethrine	3	2.00
B(a)P	4	2.43
BDE-47	4	4.83
BDE-209	2	4.84
BDE-99	3	6.80
PCB-77	2	9.54
DEHP	4	10.64
Dieldrin	3	15.54
Chlorpyrifos-ethyl	3	20.09
Lindane	2	38.93
PCB-52	4	39.89
Diazinon	2	94.35

Figure 1: The main mitochondrial pathways for cell death (inspired from (Davis and Williams 2012))



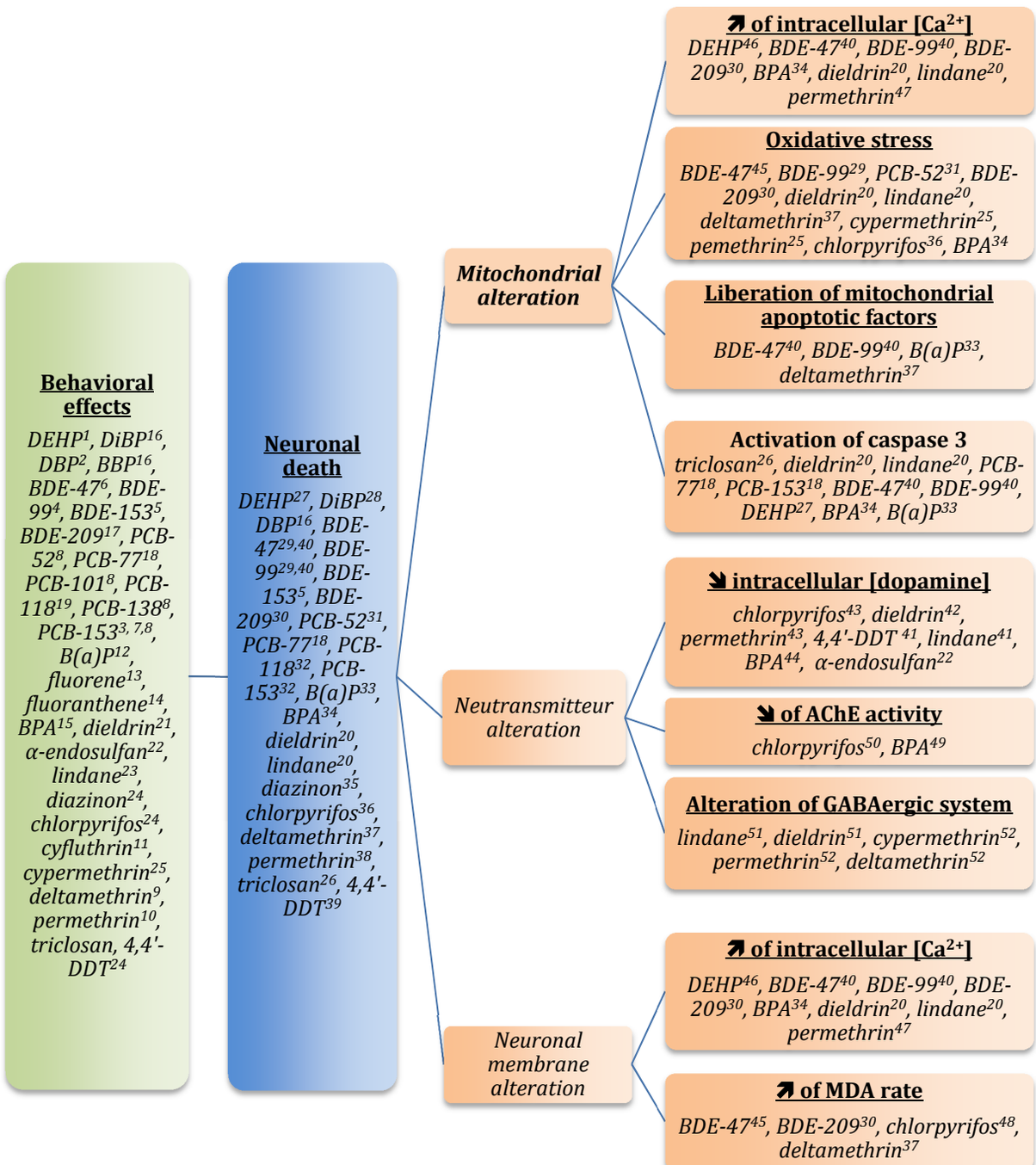
Bax: proapoptotic Bcl-2-associated X protein; Bak: Bcl-2 homologous antagonist killer; BH3: proapopotoic Bcl-2 family members; Endo G: endonuclease G; FADD: FAD domain protein; Cyt C: cytochrome C; Fas: transmembrane receptor

Figure 2: Modes of action (MOAs) structured in adverse outcome pathway (AOP)



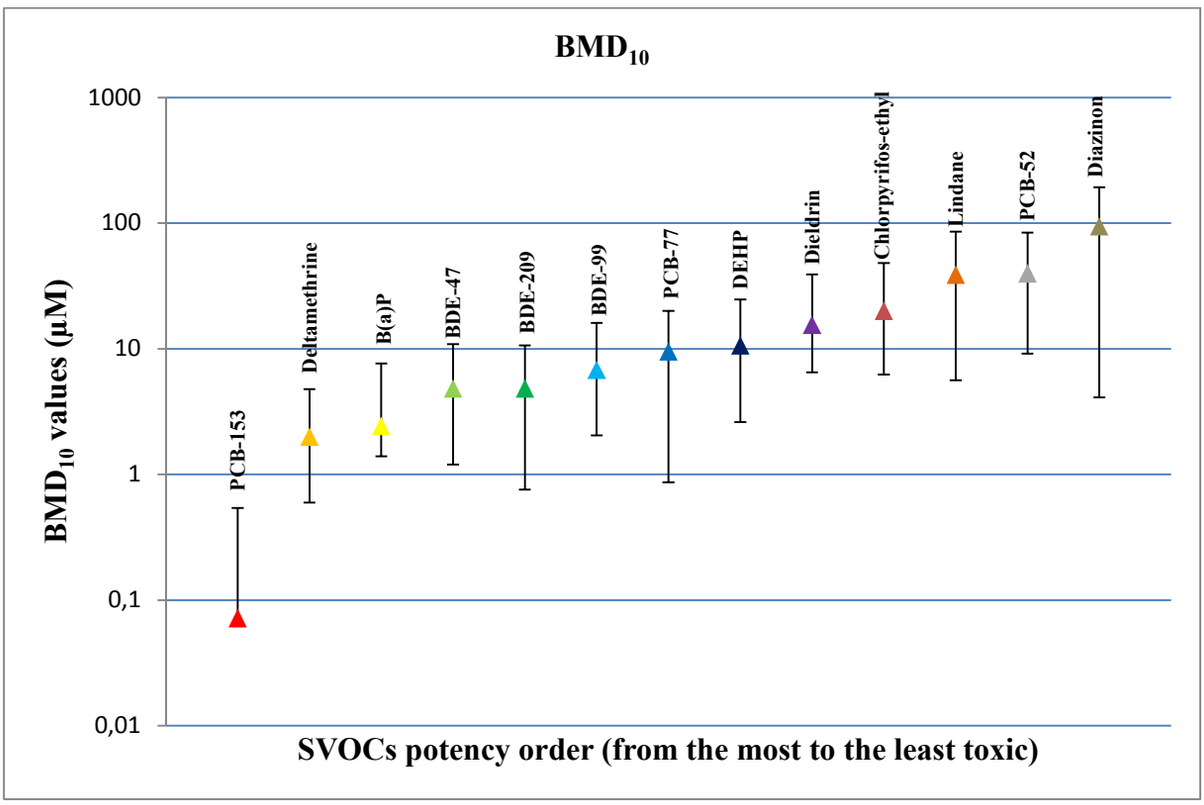
Each group represents a key event. In AOP, the clinical effect is the adverse outcome.

Figure 3 -Adverse outcome pathway of 29 indoor semi volatile organic compounds (SVOCs) on the nervous system., adapted from (Fournier et al. 2014a).



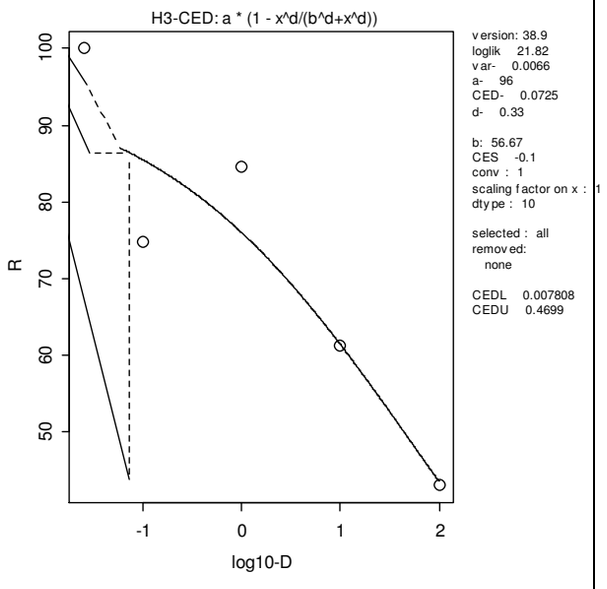
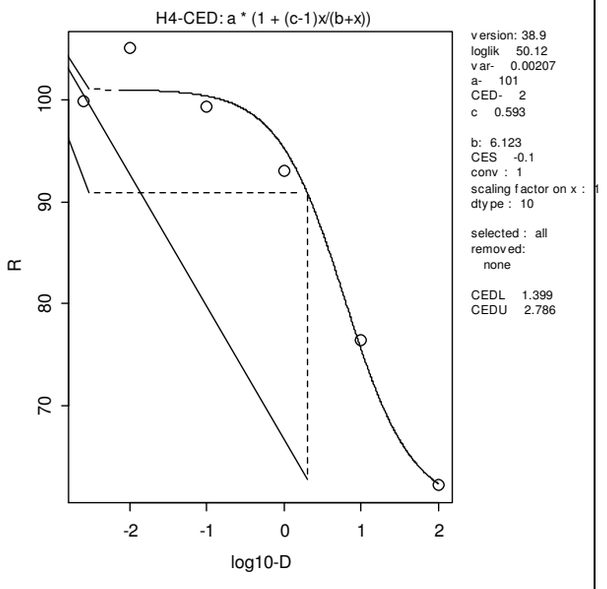
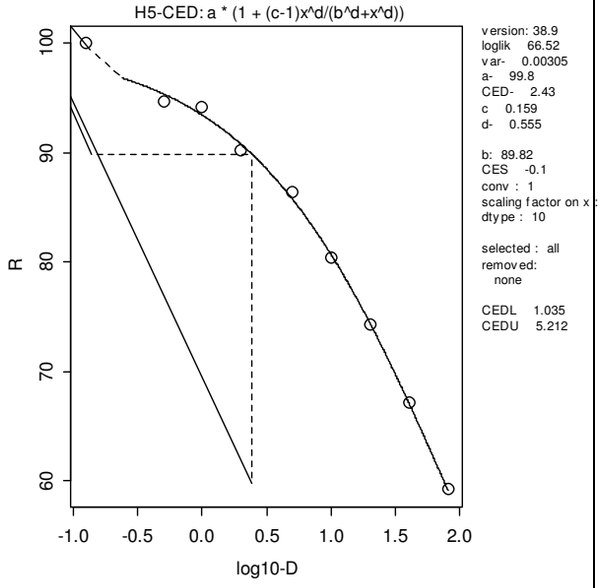
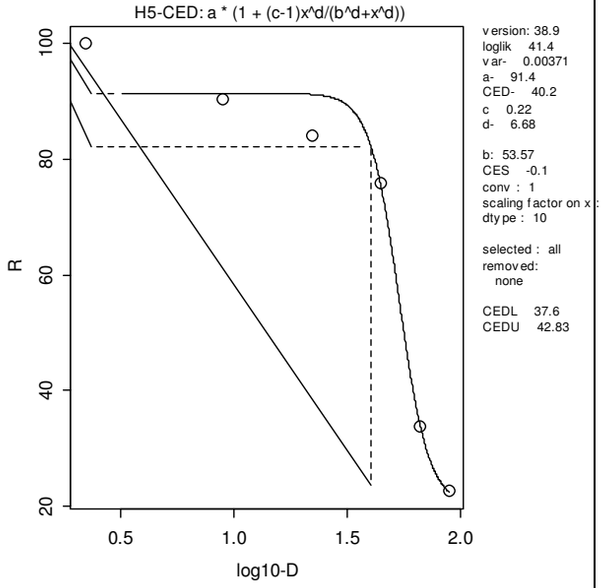
[1](Chopra et al. 2014); [2](Li et al. 2013); [3](Lynch et al. 2012); [4](Blanco et al. 2013); [5](Zhang et al. 2013); [6](Ta et al. 2011); [7](Johansen et al. 2014); [8](Elnar et al. 2012); [9](Chen et al. 2012); [10](Nasuti et al. 2012); [11](Soni et al. 2011); [12](Cheng et al. 2013); [13](Peiffer et al. 2013); [14](Saunders et al. 2003); [15](Viberg and Lee 2012); [16](Holahan and Smith 2015); [17](Dingemans et al. 2011); [18](Sánchez-Alonso et al. 2003); [19](Kuriyama and Chahoud 2004); [20](Sharma et al. 2010) ; [21](Kitazawa et al. 2001) ; [22](Lakshmana and Raju 1994) ; [23](Johri et al. 2008) ; [24](Burns et al. 2013) ; [25](Nasuti et al. 2007) ; [26](Szychowski et al. 2015) ; [27](Lin et al. 2011) ; [28](Ma et al. 2013) ; [29](Tagliaferri et al. 2010) ; [30](Chen et al. 2010) ; [31](Lee et al. 2005) ; [32](Dickerson et al. 2009) ; [33](Nie et al. 2014) ; [34](Lee et al. 2008b) ; [35](Bahrami et al. 2013) ; [36](Ki et al. 2013) ; [37](Romero et al. 2012b) ; [38](Elwan et al. 2006) ; [39](Kajta et al. 2014) ; [40](Yu et al. 2008) ; [41](Faro et al. 2009) ; [42](Kitazawa et al. 2001) ; [43](Karen et al. 2001) ; [44](Yoneda et al. 2003) ; [45](He et al. 2008) ; [46](Tully et al. 2000) ; [47](Meyer and Shafer 2006) ; [48](Jin et al. 2015) ; [49](Fan et al. 2013) ; [50](Farag et al. 2010) ; [51](Vale et al. 2003) ; [52](Eshleman and Murray 1991)

Figure 4: Comparable $BMDs_{10}$ for 12 indoor SVOCs.

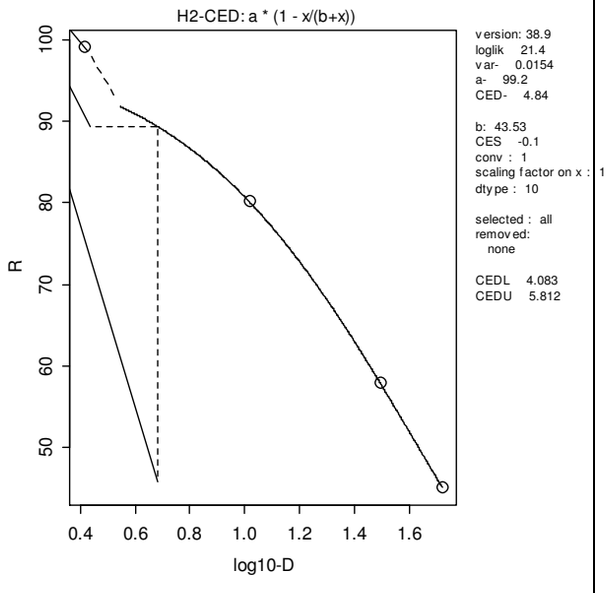


Each BMD in represented by a triangle, BMDL is under BMD and BMDU is above.

Supplementary data

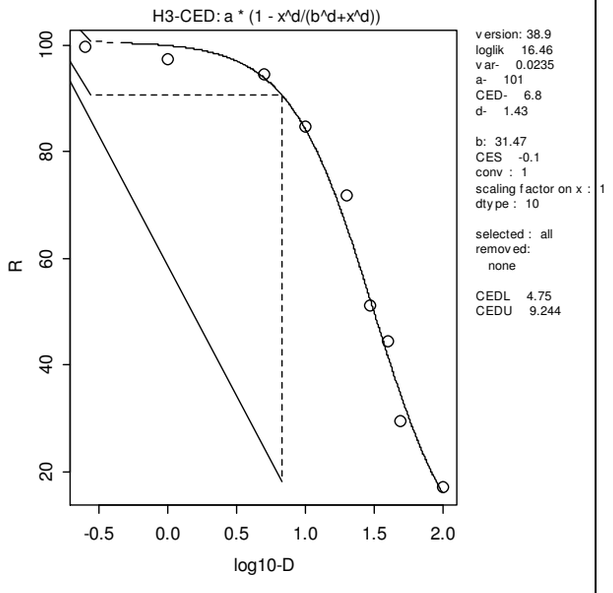
PCB-153	Delthametrin
	
a= 96	a= 101
B[a]P	**BDE-47**
	
a= 99.8	a= 91.4

BDE-209



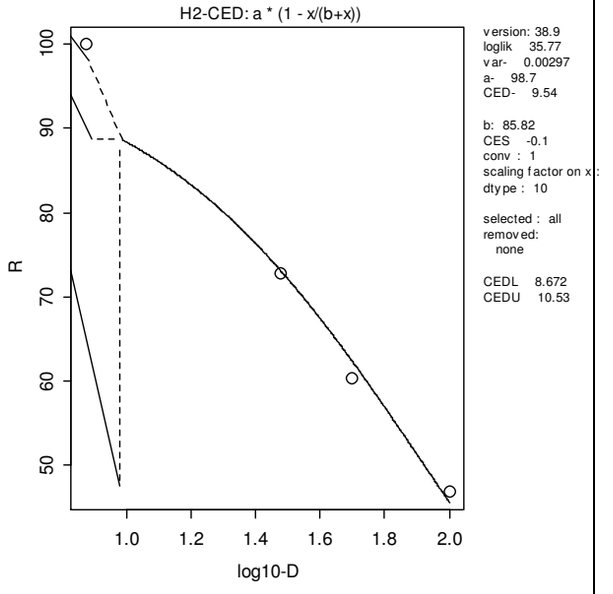
a= 99.2

BDE-99



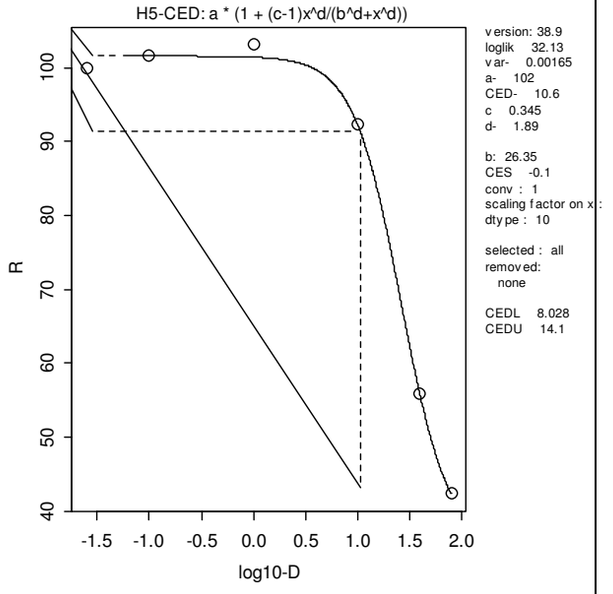
a= 101

PCB-77

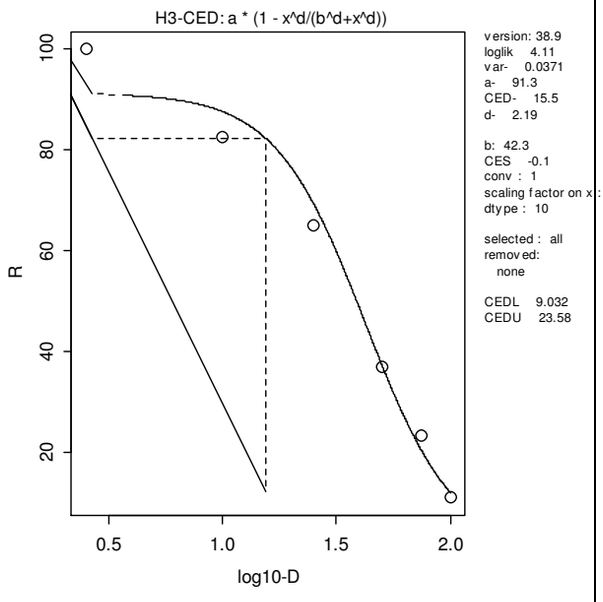
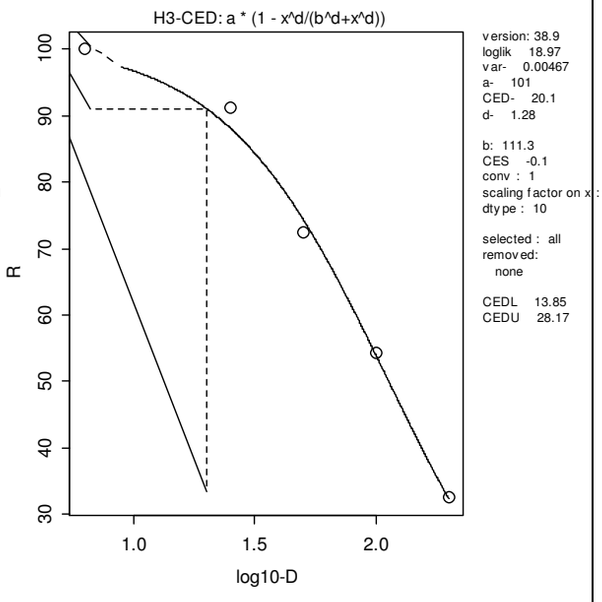
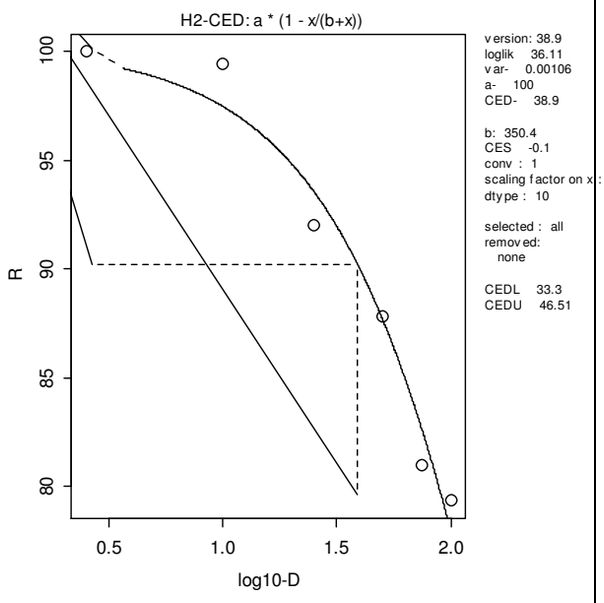
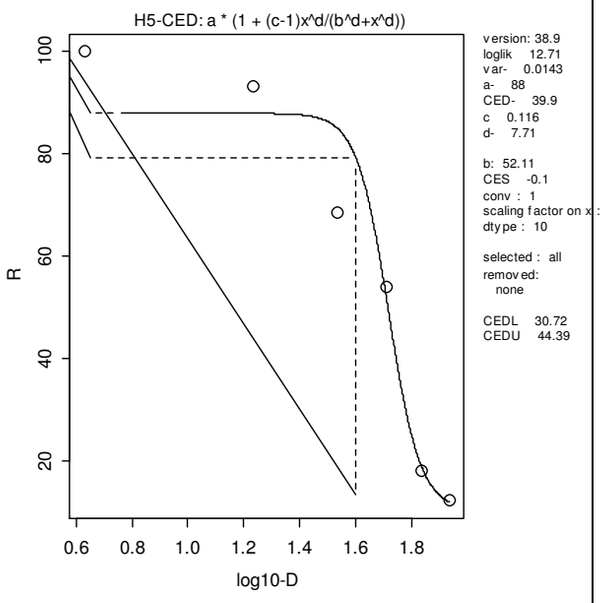


a= 98.7

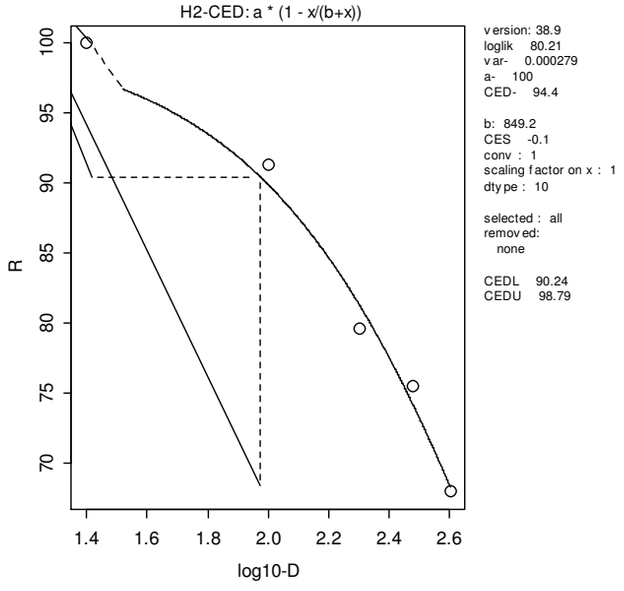
DEHP



a= 102

Dieldrin	Chlorpyrifos
	
a= 91.3	a= 101
Lindane	**PCB-52**
	
a= 100	a= 88

Diazinon



a= 100

Where “a” is the graphical control value.

DISCUSSION GENERALE

1. Une approche novatrice et réaliste : les atouts de la méthode

Si depuis des millénaires les substances chimiques font partie du quotidien de l'être humain, l'étude de leurs effets sur son organisme est une préoccupation récente. Les méthodologies d'évaluation des risques mises en place par la communauté scientifique depuis le 20^{ième} siècle n'ont de cesse d'évoluer. Les travaux entrepris et réalisés durant cette thèse de doctorat ont permis de :

1. Développer une méthodologie de regroupement de composés de familles chimiques et d'usages différents en fonction de leurs effets communs, à différentes échelles d'un organisme.
2. Développer une méthodologie de calcul d'indicateurs de toxicité (individuels et cumulés) comparables sur la base de données de contaminations réelles et représentatives d'une situation française
3. Construire des indicateurs de toxicité comparables en utilisant les données de toxicité publiées dans la littérature. Ainsi, ont pu être calculés 6 indicateurs de toxicité individuels (BMD) et cumulés (RPF) pour le système reproducteur, sur la base de données *in vivo* mesurant la diminution de la concentration sérique de testostérone chez des rats mâles adultes chroniquement exposés par voie orale et 13 indicateurs de toxicité individuels (BMD) pour le système nerveux, sur la base de données *in vitro* de mort neuronale.

Ces indicateurs seront un des éléments clés permettant au projet général ECOS de répondre à son objectif : l'évaluation des risques sanitaires cumulés multivoies. En outre ces travaux ont été réalisés grâce au rapprochement de disciplines différentes mais complémentaires : la toxicologie, l'évaluation des risques, les statistiques et la modélisation de données.

2. Les limites de l'approche

Bien que cette démarche soit novatrice et permette le calcul d'indicateurs de toxicité comparables, utilisables en évaluation des risques cumulés, elle est dépendante des données publiées dans la littérature scientifique. Les principales limites de cette démarche découlent donc directement du fait qu'elle soit dépendante de ces données. En effet, dans les deux cas où elle a été appliquée (système reproducteur et système nerveux), les mêmes contraintes ont été notées. Elles sont décrites ci-dessous.

2.1.La disponibilité des données

Dans les deux cas pratiques, plus de la moitié des COSV détectés dans plus de 10 % des logements ont été écartés de l'étude car ils n'avaient pas été documentés comme repro- ou neurotoxiques. Cette absence de données ne signifie pas forcément qu'ils n'agissent pas sur ces systèmes mais qu'actuellement, soit leur toxicité sur ces derniers n'a pas encore été testée, soit que les études mises en œuvre n'ont pas encore permis de la mettre en évidence. De plus, les données brutes des articles publiés étaient rarement disponibles (dans les articles et même après avoir contacté les auteurs concernés). Cette limite participe grandement aux incertitudes des calculs car dans presque tous les cas, les résultats des tests conduits par les auteurs des articles (valeurs et écarts-types) ont été mesurés graphiquement. Ces éléments conduisent à recommander une présentation des résultats des données toxicologiques plus complète associant le nombre d'animaux, les médianes et/ou moyennes des réponses mesurées, les écarts types, minimum, maximum, etc.

2.2.La comparabilité des données

Dans les deux études de cas, les études n'étaient pas parfaitement comparables en termes d'espèces, de cellules testées, d'âge des animaux, de fenêtres d'exposition, de durées et de voies d'exposition et de gammes de doses testées.

Spécifiquement pour la construction des indicateurs neurotoxiques où le calcul d'indicateurs de toxicité cumulés n'a pu être conduit. En effet, les données *in vitro* extraites de la littérature différaient en termes d'espèces, de tests de viabilité cellulaire, de lignées cellulaires, de fenêtre et de durée d'exposition. Les données toxicologiques utilisées doivent être *a minima* comparables du fait que les RPF estiment la puissance des composés les uns par rapport aux autres pour un même effet. Ainsi pour ce groupe de composés, c'est la démarche PODI qui est proposée pour l'évaluation des risques cumulés. Cette démarche permet en effet plus de flexibilité quant aux données brutes en termes de précision des effets et de comparabilité des données.

De plus, ce manque de comparabilité induit également un biais dans la modélisation des relations dose-réponse et donc dans le calcul des indicateurs de toxicité. En effet, PROAST utilise différents modèles de Hill utilisant 2 à 4 paramètres selon les données brutes fournies, afin de modéliser aux mieux la courbe dose-réponse. En fonction du nombre de paramètres, l'allure des courbes peut changer et donc également la valeur des BMD qui en découlent. Le choix du modèle s'ajustant le mieux aux données fournies s'est fait grâce au test du rapport de vraisemblance (influence de l'ajout d'un paramètre sur la modélisation de la relation dose-réponse). Les modèles proposés par ce test étaient dépendants des jeux de données fournies, différents en fonction des composés. Les modèles n'avaient donc pas le même nombre de paramètres. L'allure des courbes tracées était ainsi différente en fonction des jeux de données disponibles.

Dans le meilleur cas, le calcul d'indicateurs de toxicité, en particulier pour les RPF, doit être fait à partir de données provenant d'un même laboratoire, testant différents composés sur le même matériel (lignées cellulaires ou animaux), utilisant les mêmes protocoles expérimentaux en termes de voies, durées d'exposition, fenêtre de vulnérabilité, espèces et souches, et dans des gammes de doses comparables.

2.3.Propriétés physico-chimiques des composés

Les COSV sont des contaminants de familles chimiques très différentes ayant donc des propriétés physico-chimiques variées. Dans l'étude de cas sur les effets neurotoxiques des COSV, nous avons souligné que cette différence de caractéristiques chimiques pouvait conduire à une distorsion des puissances relatives de ces composés. En effet, les polluants bio-accumulables ou persistants dans l'organisme auraient potentiellement une « BMD-chronique » plus faible que celle obtenue sur la base d'une étude *in vitro* à court terme puisque les niveaux d'imprégnation sont d'autant plus élevés que les durées d'exposition sont longues.

De plus, ces différents COSV ne sont pas métabolisés de la même manière. Les essais toxicologiques *in vitro* sont plus souvent réalisés avec les composés parents, ce qui ne permet pas de prendre en compte la toxicité réelle des métabolites lorsque l'on veut construire des indicateurs de toxicité cumulés sur la base de données *in vitro*. Pourtant, la métabolisation d'un composé peut conduire à la production de plusieurs métabolites toxiques (parfois plus toxiques même que le composé parent) (Macherey and Dansette 2008). Pour autant, les avantages des études *in vitro* sont nombreux en EQRS. Elles permettent de générer en peu de temps de nombreuses données de toxicité à moindre coût et donc de générer des données sur de nombreux contaminants, facilitant la mise en place de stratégies d'évaluation des mélanges. En revanche,

les résultats des études *in vitro* devraient aujourd'hui être complétés par l'étude de la toxicité des principaux métabolites connus pour ces composés.

2.4.Le calcul des benchmark doses

Pour le calcul des BMD, un certain nombre de limites ont été identifiées à différentes étapes clés de leur construction, à savoir le choix de la réponse et le choix du logiciel. Dans le cas du choix du logiciel, il a été possible de réaliser une analyse de sensibilité en comparant les BMD calculées avec plusieurs logiciels. Cette analyse est présentée dans le chapitre suivant. Va être discuté ici, le choix de la réponse.

Dans l'idéal, le niveau de réponse (BMR) retenu équivaut au niveau de réponse néfaste, qui est le niveau de variation par rapport au contrôle conduisant à un effet néfaste. Dans les faits, il est très difficile d'estimer ce niveau et donc il faut choisir une méthode permettant de s'en approcher. Dans ce type d'incertitudes, il est recommandé de retenir une BMR égale à un écart-type (EC) de la réponse contrôle (US EPA 2012). Bien qu'un jugement d'experts puisse être nécessaire dans le choix de la réponse quant aux caractéristiques statistiques et biologiques des données (US EPA 2012), il est important de standardiser la méthodologie de calcul de BMD afin de faciliter leur comparaison (Wignall et al. 2014). Dans le cas du groupe de COSV reprotoxiques, nous étions dans ce type d'incertitudes et le choix d'une BMR égale à un EC de la réponse contrôle a été fait. Cependant, les données brutes et donc les EC étant très différents selon les COSV, le choix d'appliquer la même BMR à tous les COSV a été pris. Ainsi, les écarts-types des réponses contrôles les plus et les moins importants (respectivement BBP, EC=46 %, arrondi à 50 % et BPA, EC=10%) du groupe ont été retenus. Ce choix nous a permis d'obtenir des BMD_{10} et des BMD_{50} pour chacun des composés. Ont ainsi pu être comparés la toxicité et l'ordre de puissance des COSV à ces deux niveaux de réponses. Les jeux de données brutes, la toxicité propre à

chaque composé pour un effet déterminé et donc l'allure des courbes étant différentes, l'ordre des puissances peut varier dans un même groupe de COSV en fonction de la BMR retenue. Dans le groupe de COSV reprotoxiques, l'ordre a effectivement changé en fonction de la BMR retenue. Le BPA, composé le plus toxique du groupe pour une BMR de 10 %, s'est retrouvé moins toxique que le B[a]P pour une BMR de 50 %. Ce changement d'ordre de puissance et donc de valeurs des RPF n'a été observé que pour le BPA. Ce phénomène peut être expliqué par la grande différence observée dans les gammes de doses testées entre les COSV et la possibilité d'une relation dose-réponse non monotone, qui serait visible ici uniquement pour le BPA, car seul à avoir été testé à de très faibles doses. En effet, les résultats des études expérimentales relatives à une association entre exposition au BPA et diminution de testostérone sont assez discordants en fonction des schémas d'étude (Peretz et al. 2014). Les faibles doses de BPA (2,4 µg/kg/j) auraient pour effet une diminution du niveau de testostérone chez le rat adulte comme montré dans les études de D'Cruz et al. (2012) ou Akingbemi et al. (2004) mais cet effet n'est pas toujours observé à plus forte dose lors d'exposition pré- ou périnatales (Peretz et al. 2014). Cette relation non monotone a été identifiée dans de nombreuses études (Vandenberg 2014). Mais cette différence pourrait également être liée à la moindre qualité des données d'entrée. En effet, dans l'étude de D'Cruz, on peut s'interroger sur les valeurs des EC à la moyenne des concentrations de testostérone, qui apparaissent particulièrement faibles (4 à 10 % contre environ 30 % pour les autres COSV). La valeur de l'EC retenu pouvant modifier l'allure de la courbe et donc la valeur de la BMD, son impact sur la valeur de nos indicateurs va être testé dans une analyse de sensibilité. Dans ce type de calcul, il est donc important de préciser et de justifier le choix des BMR, dans le cas où ce dernier diffèrerait des recommandations (10 % du contrôle pour des valeurs dichotomiques, 1 EC de la réponse contrôle pour valeurs continues) (Wignall et al. 2014).

3. Analyses de sensibilité

Dans cette section, va être testée l'influence de différents choix méthodologiques sur le calcul des indicateurs de toxicité, à savoir : choix du logiciel, de l'écart-type, du modèle mathématique, de la fenêtre d'exposition des animaux et du modèle d'étude (*in vitro* versus *in vivo*).

3.1.Choix du logiciel pour le calcul de BMD

Après avoir extrait les données brutes des articles retenus pour chacun des COSV d'intérêt, la première difficulté rencontrée a été le choix du logiciel de calcul de BMD à utiliser. Deux logiciels sont disponibles en libre accès sur internet: PROAST, développé par le RIVM, et BMDS, développé par l'US EPA. Ainsi, pour réaliser une analyse de sensibilité sur le choix du logiciel, les BMD et RPF des 6 COSV reprotoxiques ont été testés avec BMDS et comparés avec ceux obtenus avec PROAST (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Comparaison des résultats des calculs de BMD et RPF entre PROAST et BMDS pour une diminution de 10% de la testostérone en utilisant le modèle de Hill.

COSV	BMD_{10} PROAST (mg/kg/j)	BMD_{10} BMDS (mg/kg/j)	RPF_{10} PROAST	RPF_{10} BMDS
B[a]P	0.0034	0.0083	1597	587.95
BPA	7.72E-07	0.010	7033679	488
DEP	0.24	0.17	22.63	28.71
DEHP	5.04	18.39	1.08	0.27
Cyperméthrine	*5.43*	*4.88*	*1*	*1*
BBP	57.34	89.22	0.095	0.055

Excepté pour le BPA, les résultats obtenus avec BMDS sont du même ordre de grandeur qu'avec PROAST (un facteur 5 maximum). Le choix du logiciel n'influence donc pas de manière

significative les calculs de BMD. Cependant, le calcul de RPF permet de constater qu'avec BMDS, le DEHP apparait près de 4 fois plus toxique que la cyperméthrine alors qu'avec PROAST leurs toxicités étaient équivalentes. Dans le cas du BPA, les données recueillies dans la littérature montraient une toxicité très importance de ce composé à de faibles concentrations. La courbe ainsi modélisée avait une pente très importante. Avec PROAST, la BMD_{10} du BPA avait une valeur très faible et donc un RPF_{10} très important au regard des autres composés. Ces résultats laissaient à penser que le BPA était beaucoup plus toxique à faibles doses que les autres COSV. Cependant la différence des valeurs de BMD obtenues avec les deux logiciels serait plutôt en faveur d'un problème de modélisation lié au jeu de données. Il est donc difficile d'interpréter la BMD et le RPF du BPA au regard des autres composés. Les deux logiciels ont leurs avantages et leurs inconvénients mais les différences les plus importantes sont :

- Le nombre de modèles testés : pour des données continues, BMDS teste 5 types de modèles (exponentiel, Hill, linéaire, polynomiale et puissance), alors que PROAST teste 2 types de modèles (exponentiel et Hill). Néanmoins, ces différences ne sont pas à l'origine de l'écart observé pour le PBA étant donné que l'analyse de sensibilité a été faite uniquement avec le modèle de Hill ;
- Le choix du meilleur modèle : BMDS se base principalement sur le critère d'Akaike (on retient le modèle ayant le critère d'Akaike le plus faible) alors que PROAST se base sur le test des rapports de vraisemblances des modèles pris deux à deux (log likelihood ratio test où on retient le modèle ayant la vraisemblance la plus proche du modèle de référence)

En comparaison avec BMDS, PROAST semble donner des résultats de BMD plus faibles (Tableau 4), ce qui est plus conservateur et donc recommandé dans le cas d'évaluation des risques, en situation d'incertitude.

3.2.Influence de l'écart type sur le calcul de benchmark doses

Dans le groupe de COSV reprotoxiques, les indicateurs de toxicité calculés pour le BPA sont discutables, en particulier en raison des données brutes extraites d'une étude de la littérature, celle de D'Cruz et al. Cette étude était la seule disponible, répondant à nos critères méthodologiques et permettant le calcul de BMD. Au vu de la suspicion des effets anti-androgéniques du BPA, il a été préférable de retenir cette étude en soulignant cependant ses limites, à prendre en considération lors de l'utilisation de ces indicateurs de toxicité.

En particulier, dans cette étude, les EC étaient particulièrement faibles comparés à ces ceux des autres composés du groupe (4 à 10 % contre 26,4 arrondi à 30 % en moyenne pour les autres composés). L'allure des courbes doses-réponses tracées par PROAST étant dépendante de paramètres comme l'EC, une analyse de sensibilité a donc été réalisée afin de comparer les valeurs des BMD_{10} et BMD_{50} du BPA avec celles estimées à partir d'un EC théorique équivalent à la moyenne des EC des autres composés du groupe (soit 30 %).

Ainsi, un écart type de 30 % a été appliqué pour chaque réponse mesurée par D'Cruz. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le **Tableau 55**.

Tableau 5 : Influence de l'écart-type sur le calcul de BMD et RPF : Exemple du BPA.

	BMD_{10} (mg/kg/j)	**BMD_{50} (mg/kg/j)**	**RPF_{10}**	**RPF_{50}**
EC documenté	7.72E-07	0.27	7033679	181
EC 30%	0.0471	0.424	115.33	115.33

Ce changement d'EC conduit à des modifications notables de valeur de la BMD_{10}. En effet, pour une réponse de 10 %, on retrouve un facteur 100 000 entre les valeurs de BMD calculées avec les EC documentés et un EC de 30 %. Pour une réponse de 50 %, les BMD calculées sont du même

ordre de grandeur. Cette différence se retrouve dans le calcul de RPF. Pour une réponse de 10 %, en utilisant un EC de 30 %, le RPF_{10} tombe à 115.33 (contre 7033679 avec les EC documentés). Avec ces nouvelles valeurs, le BPA, devient le deuxième composé le plus toxique, derrière le B[a]P (RPF_{10}= 1597), dès une réponse de 10 %. L'influence des EC est donc majeure et peut radicalement changer la puissance calculée d'un composé. Il est donc nécessaire d'utiliser les données publiées dans la littérature avec précaution et de garder un œil critique quant aux études sources. Devant ce type d'incertitude, une autre étude testant la toxicité du BPA dans des conditions similaires serait nécessaire pour confirmer ou infirmer ces résultats.

3.3.Influence du choix du modèle

Pour nos calculs de BMD, nous avons fait le choix d'utiliser le logiciel PROAST (contre BMDS) et de ne retenir que les modèles de Hill (contre les modèles exponentiels également calculés par PROAST dans le cas de données continues). En accord avec les experts de l'INERIS, les modèles de Hill ont été préférés aux modèles exponentiels car ils ont été décrits comme des modèles se rapprochant le plus de la réalité des effets biologiques (Levasseur et al. 1998). L'influence de ce choix entre modèles de Hill et modèles exponentiels a été testée et est présentée dans le tableau 6. Pour chaque composé reprotoxique, nous avons comparé les résultats des calculs de BMD_{10} et BMD_{50} obtenus avec les modèles de Hill et les modèles exponentiels. Les résultats de ces comparaisons sont présentés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Comparaison des résultats des calculs de BMD_{10} et BMD_{50} en fonction des modèles de Hill ou exponentiels.

COSV	BMD_{10} Hill (mg/kg/j)	BMD_{10} exponentiel (mg/kg/j)	BMD_{50} Hill (mg/kg/j)	BMD_{50} exponentiel (mg/kg/j)
B[a]P	0.0034	0.0074	0.030	0.011
BPA	7.72E-07	1^{E}-06	0.27	0.14
DEP	0.24	0.12	2.18	2.09
DEHP	5.04	16.88	/	/
Cyperméthrine	5.43	7.64	48.90	72.88
BBP	57.34	81.23	520	534.41

Il n'y a pas de différence notable entre les résultats des calculs de BMD par l'utilisation des modèles de Hill ou exponentiels. Le choix du modèle de Hill dans ces travaux n'a donc pas de répercussions majeures sur les valeurs de nos indicateurs de toxicité.

3.4.Choix de la fenêtre d'exposition : cas des données reprotoxiques

L'exposition de la mère pendant la grossesse à des agents extérieurs peut conduire à des effets néfastes chez l'enfant à naitre. C'est notamment le cas chez les individus mâles où le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS), décrit pour la première fois en 2001 par Skakkebaek et son équipe, est de plus en plus fréquent en raison des expositions aux contaminants environnementaux (Skakkebaek et al. 2001). Durant la période fœtale, la masculinisation est contrôlée par des hormones produites par les testicules fœtaux, notamment par la testostérone (Welsh et al. 2008). Ainsi, l'altération de la production de cette hormone pendant cette période peut conduire à des troubles du développement de l'appareil reproducteur mâle (syndrome TDS regroupant cancer des testicules, diminution de la qualité du sperme, non descente testiculaire et

hypospadias). Welsh et son équipe ont déterminé que pendant cette période, la fenêtre de programmation de la masculinisation se situait entre le 15,5^{ième} jour jusqu'au 19,5^{ième} jour de gestation chez le rat (correspondant à la période entre la 8^{ième} et la 14^{ième} semaine de gestation chez l'homme). L'influence du choix de la fenêtre d'exposition des COSV a été testée en estimant les BMD_{10} et BMD_{50} basées sur des expositions *in utero* chez le rat.

Le choix des études sources a été fait en appliquant la même méthodologie que celle décrite dans les chapitres précédents. Sur les 6 COSV reprotoxiques pour lesquels des BMD ont pu être calculées dans le cas d'une exposition à l'âge adulte, nous avons trouvé, pour 3 d'entre eux, une étude testant leur impact sur la production de testostérone fœtale lors d'une exposition *in utero* (Howdeshell et al. 2008). Dans cette étude, des fœtus de rats SD ont été exposé du 8^{ième} au 18^{ième} jour de gestation à différents phtalates par gavage des rates gestantes. A partir de ces résultats, nous avons pu calculer des BMD pour deux des trois phtalates pour lesquels nous avions des données, le BBP et le DEHP (utilisant le modèle Hill a 3 paramètres) (**Tableau 7**).

Tableau 7 : BMD_{10}, BMD_{50} et RPF correspondant pour 3 COSV agissant sur la testostérone fœtale et adulte.

	BMD_{10} (mg/kg/j)		**BMD_{50} (mg/kg/j)**		**RPF_{10}**		**RPF_{50}**	
	Fœtus	**Adultes**	**Fœtus**	**Adultes**	**Fœtus**	**Adultes**	**Fœtus**	**Adultes**
BBP	266.71	57.37	486.53	520	0.44	0.088	0.93	nd
DEP	nd	0.24	nd	2.18	nd	21	nd	nd
DEHP	116.79	5.04	454.61	nd	1	1	1	nd

nd: BMD non déterminée en raison de l'allure des courbes dose-réponse

Les auteurs ont calculé les BMD_{50} de ces composés en utilisant un autre logiciel de modélisation de courbes dose-réponse (GraphPad). Cependant, leurs résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus avec PROAST. Le DEP ne semble pas diminuer de façon significative la

testostérone fœtale lors d'une exposition *in utero.* Dans l'article source, Howdeshell explique ce phénomène par la structure moléculaire des différents phtalates. En effet, les diesters de phtalate avec 4 à 6 atomes de carbone de longueur et en position *ortho* (par exemple les BBP, DBP, DEHP, DiBP et DPP) inhibent la testostérone fœtale, à l'inverse du DEP.

L'avantage de ces données dose-réponse est qu'elles proviennent de la même étude. Elles sont comparables car ces phtalates ont été testés sur les mêmes animaux, aux mêmes doses, dans le même laboratoire et utilisant le même protocole.

Comparées aux BMD obtenues chez le rat adulte, pour le même effet, les BMD_{10} obtenus chez le rat exposé *in utero* ont des valeurs biens plus grandes : 226.71 mg/kg/j contre 57.34 mg/kg/j chez le rat adulte avec le BBP et 116.79 mg/kg/j contre 5.04 mg/kg/j chez le rat adulte avec le DEHP. A l'inverse, la BMD_{50} obtenue pour le BBP chez le fœtus de rat est comparable à celle obtenue chez l'adulte (486.53 mg/kg/j chez le fœtus contre 520 mg/kg/j chez l'adulte). Au vu de ces résultats, des phtalates comme le BBP semblent être moins toxiques, à un niveau de réponse de 10 %, lors d'une exposition *in utero* chez le fœtus que lors d'une exposition à l'âge adulte. Enfin chez le fœtus, toujours pour une BMR de 10 %, le BBP apparait près de 2 fois moins toxique que le DEHP alors que pour la même BMR chez l'adulte, il apparait près de 10 fois moins toxique que le DEHP. La toxicité de ces composés est donc dépendante non seulement de leur fenêtre d'exposition mais également du niveau de la réponse choisi.

Les deux fenêtres d'exposition comparées sont extrêmement différentes en termes de sensibilité et de vulnérabilité. En effet, bien que le fœtus semble plus vulnérable pendant sa période de développement que l'adulte (forte période de croissance, de nombreuses divisions cellulaires…) (Campion et al. 2012), il est relativement protégé des contaminants extérieurs par différentes

barrières : l'organisme de la mère (métabolisation et élimination des contaminants) et la barrière placentaire (Prouillac and Lecoeur 2010). En outre, les concentrations de contaminants d'exposition fœtale sont différentes des concentrations d'exposition environnementales de la mère. Par exemple, pour les pesticides, Guo et son équipe ont mesuré la différence entre les concentrations de pesticides organochlorés et de certains de leurs métabolites retrouvés chez la mère et dans le sang de cordon du fœtus (Guo et al. 2014). Leurs résultats montrent que ces pesticides sont plus souvent quantifiés et en concentrations supérieures dans le sérum de la mère que dans le sang de cordon du nouveau-né.

Dans le cas d'une exposition *in utero* aux phtalates, les BMD apparaissent plus élevées que celles calculées lors d'une exposition à l'âge adulte. A plus fortes doses en revanche, et lors d'une exposition continue, l'élimination et la métabolisation de ces contaminants par la mère pourraient être incomplètes, les rendant ainsi plus disponibles dans l'organisme pour une exposition fœtale.

Ces comparaisons ont également permis de voir que l'action des COSV pouvait être très différente en fonction de la période d'exposition. En effet, le DEP était considéré comme un des composés les plus toxiques chez l'adulte pour l'inhibition de la concentration de testostérone alors que pour ce même effet, il ne serait, selon Howdeshell et le protocole employé lors de son expérimentation, pas toxique chez le fœtus. Il aurait été intéressant de réaliser cette comparaison avec d'autres fenêtres d'exposition comme les animaux juvéniles, chaque stade du développement (ou fenêtre d'exposition) pouvant avoir des caractéristiques et une vulnérabilité propre (Campion et al. 2012).

Dans le cadre de calcul d'indicateurs de toxicité pour une évaluation des risques, il est donc important de considérer toutes les situations (populations exposées, fenêtre et temps

d'exposition,…) afin de protéger le plus grand nombre. En outre, le fœtus ne doit pas être considéré comme un « petit adulte » mais comme une population à part. Si dans l'exemple de l'estimation des BMD_{10} du DEHP et du BBP, considérant la diminution de la testostérone sérique, le fœtus semble moins sensible à l'exposition de ces contaminants, ce n'est pas toujours le cas. Les résultats de différentes études testant les mêmes composés doivent donc être comparés afin de confirmer de la toxicité de chacun. Les BMD calculées à partir de données fournies par ces études doivent protéger l'ensemble des populations exposées, y compris les plus sensibles.

Il semble donc important de produire plus de données de relations dose-réponse exploitables et de bonne qualité concernant l'exposition fœtale afin de prendre en compte la sensibilité des fœtus et ainsi mieux connaitre les effets réels des contaminants de nos environnements sur ces populations particulières.

3.5.Choix du modèle d'étude : cas des composés neurotoxiques

De nombreux COSV agissent sur le système nerveux par différents mécanismes et modes d'action. Le choix de la mort neuronale comme évènement clef a permis de prendre en compte un grand nombre de ces modes d'action (comme l'altération des mitochondries, des neurotransmetteurs et de la membrane plasmique des neurones) et ainsi de prendre en compte un maximum de composés dans le calcul des BMD. Cette mort neuronale induite peut conduire à des altérations du comportement (Cheng et al., 2009; Zhang et al., 2013). Une comparaison entre les BMD neurotoxiques « *in vitro* » basées sur la mort neuronale, et des BMD neurotoxiques « *in vivo* » basées des effets neurocomportementaux a donc été réalisée. Des études *in vivo* mesurant les effets sur le comportement des animaux exposés au B[a]P, au PCB-153 et au BDE-47 ont été trouvées dans la littérature scientifique. Seuls le B[a]P et le BDE-47 avaient des données modélisables. En effet, Johansen et son équipe ont testé l'effet du PCB-153 sur les déficits de

l'attention et l'hyperactivité (attention deficit/hyperactivity disorder, ADHD) de rats mâles et femelles de deux souches différentes (des rats hypertendus spontanément et des rats Wistar Kyoto) (Johansen et al. 2014). Ils observèrent des effets neurocomportementaux induits dépendants de la souche et du sexe des animaux exposés mais également dépendants de la dose et de la fenêtre d'exposition. En fonction des doses testées, les effets induits pouvaient être très différents, rendant la relation dose-réponse non monotone. Par exemple, une exposition à 1 mg/kg de PCB-153 réduisait les troubles ADHD chez les rats hypertendus alors que les effets opposés furent observés à des expositions à 3 et 6 mg/kg. Ces fluctuations d'effets ont rendu la modélisation d'une courbe dose-réponse (et donc le calcul de BMD) impossible avec PROAST. Le B[a]P a été testé sur des rats Sprague Dawley mâles adultes par injections intrapéritonéales (à des doses de 1 à 6.25 mg/kg/j) pendant 45 jours afin de tester son effet sur l'apprentissage spatial (latent) et la mémoire de ces animaux (Cheng et al. 2013). Le BDE-47 a lui aussi été testé sur des rats Sprague Dawley mâles adultes mais par gavage (à des doses de 0.1 à 1 mg/kg/j) pendant 30 jours dans le but là aussi de tester son effet sur l'apprentissage spatial (latent) et la mémoire des animaux exposés (Yan et al. 2012). Les effets de des composés ont été mesurés grâce au test Morris Water Maze (MWM). Dans ce test, l'apprentissage spatial est mesuré en comptant le nombre de passage des rats au-dessus de la plateforme située dans la zone cible. C'est ce test que nous avons retenu dans cet exemple car la diminution de l'apprentissage spatial pourrait être liée à la mort neuronale (Cheng et al. 2013).

Les voies d'expositions des rats sont différentes dans ces deux études. Les relations doses-réponses disponibles testant l'impact de COSV sur des effets neurocomportementaux étant rares, l'étude de Cheng testant le B[a]P par injections intrapéritonéales chez le rat a été gardée pour cet exemple, le but étant de comparer les BMD *in vivo* et *in vitro* pour des effets neurotoxiques.

A partir de ces données, des BMD_{10} ont pu être calculées (modèles de Hill à 4 et 2 paramètres pour le B[a]P et BDE-47 respectivement). Les BMD *in vitro* ont été converties en mg/kg/j[7]. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : BMD_{10} des 2 COSV agissant sur le comportement du rat adulte *in vivo* et la mort neuronale *in vitro*.

COSV	Voie et durée d'exposition pour l'étude in vivo	Effet mesuré	BMD_{10} *in vivo* (mg/kg/jr)	BMD_{10} *in vitro* (mg/kg/jr)
B[a]P	Intrapéritonéale, 45 jours	Apprentissage spatial (latent) avec le test MWM	0.47	2.5^{E}-06
BDE-47	Gavage, 30 jours	Apprentissage spatial (latent) avec le test MWM	0.039	9.4^{E}-06

MWM : Morris Water Maze

Les BMD obtenues *in vitro* apparaissent beaucoup plus faibles que celles obtenues *in vivo*. Les doses testées *in vitro* étant plus faibles que celles testées *in vivo*, cet écart dans les valeurs des BMD est normal.

En condition *in vivo*, le BDE-47, avec une durée d'exposition plus faible, apparait plus de 10 fois plus toxique que le B[a]P. En condition *in vitro*, c'est l'inverse qui est observé : le B[a]P apparait près de 4 fois plus toxique que le BDE-47.

Cette variation peut être expliquée soit par les propriétés physico-chimiques de ces composés, soit par les protocoles expérimentaux utilisés. En effet, dans les études retenues, les animaux sont

[7] *La conversion a été faite en utilisant la formule :* $(n \times M)/0.25$ *où n est la* BMD_{10} *in vitro, exprimée en mol (1 µmol =*10^{E}*-6 mol) ; M est la masse molaire (exprimée en g/mol) ; 0.25 est le poids moyen d'un rat adulte (exprimé en kg).*

Masses Molaires : B[a]P=252.31 g/mol ; BDE-47=485.79 g/mol

exposés par voie orale au BDE-47 et par injections intrapéritonéales au B[a]P. Cette différence de voies d'exposition pourrait expliquer cette différence de toxicité (métabolisation différente par exemple). De même, les gammes de doses testées ne sont pas les mêmes : le B[a]P a une gamme de doses allant de 1 à 6,25 mg/kg/j alors le BDE-47 a gamme de dose allant de 0,1 à 1 mg/kg/j. Ainsi, la toxicité du B[a]P aux plus faibles doses est inconnue dans cette étude. Dans le cas d'une relation dose-réponse non monotone, la toxicité de ce composé pourrait être plus grande à des gammes de doses plus faibles.

Enfin, les effets mesurés étaient différents selon que l'on soit en condition *in vitro* ou *in vivo*. Bien que les études sources, décrivant des effets neurocomportementaux du B[a]P et du BDE-47, aient relié ces effets à une neurotoxicité, la mort neuronale est un élément précurseur des effets observables sur le comportement (cf figure 3 de l'article présenté dans la partie « effet neurotoxiques des COSV »). Il était donc attendu que les BMD *in vitro* décrivant une mort neuronale soient inférieures ou égales à celles décrivant un effet sur le comportement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Conclusion

L'évaluation des risques cumulés et sa méthodologie n'ont cessé d'évoluer. Comme le recommandait l'US EPA dès 1986, il semble nécessaire de donner un cadre aux recherches et aux études fournissant des données utiles à l'évaluation des risques (US EPA 1986). L'OCDE et l'US EPA ont été parmi les premiers investigateurs à décrire différentes démarches de regroupements pour l'évaluation des risques cumulés (OECD 2007, 2014; US EPA 1997). Ces regroupements furent une évolution dans les démarches traditionnelles de CRA. L'EFSA publia par la suite plusieurs opinions concernant le regroupement de pesticides : en fonction de leurs effets communs, par la création de « cumulative assessment groups » (EFSA 2013a) ou en fonction de leurs effets communs mais via différents modes d'actions (EFSA 2013b). Actuellement, les expositions réelles commencent à être prises en compte dans l'évaluation des risques cumulés. Ainsi des études récentes comme celle de Crépet et al ont pris compte les expositions réelles (via l'alimentation) à des pesticides, dans leur évaluation des risques cumulés (Crépet et al. 2013). La prise en compte de ces expositions réelles est nécessaire pour mesurer les effets de nos environnements sur notre santé. Elle est la prochaine étape d'une évaluation réaliste des risques cumulés pour la santé humaine.

Les travaux présentés ici ont été les premiers à permettre le calcul d'indicateurs de toxicité individuels et cumulés, en prenant en compte non seulement les expositions réelles, mais également des composés de familles chimiques différentes.

Les résultats de ces recherches montrent tout d'abord la faisabilité de ces travaux à partir de données de contaminations et de toxicité existantes mais également l'importance de la standardisation des protocoles expérimentaux (au moins 3 doses testées en plus du contrôle) afin

d'accroitre le nombre de données doses-réponses comparables et donc exploitables pour le calcul d'indicateurs de toxicité. De plus, il semble nécessaire de produire ce type de données pour les contaminants auxquels nous sommes les plus exposés ainsi qu'à une plus grande transparence dans les résultats de ces études (publications des études montrant l'absence d'effets de composés).

2. Perspectives

Ce travail ouvre des voies, montre des limites, donne des directions. A court terme, de nombreux travaux peuvent être conduits et faire avancer la prise en compte des expositions réelles en évaluation des risques cumulés.

2.1. Validation des hypothèses

Les travaux conduits lors de cette thèse de doctorat ont permis l'écriture d'un projet sur la base des précédentes conclusions. Ce projet a été mis en œuvre dans le but de répondre à différentes problématiques: 1) Mieux connaître les effets des substances reprotoxiques et/ou neurotoxiques ; 2) Mieux prendre en compte les effets cocktails par le développement d'indicateurs globaux dans le cas de l'évaluation du risque chronique ; 3) Mieux connaitre les risques liés aux agents chimiques pour les populations vulnérables.

Ce projet permettrait également de vérifier en pratique l'hypothèse d'additivité des doses pour les COSV retrouvés dans les environnements intérieurs.

A partir des résultats de thèse, deux groupes d'une vingtaine de COSV seront testés *in vitro,* à la fois pour des effets reprotoxiques induisant une diminution de la testostérone sérique et des effets neurotoxiques induisant la mort neuronale. Le protocole mis en œuvre permettra d'estimer des BMD comparables (espèces et lignées cellulaires identiques, durée d'exposition et gammes de

doses comparables, au moins 3 groupes de doses…). Ces expérimentations permettront le calcul de RPF comparables. Afin de vérifier l'hypothèse d'additivité des doses, ces COSV seront également testés en mélange pour les deux effets d'intérêts.

2.2.Prise en compte des COSV précédemment exclus

Un certain nombre de COSV furent exclus de nos calculs de BMD par manque de données toxicologiques exploitables (existantes ou comparables). Il est important de continuer la veille bibliographique afin de mettre à jour continuellement les BMD calculées voir d'en calculer de nouvelles. De plus, quand l'effet est avéré mais que les données disponibles ne correspondent pas à nos critères de sélection ou qu'il n'existe pas de relation dose-réponse exploitable, il serait intéressant de :

- Développer des modèles QSAR pour ces composés afin de prendre en compte leur toxicité dans le cadre d'une évaluation des risques, même si l'indicateur de toxicité calculé sera moins précis. Cette démarche est notamment recommandée par l'Union Européenne (European Union 2012).
- Tester les composés les plus concentrés dans les environnements intérieurs et pour lesquels il n'existe pas/peu de données toxicologiques dans le but d'obtenir une relation dose-réponse exploitable (*in vitro* ou *in vivo*). En effet, plus les techniques d'analyses chimiques évolueront, plus il y aura de nouveaux composés quantifiés dans nos environnements intérieurs sans que nous n'ayons d'idées précises quant à leurs toxicités.

Si la production mondiale de produits chimiques est maintenant réglementée et encadrée, et que de nombreuses données toxicologiques sont générées dans le cadre de cet encadrement (cf REACH), les données toxicologiques pour l'ensemble des substances du marché, à l'instant t, ne

sont pas encore suffisamment publiées dans la littérature internationale, qui se focalise généralement sur un petit nombre de substances. En 2011 Philippe Grandjean et son équipe publiaient un article sur ce sujet, décrivant l'effet « Matthew » (Grandjean et al. 2011). Cet article résume parfaitement l'état d'esprit de la recherche scientifique actuelle et sa quête de publications dans les meilleurs journaux. Dans cet article, Grandjean montre qu'en près de 10 ans (de 2000 à 2009), le top 20 des produits chimiques environnementaux les plus étudiés représente à lui seul 12% des articles publiés durant cette période. Le top 100 représenterait un quart à un tiers des publications. La conclusion de cet article est à mon sens également une perspective à prendre en compte par l'ensemble de la communauté scientifique et des financeurs : « Such bias detracts from the societal needs for documentation on less well known environmental hazards, and it may also impact negatively on the potentials for innovation and discovery in research ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelouahab N, Ainmelk Y, Takser L. 2011. Polybrominated diphenyl ethers and sperm quality. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 31:546–50; doi:10.1016/j.reprotox.2011.02.005.

Aillaud G-J. 1990. Pastel et indigo ou les origines du bleu. Revue d'histoire de la pharmacie 78:13–20; doi:10.3406/pharm.1990.3031.

Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. Endocrinology 145:592–603; doi:10.1210/en.2003-1174.

Alonso V, Linares V, Bellés M, Albina ML, Pujol A, Domingo JL, et al. 2010. Effects of BDE-99 on hormone homeostasis and biochemical parameters in adult male rats. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 48:2206–11; doi:10.1016/j.fct.2010.05.048.

Berg M Van den, Birnbaum L, Bosveld T, Brunström B, Cook P, Feeley M, et al. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environmental health perspectives 106: 775–92.

Berg M Van den, Birnbaum LS, Denison M, Vito M De, Farland W, Feeley M, et al. 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 93:223–41; doi:10.1093/toxsci/kfl055.

Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. 2013. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012.

Blanchard O, Glorennec P, Mercier F, Bonvallot N, Chevrier C, Ramalho O, et al. 2014. Semivolatile Organic Compounds in Indoor Air and Settled Dust in 30 French Dwellings. Environmental science & technology 48: 3959–3969.

Blanc-Lapierre A, Bouvier G, Garrigou A, Canal-Raffin M, Raherison C, Brochard P, et al. 2012. [Chronic central nervous system effects of pesticides: state-of-the-art]. Revue d'épidémiologie et de santé publique 60:389–400; doi:10.1016/j.respe.2012.03.006.

Blanco J, Mulero M, Heredia L, Pujol A, Domingo JL, Sánchez DJ. 2013. Perinatal exposure to BDE-99 causes learning disorders and decreases serum thyroid hormone levels and BDNF gene expression in hippocampus in rat offspring. Toxicology 308:122–8; doi:10.1016/j.tox.2013.03.010.

Bonvallot N, Bodin L, Duboudin C, Bard D. 2009. Benchmark dose : définitions , intérêt et usages en évaluation des risques sanitaires. Environnement, Risques & Santé 8: 529–537.

Bonvallot N, Mandin C, Mercier F, Bot B Le, Glorennec P. 2010. Health ranking of ingested semi-volatile organic compounds in house dust: an application to France. Indoor air 20:458–72; doi:10.1111/j.1600-0668.2010.00667.x.

Borch J, Axelstad M, Vinggaard AM, Dalgaard M. 2006a. Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis. Toxicology letters 163:183–90; doi:10.1016/j.toxlet.2005.10.020.

Borch J, Ladefoged O, Hass U, Vinggaard AM. 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 18:53–61; doi:10.1016/j.reprotox.2003.10.011.

Borch J, Metzdorff SB, Vinggaard AM, Brokken L, Dalgaard M. 2006b. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. Toxicology 223:144–55; doi:10.1016/j.tox.2006.03.015.

Burns CJ, Mcintosh LJ, Mink PJ, Jurek AM, Li AA, Dow T, et al. 2013. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. 127–283; doi:10.1080/10937404.2013.783383.

Campion S, Catlin N, Heger N, McDonnell E V, Pacheco SE, Saffarini C, et al. 2012. Male reprotoxicity and endocrine disruption. EXS 101:315–60; doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_11.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Fourth national report on human exposure to environmental chemical, updated tables, February 2015. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Environmental Health. Division of Laboratory Scienc. 1095 p.

Chen C, Tang Y, Jiang X, Qi Y, Cheng S, Qiu C, et al. 2012a. Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 125:248–61; doi:10.1093/toxsci/kfr265.

Chen J, Liufu C, Sun W, Sun X, Chen D. 2010. Assessment of the neurotoxic mechanisms of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in primary cultured neonatal rat hippocampal neurons includes alterations in second messenger signaling and oxidative stress. Toxicology letters 192:431–9; doi:10.1016/j.toxlet.2009.11.020.

Chen N-N, Luo D-J, Yao X-Q, Yu C, Wang Y, Wang Q, et al. 2012b. Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats. Journal of Alzheimer's disease : JAD 30:585–94; doi:10.3233/JAD-2012-111946.

Cheng J, Gu J, Ma J, Chen X, Zhang M, Wang W. 2009. Neurobehavioural effects, redox responses and tissue distribution in rat offspring developmental exposure to BDE-99. Chemosphere 75:963–8; doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.004.

Cheng S, Xia Y, He J, Liu X, Chen X, Ding Y, et al. 2013. Neurotoxic effect of subacute benzo(a)pyrene exposure on gene and protein expression in Sprague-Dawley rats. Environmental toxicology and pharmacology 36:648–58; doi:10.1016/j.etap.2013.06.008.

Chiu YH, Afeiche MC, Gaskins AJ, Williams PL, Petrozza JC, Tanrikut C, et al. 2015. Fruit and vegetable intake and their pesticide residues in relation to semen quality among men from a fertility clinic. Human reproduction (Oxford, England) dev064–; doi:10.1093/humrep/dev064.

Chopra V, Harley K, Lahiff M, Eskenazi B. 2014. Association between phthalates and attention deficit disorder and learning disability in U.S. children, 6-15 years. Environmental research 128:64–9; doi:10.1016/j.envres.2013.10.004.

Chung J-Y, Kim Y-J, Kim JY, Lee SG, Park J-E, Kim WR, et al. 2011. Benzo[a]pyrene reduces testosterone production in rat Leydig cells via a direct disturbance of testicular steroidogenic machinery. Environmental health perspectives 119:1569–74; doi:10.1289/ehp.1003391.

Couteur DG Le, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. 1999. Pesticides and Parkinson's disease. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie 53:122–30; doi:10.1016/S0753-3322(99)80077-8.

Crépet A, Tressou J, Graillot V, Béchaux C, Pierlot S, Héraud F, et al. 2013. Identification of the main pesticide residue mixtures to which the French population is exposed. Environmental Research 126:125–133; doi:10.1016/j.envres.2013.03.008.

Dallinga JW, Moonen EJC, Dumoulin JCM, Evers JLH, Geraedts JPM, Kleinjans JCS. 2002. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. Human Reproduction 17:1973–1979; doi:10.1093/humrep/17.8.1973.

Dingemans MML, Berg M van den, Westerink RHS. 2011. Neurotoxicity of brominated flame retardants: (in)direct effects of parent and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers on the (developing) nervous system. Environmental health perspectives 119:900–7; doi:10.1289/ehp.1003035.

Drescher K, Boedeker W. 1995. Assessment of the combined effects of substances: the relationship between concentration addition and independent action. Biometrics 51: 716–730.

Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, et al. 2003. Phthalate exposure and human semen parameters. Epidemiology (Cambridge, Mass.) 14: 269–77.

Eadon G, Kaminsky L, Silkworth J, Aldous K, Hilker D, O'Keefe P, et al. 1986. Calculation of 2,3,7,8-TCDD equivalent concentrations of complex environmental contaminant mixtures. Environmental health perspectives 70: 221–7.

EFSA. 2013a. Scientific Opinion on the identification of pesticides to be included in cumulative assessment groups on the basis of their toxicological profile. EFSA Journal 11: 3293.

EFSA. 2013b. Scientific Opinion on the relevance of dissimilar mode of action and its appropriate application for cumulative risk assessment of pesticides. 11; doi:10.2903/j.efsa.2013.3472.

Elnar AA, Diesel B, Desor F, Feidt C, Bouayed J, Kiemer AK, et al. 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (∑6 NDL-PCBs) in mice. Toxicology 299:44–54; doi:10.1016/j.tox.2012.05.004.

European Union. 2012. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. 1–50.

Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. 2014. Derivation of toxicological reference values for taking mixtures into account in health risk assessment: Existing methods and recent applications. Environnement, Risques & Santé 13:203–221; doi:10.1684/ers.2014.0696.

Fréry N, Guldner L, Saoudi A, Garnier R, Zeghnoun A, Bidondo M-L. 2013. Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Tome 2 - Polychlorobiphényles (PCB-NDL) et pesticides. 178 p.

Fukuto TR. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environmental health perspectives 87: 245–54.

Glorennec P, Mercier F, Blanchard O, Bonvallot N, Ramalho O, Mandin C. 2011. Cumulative indoor exposures to Semi-Volatile Organic Compounds (SVOCs)in France: the ECOS project. Indoor Air Conference.

González-Alzaga B, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Rodríguez-Barranco M, Ballester F, Rebagliato M, et al. 2014. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. Toxicology letters 230:104–21; doi:10.1016/j.toxlet.2013.11.019.

Grandjean P, Eriksen ML, Ellegaard O, Wallin JA. 2011. The Matthew effect in environmental science publication: a bibliometric analysis of chemical substances in journal articles. Environmental health : a global access science source 10:96; doi:10.1186/1476-069X-10-96.

Gray LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN, Parks L. 2000. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 58: 350–65.

Guo H, Jin Y, Cheng Y, Leaderer B, Lin S, Holford TR, et al. 2014. Prenatal exposure to organochlorine pesticides and infant birth weight in China. Chemosphere 110:1–7; doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.017.

Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Evans N, Foster PMD, Gray EL, et al. 2012. Genomic biomarkers of phthalate-induced male reproductive developmental toxicity: a targeted RT-PCR array approach for defining relative potency. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 125:544–57; doi:10.1093/toxsci/kfr315.

Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE. 2011. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 123:206–16; doi:10.1093/toxsci/kfr146.

Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM. 2006. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. Epidemiology (Cambridge, Mass.) 17:682–91; doi:10.1097/01.ede.0000235996.89953.d7.

Homero, Didot P. 1788. *L'Odyssée d'Homere: avec des Remarques précédé de rèflexions sur l'Odyssée et sur la traducion des poëtes (Google eBook)*. de l'Imprimerie de Didot l'Aînê.

Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Rider C V, Wilson VS, Gray LE. 2007. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 99:190–202; doi:10.1093/toxsci/kfm069.

Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambright CR, Rider C V, Blystone CR, et al. 2008. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 105:153–65; doi:10.1093/toxsci/kfn077.

Jaakkola JJK, Knight TL. 2008. The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. Environmental health perspectives 116:845–53; doi:10.1289/ehp.10846.

Jin Y, Wang L, Ruan M, Liu J, Yang Y, Zhou C, et al. 2011. Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. Chemosphere 84:124–30; doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.034.

Johansen EB, Fonnum F, Lausund PL, Walaas SI, Bærland NE, Wøien G, et al. 2014. Behavioral changes following PCB 153 exposure in the spontaneously hypertensive rat - an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Behavioral and brain functions : BBF 10:1; doi:10.1186/1744-9081-10-1.

Johnson PI, Stapleton HM, Mukherjee B, Hauser R, Meeker JD. 2013. Associations between brominated flame retardants in house dust and hormone levels in men. The Science of the total environment 445-446:177–84; doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.017.

Kamel F, Hoppin JA. 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. Environmental health perspectives 112: 950–8.

Ki Y-W, Park JH, Lee JE, Shin IC, Koh HC. 2013. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. Toxicology letters 218:235–45; doi:10.1016/j.toxlet.2013.02.003.

Korrick SA, Sagiv SK. 2008. Polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and neurodevelopment. Current opinion in pediatrics 20:198–204; doi:10.1097/MOP.0b013e3282f6a4e9.

Kortenkamp A, Faust M. 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. International journal of andrology 33:463–74; doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01047.x.

Kortenkamp A, Faust M, Backhaus T. 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity.

Kumar A, LaVoie HA, DiPette DJ, Singh US. 2013. Ethanol neurotoxicity in the developing cerebellum: underlying mechanisms and implications. Brain sciences 3:941–63; doi:10.3390/brainsci3020941.

Lee J-Y, Kim J-W, Lim H-S, Joo W-H, Cho Y-K, Moon J-Y. 2005. Changes in antioxidant defense systems by 2,2’,5,5'-tetrachlorobiphenyl exposure in neuronal SK-N-MC cells. Toxicology letters 157:139–49; doi:10.1016/j.toxlet.2005.01.013.

Lee S, Suk K, Kim IK, Jang I-S, Park J-W, Johnson VJ, et al. 2008. Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB. Journal of neuroscience research 86:2932–42; doi:10.1002/jnr.21739.

Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PMD, Gaido KW. 2004. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 81:60–8; doi:10.1093/toxsci/kfh169.

Levasseur LM, Slocum HK, Rustum YM, Greco WR. 1998. Modeling of the time-dependency of in vitro drug cytotoxicity and resistance. Cancer Research 58: 5749–5761.

Lévi Strauss M. Teintures précieuses de la Méditerranée (exposition). Encyclopædia Universalis [en ligne]. Available: http://www.universalis.fr/encyclopedie/teintures-precieuses-de-la-mediterranee/ [accessed 4 March 2015].

Liang J, Zhu H, Li C, Ding Y, Zhou Z, Wu Q. 2012. Neonatal exposure to benzo[a]pyrene decreases the levels of serum testosterone and histone H3K14 acetylation of the StAR promoter in the testes of SD rats. Toxicology 302:285–29; doi:10.1016/j.tox.2012.08.010.

Lin C-H, Chen T-J, Chen S-S, Hsiao P-C, Yang R-C. 2011. Activation of Trim17 by PPARγ is involved in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis on Neuro-2a cells. Toxicology letters 206:245–51; doi:10.1016/j.toxlet.2011.08.002.

Loewe S, Muischnek H. 1926. Effect of combinations: mathematical basis of problem. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 114:313–326; doi:10.1007/BF01952257.

London L, Beseler C, Bouchard MF, Bellinger DC, Colosio C, Grandjean P, et al. 2012. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. Neurotoxicology 33:887–96; doi:10.1016/j.neuro.2012.01.004.

Macherey A, Dansette PM. 2008. Biotransformations Leading to Toxic Metabolites : Chemical Aspect. The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition) 674–696.

Mandin C., Mercier F., Lucas J-P., Ramalho O., Blanchard O., Bonvallot N., Raffy G., Gilles E., Glorennec P., Le Bot B, 2014a.ECOS-POUSS: A Nationwide Survey of Semi-Volatile Organic Compounds in Home Settled Dust. Indoor Air conference, Hong-Kong.

Mandin C, Mercier F, Lucas J-P, Ramalho O, Gilles E, Blanchard O, Bonvallot N, Glorennec P, Le Bot B, 2014b. ECOS-PM: A Nationwide Survey of Semi-Volatile Organic Compounds in Indoor Air. Indoor Air conference, Hong-Kong.

Meek M, Bucher J. 2003. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. Critical reviews in toxicology 33:591–653; doi:10.1080/10408440390250136.

Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. 2009. Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. Journal of andrology 30:287–97; doi:10.2164/jandrol.108.006403.

Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, et al. 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 30:532–9; doi:10.1016/j.reprotox.2010.07.005.

Mérat FV, Lens AJ de. 1837. *Dictionnaire universel de matière médicale et de thérapeutique générale, Volume 4 (Google eBook)*. Société Belge de Librairie.

Mercier F, Gilles E, Saramito G. 2014. A multi-residue method for the simultaneous analysis in indoor dust of several classes of semi-volatile organic compounds by pressurized liquid extraction and gas chromatography / tandem mass spectrometry. Journal of chromatography. A 1336: 101–111.

Mercier F, Glorennec P, Blanchard O, Bot B Le. 2012. Analysis of semi-volatile organic compounds in indoor suspended particulate matter by thermal desorption coupled with gas chromatography/mass spectrometry. Journal of chromatography. A 1254:107–14; doi:10.1016/j.chroma.2012.07.025.

Mercier F, Glorennec P, Thomas O, Bot B Le. 2011a. Organic Contamination of Settled House Dust , A Review for Exposure Assessment Purposes. 6716–6727.

Mercier F, Glorennec P, Thomas O, Bot B Le. 2011b. Organic contamination of settled house dust, a review for exposure assessment purposes. Environmental science & technology 45:6716–27; doi:10.1021/es200925h.

Midoro-Horiuti T, Tiwari R, Watson CS, Goldblum RM. 2010. Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups. Environmental health perspectives 118:273–7; doi:10.1289/ehp.0901259.

Muñoz-Quezada MT, Lucero BA, Barr DB, Steenland K, Levy K, Ryan PB, et al. 2013. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. Neurotoxicology 39:158–68; doi:10.1016/j.neuro.2013.09.003.

Nakajima Y, Goldblum RM, Midoro-Horiuti T. 2012. Fetal exposure to bisphenol A as a risk factor for the development of childhood asthma: an animal model study. Environmental health : a global access science source 11:8; doi:10.1186/1476-069X-11-8.

Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, et al. 2010. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. Toxicology letters 194:16–25; doi:10.1016/j.toxlet.2010.02.002.

Narahashi T. 1996. Neuronal Ion Channels as the Target Sites of Insecticides. Pharmacology & Toxicology 79:1–14; doi:10.1111/j.1600-0773.1996.tb00234.x.

Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni ML, Stefano A Di, Sozio P, Cantalamessa F. 2007. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. Toxicology 229:194–205; doi:10.1016/j.tox.2006.10.015.

Nie J-S, Zhang H-M, Zhao J, Liu H-J, Niu Q. 2014. Involvement of mitochondrial pathway in benzo[a]pyrene-induced neuron apoptosis. Human & experimental toxicology 33:240–50; doi:10.1177/0960327113493301.

Nisbet IC, LaGoy PK. 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Regulatory toxicology and pharmacology : RTP 16: 290–300.

NRC. 1983. Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process.

O'Shea JG. 1990. "Two minutes with venus, two years with mercury"--mercury as an antisyphilitic chemotherapeutic agent. Journal of the Royal Society of Medicine 83: 392–5.

OECD. 2007. Guidance on grouping of chemicals.

OECD. 2014. Guidance on grouping of chemicals, second edition.

Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, et al. 2006. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. Environmental health perspectives 114: 1643–8.

Peiffer J, Cosnier F, Grova N, Nunge H, Salquèbre G, Decret M-J, et al. 2013. Neurobehavioral toxicity of a repeated exposure (14 days) to the airborne polycyclic aromatic hydrocarbon fluorene in adult Wistar male rats. PloS one 8:e71413; doi:10.1371/journal.pone.0071413.

Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser R, et al. 2014. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. Environmental health perspectives 122:775–86; doi:10.1289/ehp.1307728.

Polańska K, Jurewicz J, Hanke W. 2013. Review of current evidence on the impact of pesticides, polychlorinated biphenyls and selected metals on attention deficit / hyperactivity disorder in children. International journal of occupational medicine and environmental health 26:16–38; doi:10.2478/s13382-013-0073-7.

Prouillac C, Lecoeur S. 2010. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 38:1623–35; doi:10.1124/dmd.110.033571.

Qiu C, Cheng S, Xia Y, Peng B, Tang Q, Tu B. 2011. Effects of subchronic benzo(a)pyrene exposure on neurotransmitter receptor gene expression in the rat hippocampus related with spatial learning and memory change. Toxicology 289:83–90; doi:10.1016/j.tox.2011.07.012.

Rudel RA, Perovich LJ. 2009. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. Atmospheric environment (Oxford, England : 1994) 43:170–181; doi:10.1016/j.atmosenv.2008.09.025.

Salian S, Doshi T, Vanage G. 2009. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. Toxicology 265:56–67; doi:10.1016/j.tox.2009.09.012.

Sánchez-Alonso JA, López-Aparicio P, Recio MN, Pérez-Albarsanz MA. 2003. Apoptosis-mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. Toxicology letters 144: 337–49.

Saradha B, Vaithinathan S, Mathur PP. 2008. Single exposure to low dose of lindane causes transient decrease in testicular steroidogenesis in adult male Wistar rats. Toxicology 244:190–7; doi:10.1016/j.tox.2007.11.011.

Seta D Della, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessì-Fulgheri F, Farabollini F. 2006. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. Hormones and behavior 50:301–7; doi:10.1016/j.yhbeh.2006.03.015.

Sharma H, Zhang P, Barber DS, Liu B. 2010. Organochlorine pesticides dieldrin and lindane induce cooperative toxicity in dopaminergic neurons: role of oxidative stress. Neurotoxicology 31:215–22; doi:10.1016/j.neuro.2009.12.007.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Human Reproduction 16:972–978; doi:10.1093/humrep/16.5.972.

Slob W. 2002. Dose-response modeling of continuous endpoints. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 66: 298–312.

Soni I, Syed F, Bhatnagar P, Mathur R. 2011. Perinatal toxicity of cyfluthrin in mice: developmental and behavioral effects. Human & experimental toxicology 30:1096–105; doi:10.1177/0960327110391386.

Svechnikov K, Svechnikova I, Söder O. 2008. Inhibitory effects of mono-ethylhexyl phthalate on steroidogenesis in immature and adult rat Leydig cells in vitro. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 25:485–90; doi:10.1016/j.reprotox.2008.05.057.

Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. 2005. Decrease in Anogenital Distance among Male Infants with Prenatal Phthalate Exposure. Environmental Health Perspectives 113:1056–1061; doi:10.1289/ehp.8100.

Ta TA, Koenig CM, Golub MS, Pessah IN, Qi L, Aronov PA, et al. 2011. Bioaccumulation and behavioral effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in perinatally exposed mice. Neurotoxicology and teratology 33:393–404; doi:10.1016/j.ntt.2011.02.003.

US EPA. 2002. A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes. doi:EPA/630/P-02/002F.

US EPA. 1997. Background Document Presented to the FIFRA Scientific Advisory Panel at the March 1997 Public Meeting. "The Grouping of a Series of Chloroacetanilide Pesticides Based on a Common Mechanism of Toxicity."

US EPA. 2012. Benchmark Dose Technical Guidance.

US EPA. 1986. Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. 51: 34014–34025.

US EPA. 2000. Office of Pesticide Programs Science Policy on the use of data on cholinesterase inhibition for risk assessments of organophosphorous and carbamate pesticides.

US EPA. 2006. Organophosphorus Cumulative Risk Assessment - 2006 Update.

US EPA. 1993. Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons.

US EPA. 2005. Toxicological review of n-hexane. In support of summary information on the integrated risk information (IRIS). EPA/635/R–03/012.

Vandenberg LN. 2014. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. Dose-response : a publication of International Hormesis Society 12:259–76; doi:10.2203/dose-response.13-020.Vandenberg.

Viberg H, Lee I. 2012. A single exposure to bisphenol A alters the levels of important neuroproteins in adult male and female mice. Neurotoxicology 33:1390–5; doi:10.1016/j.neuro.2012.09.002.

Viel J-F, Warembourg C, Maner-Idrissi G Le, Lacroix A, Limon G, Rouget F, et al. 2015. Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. Environment international 82:69–75; doi:10.1016/j.envint.2015.05.009.

Wang H, Wang S-F, Ning H, Ji Y-L, Zhang C, Zhang Y, et al. 2011. Maternal cypermethrin exposure during lactation impairs testicular development and spermatogenesis in male mouse offspring. Environmental toxicology 26:382–94; doi:10.1002/tox.20566.

Welsh M, Saunders PTK, Fisken M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, et al. 2008. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization , disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. The Journal of Clinical Investigation 118; doi:10.1172/JCI34241.fetal.

Weschler CJ. 2009. Changes in indoor pollutants since the 1950s. Atmos. Environ. 43: 19–40.

Weschler CJ, Nazaroff WW. 2008. Semivolatile organic compounds in indoor environments. Atmospheric Environment 42:9018–9040; doi:10.1016/j.atmosenv.2008.09.052.

WHO working group. 2006. Development of WHO Guidelines for Indoor Air Quality. 1–27.

WHO working group. 2000. The Right to Healthy Indoor Air. 1–27.

Wignall J a, Shapiro AJ, Wright F a, Woodruff TJ, Chiu W a, Guyton KZ, et al. 2014. Standardizing benchmark dose calculations to improve science-based decisions in human health assessments. Environmental health perspectives 122:499–505; doi:10.1289/ehp.1307539.

Xue Z, Li X, Su Q, Xu L, Zhang P, Kong Z, et al. 2013. Effect of synthetic pyrethroid pesticide exposure during pregnancy on the growth and development of infants. Asia-Pacific journal of public health / Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health 25:72S–9S; doi:10.1177/1010539513496267.

Yan T, Xiang L, Xuejun J, Chengzhi C, Youbin Q, Xuelan Y, et al. 2012. Spatial learning and memory deficit of low level polybrominated diphenyl ethers-47 in male adult rat is modulated by intracellular glutamate receptors. The Journal of Toxicological Sciences 37:223–233; doi:10.2131/jts.37.223.

Yu K, He Y, Yeung LWY, Lam PKS, Wu RSS, Zhou B. 2008. DE-71-induced apoptosis involving intracellular calcium and the Bax-mitochondria-caspase protease pathway in human neuroblastoma cells in vitro. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 104:341–51; doi:10.1093/toxsci/kfn088.

Zhang H, Li X, Nie J, Niu Q. 2013. Lactation exposure to BDE-153 damages learning and memory, disrupts spontaneous behavior and induces hippocampus neuron death in adult rats. Brain research 1517:44–56; doi:10.1016/j.brainres.2013.04.014.

Zhang S-Y, Ito Y, Yamanoshita O, Yanagiba Y, Kobayashi M, Taya K, et al. 2007. Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of Leydig cells in adult male mouse. Endocrinology 148:3941–9; doi:10.1210/en.2006-1497.

Zoeller RT, Bergman Å, Becher G, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, et al. 2014. A path forward in the debate over health impacts of endocrine disrupting chemicals. Environmental health : a global access science source 13:118; doi:10.1186/1476-069X-13-118.

Zota AR, Calafat AM, Woodruff TJ. 2014. Temporal Trends in Phthalate Exposures: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2010. Environ Health Perspect 122: 235–241.

ANNEXES

Publications scientifiques

- Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. 2014. An exposure-based framework for grouping pollutant for a cumulative risk assessment approach. Case study of indoor semi-volatile organic compounds. *Environmental research. 130, 20-28.*
- Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. 2014. La construction de valeurs toxicologiques de référence adaptées à la prise en compte des mélanges en évaluation des risques sanitaires : méthodes existantes et applications récentes. *Environnement, Risques et Santé ; 13-3.*
- Fournier K, Tebby C, Zeman F, Glorennec P, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. Multiple Exposures to Indoor Pollutants: Derivation of Benchmark Doses and Relative Potency Factors based on Reprotoxic Effects. *Accepted in Regulatory Toxicology and Pharmacology.*
- Fournier K, Baumont E, Glorennec P, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. Complex indoor chemical exposures: derivation of comparative benchmark doses based on neurotoxic effects. *Submitted in Environmental Health.*

Communications orales en congrès internationaux

- Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. Dec 2012. Cumulative exposures to indoor semi volatile organic compounds: grouping chemicals for the derivation of « multi-pollutants » toxicity reference values. *Colloque PNRPE. Paris, FR.*

- Fournier K, Baumont E, Tebby C, Zeman C, Zmirou-Navier D, Glorennec P; Bonvallot N. Oct 2014. Derivation of cumulative toxicity indicators for indoor semi-volatile organic compounds: the case of reprotoxic and neurotoxic mixtures. *PPTOX IV. Boston, MA.*

Communications orales en congrès nationaux

- Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. Nov 2012. Expositions cumulées aux composés organiques semi-volatils dans les environnements intérieurs : regroupement de polluants pour la construction de valeurs toxicologiques de références "multi-polluants ». *Première journée des jeunes chercheurs de l'IRSET. Rennes, FR.*

- Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. Apr 2013. ECOS-TOX: Cumulative exposures to indoor semi-volatile organic compounds: Derivation of "multi-pollutants" toxicity reference values. *Rencontres scientifiques du réseau doctoral en santé publique. Paris, FR.*

- Fournier K, Baumont E, Tebby C, Zeman C, Zmirou-Navier D, Glorennec P; Bonvallot N. Dec 2014. Derivation of cumulative toxicity indicators for indoor semi-volatile organic compounds: the case of reprotoxic and neurotoxic mixtures. *Troisième journée des jeunes chercheurs de l'IRSET. Rennes, FR*

- Fournier K, Schoch P. Apr 2015. Quel lien entre des indicateurs de toxicité et l'intelligence stratégique localisée ? Exemple de ponts possibles entre les sciences permettant le développement de projets innovants. *Rencontres scientifiques du réseau doctoral en santé publique. Rennes, FR.*

Communications orales lors de journées de recherche

- Fournier K, Bonvallot N. Feb 2013. Exemples d'évaluation des risques sanitaires liés aux mélanges. *Réunion SFSE. Paris, FR*.

- Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. Apr 2013. Expositions cumulées aux composés organiques semi-volatils dans les environnements intérieurs : regroupement de polluants pour la construction de valeurs toxicologiques de références « multi-polluants ». *GT ANSES. Paris, FR.*

- Fournier K, Glorennec P, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. May 2014. Prise en compte des effets cumulés lors d'exposition multiples en EQRS : Exemple de polluants reprotoxiques de l'habitat. *Séminaire de recherche de l'Institut de recherche en santé, environnement et travail. Rennes, FR.*

- Fournier K, Baumont E, Tebby C, Zeman C, Zmirou-Navier D, Glorennec P, Bonvallot N. Jan 2015. Derivation of cumulative toxicity indicators for indoor pollutants: the case of reprotoxic and neurotoxic mixtures. *Rencontres IRSET et Institut Armand Frappier. Montréal, CA.*

- Fournier K. Jun 2015. Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence. *CES Substances ANSES : VGAI pour un mélange d'aldéhydes.*

- Fournier K, Bonvallot N, Glorennec P. June 2015. Assessing realistic combinations of chemicals. *Workshop SPTC and PRINCEPS on current approaches to assess chemical contaminant mixture effects and regulatory implication*

Communications par affiches en congrès internationaux

- Fournier K, Glorennec P, Bonvallot N. June 2012. Indoor exposure to SVOCs: grouping chemicals for the derivation of toxicity reference values. *European Doctoral College on Environment and Health. Rennes, FR.*

- Fournier K, Glorennec P, Bodin L, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. Mar 2014. Multiple exposures to indoor pollutants: derivation of benchmark doses based on reprotoxic effects. *53rd annual meeting of the Society Of Toxicology. Phoenix, AZ. The Toxicologist. Supplement to Toxicological Sciences:262.*

- Fournier K, Tebby C, Glorennec P, Bodin L, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. Sep 2014. Multiple exposures to indoor pollutants: derivation of benchmark doses based on reprotoxic effects. *Eurotox, 50th Congress of the European Societies of Toxicology. Edinburgh, SC. Toxicology Letters ; 229 (Suppl) :S212.*

Communications par affiches en congrès nationaux

- Fournier K, Glorennec P, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. Jan 2013. ECOS-TOX: Construction de valeurs toxicologiques de références (VTR) pour des expositions multiples. *Rencontre scientifique VAS « la recherche fondamentale au service du médicament et de la santé ». Rennes, FR.*

- Fournier K, Glorennec P, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. Nov 2013. Exposition cumulée aux polluants des environnements intérieurs: calcul d'indicateurs de toxicité. *Colloque Société Française de Toxicologie. Paris, FR.*

- Fournier K, Glorennec P, Zmirou-Navier D, Bonvallot N. Nov 2013. ECOS-TOX: Exposition cumulée aux polluants des environnements intérieurs: Calcul d'indicateurs de toxicité cumulée. *Colloque Primequal. La Rochelle, FR.*

Récompense

- In Training and Early Career Travel Grant Award, PPTOX IV, Boston (2014)

Activités parallèles

- Président de l'Association Nicomaque (pôle Breton des associations de doctorants et jeunes docteurs) d'avril 2013 à février 2015
    - Organisation de congrès scientifiques (forum docteurs & entreprises), de festivals de courts métrages (Sciences en Cour[t]s), divers évènements festifs à but de cohésion sociale.
    - Prise en charge d'un stagiaire en communication

- Président du bureau des élèves et étudiants de l'EHESP depuis novembre 2014
    - Création et supervision de nombreux évènements festifs (dont la création du gala de l'EHESP), culturels et sportifs.
    - Prise en charge d'un stagiaire en webdesign et web-graphisme.

- Participation à la création d'une société en intelligence économique stratégique localisée

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

Denis Zmirou-Navier

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

Nathalie THERET
Directrice Ecole Doctorale VAS

DT UR/2015/Santé/10 n°115

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le 21 SEP. 2015

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

P/le Président et par délégation
le Vice-Président

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

UNIVERSITÉ DE RENNES 1 **DRI/Pôle Espace Doctoral – Scolarité des Doctorants**
Campus de Beaulieu CS 74205 35042 RENNES cedex

Doctorat de l'Université de Rennes 1 – mention **BIOLOGIE ET SCIENCES DE LA SANTE**

Soutenu le **09 octobre 2015** par **FOURNIER Kévin**

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

RAPPORT DE SOUTENANCE (Signature obligatoire de tous les membres du jury)

Nom du Président de jury: Laurent VERNHET

Lors de la soutenance, Mr Kevin Fournier a présenté de manière claire et didactique les résultats qu'il a obtenus au cours de son doctorat d'Université co-dirigé par le professeur Denis Zmirou-Navier (directeur) et le docteur Nathalie Bonvallot (co-directrice). Ces travaux ont porté sur la « construction d'indicateurs de toxicité cumulés : cas des composés organiques semi-volatils dans les environnements intérieurs ». Par la modélisation de données biologiques décrites dans la littérature, Kevin Fournier a construit et proposé des indicateurs de toxicité pour des groupes de composés chimiques appartenant à des familles différentes, constituant des contaminations réelles de notre environnement et partageant des modes d'action commun en lien avec des effets reprotoxiques ou neurotoxiques. L'importance de la thématique étudiée, pour l'évaluation à terme des risques sanitaires des mélanges complexes, et l'originalité des résultats obtenus ont été unanimement soulignées par le jury de thèse. La qualité du travail présenté a permis des échanges nourris avec les membres du jury, durant lesquels Kevin Fournier a toujours su apporter des réponses argumentées aux questions posées. Ce travail de thèse conséquent fait l'objet de 2 articles acceptés et d'un article soumis dans des revues internationales de très bon niveau, et d'un article accepté dans une revue nationale, dans lesquels Kevin Fournier est premier auteur. De plus, Kevin Fournier a eu l'opportunité de présenter oralement ses travaux, à plusieurs reprises, dans des congrès nationaux et internationaux durant sa thèse. Enfin, les travaux de recherche présentés par Kevin Fournier ouvrent de réelles perspectives dans le domaine de la modélisation pour l'évaluation des risques.

Après délibération, le Jury a décidé, à l'unanimité, d'accorder à Mr Kevin Fournier le grade de Docteur de l'Université de Rennes 1, mention Biologie et Sciences de la Santé.

Signatures des membres du jury :

D. ZMIROU

Kevin FOURNIER, Construction d'indicateurs de toxicité cumulés : cas des composés organiques semi volatils dans les environnements intérieurs. Rennes, le 9 octobre 2015.

Résumé : Les composés organiques semi volatils (COSV) sont largement présents dans les environnements intérieurs et sont suspectés d'être repro- ou neurotoxiques. Dans le cadre de la mise en œuvre d'une démarche d'évaluation des risques cumulés, l'objectif de cette thèse est de construire des indicateurs de toxicité pour les COSV détectés dans les logements français. Les COSV ont été regroupés en fonction de leurs effets repro et neurotoxiques et des benchmark doses (BMD) ont été estimées par modélisation des relations dose-réponse disponibles dans la littérature. Ainsi, des BMD comparables ont pu être produites pour 6 COSV reprotoxiques sur la base d'une diminution de testostérone sérique (rats adultes exposés par voie orale). La toxicité relative des COSV était sensiblement la même en fonction du niveau de réponse choisi (10 ou 50 %) : B[a]P > DEP > DEHP > cyperméthrine > BBP, excepté pour le bisphénol A qui apparait le plus toxique de 3 ordres de grandeur à 10% de réponse, alors que sa toxicité se situe entre celle du B[a]P et du DEP à 50% de réponse. Pour les COSV neurotoxiques, des BMD ont pu être produites pour 13 COSV, sur la base d'une diminution de la viabilité neuronale mesurée *in vitro*, à partir de données provenant de différentes lignées et espèces. Dans ce cas, les BMD correspondant à 10 % de mort neuronale s'échelonnaient de 0,07 µM pour le PCB-153, à 95 µM pour le diazinon. L'originalité de ce travail repose sur le regroupement de composés de familles chimiques différentes qui constituent des contaminations réelles de notre environnement. Si l'estimation de BMD a été possible à partir des données de la littérature, de nombreuses limites méthodologiques conduisent à émettre des recommandations, en particulier sur la standardisation des protocoles expérimentaux et la disponibilité des résultats sous une forme adaptée à la modélisation de la relation dose-réponse.

Abstract: Semi-volatile organic compounds (SVOCs) are widely present in indoor environments and are suspected to be repro- or neurotoxic. In carrying forward a cumulative health risk assessment, the objective of this thesis is to derive toxicity indicators for SVOCs detected in French dwellings. SVOCs were grouped according to their repro- and neurotoxic effects and Benchmark Doses (BMDs) were estimated by modeling dose-response relationships from scientific literature. Thereby, comparable BMDs were estimated for 6 reprotoxic SVOCs leading to a decrease in serum testosterone levels (adult male rats orally exposed). Relative toxicity of SVOCs was substantially the same according to the selected response (10 or 50%): B[a]P > DEP > DEHP > cypermethrin > BBP, excepted for bisphenol A appearing the most toxic (3 orders of magnitude) for a 10% - response, while its toxicity is between that of B[a]P and DEP for a 50% - response. For neurotoxic SVOCs, 13 BMDs were derived based on a decrease of *in vitro* neuronal viability, using data from different cell lines and species. In this case, BMDs corresponding to 10% of neuronal death ranged from 0.07 µM for PCB-153 to 95 µM for diazinon. The originality of this work is the grouping of compounds from different chemical families which we are really exposed to. BMDs estimation from published data was possible but many methodological limitations lead us to put forward recommendations especially on the standardization of experimental protocols and the availability of results in adapted format for dose-response relationship modeling.