



**Université de Liège**

**FACULTE DE MEDECINE**

Département de Pharmacie

Service de Toxicologie Clinique, Médico-Légale, de l'Environnement et en Entreprise

Professeur Corinne Charlier

***Évaluation de l'exposition de l'Homme à différents  
perturbateurs endocriniens non persistants***

Lucas Dewalque

Pharmacien

Candidat Spécialiste en Biologie Clinique

Service de Toxicologie Clinique, Médico-Légale, de l'Environnement et en Entreprise

CHU de Liège

Thèse de Doctorat présentée en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences Pharmaceutiques et Biomédicales

Année académique 2015-2016





**Université de Liège**

**FACULTE DE MEDECINE**

Département de Pharmacie

Service de Toxicologie Clinique, Médico-Légale, de l'Environnement et en Entreprise

Professeur Corinne Charlier

***Évaluation de l'exposition de l'Homme à différents  
perturbateurs endocriniens non persistants***

Lucas Dewalque

Pharmacien

Candidat Spécialiste en Biologie Clinique

Service de Toxicologie Clinique, Médico-Légale, de l'Environnement et en Entreprise

CHU de Liège

Thèse de Doctorat présentée en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences Pharmaceutique et Biomédicales

Année académique 2015-2016



La toxicité potentielle liée à l'exposition de l'être humain aux perturbateurs endocriniens inquiète les scientifiques depuis plusieurs décennies. Ces substances chimiques qui interfèrent avec le bon fonctionnement du système hormonal sont suspectées d'être impliquées dans le développement de nombreuses pathologies endocriniennes telles que les troubles de la fertilité, le cancer du sein, les maladies métaboliques, les maladies neurodéveloppementales, etc. Cette suspicion est née de l'observation d'une augmentation de l'incidence de ces différentes pathologies endocriniennes conjointement à la contamination toujours plus importante de notre environnement. Si un lien de cause à effet reste, à l'heure actuelle, difficile à démontrer, cette hypothèse est néanmoins appuyée par des données issues de l'expérimentation animale ainsi que par des études épidémiologiques réalisées chez l'Homme où la survenue de maladies a été mise en relation avec le niveau d'exposition.

Dans notre travail de thèse, nous avons évalué l'exposition humaine à certains perturbateurs endocriniens non persistants, à savoir trois classes chimiques pour lesquelles peu de données étaient disponibles en Belgique : les phtalates, les parabènes et la benzophénone-3.

Pour apprécier le niveau d'imprégnation de la population, nous avons développé une méthode analytique originale permettant de rechercher simultanément dans l'urine les biomarqueurs d'exposition de cinq phtalates, quatre parabènes et de la benzophénone-3. Cette méthode, qui consistait en une hydrolyse enzymatique des métabolites de phase-II suivie d'une extraction en phase solide et d'une injection sur chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, a ensuite été validée pour être applicable lors d'études épidémiologiques.

La population qui nous a servi de matériel d'étude était constituée de 261 individus originaires de la Province de Liège. La majorité des participants recrutés présentaient des niveaux mesurables pour la plupart des composés étudiés, témoignage d'une exposition ubiquitaire. Les concentrations urinaires variaient fortement d'un individu à l'autre et pouvaient être différentes en fonction de l'âge et du sexe. De plus, des corrélations significatives entre différents biomarqueurs pouvaient être le reflet de sources communes d'exposition.

Dans la mesure où les propriétés pharmacocinétiques des phtalates sont suffisamment connues pour établir un niveau de risque à partir d'une évaluation de

l'exposition, nous avons procédé à ce calcul de risque pour les différents phtalates mesurés. Cette démarche a consisté à estimer les doses journalières reçues pour les comparer aux doses journalières acceptables publiées par l'Autorité européenne de sécurité des aliments. Sachant que plusieurs phtalates présentent la même toxicité anti-androgénique, le risque d'effets cumulatifs lié à une exposition concomitante à plusieurs de ces composés est vraisemblable. Nous avons évalué ce risque à l'aide du « *hazard index* » et nous avons observé qu'une proportion non négligeable des enfants de moins de 12 ans pourrait être exposée à un « cocktail de phtalates » susceptible d'être nocif pour la santé.

Puisque les phtalates, les parabènes et la benzophénone-3 sont des perturbateurs endocriniens non persistants, nous avons réalisé une étude de chrono-variabilité intra-individuelle pour apprécier la représentativité dans le temps des mesures urinaires de leurs biomarqueurs d'exposition. La reproductibilité des concentrations urinaires et la capacité d'une mesure unique à correctement prédire les niveaux moyens d'exposition sur une période de quatre mois ont été évaluées. Il ressort de ces analyses que, malgré une importante variabilité intra-individuelle, des mesures urinaires ponctuelles peuvent correctement représenter l'exposition chronique d'un individu pour la majorité des biomarqueurs étudiés.

A l'avenir, une des actions prioritaires de la société devra être de réduire les risques d'exposition en améliorant la connaissance des sources et voies d'entrée dans l'organisme des perturbateurs endocriniens. Ceci est tout particulièrement important pour les populations les plus vulnérables comme les femmes en âge de procréer et les enfants.

For several decades, harmful effects of endocrine-disrupting chemicals on human health are a matter of concern. These chemicals may interfere with the body's hormonal system and they have been suspected to be associated with several endocrine pathologies such as fertility disorders, breast cancer, metabolic diseases, neurodevelopmental defects, etc. The increasing incidence of various endocrine disorders these last years, simultaneously with the wide pollution of environment has led to the suspicion that environmental chemicals can be detrimental to human health. Even if a direct correlation is hard to prove, the endocrine disruption hypothesis is supported by the results of animal and epidemiological studies.

Our work has consisted to assess human exposure to three chemical classes of non persistent endocrine-disrupting chemicals poorly studied in Belgium: the phthalates, the parabens and the benzophenone-3.

We first developed a new analytical procedure able to simultaneously quantify the biomarkers of exposure of five phthalates, four parabens and the benzophenone-3 in urine. This method, consisting in an enzymatic hydrolysis of phase-II metabolites followed by a solid-phase extraction and an injection on liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, was validated in order to perform epidemiological studies.

A total of 261 people living in Liege and surrounding areas were included in the study. Nearly all subjects were positive for many of the tested compounds which is in agreement with an ubiquitous exposure. The levels of urinary biomarkers were related to gender and/or age but also to shared sources of exposure to these chemicals.

For phthalates, the risk of exposure was assessed for each individual phthalate and also for the cumulative exposure. Phthalates' daily intakes were estimated based on urinary metabolite levels measured and compared to the tolerable daily intakes established by the European Food Safety Authority. Since several phthalates share the same anti-androgenic activity, the risk of phthalate cumulative exposure is real and it was assessed by hazard index calculation. A significant proportion of children younger than 12 years might be exposed to a mixture of phthalates which is harmful for the health.

Since phthalates, parabens and benzophenone-3 are non persistent compounds, we tried to assess if a single urine measurement can be representative of long or middle term contamination. Beside of the huge variability of urinary biomarker concentrations, spot urine analysis appeared to correctly represent the long-term individual level of exposure for at least a part of the studied compounds.

In the future, the priority of the decision-makers should be to reduce exposure to endocrine disrupters, through a better identification of the sources and ways of contamination, especially for the most vulnerable populations, which are women of childbearing age and children.



D'abord et avant tout, je tiens d'abord à présenter mes plus sincères remerciements au professeur Corinne Charlier qui m'a accueilli dans le service de Toxicologie et qui a suivi de près mon travail durant ces quatre années. Son soutien indéfectible, son enthousiasme pour la recherche sur les perturbateurs endocriniens et ses nombreux conseils m'auront aidé à progresser et à mener à bien cette thèse de doctorat.

Je tiens également à remercier le professeur Guy Plomteux pour ses recommandations avisées et pour son aide lors de nos nombreuses réunions sur l'avancement du travail de thèse.

Mes remerciements vont également à Catherine Pirard pour ses excellents conseils concernant la pratique de laboratoire, ses relectures et le temps qu'elle m'a consacré pour celles-ci.

Ensuite, j'aimerais également remercier Nathalie Dubois pour son appui lors des différentes étapes du développement analytique ainsi que pour son écoute au quotidien.

Merci aux membres de mon comité de thèse – les professeurs et les docteurs Jean-Pierre Bourguignon, Gerald Piérard, Claudine Franchimont, Pascale Quatresooz et Anne-Simone Parent – pour leurs suggestions et également pour avoir pris le temps de suivre mon travail année après année. Je les remercie aussi d'avance, avec le docteur Brice Appenzeller et le professeur Dominique Lison, d'avoir également pris le temps de lire ma thèse. Je remercie tout particulièrement l'équipe de dermatologie/dermatopathologie pour leur enthousiasme pour les études sur les polluants environnementaux.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe scientifique de toxicologie : Raphaël, Virginie, Marine et Innocent pour leur écoute et pour leur soutien. Je remercie également les techniciens de toxicologie – Chantal, Patricia, Viviane, Isabelle, Jessica, Jennifer, Alexandra, Nicolas, Resmi et Laurence – qui m'ont tous aidé d'une façon ou d'une autre durant ces années.

Je souhaite également présenter mes remerciements à Bernadette et Shirley pour les réponses qu'elles ont pu apporter à mes interrogations ainsi que pour leurs nombreux coups de pouce logistiques.

De plus, je tiens à remercier le professeur Adelin Albert pour son aide et ses conseils en termes d'analyse statistique. De même, je remercie mesdames Bernadette Govaerts, Celine Bugli et Sarah Vandepaar pour le temps qu'elles m'ont consacré et l'aide précieuse qu'elles m'ont apporté pour décoder les statistiques de la chrono-variabilité.

Je remercie aussi tous les participants des différentes études réalisées au cours de ce doctorat qui m'ont fourni un ou plusieurs échantillons d'urine. Sans eux, ce travail n'aurait pas été possible. Merci aussi au professeur Véronique Deneys, au professeur Jean Petermans et à Clémence Sagot pour leur aide dans le recrutement des participants.

Merci également à Louise et Anaïs qui m'ont encouragé et poussé à commencer un doctorat. Mes remerciements vont aussi à mes proches, Gilles et Romain notamment, qui m'ont soutenu et encouragé durant ce travail. Je suis également reconnaissant envers ma famille pour son écoute et son soutien ainsi qu'envers ma belle-famille qui m'a accueilli, écouté, soutenu et encouragé durant ces quatre années.

Merci aussi à toi, Mathilde, pour avoir été à mes côtés durant toutes ces années. Sans ta présence, ton soutien quotidien et tes encouragements, rien de tout ceci n'aurait été possible !

## Table des matières

---

Résumé .....	5
Abstract .....	7
Remerciements .....	9
Table des matières .....	11
Liste des abréviations .....	12
Introduction.....	14
a) Le mécanisme de la perturbation endocrinienne .....	18
Publication 1 .....	26
b) Les produits chimiques à effet perturbateur endocrinien .....	33
c) La mesure de l'imprégnation de l'Homme par les perturbateurs endocriniens..	34
Publication 2 .....	36
Partie I : Objectifs du travail.....	43
Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens .....	46
a) Phtalates .....	48
b) Parabènes .....	56
a) Benzophénone-3 .....	60
Partie III : Développement analytique.....	63
Publication 3 .....	67
Partie IV : Contamination de la population générale par les phtalates, les parabènes et la benzophénone-3.....	79
a) La population générale .....	80
Publication 4 .....	84
b) Estimation de l'apport quotidien en phtalates.....	98
Publication 5 .....	100
c) Chrono-variabilité de l'exposition .....	109
Publication 6 .....	111
Partie V : Discussion et perspectives .....	128
Références .....	137
Annexes.....	169
a) Annexe 1 : mode opératoire.....	170
b) Annexe 2 : paramètres de validation ( <i>Helix pomatia</i> ).....	188
c) Annexe 3 : paramètres de validation ( <i>Escherichia coli</i> ).....	208
d) Annexe 4 : paramètres de validation (sans enzyme) .....	228

5-OH-MEHP : mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate  
5-oxo-MEHP : mono-2-éthyl-5-oxo-hexyl phtalate  
APHB : acide para-hydroxybenzoïque  
AR : récepteur aux androgènes  
BBzP : benzylbutyl phtalate  
BMD : benchmark dose  
BP : n-butylparabène  
BP3 : benzophénone-3  
BPA : bisphénol A  
COPHES : Consortium to Perform Human Biomonitoring on a European Scale  
DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène  
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane  
DEHP : di-2-éthylhexyl phtalate  
DEMOCOPHES : Demonstration of a Study to Coordinate and Perform Human Biomonitoring on a European Scale  
DEP : diéthyl phtalate  
DiBP : di-iso-butyl phtalate  
DJA : dose journalière acceptable  
DnBP : di-n-butyl phtalate  
EFSA : European Food Safety Authority  
EP : éthylparabène  
ER : récepteur aux œstrogènes  
ERRy : estrogen-related receptor  $\gamma$   
FLEHS : Flemish Environment and Health Study  
GnRH : gonadotropin releasing hormone  
HI : hazard index  
HPLC : high pressure liquid chromatography  
HQ : hazard quotient  
ICC : coefficient de corrélation intra-classe  
IPCS : Programme International sur la Sécurité des Chimiques  
LH : hormone lutéinisante  
LOAEL : lowest observed adverse effect limit  
LXR : liver X receptor  
MBzP : monobenzyl phtalate

MEHP : mono-2-éthylhexyl phtalate  
MEP : monoéthyl phtalate  
mER : récepteur aux œstrogènes membranaire  
MiBP : mono-iso-butyl phtalate  
MnBP : mono-n-butyl phtalate  
MP : méthylparabène  
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem  
NF-κB : nuclear factor-kappa B  
NOAEL : no observed adverse effect limit  
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques  
OIT : Organisation Internationale du Travail  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PCB : polychlorobiphényle  
PE : perturbateur endocrinien  
PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement  
POP : polluant organique persistant  
PP : n-propylparabène  
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor  
PVC : polychlorure de vinyle  
REACH : Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals  
RfD : dose de référence  
SHBG : sex hormone binding globuline  
SOP : procédure opératoire standardisée  
T3 : triiodothyronine  
T4 : thyroxine  
TCS : triclosan  
TR : récepteur aux hormones thyroïdiennes  
UHPLC : ultra high pressure liquid chromatography  
US EPA : United States Environmental Protection Agency

# Introduction

En 2002, au nom du Programme International sur la Sécurité des produits Chimiques (IPCS), trois partenaires, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) et l'Organisation Internationale du Travail (OIT), ont publié un rapport sur les perturbateurs endocriniens (PE) dans lequel ils furent définis comme des « *substances ou des mélanges de substances exogènes altérant les fonctions du système endocrinien et induisant de ce fait des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou au niveau des (sous)-populations* » (IPCS, 2002). Dans ce texte, on trouvait aussi la définition des PE éventuels qui sont des « *substances ou des mélanges de substances exogènes qui possèdent des propriétés dont on pourrait s'attendre à ce qu'elles mènent à une perturbation endocrinienne chez un organisme intact, ses descendants ou au niveau des (sous)-populations* » (IPCS, 2002). Ce document présentait une synthèse des connaissances disponibles sur la toxicité des PE mais il s'agissait de données obtenues surtout chez l'animal. Chez l'Homme, les effets néfastes potentiels des PE sur la santé ayant été insuffisamment étudiés, les auteurs du rapport concluaient celui-ci en soulignant la nécessité d'investigations supplémentaires (IPCS, 2002).

Entre 2002 et 2012 ont été publiés de nombreux travaux scientifiques sur les PE, leurs effets chez l'Homme et leur toxicité (Diamanti-Kandarakis et al., 2009 ; Kortenkamp et al., 2011 ; Vandenberg et al., 2012 ; de Coster et van Larebeke, 2012). Au terme de cette période (2012), l'OMS et le PNUE ont publié un nouvel « *état de la science* » complétant le rapport de 2002, traitant des effets des produits chimiques PE sur l'environnement et la santé de l'Homme, et qualifiant ce groupe de substances de « *menace mondiale* », en raison de leur toxicité pour la population générale (OMS/PNUE, 2012).

Nous vivons, à l'heure actuelle, dans un environnement contaminé par de nombreuses substances chimiques. Cette situation s'explique par le développement économique, l'accroissement de la qualité de vie et les progrès dans les domaines agricole et industriel, rendus possibles par l'utilisation, parfois massive, de substances chimiques diverses. Par exemple, les pesticides qui ont permis d'augmenter les rendements agricoles dans le but de subvenir ainsi aux besoins alimentaires des populations en nombre toujours plus important. Des innovations dans l'industrie chimique comme la création de plastiques aux propriétés

avantageuses et aux multiples usages se sont accompagnées d'une dispersion environnementale de ces produits chimiques avec apparition d'effets délétères sur la santé de l'Homme. Ces effets toxiques commencent seulement à être compris et sont depuis peu une source d'inquiétude pour de nombreux scientifiques.

Afin de réduire les risques sanitaires, l'Union Européenne – première zone économique majeure à s'intéresser aux PE – a pour objectif de proposer un cadre réglementaire. Selon l'IPCS, une substance est classée comme PE si elle présente un effet sur le système endocrinien, si cet effet est nocif et s'il existe un lien de causalité entre effet et nocivité (IPCS, 2002). Ce lien est toujours très difficile à démontrer. Toutes les substances actives sur le système hormonal ne sont pas nécessairement nocives, par exemple, des médicaments qui agissent sur certaines fonctions endocriniennes. La qualification « d'effet nocif » est également compliquée car difficilement dissociable des réponses adaptatives de l'organisme sur le système hormonal. En raison des limitations dans la définition des PE par l'IPCS, la Commission Européenne a chargé l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) de fournir pour 2013 une nouvelle définition des PE devant servir de socle législatif et qui serait basée non plus sur la nocivité, comme déjà dit, difficile à établir, mais sur le risque sanitaire. Cette définition, sur laquelle pourraient s'appuyer les décideurs politiques, n'a cependant pas encore vu le jour et c'est toujours celle de l'IPCS qui est employée par l'EFSA. Au vu de ce retard et des enjeux sanitaires liés à l'exposition aux PE, la Suède, à laquelle devrait se joindre la France en 2015, a introduit un recours en carence devant la Cour de justice de l'Union Européenne à l'égard de la Commission pour non respect des échéances réglementaires. Dans un même ordre d'idées, plusieurs pays membres de l'Union Européenne, comme le Danemark, le Royaume-Uni et la France, n'ont pas attendu l'existence d'une définition réglementaire pour interdire l'utilisation de certains PE comme le bisphénol A (BPA), les phtalates et les parabènes. Ces exemples illustrent le contexte actuel dans lequel la question de la perturbation endocrinienne a dépassé les sphères scientifiques et académiques pour devenir un enjeu complexe sur le plan politique et économique. En effet, certains produits chimiques parmi les PE, comme des plastifiants ou des pesticides, représentent des volumes de production qui dépassent le million de tonnes par an traduisant ainsi leur importance économique pour le monde industriel. À l'inverse, l'impact des PE sur la santé est estimé annuellement à



plus de 150 milliards d'euros pour l'Union européenne uniquement. Cette estimation ne tient compte que des effets PE suivants : les troubles neurodéveloppementaux chez l'enfant, les maladies métaboliques chez l'adulte et la réduction de la fertilité masculine (Trasande et al., 2015). À l'heure actuelle, le sujet de la perturbation endocrinienne est devenu le lieu d'une confrontation entre des impératifs sanitaires pour lesquels des preuves irréfutables restent difficiles à fournir et le lobbying industriel qui continue de cultiver ce doute pour préserver ses intérêts financiers.

### a) Le mécanisme de la perturbation endocrinienne

Les PE considérés par certains comme une « *menace mondiale* » pourraient être impliqués dans le développement de nombreuses pathologies dont l'incidence a augmenté ces dernières décennies parallèlement au développement économique de nos sociétés et trop rapidement pour qu'elle puisse s'expliquer uniquement par des facteurs génétiques (OMS/PNUE, 2012).

On considère, généralement, comme PE les produits chimiques capables d'interférer à n'importe quelle étape du fonctionnement d'un système endocrinien (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Celui-ci est constitué de cellules, souvent regroupées en glandes, capables de sécréter des hormones. Ces dernières sont des messagers qui agissent localement ou à distance de leur site de sécrétion et qui présentent une structure chimique dérivée, la plupart du temps, d'acides aminés, de stéroïdes ou de peptides. Les hormones régulent de nombreux processus physiologiques dont la croissance, le développement, la reproduction, la grossesse, le métabolisme énergétique, la soif, la satiété, la pression artérielle, le rythme cardiaque, le sommeil, etc. Après leur synthèse, les hormones sont libérées dans le flux sanguin et véhiculées par des protéines de transport jusqu'à leur(s) cible(s) tissulaire(s) où elles vont se fixer à des récepteurs membranaires ou nucléaires spécifiques pour produire un effet avant d'être métabolisées et éliminées. Ces récepteurs présentent des spécificités tissulaire, de réponse et temporelle ce qui signifie (1) que l'hormone n'agit pas sur toutes les cellules de l'organisme car le récepteur cible n'est pas ubiquitaire ou alors il est présent sous différents isoformes dont l'activation génère des réponses spécifiques (par exemples, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , mER $\alpha$  et mER $\beta$ ), (2) que deux cellules présentant un même récepteur hormonal ne répondront pas nécessairement de la même façon car différents corégulateurs transcriptionnels pourraient intervenir et moduler la réponse, et (3) que les effets résultant de l'interaction entre l'hormone et son récepteur varient en fonction du stade de développement de l'individu (Vandenberg et al., 2012).

Le climat hormonal durant les différents stades du développement est en effet critique. Lorsqu'il est bien régulé, il permet une croissance correcte ainsi qu'une programmation normale du système endocrinien pour l'entièreté de la vie de

l'individu. Une perturbation hormonale durant cette période, qui s'étend du stade foetal à la fin de la puberté, peut avoir des conséquences irréversibles et prédisposer à certaines pathologies qui ne s'exprimeront qu'une fois l'individu arrivé à l'âge adulte (Hanson et Gluckman, 2011 ; Mahoney et Padmanabhan, 2010). Le décalage dans le temps entre la fenêtre de vulnérabilité et les effets de l'exposition complique l'étude et la mise en évidence de la nocivité des PE étant donné que les conséquences d'une exposition ne pourraient s'observer que des années après celle-ci alors que toute exposition pourrait avoir cessé (OMS/PNUE, 2012). Les PE pourraient également présenter des effets transgénérationnels ce qui signifie que les conséquences d'une exposition d'un individu à un moment précis n'affecterait pas uniquement ce dernier mais aussi ses descendants (OMS/PNUE, 2012).

Plusieurs mécanismes d'action des PE sont connus :

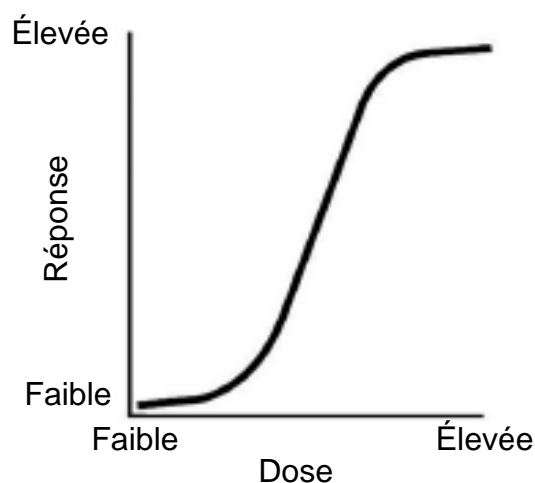
- le plus couramment décrit est celui de l'interaction directe du composé avec un récepteur hormonal, ce qui entraîne l'apparition d'effets agonistes, antagonistes ou modulateurs (De Coster et van Larebeke, 2012) ;
- un autre mécanisme d'action consiste à bloquer ou à stimuler la synthèse ou la libération d'une hormone. C'est le cas des phtalates qui réduisent la production de la testostérone (Howdeshell et al., 2008) ou des parabènes et de certains pesticides qui inhibent l'aromatase et entraînent, de ce fait, une réduction de la synthèse du 17-bêta-œstradiol (van Meeuwen et al., 2008 ; Vinggaard et al., 2000) ;
- certains PE sont également capables d'augmenter la fraction libre, c'est-à-dire active, des hormones en les déplaçant de leurs sites de transport des protéines plasmatiques. C'est, par exemple, le cas de plusieurs alkylphénols et du BPA qui vont interagir avec la SHBG, laquelle lie les hormones sexuelles (Déchaud et al., 1999) ;
- des inhibitions des voies d'élimination d'hormones ont également été décrites. Des sulfotransférases impliquées dans le catabolisme des œstrogènes sont bloquées par le tétrabromobisphénol A et par plusieurs métabolites des dioxines et furanes (Kester et al., 2002) ;

- enfin, des perturbations de l'expression génique par le biais d'altérations épigénétiques ont été décrites sous l'influence de certains PE (Uzumcu et al., 2012 ; Skinner et al., 2011 ; Anway et al., 2006).

Certains PE peuvent agir sur le système hormonal par le biais de plusieurs mécanismes d'action, par exemple en interagissant simultanément avec différents récepteurs hormonaux (Bonefeld-Jørgensen et al., 2007 ; Vandenberg et al., 2012 ; De Coster et van Larebeke, 2012).

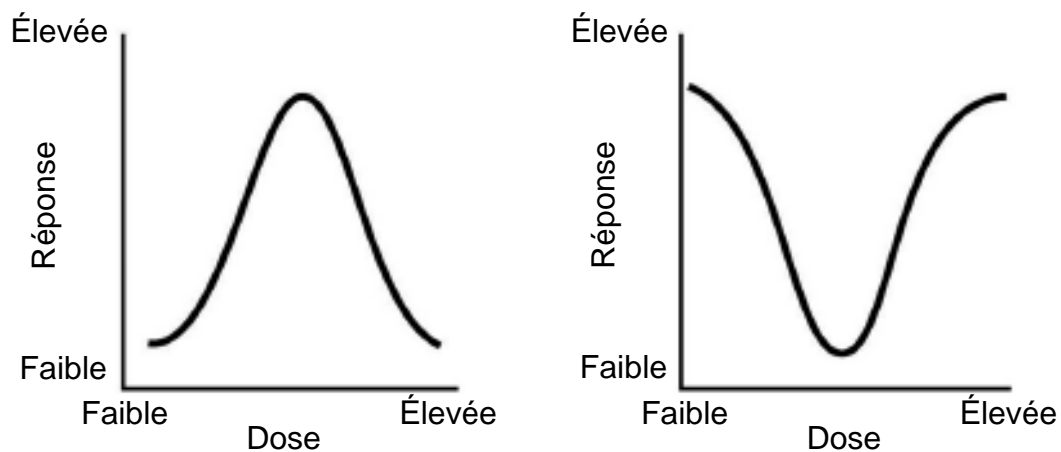
En conclusion, les PE agissent par des mécanismes tellement diversifiés que leur identification en devient problématique nécessitant alors le recours à de trop nombreux tests (OMS/PNUE, 2012). Bien que l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) ait rapporté plusieurs méthodes validées pour l'identification des PE, un grand nombre de mécanismes qui pourraient être pertinents en termes de santé humaine et animale ne sont actuellement pas couverts par ces tests (Kortenkamp et al., 2011). Cette diversité d'action laisse penser que de nombreux produits chimiques n'ont probablement pas encore été identifiés en tant que PE.

Les hormones sont des molécules actives à très faibles concentrations, entre le picomolaire et le nanomolaire, d'une part parce qu'elles se lient avec une très haute affinité à des récepteurs très spécifiques et, d'autre part, parce que la relation entre la dose et la réponse est non linéaire avec un aspect sigmoïde (Figure 1 ; Vandenberg et al., 2012).



**Figure 1 :** Relation dose-réponse non linéaire (Vandenberg et al., 2012).

Ceci implique qu'une légère modification du taux d'une hormone peut engendrer un effet important alors que de grandes variations de concentrations n'auront que peu d'influence si elles interviennent lorsque la réponse est déjà maximale (Vandenberg et al., 2012). Certaines hormones présentent des relations non monotones entre la dose et l'effet, c'est-à-dire avec une inversion du signe de la pente lorsque la concentration augmente (U ou U inversé ; Figure 2).



**Figure 2** : Relations dose-réponse non monotones (Vandenberg et al., 2012).

Plusieurs explications à ces relations dose-réponse non monotones ont été rapportées par Vandenberg et al. (2012). (1) Tout d'abord, l'effet global observé pour une hormone serait, en réalité, la somme de plusieurs relations monotones qui exprimeraient différents effets en raison de spécificités tissulaires ou de réponse. (2) Par ailleurs, en cas de stimulations répétées, des mécanismes de régulation négative des concentrations cellulaires de récepteurs ainsi que des processus de désensibilisation de ces récepteurs pourraient intervenir, ce qui entraînerait finalement une diminution de l'effet observé. (3) Ensuite, l'effet d'une hormone pourrait être diminué à doses élevées par cytotoxicité. (4) Finalement, les hormones en quantité importante pourraient également se lier à d'autres récepteurs qui ne leur sont pas spécifiques et produire d'autres effets. Puisqu'ils agissent sur les mêmes cibles, les hormones et les PE possèdent des propriétés similaires et peuvent, par conséquent, également agir à faibles doses et selon des relations dose-réponse non linéaires et non monotones.

Ces divers et nombreux mécanismes d'action des PE menacent la santé de l'Homme.

De larges études prospectives réalisées dans plusieurs pays d'Europe ont montré une importante diminution de la qualité du sperme durant ces dernières décennies (Jørgensen et al., 2011, 2012 ; Rolland et al., 2013). Celle-ci est maintenant située sous des valeurs qui ont été associées à une réduction de la fécondité chez 23% des jeunes hommes (Skakkebaek, 2010 ; Jørgensen et al., 2011, 2012). Dans certains pays d'Europe, l'incidence du cancer du testicule à cellules germinales s'est vue multipliée par quatre en un demi-siècle (Richiardi et al., 2004). De façon similaire, les cas de cryptorchidie sont deux fois plus fréquents qu'il y a 50 ans (Boisen et al., 2004), et ceux d'hypospadias ont également augmenté (Lund et al., 2009). Ces différentes pathologies seraient en partie responsables des difficultés à procréer observées chez 4 à 17% des couples dans les pays occidentaux (Boivin et al., 2007). On constate également l'augmentation de l'incidence d'autres pathologies comme la puberté précoce (Aksglaede et al., 2009 ; Euling et al., 2008 ; Toppari et Juul, 2010), le cancer du sein (OMS/PNUE 2012), l'hypothyroïdisme congénital (Pearce et al., 2010), l'accouchement prématuré (Beck et al., 2010), les troubles du métabolisme comme le diabète (Danaei et al., 2011 ; Ziegler et al., 2011) et l'obésité (Tremblay et al., 2002). Des troubles du développement cognitif tels que l'autisme (Wingate et al., 2012) et le déficit d'attention associé à de l'hyperactivité (Polanczyk et al., 2007) sont également plus fréquents que par le passé.

Les pathologies citées ci-dessus présentent toutes une composante hormonale susceptible d'être affectée par la présence d'un PE. Par exemple, les pathologies du système reproducteur masculin tels que le cancer du testicule, la réduction de la qualité du sperme, la cryptorchidie et l'hypospadias peuvent être rattachés à une perturbation de la synthèse ou de l'action des hormones androgéniques et de l'insulin-like factor 3 (Kalfa et al., 2009 ; Barthold, 2008 ; Fisher, 2004 ; Luccio-Camelo et Prins, 2011 ; Toppari et al., 2010). D'autres troubles du système reproducteur peuvent être retenus, notamment le syndrome des ovaires polykystiques dont une des hypothèses étiologiques serait la surexposition fœtale aux androgènes (Conway et al., 2014), l'endométriose, partiellement dépendante des œstrogènes (Vercellini et al., 2014) ainsi que plusieurs pathologies tumorales

d'organes ou de glandes endocrines tributaires des hormones sexuelles, comme le cancer de l'ovaire (Brown et Hankinson, 2014), de l'endomètre (Brown et Hankinson, 2014) et de la prostate (Corona et al., 2011) ainsi que le fibrome utérin (Ishikawa et al., 2010). De la même façon, le moment de survenue de la puberté dépend de différentes hormones telles que la GnRH, la kisspeptine et les hormones sexuelles (Toppari et Juul, 2010 ; Tena-Sempere, 2010). Dans le même ordre d'idée, les œstrogènes sont un facteur de risque du cancer du sein (Brown et Hankinson, 2014 ; Key et al., 2002) et le bon déroulement de la grossesse est hautement dépendant de l'œstradiol et de la progestérone (Hess, Nayak et Giudice, 2006).

On peut encore citer l'obésité et le diabète, qui sont des maladies endocriniennes complexes où interagissent de nombreuses hormones impliquées dans le métabolisme des lipides et des sucres, dans la satiété et la régulation des apports alimentaires ainsi que dans le développement des tissus gras (Janesick et Blumberg, 2011 ; Casals-Casas et Desvergne, 2011).

Les hormones thyroïdiennes, sexuelles, hypothalamiques et pituitaires sont toutes impliquées à divers stades du développement du système nerveux central et elles conditionnent également certains processus comportementaux qui pourraient donc être affectés par la présence de PE (Bernal, 2005 ; Berenbaum et Beltz, 2011).

Depuis peu, on suspecte l'implication des PE dans l'ostéoporose et les troubles du remodelage osseux, en raison de l'implication des œstrogènes dans l'homéostasie de l'os (OMS/PNUE, 2012). Cette théorie est également soutenue par l'observation de réduction de la densité osseuse chez l'Homme après une intoxication à des composés œstrogéniques (Agas et al., 2013 ; OMS/PNUE, 2012).

Enfin, connaissant les profondes connexions qui existent entre les systèmes endocriniens et immunitaires (Chryssikopoulos, 1997), les PE pourraient être impliqués dans l'augmentation d'incidence de plusieurs pathologies du système immunitaire comme les allergies (Chalubinski et al., 2006), certaines maladies auto-immunes (Diamanti-Kandarakis et al., 2009), l'asthme (Dodson et al., 2012 ; Kolarik et al., 2008) ou encore des pathologies tumorales de ce système, par exemple certaines leucémies infantiles (Belson, Kingsley et Holmes, 2007 ; Pearce et al., 2014). Ces hypothèses sont supportées d'une part, par l'action de plusieurs PE sur des récepteurs nucléaires impliqués dans l'inflammation et les processus immunitaires tels que NF- $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  et LXR (Liu et al., 2014 ; Hurst and

Waxman, 2003 ; Marmugi et al., 2012) et d'autre part, par l'observation, chez l'être humain, d'associations entre des troubles de l'immunité et l'exposition à certains polluants à effet PE (Hoppin et al., 2013 ; Shiue 2013 ; Wang et al., 2014 ; OMS/PNUE, 2012).

Pour compléter ces notions relatives aux mécanismes d'action des PE, il convient de s'intéresser aux effets à faible dose des PE.

On définit les faibles doses de PE de deux manières, soit comme des concentrations inférieures à celles utilisées dans les tests toxicologiques habituels (tests s'intéressant aux lésions organiques, à la mortalité, à la perte de poids ou à la taille d'une portée), soit comme des doses équivalentes à celles correspondant aux niveaux d'imprégnation d'une population non exposée professionnellement (Vandenberg et al., 2012). En pratique, il s'agit de doses variant du  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$  au  $\text{mg}/\text{kg}/\text{jour}$ . Les effets à faible dose des PE s'expliquent par la sensibilité importante du système endocrinien à de faibles modifications des concentrations d'hormones. Toute modification des concentrations d'une hormone par perturbation de sa synthèse, de son transport ou de son élimination suite à une exposition à un PE est susceptible de produire un effet biologique mesurable (Crofton, 2008 ; Milligan et al., 1998). De même, les PE se liant aux récepteurs hormonaux additionnent leur action à celle des hormones endogènes et peuvent, même avec une affinité de liaison très inférieure à celles-ci, entraîner un dépassement du seuil de stimulation nécessaire pour produire un effet (Crofton, 2008 ; Milligan et al., 1998).

L'existence d'effets à faible dose et de relations dose-réponse non linéaires et non monotones remettent en question les principes d'estimation des doses acceptables sans effet sur la santé c'est-à-dire les DJA. Classiquement, les DJA, qui sont utilisées comme valeurs seuils d'exposition sans effet néfaste attendu, sont établies sur base des NOAEL, LOAEL ou BMD après application de facteurs d'incertitude, lesquels tiennent compte des variations inter- et intra-espèces. En pratique, les DJA sont très rarement testées et elles sont, pour la plupart, extrapolées à partir de tests réalisés à doses élevées sur base du principe selon lequel la relation entre la dose et l'effet est monotone. Comme mentionné précédemment, parce que les hormones ainsi que les PE agissent selon des relations dose-réponse non monotones, des DJA qui préjugent de l'existence de



relations linéaires et monotones entre la dose et l'effet ne peuvent garantir la sécurité de ces composés aux plus faibles concentrations, c'est-à-dire aux niveaux auxquels la population est exposée.

La Publication 1 rapporte les mécanismes de PE influençant la fertilité masculine.

# LA FERTILITÉ MASCULINE MENACÉE PAR LA PRÉSENCE DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS DANS L'ENVIRONNEMENT?

L. DEWALQUE (1), C. CHARLIER (2, 3)

**RESUME :** Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques interférant avec le système hormonal. Ces polluants, présents dans l'environnement, peuvent entraîner l'apparition de maladies chez l'Homme. Dans cet article, nous nous intéressons à ces produits chimiques à effets perturbateurs endocriniens susceptibles d'entraîner une diminution de la qualité du sperme et un syndrome de dysgénésie testiculaire, deux pathologies impliquées dans le déclin de la fertilité masculine. La question de l'influence environnementale sur cette pathologie complexe qu'est l'hypofertilité masculine prend ici tout son sens.

**MOTS-CLÉS :** *Perturbateurs endocriniens - Qualité du sperme - Fertilité - Syndrome de dysgénésie testiculaire*

La pollution de l'environnement par des substances chimiques s'est accentuée au cours des dernières décennies. Conçues pour répondre aux besoins croissants, notamment de l'agriculture, de l'industrie, de la recherche scientifique et de la médecine, ces molécules chimiques, qui ont permis d'améliorer le développement économique de nos sociétés, ont été produites à grande échelle, ce qui a conduit nécessairement à leur libération dans l'environnement.

Ainsi, cette évolution a, logiquement, amené au développement de la toxicologie environnementale, dont l'objectif est d'étudier l'impact des polluants chimiques sur l'environnement et, secondairement, sur la santé de l'être humain. Parmi ces polluants chimiques, certains peuvent être classés dans la catégorie des perturbateurs endocriniens (PEs).

L'International Programme on Chemical Safety de l'Organisation Mondiale de la Santé (1), a proposé une définition des PEs :

- un PE est une substance exogène ou un mélange de substances altérant les fonctions du système endocrinien et, en conséquence, entraînant des effets nocifs dans un organisme intact,

MASCULINE FERTILITY THREATENED BY THE PRESENCE OF ENDOCRINE DISRUPTORS IN ENVIRONMENT ?

**SUMMARY :** Endocrine disruptors are chemicals substances interfering with the hormonal system. These pollutants, present in environment, can lead to diseases in human being. In this article, we take an interest to some endocrine disrupting substances linked to decrease in sperm quality and testicular dysgenesis syndrome, two pathologies involve in masculine fertility decline. The role of environment in complex diseases as male hypofertility is questioned.

**KEYWORDS :** *Endocrine disruptors - Sperm quality - Fertility - Testicular dysgenesis syndrome*

dans sa progéniture ou dans des (sous-) populations;

- un PE potentiel est une substance exogène ou un mélange de substances qui possèdent des propriétés dont on pourrait s'attendre à ce qu'elles amènent à une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, dans sa progéniture ou dans des (sous-)populations.

De nombreux essais permettent de déterminer si une substance est perturbatrice endocrinienne. Brièvement, il existe (2) :

- des techniques *in vitro* permettant d'objectiver le mécanisme d'action du produit (test de liaison au récepteur, test de transduction du signal, test d'inhibition d'enzymes, test de prolifération cellulaire, test de synthèse hormonale,...);

- des techniques *in vivo* utilisées pour mettre en évidence l'effet d'une substance sur un organisme (essai d'utérotrophie, essai sur la reproduction et l'exposition durant le développement, essai sur plusieurs générations,...);

- des techniques *in silico*. Il s'agit de modélisations mathématiques permettant de prédire le profil toxicologique d'une substance;

- des technologies de génomique, protéomique et métabolomique ainsi que l'imagerie cellulaire.

Les PEs sont un groupe hautement hétérogène de produits avec un poids moléculaire inférieur à 1.000 Da, dans lequel on retrouve des substances synthétiques, des substances et hormones naturelles, des médicaments, des métaux lourds

(1) Chercheur, Service de Toxicologie Clinique, Médico-légale, Environnementale et en Entreprise, CHU de Liège.

(2) Professeur, Chef de Service, Service de Toxicologie Clinique, Médico-légale, Environnementale et en Entreprise, CHU de Liège.

(3) Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, Département de Pharmacie, Université de Liège.

et leurs produits de dégradation (les molécules d'une masse atomique supérieure à 1.000 Da ne traversent pas les barrières membranaires).

La présence de ces substances dans l'environnement et l'exposition de la population à celles-ci sont liées à leur persistance, à leur volume de production et aux réglementations en vigueur. Un exemple est celui du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), interdit en Europe et toujours utilisé dans certains pays d'Afrique pour lutter contre le paludisme (3). Les personnes en contact étroit avec ces produits (agriculteurs ou ouvriers d'industrie) sont plus à risque d'être exposés.

La contamination de l'environnement peut être la conséquence soit d'une libération du produit au départ du site d'utilisation [libération de tributylétain, un «anti-salissant» contenu dans la peinture des coques des bateaux (4), contamination de la nourriture par du bisphénol A (BPA) (5)], soit d'un rejet depuis le lieu de production [incinérateurs de déchets ménagers avec production de dioxines dans l'atmosphère (6)] ou soit encore d'un relargage accidentel [contamination du lac Apopka par des pesticides organochlorés (7), contamination de la population de Seveso Italie en 1976 par la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (6)].

Lorsqu'ils sont présents dans l'environnement, les PE peuvent pénétrer dans l'organisme de différentes façons : par voie digestive (consommation d'eau ou d'aliments contaminés (8)), par voie pulmonaire (respiration d'air pollué (8)) ou par voie dermique (application de cosmétiques (9)). Une autre voie de contamination est l'exposition du fœtus et du nouveau-né aux PE par la mère via le cordon ombilical et l'allaitement (10, 11). Plus encore que le mode de transmission, c'est le moment d'exposition aux PE qui est déterminant, notamment pendant le stade fœtal et néonatal, où la différenciation sexuelle et la programmation du système endocrinien ont lieu. Il s'agit d'une période de grande vulnérabilité à des stimuli hormonaux exogènes. Les conséquences de ces expositions pourraient n'apparaître qu'après plusieurs années.

Les mécanismes d'action des PE sont variés et complexes. Les PE peuvent interagir directement avec les récepteurs situés dans le noyau (récepteurs aux œstrogènes, aux androgènes,...) en tant qu'antagoniste, agoniste, agoniste inverse ou agoniste partiel. Ils peuvent aussi se combiner à des récepteurs orphelins (c'est-à-dire, des récepteurs dont le rôle n'est pas connu comme le récepteur aux hydrocarbures aromatiques – AhR), mais aussi à des récepteurs membra-

naires [récepteur œstrogénique membranaire, récepteurs aux neurotransmetteurs (sérotonine, histamine,...)]. Les PE peuvent interférer avec la production, le stockage, le métabolisme, le transport et l'excrétion d'hormones naturelles et influencer, par ailleurs, la production des seconds messagers (AMPC). Des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN) ont également été décrits avec, pour conséquence, des modifications de l'expression de certains gènes (10, 11).

Parmi les effets toxiques observés chez l'Homme exposé aux PE, la reprotoxicité est souvent évoquée, dans la mesure où des interactions avec les hormones sexuelles sont fréquentes. Si cette reprotoxicité semble corroborée par la disponibilité de preuves chez l'animal, l'extrapolation à l'Homme n'est pas encore acceptée par tous (11).

Parmi ces pathologies de la reproduction, on note, chez la femme, le retard de croissance intra-utérin (12), la puberté précoce (13), le syndrome des ovaires polykystiques (13), les troubles du cycle ovarien (14), l'endométriose (15), les affections mammaires bénignes ou malignes (9, 16), les adénocarcinomes vaginaux (17), les léiomyomes utérins (16) et les troubles de la lactation (16).

Chez l'homme, on peut citer le retard de croissance intra-utérin (18), la puberté précoce ou tardive (13), l'hypertrophie de la prostate (19) et le syndrome de dysgénésie testiculaire, comprenant cryptorchidie (absence d'un ou deux testicules dans le scrotum), hypospadias (ouverture de l'urètre sur la face inférieure du pénis), diminution de la qualité du sperme et cancer du testicule (20).

Le syndrome de dysgénésie testiculaire et une diminution de la qualité du sperme entraînent des troubles de la fertilité chez l'homme.

#### SYNDROME DE DYSGÉNÉSIE TESTICULAIRE

Des observations épidémiologiques, ont permis d'émettre l'hypothèse d'un facteur commun – d'origine génétique ou environnementale – à la diminution de la qualité du sperme, à la présence d'anomalies du tractus urogénital mâle (cryptorchidie et hypospadias) et au cancer des cellules germinales du testicule (21). Le mécanisme physiopathologique du syndrome de dysgénésie testiculaire se manifesterait, au stade prénatal, par une altération fonctionnelle des cellules de Leydig et de Sertoli, avec une insuffisance androgénique secondaire et une anomalie du développement des cellules germinales. Diffé-

rentes études *in vivo* ont apporté la preuve que ce syndrome pouvait être induit par l'exposition au stade fœtal à des PE possédant des propriétés œstrogéniques ou anti-androgéniques (pesticides, phtalates, bisphénol A ou BPA,...) (22).

#### **DIMINUTION DE LA QUALITÉ DU SPERME ET TROUBLES DE LA FERTILITÉ**

L'infertilité est définie comme l'incapacité à développer une grossesse après un an de rapports sexuels non protégés. Elle concerne environ 15% des couples. Les hommes sont la cause unique de cette infertilité dans 20% des cas et considérés comme un facteur contributif dans 30-40% des cas (23). Une réduction de la fertilité apparaîtra si la qualité du sperme est diminuée, ce qui se mesurera par un abaissement du nombre ou de la mobilité des spermatozoïdes, mais aussi par l'existence de formes anormales de ces gamètes (1).

Les nombreuses études réalisées à ce jour ont tenté d'étudier l'évolution dans le temps de la qualité du sperme (24) sans qu'il ne soit possible de démontrer que celle-ci ait diminué significativement dans l'ensemble du monde alors que des diminutions existent en fonction des zones géographiques (25).

De nombreux facteurs peuvent, bien entendu, avoir une influence sur le nombre de spermatozoïdes : tout d'abord, des caractéristiques individuelles (ethnicité, âge, maladies, médication, style de vie, tabagisme, activité sexuelle, stress, activité socioprofessionnelle, chaleur,...), mais aussi les conditions de réalisation de l'étude (saison, méthode de prélèvement ou technique analytique) (1, 26). Cependant, ces facteurs confondants ne suffisent pas, à eux seuls, à expliquer les différences observées entre zones géographiques et il faut donc bien admettre la réalité d'une composante environnementale (27).

Cette influence environnementale peut s'exercer par une toxicité directe des PE sur la spermatogenèse à l'âge adulte ou par une toxicité *in utero* ou en phase prépubère entraînant une hypofertilité à l'âge de procréer.

Des preuves d'effets reprotoxiques chez l'homme existent pour plusieurs substances chimiques aux propriétés perturbatrices endocriniennes.

Dans le vaste groupe des PE, certains sont désignés comme polluants organiques persistants (POPs). Il s'agit de composés présents en grande quantité dans l'environnement en raison de leur forte rémanence. Fortement liposolubles,

ces produits vont se concentrer dans la chaîne alimentaire, et une fois résorbés chez l'Homme, dans les tissus adipeux. Parmi les POPs, on trouve les pesticides organochlorés (POCs), les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDDs), les polychlorodibenzo-furanes (PCDFs), les polychlorobiphényles (PCBs), les polybromodiphényléthers (PBDEs) et les acides perfluoroalkyles (PFAAs).

#### *PESTICIDES ORGANOCHLORÉS*

L'emploi des POCs a été banni en Europe mais ils restent encore utilisés en Afrique pour lutter contre la malaria (3). Le p,p'-dichlorodiphényldichloroéthylène (p,p'-DDE), un métabolite du DDT, possède des propriétés anti-androgéniques (28). Malgré l'interdiction d'utilisation, la population continue d'y être exposée via la consommation d'aliments contaminés en provenance du marché mondial. Un lien entre les concentrations sériques en p,p'-DDE et la diminution de la qualité du sperme a été établi par différents auteurs (3, 29). Pour certains, c'est l'exposition *in utero* à ce produit qui serait en relation avec la diminution de la qualité du sperme à l'âge adulte (30).

#### *POLYCHLOROBIPHÉNYLES, POLYCHLORODIBENZO-P-DIOXINES ET POLYCHLORODIBENZO-FURANES*

Les PCBs, dont il existe 209 congénères, étaient largement utilisés comme isolants électriques dans les transformateurs avant d'être réglementés. Lors de la dégradation des PCBs, on ne peut éviter la production de PCDDs (75 congénères) et PCDFs (135 congénères). Ces résidus sont donc produits dans les incinérateurs de déchets ménagers, dans la métallurgie, au cours du processus de fabrication de composés chlorés, dans le blanchissement de la pâte à papier et par les émissions de gaz des voitures. Les PCBs, PCDDs et PCDFs agiraient via le récepteur AhR dont l'activation entraînerait différents effets, dont des altérations de l'équilibre hormonal (10, 11).

Dans plusieurs études, il existe une association inverse entre les niveaux en PCBs dans le sérum ou le liquide séminal et la qualité du sperme. Ces associations ont été retrouvées quelle que soit la gamme de concentrations en PCBs, suggérant qu'il n'y aurait pas d'effet seuil à cette toxicité (31, 32).

Il en va de même pour les produits de dégradation (PCDDs, PCDFs) pour lesquels il existe également une relation inverse entre le niveau d'exposition et la qualité du sperme (6, 33).

*ACIDES PERFLUOROALKYLES*

Les PFAAs sont des résidus de dégradation des composés polyfluorés utilisés comme surfactants dans de nombreux produits industriels ou domestiques. Présents dans les carpettes, les textiles, le papier,... les PFAAs les plus fréquemment observés sont l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS) et l'acide perfluorohexane sulfonique (PFHxS) (34). Sous l'influence des PFAAs, les taux sériques des hormones sexuelles seraient modifiés (35).

Une récente étude, réalisée chez 105 Danois issus de la population générale, a montré que les concentrations sériques des PFOS, PFOA et PFHxS pouvaient être relativement élevées. Cette étude a aussi montré que le nombre de spermatozoïdes était diminué proportionnellement aux taux sériques de PFOS et PFOA (36).

*POLYBROMODIPHÉNYLÉTHERS*

Les PBDEs (209 congénères), utilisés pour ignifuger les plastiques, les matériaux électroniques et les textiles, sont aussi des perturbateurs endocriniens (37).

Une association inverse entre les concentrations en PBDEs et la qualité du sperme a été établie par certains auteurs (38, 39).

*PESTICIDES NON PERSISTANTS*

Les pesticides non persistants comprennent différentes classes de molécules telles que les organophosphates, les carbamates, les pyréthroïdes, les triazines, les acétanilides,... Ces substances, développées pour remplacer les pesticides persistants (organochlorés) lorsque ceux-ci furent interdits, sont utilisées en grandes quantités. L'exposition humaine se fait par la consommation d'aliments contaminés ou par l'inhalation ou le contact dermique avec des pesticides présents dans l'environnement extérieur ou à l'intérieur des maisons (11).

Plusieurs études épidémiologiques, réalisées sur base de questionnaires ou par la mesure des polluants dans l'environnement, ont mis en évidence une diminution de la qualité du sperme chez des agriculteurs qui recouraient à l'utilisation de ces pesticides (40, 41).

Dans la population générale, d'autres études ont été effectuées pour apprécier, d'une part, la qualité du sperme, et d'autre part, la présence de biomarqueurs urinaires spécifiques de l'exposition à certains pesticides. Des associations positives entre la diminution de la qualité du sperme et la présence de ces biomarqueurs ont été obser-

vées pour l'alachlore, le diazinon, l'atrazine, le carbaryl et le chlorpyrifos (11, 42-44), qui présentent des propriétés perturbatrices endocriniennes (11). Pour le carbaryl, cependant, la lésion biochimique pourrait être différente et résulter d'un mécanisme de stress oxydatif avec production de «Reactive Oxygene Species» entraînant une lipopéroxydation membranaire et des dommages sur les spermatozoïdes (44). Enfin, une relation a été établie entre la baisse de la qualité du sperme résultant de dommages à l'ADN des spermatozoïdes et la présence de métabolites urinaires de pesticides pyréthroïdes (45).

*PHTALATES*

Les diesters de l'acide phtalique (phtalates) sont des produits utilisés dans la fabrication des plastiques. Largement répandus, on les retrouve dans des objets aussi divers que jouets, contenants de nourritures, emballages, poches de transfusion, cosmétiques et médicaments (46-48). Ces molécules sont rapidement métabolisées en monoesters phtaliques et excrétées dans l'urine sous forme libre ou conjuguée. La mesure urinaire des monoesters de phtalate permet d'évaluer l'exposition de la population aux composés parents, qui est importante. L'étude NHANES 1999-2000 a montré que, dans plus de 75% de la population générale, on trouvait dans l'urine du monoéthyl phtalate, du mono-2-éthylhexyl phtalate, du monobenzyl phtalate et du mono-n-butyl phtalate (49). Les phtalates possèdent des propriétés anti-androgéniques (11).

Une association négative a été décrite entre la qualité du sperme et les concentrations urinaires de certains phtalates (50, 51). Par ailleurs, dans l'étude de Duty et al., la présence du monoéthyl phtalate urinaire était associée à des dommages au niveau de l'ADN des spermatozoïdes (52). De la même façon, Hauser et al. ont montré que l'exposition simultanée à des phtalates et des PCBs présente des effets néfastes synergiques sur la qualité du sperme; ceux-ci s'expliquent par un effet direct des phtalates, mais aussi par l'action inhibitrice des PCBs sur l'UDP-glucuronyl transférase, ralentissant ainsi l'élimination urinaire des phtalates (53). Cet exemple montre la nécessité de prendre en considération les effets potentiellement additifs et synergiques des mélanges de produits PE.

*BISPHÉNOL A*

Le BPA est utilisé dans la production de polycarbonates et de résines époxy. On peut le retrouver dans les lunettes de soleil, les disques optiques compacts (CDs), les biberons, les bou-

teilles, les boîtes de conserve,... Cette substance est produite à plusieurs millions de tonnes par an. Le BPA est un PE possédant des propriétés œstrogéniques (54).

Une étude récente a montré que les taux de BPA urinaire pourraient être associés avec la diminution de la qualité du sperme et des dommages à l'ADN des spermatozoïdes (55).

#### PARABÈNES

Les parabènes sont des conservateurs antimicrobiens largement utilisés dans les aliments, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques. Ces molécules possèdent des propriétés œstrogéniques et anti-androgéniques. Les parabènes peuvent être retrouvés fréquemment dans l'urine, témoignant d'une exposition importante de la population. L'absorption à travers la peau est la principale voie d'entrée de ces produits dans l'organisme (cosmétiques) (56). Le n-butylparabène est associé avec des dommages à l'ADN au niveau des spermatozoïdes (57).

#### CONCLUSION

Certaines études, chez l'animal et chez l'Homme, constituent des éléments de preuve de l'influence des PEs sur la qualité du sperme, mais il n'y a pas unanimité sur ce sujet. Aussi, de nouvelles études épidémiologiques sont nécessaires pour mieux comprendre les risques encourus par l'Homme, en tenant compte des considérations suivantes :

- la recherche dans les milieux biologiques d'une substance chimique ne donne pas une vue globale sur l'exposition subie par la population puisque de nombreux polluants sont présents simultanément dans l'environnement. Or, diverses études ont montré qu'une exposition conjointe à plusieurs substances pouvait avoir des effets variables : additifs, synergiques, voire antagonistes (58, 59);

- la difficulté de distinguer si l'effet observé est la conséquence d'une exposition durant le développement fœtal ou à la maturité (dommage à l'ADN des spermatozoïdes,...). L'impact des PEs est dépendant de l'âge auquel le patient est exposé, c'est ce qu'on appelle la fenêtre de vulnérabilité. Une exposition durant la période fœtale ou postnatale, que ce soit par voie placentaire, par le lait maternel ou par une autre voie, peut avoir des conséquences sur la qualité du sperme, visibles seulement à partir de l'adolescence (toxicité à long terme);

- la variabilité de rémanence des PEs est importante. Dans le cas des POPs, on peut plus

facilement estimer l'exposition quantitative des individus au stade fœtal ou au début de la vie car ces substances présentent de longues demi-vies dans l'organisme. A l'inverse, la définition du risque attaché aux substances rapidement éliminées de l'organisme représente un défi méthodologique;

- l'absence de relation linéaire entre la dose et la réponse (effets nocifs parfois à très faible dose) rend très difficile l'établissement de doses limites sans effets néfastes observés (No Observed Adverse Effect Limit, NOAELs) qui serviront à définir des doses journalières acceptables (DJA) (60).

Le risque pour l'Homme de développer des maladies est lié à divers paramètres dont l'influence est aujourd'hui bien établie, comme les facteurs génétiques ou le style de vie; cependant, l'incidence de maladies complexes ne peut s'expliquer si l'on ne prend pas en considération les nombreux facteurs environnementaux qui, à des moments divers de notre vie, peuvent moduler les réponses de notre organisme.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. World Health Organisation.— International Programme on Chemical Safety (WHO - IPCS). Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. — <http://www.who.int/pcs> – Consultation du 3 avril 2012.
2. Quignot N, Barouki R, Lemazurier E.— Perturbation endocrinienne et évaluation du risque pour la reproduction humaine : entre défis scientifiques d'aujourd'hui et enjeux de demain. *ERS*, 2011, **10**, 454-468.
3. Aneck-Hahn NH, Schulenburg GW, Bornman MS, et al.— Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *J Androl*, 2007, **28**, 423-434.
4. Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, et al.— The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around southwest England : evidence for the effect of tributyltin from anti-fouling paints. *J Marine Biol Assoc*, 1986, **66**, 611-640.
5. Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, et al.— Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2009, **26**, 928-937.
6. Mocarelli P, Gerthoux PM, Patterson Jr DG, et al.— Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ Health Perspect*, 2008, **116**, 70-77.
7. Guillette LJ Jr, Gross TS, Masson GR, et al.— Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect*, 1994, **102**, 680-688.
8. Scheen AJ, Giet D.— Rôle de l'environnement dans les maladies complexes : pollution atmosphérique et contamination alimentaire. *Rev Med Liège*, 2012, **67**, 226-233.

9. Darbre PD.— Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006, **20**, 121-143.
10. Manning T.— Endocrine-disrupting chemicals : a review of the state of the science. *Australas J Ecotoxicol*, 2005, **11**, 1-52.
11. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC et al.— Endocrine-disrupting chemicals : an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev*, 2009, **30**, 293-342.
12. van den Hazel P, Zuurbier M, Babisch W, et al.— Today's epidemics in children : possible relations to environmental pollution and suggested preventive measures. *Acta Paediatr Suppl*, 2006, **453**, 18-25.
13. Buck LGM, Gray Jr LE, Marcus M, et al.— Environmental factors and puberty timing : expert panel research needs. *Pediatrics*, 2008, **121**, 192-207.
14. Ibáñez L, Potau N, Ferrer A, et al.— Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**, 3391-3393.
15. Rier SE, Foster WG.— Environmental dioxins and endometriosis. *Toxicol Sci*, 2002, **70**, 161-170.
16. McLachlan JA, Simpson E, Martin M.— Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006, **20**, 63-75.
17. Li S, Hursting SD, Davis BJ, et al.— Environmental exposure, DNA methylation and gene regulation : lessons from diethylstilbesterol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **983**, 161-169.
18. Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE.— Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update*, 2001, **7**, 282-286.
19. Maffini M, Rubin B, Sonnenschein C, et al.— Endocrine disruptors and reproductive health : the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, **254-255**, 179-186.
20. Sharpe RM.— Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006, **20**, 91-110.
21. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, et al.— Testicular dysgenesis syndrome : an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*, 2001, **16**, 972-978.
22. Virtanen HE, Rajpert-De Meyts E, Main KM, et al.— Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, **207**, 501-505.
23. Adamson GD, Baker VL.— Subfertility : causes, treatment and outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003, **17**, 169-185.
24. Swan SH, Elkin EP, Fenster L.— Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*, 1997, **105**, 1228-1232.
25. Jørgensen N, Carlsen E, Nerømoen I, et al.— East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area : a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod*, 2002, **17**, 2199-2208.
26. Phillips KP, Tanphaichitr N.— Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2008, **11**, 188-220.
27. Swan SH.— Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: longterm effects in humans. *APMIS*, 2000, **108**, 793-804.
28. Kelce WR, Stone CR, Laws SC, et al.— Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 1995, **375**, 581-585.
29. Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, et al.— Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. *Epidemiology*, 2006, **17**, 450-458.
30. Charlier CJ, Foidart JM.— Comparative study of dichlorodiphenyldichloroethylene in blood and semen of two young male populations : lack of relationship to infertility, but evidence of high exposure of the mothers. *Reprod Toxicol*, 2005, **20**, 215-220.
31. Hauser R, Chen Z, Pothier L, et al.— The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect*, 2003, **111**, 1505-1511.
32. Hsu PC, Huang W, Yao WJ, et al.— Sperm changes in men exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *JAMA*, 2003, **289**, 2943-2944.
33. Comhaire FH, Mahmoud AM, Schoonjans F.— Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). *Reprod Toxicol*, 2007, **23**, 133-137.
34. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, et al.— Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect*, 2007, **115**, 1298-1305.
35. Jensen AA, Leffers H.— Emerging endocrine disrupters: perfluoroalkylated substances. *Int J Androl*, 2008, **31**, 161-169.
36. Joensen UN, Bossi R, Leffers H, et al.— Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect*, 2009, **117**, 923-927.
37. Darnerud PO.— Brominated flame retardants as possible endocrine disrupters. *Int J Androl*, 2008, **31**, 152-160.
38. Abdelouahab N, Ainmelk Y, Takser L.— Polybrominated diphenyl ethers and sperm quality. *Reprod Toxicol*, 2011, **31**, 546-550.
39. Akutsu K, Takatori S, Nozawa S, et al.— Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2008, **80**, 345-350.
40. Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, et al.— A survey of semen indices in insecticide sprayers. *J Occup Health*, 2004, **46**, 109-118.
41. Lifeng T, Shoulin W, Junmin J, et al.— Effects of fenvalerate exposure on semen quality among occupational workers. *Contraception*, 2006, **73**, 92-96.
42. Swan SH, Kruse RL, Liu F, et al.— Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect*, 2003, **111**, 1478-1484.
43. Swan SH.— Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl*, 2006, **29**, 62-68.
44. Meeker JD, Ryan L, Barr DB, et al.— The relationship of urinary metabolites of carbaryl/naphthalene and chlorpyrifos with human semen quality. *Environ Health Perspect*, 2004, **112**, 1665-1670.
45. Meeker JD, Barr DB, Hauser R.— Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Hum Reprod*, 2008, **23**, 1932-1940.

46. Koo HJ, Lee BM.— Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J Toxicol Environ Health A*, 2004, **67**, 1901-1914.
47. Schettler T.— Human exposure to phthalates via consumer products. *Int J Androl*, 2006, **29**, 134-139.
48. Hernández-Díaz S, Mitchell AA, Kelley KE, et al.— Medications as a potential source of exposure to phthalates in the U.S. population. *Environ Health Perspect*, 2009, **117**, 185-189.
49. Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, et al.— Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect*, 2004, **112**, 331-338.
50. Fredricsson B, Moller L, Pousette A, et al.— Human sperm motility is affected by plasticizers and diesel particle extracts. *Pharmacol Toxicol*, 1993, **72**, 128-133.
51. Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, et al.— Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril*, 2002, **78**, 1187-1194.
52. Duty SM, Singh NP, Silva MJ, et al.— The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect*, 2003, **111**, 1164-1169.
53. Hauser R, Williams P, Altshul L, et al.— Evidence of interaction between polychlorinated biphenyls and phthalates in relation to human sperm motility. *Environ Health Perspect*, 2005, **113**, 425-430.
54. Ineris.— Le bisphénol A, mise à jour juin 2010 – [www.ineris.fr](http://www.ineris.fr) – consultation du 3 avril 2012.
55. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, et al.— Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol*, 2010, **30**, 532-539.
56. Darbre PD, Harvey PW.— Paraben esters : review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol*, 2008, **28**, 561-578.
57. Meeker JD, Yang T, Ye X, et al.— Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage. *Environ Health Perspect*, 2011, **119**, 252-257.
58. Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A.— Something from “nothing” - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*, 2002, **36**, 1751-1756.
59. Kamrin MA.— The “low dose” hypothesis : validity and implications for human risk. *Int J Toxicol*, 2007, **26**, 13-23.
60. Eustache F, Mondon F, Canivenc-Lavier MC, et al.— Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect*, 2009, **117**, 1272-1279.

Les demandes de tirés à part sont à adresser à  
Mr L. Dewalque, Service de Toxicologie Clinique,  
Médico-Légale, de l'Environnement et en Entreprise  
CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.  
Email : [lucas.dewalque@ulg.ac.be](mailto:lucas.dewalque@ulg.ac.be)



### **b) Les produits chimiques à effet perturbateur endocrinien**

Les PE constituent un groupe hétérogène de substances chimiques pour la plupart synthétisés par l'Homme mais parfois d'origine naturelle comme les phytoestrogènes du soja (génistéine, daidzéine) ou des mycotoxines (zéaralénone). À l'heure actuelle un millier de substances différentes ont été cataloguées comme PE (TEDX List, 2015 ; OMS/PNUE, 2012) mais ce nombre est probablement sous-estimé dans la mesure où la majorité des substances chimiques synthétiques n'ont pas encore été testées pour les nombreux mécanismes possibles de perturbation endocrinienne (Kortenkamp et al., 2011). En effet, la plupart des tests de toxicologie expérimentale concernent les perturbations des hormones thyroïdiennes, œstrogéniques et androgéniques.

Dans le groupe des PE avérés, on trouve des composés chimiques aux usages très variés comme des plastiques et résines (BPA, bisphénol S, bisphénol F, styrène), des plastifiants (phtalates), et des substances utilisées dans les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle comme agents antimicrobiens ou adjuvants (parabènes, TCS, résorcinol, phtalates) ou comme filtres bloquant les rayonnements ultraviolets (benzophénones, 3-benzylidene-camphor). Sont également considérés comme PE divers pesticides (DDT, chlordane, méthoxychlore, prochloraz, linuron, vinclozoline, manèbe, zinèbe, chlorpyrifos, hexachlorobenzène, oxyde de tributylétain, chlorophénols), des composés ignifugeants utilisés comme retardateurs de flamme (tétrabromobisphénol A, polybromodiphényléthers), des substances employées par l'industrie chimique comme refroidissants, surfactants, lubrifiants ou composants de peinture (polychlorobiphényles, nonylphénols, octylphénols, composés perfluorés) et des produits générés lors de divers processus industriels, pendant le recyclage de papiers ou lors de l'incinération de déchets (dioxines, hydrocarbures aromatiques polycycliques). Certains métaux lourds (plomb, mercure, cadmium) ainsi que certains médicaments (diéthylstilbestrol, dérivés œstroprogestatifs des pilules contraceptives) ont également été décrits comme des PE (TEDX List, 2015).

### **c) La mesure de l'imprégnation de l'Homme par les perturbateurs endocriniens**

Différentes approches sont possibles pour mesurer l'exposition humaine. La première consiste à mesurer les niveaux de polluants directement dans l'environnement pour ensuite estimer la dose d'exposition en fonction de la (des) voie(s) d'entrée dans l'organisme. Parce que l'Homme est potentiellement exposé par voie orale, dermique ou pulmonaire, des mesures dans les aliments, les cosmétiques appliqués sur la peau ou dans les poussières et l'air ambiant peuvent être réalisées pour reconstituer la dose d'exposition totale (Bekö et al., 2013 ; Fromme et al., 2013a ; Ocaña-González et al., 2015). L'autre approche, celle du biomonitoring humain, permet de mesurer directement la dose effective et totale à laquelle un individu ou une population d'individus sont exposés. Le principe du biomonitoring humain consiste à mesurer des biomarqueurs d'exposition chez un sujet. Un biomarqueur d'exposition est défini comme « *une substance exogène ou comme un de ses métabolites ou encore comme le produit d'une interaction entre cette substance et certaines cibles moléculaires ou cellulaires qui est mesuré dans un compartiment d'un organisme* » (NAS/NRC 1989). Le biomarqueur de premier choix est la substance elle-même ou un métabolite spécifique. Le choix se portera préférentiellement sur une matrice facile à prélever et à analyser comme l'urine, le sang ou les phanères. Un des avantages du biomonitoring d'exposition réside dans le fait que la mesure du biomarqueur renseigne sur la somme de toutes les sources d'exposition, connues ou inconnues, de l'individu. Mais par contre, on perd des informations sur l'importance relative des différentes sources et voies d'exposition contrairement aux mesures environnementales, ce qui pourrait limiter d'éventuelles actions préventives visant à réduire l'exposition.

De vastes études épidémiologiques destinées à évaluer l'imprégnation humaine ont montré que la majorité de la population est exposée en permanence et simultanément à la plupart des PE cités ci-dessus (NHANES, 2015 ; Kolossa-Gehring et al., 2007 ; CHMS, 2015 ; Frederiksen et al., 2014). Parce que beaucoup de ces substances agissent par les mêmes mécanismes d'action ou sur les mêmes axes du système endocrinien, les effets résultant de ce cocktail d'exposition sont

vraisemblables mais difficiles à prédire. Dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*, des effets additifs et synergiques ont été observés lors d'une exposition à des mélanges de PE même à des doses auxquelles ces composés ne produisaient aucun effet lorsqu'ils étaient administrés seuls (Silva et al., 2002 ; Kortenkamp et Faust, 2010 ; Christiansen et al., 2009 ; Kortenkamp et al., 2009). Cette possibilité « *d'effets cocktail* » justifie le fait de mesurer simultanément l'exposition humaine au plus grand nombre possible de PE. Cependant, à l'heure actuelle, il n'est pas possible d'atteindre cet objectif à l'aide d'une seule technique analytique en raison de la grande diversité des structures chimiques de ces composés.

L'interprétation des mesures de polluants dans les milieux biologiques est fortement dépendante de la toxicocinétique des composés étudiés. Parmi les PE, certaines molécules comme les pesticides organochlorés (DDT, hexachlorobenzène, hexachlorocyclohexanes), les retardateurs de flamme bromés (polybromodiphényléthers), les dioxines et les intermédiaires de synthèse du téflon (acides perfluorooctanoïque et perfluorooctanesulfonique) ont la capacité de se fixer dans les graisses ou sur certaines protéines de l'organisme, de s'y accumuler et d'y persister pendant des années, voire des décennies (Smith, 1999 ; Yesair et al., 1986 ; Jung et al., 1997 ; Patterson et al., 1989 Shirai et Kissel, 1996 ; Thuresson et al., 2006 ; Olsen et al., 2007). Pour ces polluants organiques persistants (POP), les concentrations sériques sont alors le reflet de l'exposition cumulative sur plusieurs années. A contrario, pour des PE éliminés de l'organisme en quelques heures ou en quelques jours comme, par exemple, le BPA, les phtalates, les parabènes ou le TCS, on préférera les mesures urinaires de polluants, représentatives d'une exposition à court terme ou encore constante (Anderson et al., 2001, 2011 ; Koch et al., 2012 ; Stahlhut et al., 2009 ; Janjua et al., 2008a ; Sandborgh-Englund et al., 2006).

L'apport du laboratoire de toxicologie dans la mise en évidence de la perturbation endocrinienne, décrit dans la Publication 2, comprend l'identification des composés PE et l'évaluation de l'exposition de l'être humain par des mesures d'exposition ou des mesures d'effet.

## Détection des signaux faibles des perturbateurs endocriniens en santé environnementale

LUCAS DEWALQUE  
CORINNE CHARLIER

Domaine universitaire du  
Sart Tilman  
CHU-B35  
Service de toxicologie  
clinique, médico-légale, de  
l'environnement et en  
entreprise  
4000 Liège  
Belgique  
<lucas.dewalque@ulg.ac.  
be>  
<c.charlier@chu.ulg.ac.be>

Tirés à part :  
L. Dewalque

Article reçu le 9 janvier 2013,  
accepté le 6 mai 2013

**Résumé.** Dans l'étude de l'impact des produits chimiques à effet perturbateur endocrinien sur la santé de l'homme, l'apport du laboratoire de toxicologie est significatif. En effet, il peut aider à établir le risque toxique pour l'homme des polluants de l'environnement par des mesures d'exposition (identification et dosage des principaux polluants) ou des mesures d'effet, dans les différents compartiments de l'environnement, sur des populations sentinelles, ou sur l'homme.

**Mots clés :** exposition environnementale ; perturbateurs endocriniens ; polluants environnementaux.

### Abstract

#### **Detection of weak signals of endocrine disruptors in environmental health**

Toxicology laboratories can provide many tools useful for understanding the health impact of endocrine disruptors. They can offer exposure measurement (e.g., identification and quantification of the main pollutants), but can also determine biological impacts, that is, measure effects. These determinations can be performed on water, air or soil, on animals used as sentinels, and also on humans.

**Key words:** endocrine disruptors; environmental exposure; environmental pollutants.

### Les perturbateurs du système endocrinien

La perturbation endocrinienne est un concept vieux d'une vingtaine d'années, apparu avec les premières publications relatives à l'action - chez l'homme - de produits chimiques sur la fonction gonadique.

Des pesticides organochlorés, principalement le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), les polychlorobiphényles (PCB), les dioxines, les composés perfluorés, tels que l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) et le perfluorooctane sulfonate (PFOS), des phtalates et parabènes, le triclosan, le bisphénol A ainsi que certains métaux lourds, comme le cadmium, le plomb ou le mercure, ont été régulièrement soupçonnés puis reconnus comme

agents causals, ou au moins comme facteurs de risque de pathologies où une étiologie hormonale est décrite, parmi lesquelles le cancer du sein, l'hypofertilité masculine ou la puberté précoce [1-9]. Ainsi, ce sont les perturbations des fonctions hormonales sous la dépendance des stéroïdes sexuels qui sont le mieux décrites dans la littérature [10]. Les actions de ces produits chimiques sur les gonades sont, au moins partiellement, identifiées, se traduisant par des effets agonistes ou antagonistes des ligands naturels des récepteurs aux estrogènes ou aux androgènes [11]. Cette similarité d'effet s'explique soit par une analogie de structure avec le ligand naturel, soit, par exemple pour les PCB coplanaires ou certains isomères de la dioxine, par répression du gène codant pour les récepteurs aux estrogènes [12]. Les perturbateurs endocriniens peuvent également modifier le métabolisme des hormones circu-

Pour citer cet article : Dewalque L, Charlier C. Détection des signaux faibles des perturbateurs endocriniens en santé environnementale. *Environ Risque Sante* 2013 ; 12 : 345-51. doi : 10.1684/ers.2013.0630

lantes par induction ou inhibition enzymatique. Ainsi, le p,p'-DDE stimule l'activité de l'aromatase, qui est responsable de la transformation périphérique de la testostérone en 17 $\beta$ -estradiol, alors que des parabènes comme les méthyl-, éthyl- et propylparabène l'inhibent [13, 14]. Parfois, les perturbateurs endocriniens peuvent entraîner une déviation métabolique. Alors que physiologiquement le 17 $\beta$ -estradiol est métabolisé en estrone, puis en 2-hydroxyestrone faiblement anti-estrogénique, la métabolisation du 17 $\beta$ -estradiol, en présence de p,p'-dichlorodiphényldichloroéthylène (p,p'-DDE), conduira à la formation de 16 $\alpha$ -hydroxyestrone fortement estrogénique et génotoxique [15].

Mais les modifications hormonales sexuelles induites par les perturbateurs endocriniens ne sont pas les seules toxicités reconnues. Certains perturbateurs endocriniens sont susceptibles d'altérer le fonctionnement d'autres glandes endocrines spécialisées qui fabriquent des hormones contrôlant d'autres fonctions de l'organisme. Les phtalates, le DDT, l'hexachlorobenzène, les PCB, les retardateurs flamme bromés, le pentachlorophénol, le bisphénol A ou les alkylphénols interfèrent sur divers mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes comme la liaison au récepteur thyroïdien, la capture d'iode par la glande thyroïdienne, la liaison des hormones thyroïdiennes et de l'iode plasmatique à des protéines de transport, l'action de la thyroperoxydase et des 5'-dédiodes [16, 17]. Une exposition aux xénobiotiques peut entraîner divers troubles thyroïdiens et des altérations du neuro-développement lors d'une exposition *in utero* [16, 17].

Par ailleurs, il est de plus en plus reconnu que l'obésité est une maladie hormonale complexe où s'ajoutent aux facteurs génétiques et comportementaux, des facteurs environnementaux [18]. L'exposition à des polluants comme le bisphénol A, les PCB, les phtalates, le tributylétain, les retardateurs de flamme bromés et PFOA est pour un nombre croissant d'entre eux susceptible d'entraîner des perturbations métaboliques pouvant conduire à l'obésité et/ou au diabète [10, 19, 20]. Ces substances chimiques ont été désignées sous les termes d'« *obésogènes* », c'est-à-dire capables de favoriser la prise de poids, ou de « *perturbateurs métaboliques* », entraînant en fait une altération du métabolisme lipidique, une sensibilité plus élevée pour le glucose et une prise de poids. Les mécanismes d'action biochimique de ces polluants sont nombreux, comprenant notamment des interactions avec les récepteurs aux estrogènes, aux hormones thyroïdiennes, aux glucocorticoïdes et aux arylhydrocarbones impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique, mais pouvant également être le fait d'effet sur le « *peroxisome proliferator-activated receptor* » (PPAR), véritable senseur lipidique [21]. L'effet diabétogène existe également pour les produits chimiques, tels que le bisphénol A, des phtalates et parabènes qui, soit augmentent la résistance à l'insuline et induisent une

apoptose des cellules  $\beta$  de Langerhans, soit sont capables de perturber le message biochimique véhiculé par le couple leptine/ghréline, en amenant un déséquilibre des apports alimentaires, ce qui favorise l'obésité [21-23].

On peut encore signaler une toxicité neurologique apparaissant après exposition à des perturbateurs endocriniens. Cela n'est pas étonnant puisqu'il existe de nombreuses relations entre le système endocrinien et le système nerveux. Les hormones thyroïdiennes et sexuelles sont impliquées dans le neuro-développement, et l'environnement hormonal durant la grossesse a une influence sur le neuro-comportement sexuel pendant la vie de l'individu [24, 25]. Si le plomb et le mercure sont des neurotoxiques connus de longue date, le rôle joué par des toxiques organiques comme le bisphénol A, les phtalates, les PCB ou les retardateurs de flamme bromés est de plus en plus souvent évoqué [26]. On pense qu'ils induisent une apoptose cellulaire et un stress oxydatif accru dans les neurones mais aussi qu'ils affectent les mécanismes de signalisation intercellulaires entraînant des déficits cognitifs et des troubles de l'attention chez l'enfant [27-32].

Pour terminer, des polluants chimiques aux propriétés perturbatrices endocriniennes possèdent également une toxicité non hormonale. Des phtalates ont été associés à des symptômes allergiques asthmatiformes chez l'enfant [33]. Parmi les composés perfluorés, les PFOA et PFOS présentent une toxicité immunitaire [34].

On peut donc constater et admettre aujourd'hui que les perturbateurs endocriniens présents dans notre environnement peuvent agir sur de multiples cibles biochimiques (transmetteurs, enzymes, hormones, récepteurs...), ce qui explique la difficulté de comprendre l'effet final et global de ces substances. La complexité du problème est évidemment aussi liée au très grand nombre de produits chimiques concernés, présents dans les différents compartiments de notre environnement [10].

## Apport du laboratoire de toxicologie

Pour tenter d'apporter une réponse aux nombreuses questions liées aux effets potentiellement toxiques de perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement, le laboratoire de toxicologie environnementale dispose de quelques moyens. Il est capable d'effectuer des mesures d'exposition (identification et quantification des perturbateurs endocriniens) et des mesures d'effets (objectivation des effets toxiques des perturbateurs endocriniens sur divers organismes). Ces mesures d'exposition et d'effet peuvent être réalisées sur les différents milieux de l'environnement, sur des popula-

tions sentinelles, sur des modèles *in vitro* ou *in vivo* ou encore chez l'homme.

### Mesure de l'exposition dans l'environnement

La présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement peut être recherchée dans les différents milieux que sont l'air, l'eau, les sols, les aliments, ... La mesure d'exposition peut être illustrée par le protocole de surveillance de la qualité des eaux en région wallonne (Belgique), qui consiste à rechercher une cinquantaine de résidus de pesticides dans les eaux souterraines sur des prélèvements effectués plusieurs fois au cours de l'année. À partir de ces données, on établit un indice de la qualité des eaux ainsi surveillées sur la base des concentrations moyennes annuelles des 9 pesticides les plus problématiques en région wallonne, dont l'atrazine, un perturbateur endocrinien rémanent dans les milieux aquatiques. Sur plus de 400 sites étudiés entre 2000 et 2005, une contamination de 61 % d'entre eux par des résidus de pesticides de nature chimique très diverse a été mise en évidence. La répétition à intervalles de temps réguliers de ces mesures permet d'évaluer l'évolution de la contamination des milieux aquatiques [35]. Un autre exemple de mesure d'exposition est fourni par l'*European Food Safety Authority* (EFSA), qui comprend 27 États membres de l'UE et deux pays supplémentaires de l'espace économique européen (l'Islande et la Norvège). L'EFSA établit chaque année un rapport d'analyse sur la présence de résidus de pesticides dans les aliments. En 2010, 77 000 échantillons répartis dans 500 catégories d'aliments furent analysés : 97,2 % contenaient des résidus de pesticides et 1,6 % renfermaient des quantités de pesticides au-dessus des limites légales maximales en résidus [36].

### Mesure de l'effet sur des populations sentinelles

Les animaux sentinelles constituent un moyen fort intéressant de surveiller biologiquement l'environnement en examinant systématiquement et régulièrement des mesures effectuées sur les animaux exposés à la pollution environnementale. Parmi les espèces animales choisies, on trouve la chevaine (*Leuciscus cephalus*), le gardon (*Rutilus rutilus*), le chabot (*Cottus gobio*), l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) ou encore l'huître (*Ostrea edulis*) [37]. Sur les animaux sentinelles, on peut envisager de réaliser des mesures d'exposition (quantifier les polluants) ou d'effectuer des mesures d'effet. Ces mesures d'effet comprennent des données comportementales (on notera la disparition, l'augmentation ou la variation densitaire de la population sentinelle étudiée) et des tests biologiques reflétant la conséquence de l'exposition à un perturbateur endocrinien, qu'il soit

estrogénique, androgénique, ou qu'il agisse sur les axes thyroïdien ou neurologique (dosages de la vitellogénine, de spigine, de l'acétylcholinestérase...) [38-40].

### Étude du mécanisme de perturbation hormonale - modèle *in vitro* et *in vivo*

La toxicologie expérimentale que l'on peut aborder par les modèles de toxicologie *in vitro* ou *in vivo* permet d'étudier la toxicité à court et à long terme des produits chimiques. C'est l'objectif de la législation REACH [41] qui prévoit l'obligation d'évaluer la toxicité de tous les nouveaux produits chimiques proposés à la vente mais aussi, progressivement, de tous ceux qui étaient présents sur le marché avant la date d'application du règlement en décembre 2008. Le but est de mieux mesurer les risques pour la santé de la faune et de l'homme exposés aux produits chimiques de l'environnement. Les produits fabriqués (ou importés) à moins d'une tonne par année ne sont pas concernés par la totalité des tests en vigueur, ce qui ne les rend cependant pas moins toxiques. Le dispositif REACH n'est cependant pas optimal et la critique la plus sérieuse que l'on peut lui faire concerne le temps qui sera nécessaire pour rattraper les quelques deux millions de dossiers toxicologiques introduits par l'industrie avant 2008. De plus, évaluer le caractère perturbateur endocrinien d'une substance chimique relève souvent d'un défi. Comme nous l'avons précédemment indiqué, les mécanismes par lesquels un toxique peut altérer l'homéostasie hormonale sont nombreux. Il est donc normal qu'il n'existe pas un test unique pour déterminer le potentiel perturbateur endocrinien, mais de nombreux tests *in vitro* et *in vivo*. On peut citer la liaison au récepteur, la prolifération cellulaire, la modification de l'expression de gènes, le test utéro-trophique, le test d'Hershberger, le test d'exposition *in utero* ou prépubère avec *end-points* précis (malformations congénitales, développement à la puberté, comportement sexuel...) [42]. De plus, ces effets doivent être mesurés sur plusieurs générations [42]. Les tests *in silico*, jugés moins fiables que les tests *in vitro* et *in vivo*, sont utilisés comme outils de « *pré-screening* » [43]. Pour rendre ces essais de qualité satisfaisante, capables de répondre aux exigences de REACH, l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) propose de coordonner le programme permettant le développement et la validation de tests de *screening* applicables des perturbateurs endocriniens [42, 44].

### Mesure d'exposition et d'effet chez l'être humain

Chez l'homme, on peut réaliser deux types de mesures : des mesures d'exposition et des mesures d'effet. Les mesures d'exposition consistent à rechercher,

identifier et quantifier les polluants qui contaminent les fluides biologiques. Les mesures d'effet sont des marqueurs qui permettent d'établir les conséquences de l'exposition. Par exemple, la mesure de la distance anogénitale, l'incidence des cas de cryptorchidies et d'hypospadias, la détermination de la qualité du sperme, la capacité estrogénique totale du sérum, l'étude des métabolismes thyroïdien et glucidique [45] sont autant de paramètres à mettre en relation avec les effets toxiques résultant de l'exposition environnementale aux produits chimiques.

Cependant, la plupart des effets ne sont pas spécifiques d'un polluant bien précis, et surtout, les mesures d'effet interviennent assez tard dans le processus pathologique, alors que les mesures d'exposition sont plus précoces. Pour cette raison, mais également parce que les biomarqueurs d'effet ne sont pas encore validés actuellement de manière unanime, on recourt davantage aux mesures d'exposition. Celles-ci peuvent se pratiquer sur divers prélèvements biologiques. On choisira le milieu biologique en tenant compte des caractéristiques physicochimiques des perturbateurs endocriniens et de leur toxicocinétique dans l'organisme. On peut, entre autres, proposer le sang, l'urine, les cheveux, le lait maternel, le méconium, ... [46, 47]. Pour les polluants organiques persistants (POP), très rémanents et bioaccumulables, le sang constitue - chez l'adulte, à la puberté ou en période périnatale - le milieu biologique de référence. Certains POP, en raison de leurs caractéristiques lipophiles, vont se stocker dans les tissus adipeux de l'individu. La mesure sérique représentera un aperçu de la fraction libre de la charge corporelle totale de ces polluants qui sera proportionnelle à la masse graisseuse de l'individu. C'est pourquoi les valeurs sériques des PCB, DDT et polybromodiphényléther (PBDE) sont la plupart du temps exprimées en  $\mu\text{g/g}$  de lipides [48]. D'autres POP moins lipophiles comme les PFOS et PFOA ne se stockent pas dans les graisses mais se lient préférentiellement aux protéines plasmatiques. Les valeurs sériques seront alors exprimées en  $\mu\text{g/L}$ . Les atomes de fluor présents dans ces molécules leur confèrent une résistance aux enzymes plasmatiques et en conséquence une longue rémanence chez l'être humain avec des temps de demi-vie respectivement de 3,5 et de 4,8 années pour les PFOA et PFOS [49].

La période de vulnérabilité maximale aux perturbateurs endocriniens est sans aucun doute la période périnatale [27]. C'est à ce moment de la vie, durant le développement embryonnaire, que s'installent et se configurent les mécanismes d'homéostasie hormonale. Une perturbation des taux hormonaux apparaissant au cours de cette période critique peut avoir des conséquences au long terme pour l'individu qui ne s'expriment qu'après plusieurs années. En raison de la difficulté importante d'effectuer un prélèvement biologique à cette période de la vie, des modèles pharmacocinétiques, au moins pour les polluants organiques persistants, ont été développés pour estimer le niveau de contamination de

l'individu au cours de sa vie embryonnaire à partir des résultats observés chez l'adolescent ou l'adulte [10].

À la différence des POP, d'autres perturbateurs endocriniens sont rapidement éliminés de l'organisme par voie urinaire, avec ou sans métabolisation. Pour eux, une urine est le milieu biologique le mieux adapté à leur mise en évidence. Répondant à ces critères, on peut citer les phtalates, les parabènes, le triclosan et le bisphénol A, tous produits à haut tonnage et pour lesquels l'exposition de la population est ubiquitaire [50-52]. Rapidement éliminés de l'organisme, la mesure urinaire de ces composés reflète une exposition récente. À l'inverse, la mesure urinaire du cadmium, un métal lourd présentant des propriétés estrogéniques, est le reflet de la charge corporelle de l'individu. Les taux urinaires de cadmium varient peu au cours du temps, parce que le cadmium est stocké dans les reins et donc éliminé de façon régulière [53].

## Laboratoire d'analyses de toxicologie environnementale

Pour doser les polluants organiques persistants et les polluants organiques non persistants, les méthodes analytiques utilisées comprennent une étape initiale d'extraction de l'échantillon biologique (appelée parfois étape de purification), au moyen d'un dispositif en phase solide et en phase liquide. Avant extraction, un standard interne est ajouté à l'échantillon biologique. Dans les analyses par spectrométrie de masse, le standard interne correspond à la molécule recherchée dans laquelle certains atomes ont été remplacés par des isotopes de masses différentes (un carbone 12 remplacé par un carbone 13 ou un hydrogène remplacé par un deutérium), ce qui permettra au détecteur de différencier les deux molécules. Le recours au standard interne est nécessaire pour corriger les variations observées au cours de différentes extractions d'un échantillon biologique, pour prendre en compte l'effet matrice (augmentation ou diminution du signal imputable à la matrice co-extraite), pour réduire les erreurs de précision [54]. Après l'étape de purification, l'extrait obtenu est injecté sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide, couplé à un détecteur par spectrométrie de masse. La très grande sensibilité analytique de la méthode permet de quantifier des molécules à la concentration du ppb ou du ppt<sup>1</sup>. La spécificité de la spectrométrie de masse en tandem est excellente. En permettant de rechercher des empreintes de fragmentation propres aux molécules d'intérêt, cette technique est capable de détecter les signaux faibles des perturbateurs endocriniens. La limitation du laboratoire de

<sup>1</sup> ppb : *part per billion*/partie par milliard ; ppt : *part per trillion*/partie par billion.

toxicologie environnementale est liée à l'impossibilité de rechercher et de quantifier la totalité des substances chimiques à effets perturbateurs endocriniens (environ 800 substances chimiques à effet perturbateur endocrinien sont recensées, comprenant des molécules de structures chimiques très différentes) [10, 55]. Une difficulté analytique supplémentaire concerne la disponibilité des standards utilisés dans les techniques de spectrométrie de masse, qui est parfois inexistante spécialement s'il s'agit de produits de dégradation de la molécule parent.

À titre d'exemple, dans notre laboratoire, une technique d'identification et de quantification des polluants organiques persistants a été développée pour les organochlorés [PCB (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), DDT (op',pp'), DDE (op',pp'),  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane, dieldrine, heptachlore, endrine, chlordécone, chlorobenzène (penta et hexa)], les perfluorés (PFOS et PFOA) et les organobromés (tétrabromobisphénol A, hexabromocyclododécane) [56]. Une autre méthode est utilisée pour les dosages urinaires des perturbateurs endocriniens non-POP, incluant les principaux phtalates [monoéthylphtalate (MEP), mono-2-éthylhexylphtalate (MEHP), mono-2-éthyl-5-oxohexylphtalate (5-oxo-MEHP) et mono-2-éthyl-5-hydroxyhexylphtalate (5-OH-MEHP), monobenzylphtalate (MBzP), mono-*n*-butylphtalate (MnPB), monoisobutylphtalate (MiBP)], les parabènes (méthylparaben, éthylparaben, *n*-propylparaben, *n*-butylparaben), le bisphénol A, le 2,5-dichlorophénol, le 4-*n*-nonylphénol, la benzophénone-3 et le triclosan [50].

## Mécanismes multiples, expositions multiples

Dans les mesures d'exposition, les mesures d'effet, l'interprétation des résultats obtenus est difficile en raison de la complexité des effets métaboliques reconnus à certains perturbateurs endocriniens. En effet, certains produits chimiques vont agir simultanément sur des cibles différentes. Pour le bisphénol A, qui est susceptible de perturber simultanément la voie thyroïdienne, la fonction neurologique et la biosynthèse des hormones gonadiques, l'importance de la dose d'exposition orientera le type de toxicité observée.

Par ailleurs, plusieurs substances chimiques qui agissent sur une même cible peuvent exercer des effets

additifs, synergiques ou antagonistes. Pour cette raison, une attention toute particulière sera accordée aux effets provoqués par l'exposition à un mélange de plusieurs perturbateurs endocriniens. Dans cette hypothèse, les effets sont souvent sous-estimés, voire méconnus. L'illustration de cette difficulté trouve toute son expression dans l'exemple fourni par Ulla Hass (Institut danois de l'alimentation) [57]. Elle a démontré que chez des rats traités par trois pesticides différents, administrés isolément et à des concentrations inférieures à la dose journalière acceptable (DJA), on n'observait aucune malformation reprotoxique de type hypospadias. En revanche, l'administration de ces trois produits en mélange, aux mêmes concentrations inférieures à la DJA, entraîne une augmentation significative de la fréquence d'hypospadias chez les rats traités [57].

Mesures d'exposition ou mesures d'effets devront donc prendre en considération ces interactions potentielles. Il faudra utiliser plusieurs techniques d'analyses pour identifier le plus grand nombre possible de perturbateurs endocriniens et espérer progresser dans la reconnaissance des effets interactifs des polluants.

## Conclusion

En conclusion, on peut affirmer aujourd'hui que les effets des perturbateurs endocriniens sur la fonction gonadique sont de plus en plus connus et de mieux en mieux décrits dans la littérature scientifique. Mais aujourd'hui, on assiste à une prise de conscience du fait que les perturbateurs endocriniens peuvent entraîner des anomalies hormonales à d'autres niveaux, avec un impact possible non seulement sur des maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète, mais encore sur le développement neurocomportemental. Dans l'étude de la mesure de l'exposition et de la mesure d'effet de ces polluants sur la santé de l'homme, le laboratoire de toxicologie apporte une contribution significative, qui s'accroîtra indubitablement dans un avenir proche. ■

## Remerciements et autres mentions

Financement : aucun ; conflits d'intérêts : aucun.

## Références

1. Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 1406-14.

2. Kortenkamp A. Are cadmium and other heavy metal compounds acting as endocrine disruptors? *Met Ions Life Sci* 2011 ; 8 : 305-17.



3. Dairkee SH, Seok J, Champion S, Sayeed A, et al. Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 2076-80.
4. Meeker JD, Hauser R. Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction. *Syst Biol Reprod Med* 2010 ; 56 : 122-31.
5. Joensen UN, Bossi R, Leffers H, Jensen AA, Skakkebaek NE, Jørgensen N. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect* 2009 ; 117 : 923-7.
6. Hauser R. Urinary phthalate metabolites and semen quality: a review of a potential biomarker of susceptibility. *Int J Androl* 2008 ; 31 : 112-6.
7. Wolff MS, Teitelbaum SL, Pinney SM, et al. Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environ Health Perspect* 2010 ; 118 : 1039-46.
8. Rasier G, Toppari J, Parent AS, Bourguignon JP. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data. *Mol Cell Endocrinol* 2006 ; 254 : 187-201.
9. Toppari J, Juul A. Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers. *Mol Cell Endocrinol* 2010 ; 324 : 39-44.
10. Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, et al. *State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and World Health Organization (WHO)*. Geneva ; New York : WHO ; UNEP, 2012. (<http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>)
11. Meeker JD, Yang T, Ye X, Calafat AM, Hauser R. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect* 2011 ; 119 : 252-7.
12. Rier SE, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Toxicol Sci* 2002 ; 87 : 3391-3.
13. You L, Sar M, Bartolucci E, Ploch S, Whitt M. Induction of hepatic aromatase by p,p'-DDE in adult male rats. *Mol Cell Endocrinol* 2001 ; 178 : 207-14.
14. van Meeuwen JA, van Son O, Piersma AH, de Jong PC, van den Berg M. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008 ; 230 : 372-82.
15. Kelce WR, Stone CR, Laws CS, et al. Persistent DDT metabolite, pp'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 1995 ; 375 : 581-5.
16. Howdeshell KL. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environ Health Perspect* 2002 ; 110 : 337-48.
17. Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE, Main KM. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* 2006 ; 154 : 599-611.
18. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 2005 ; 85 : 1131-58.
19. Newbold RR. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)* 2010 ; 9 : 206-17.
20. Grun F, Blumberg B. Endocrine disrupters as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 2009 ; 304 : 19-29.
21. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 2011 ; 73 : 135-62.
22. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Environmental estrogens and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2009 ; 304 : 84-9.
23. Hatch EE, Nelson JW, Stahlhut RW, Webster TF. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int J Androl* 2010 ; 33 : 324-32.
24. Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol* 2008 ; 20 : 784-94.
25. Balthazart J. Minireview: hormones and human sexual orientation. *Endocrinology* 2011 ; 152 : 2937-47.
26. Landrigan PJ, Goldman LR. Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. *Health Aff (Millwood)* 2011 ; 30 : 842-50.
27. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev* 2009 ; 30 : 293-342.
28. Tian YH, Baek JH, Lee SY, Jang CG. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol A induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse* 2010 ; 64 : 432-9.
29. Yamano Y, Miyakawa S, Iizumi K, et al. Long-term study of urinary bisphenol A in elementary school children. *Environ Health Perspect* 2008 ; 116 : 332-7.
30. Yolton K, Xu Y, Strauss D, Altaye M, Calafat AM, Khoury J. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicol Teratol* 2011 ; 33 : 558-66.
31. Carpenter DO. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Rev Environ Health* 2006 ; 21 : 1-23.
32. Eubig PA, Aguiar A, Schantz SL. Lead and PCBs as risk factors for attention deficit/hyperactivity disorder. *Environ Health Perspect* 2010 ; 118 : 1654-67.
33. Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ, et al. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 2004 ; 112 : 1393-7.
34. Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 2007 ; 99 : 366-94.
35. Delloye F, Imerzoukène S, Masset R, et al. *État des nappes d'eau souterraine de la wallonie - mars 2013*. Direction de la Coordination des données ; Direction des Eaux souterraines, 2013. (<http://environnement.wallonie.be>).
36. Brocca D, Medina-Pastor P, Miron I, et al. ; European Food Safety Authority (EFSA). *The 2010 European Union report on pesticide residues in food*. Parma (Italie) : EFSA, 2013. (<http://www.efsa.europa.eu/fr/>).
37. Buck WB. Animals as monitors of environmental quality. *Vet Hum Tox* 1979 ; 21 : 277-84.
38. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003 ; 13 : 57-149.
39. Fulton MH, Key PB. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 2001 ; 20 : 37-45.
40. Sumpter JP, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 1995 ; 103 : 173-8.
41. Parlement Européen ; Conseil de l'Union Européenne. Règlement CE N° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement

(CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 2006.

42. Quignot N, Barouki R, Lemazurier E. Perturbation endocrinienne et évaluation du risque pour la reproduction humaine : entre défis scientifiques d'aujourd'hui et enjeux de demain. *Environ Risque Sante* 2011 ; 10 : 454-68.

43. Jacobs MN. In silico tools to aid risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Toxicology* 2004 ; 205 : 43-53.

44. OECD. *Testing for endocrine disrupters*. Paris : OECD, 2012. (<http://www.oecd.org/>).

45. Ayotte P, Dewailly E, Lambert GH, et al. Biomarker measurement in a coastal fish-eating population environmentally exposed to organochlorines. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 1318-24.

46. Tsutsumi O. Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 ; 93 : 325-30.

47. Charlier C, Foidart JM, Pitance F, et al. Environmental DDE or HCB exposure and breast cancer: is there a risk? *Clin Chem Lab Med* 2004 ; 42 : 222-7.

48. Antonio TA, Edith RPN, Rogelio FR, Fernando DB, Catalina OA, Nelinho PMI. Assessment of persistent organic pollutants levels in blood samples from Quintana Roo, Mexico. *Int J Hyg Environ Health* 2013 ; 216 : 284-9.

49. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesul-

fonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 1298-305.

50. Pirard C, Sagot C, Deville M, Dubois N, Charlier C. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ Int* 2012 ; 48 : 78-83.

51. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Bishop AM, Needham LL. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect* 2010 ; 118 : 679-85.

52. Halden RU. Plastics and health risks. *Annu Rev Public Health* 2010 ; 31 : 179-94.

53. Faroon O, Ashizawa A, Wright S, et al. *Toxicological profile cadmium*. Atlanta (Georgia) : ATSDR, 2012. (<http://www.atsdr.cdc.gov/>).

54. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005 ; 38 : 328-34.

55. The Endocrine Disruption Exchange (TEDX). *TEDX list of potential endocrine disruptors*. Paonia (Colorado) : The Endocrine Disruption Exchange, 2011. (<http://www.endocrine-disruption.org/endocrine.TEDXList.overview.php>).

56. Charlier C, Plomteux G. Determination of organochlorine pesticide residues in blood of healthy individuals. *Clin Chem Lab Med* 2002 ; 40 : 361-4.

57. Hass U, Scholze M, Christiansen S, et al. Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 122-8.

## **Partie I : Objectifs du travail**

Depuis longtemps, le Service de Toxicologie du CHU s'intéresse à l'influence des PE sur la santé de l'Homme. Des méthodes analytiques permettant le dosage de polluants persistants dans le sang ont été développées et validées puis appliquées à l'étude épidémiologique de différentes populations.

Pour compléter cette approche, nous avons développé et validé au cours de ce travail une méthode d'analyse permettant d'identifier et de doser plusieurs biomarqueurs d'exposition de PE non persistants dans l'urine. Le choix des biomarqueurs d'exposition qui ont fait l'objet d'un développement analytique se justifie par les notions longuement évoquées dans la Partie II de ce travail. Il s'agit de plusieurs métabolites de phtalates (MEP, MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, 5-oxo-MEHP et 5-OH-MEHP), de parabènes (MP, EP, PP et BP) ainsi que de la BP3.

La méthode analytique développée consiste en une hydrolyse enzymatique des métabolites de phase II suivie d'une extraction en phase solide (SPE) et d'une détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Trois conditions opératoires d'hydrolyse enzymatique ont été validées dans le but de quantifier les biomarqueurs sous formes libre et conjuguée. Les étapes du développement analytique et l'application des trois conditions opératoires sont présentées dans la Partie III.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes fixés comme objectif d'étudier la contamination des habitants de la province de Liège par les PE sélectionnés. Nous avons recruté une population de tous âges et des deux sexes et récolté un échantillon d'urine par participant pour y mesurer les concentrations des différents biomarqueurs d'exposition. Au sein de la population recrutée, constituée de 261 participants, nous avons étudié les corrélations entre les différents biomarqueurs et nous avons comparé les niveaux d'exposition en fonction de l'âge et du sexe. Les résultats de cette étude et leur interprétation sont présentés dans la Partie IVa.

Un autre but du travail a été, sur base du niveau des métabolites de phtalates retrouvés dans l'urine et des données de toxicocinétique présentes dans la littérature, d'estimer les doses journalières d'exposition aux diesters de phtalates. Ces doses d'exposition ont été ensuite comparées aux DJA de l'EFSA dans le but de quantifier le risque associé à ces niveaux d'imprégnation. Sachant que plusieurs phtalates agissent via les mêmes mécanismes, nous avons également estimé le

risque d'effets cumulatifs lié à l'exposition simultanée aux différents phtalates. Cette analyse du risque en population générale est présentée dans la Partie IVb.

Un dernier objectif a été de réaliser une étude de chrono-variabilité intra-individuelle pour apprécier la représentativité dans le temps des mesures urinaires des PE non persistants, c'est-à-dire la reproductibilité des concentrations urinaires et la capacité d'une mesure unique à correctement prédire les niveaux moyens d'exposition sur une période de quatre mois. La chrono-variabilité du risque d'effets cumulatifs a également été envisagée. Les résultats de cette étude sont présentés dans la Partie IVc.

Dans la partie V du travail, après avoir discuté de la signification de nos résultats, nous avons énoncé quelques perspectives de recherche complémentaires relatives au biomonitoring d'exposition des PE.

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

## Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens

---

En 2011 lorsque ce travail de thèse a commencé, plusieurs méthodes de biomonitoring d'exposition étaient déjà développées ou en cours de développement au sein du laboratoire de Toxicologie. Il s'agissait notamment des méthodes de dosage des pesticides organochlorés et des polychlorobiphényles (Charlier et Plomteux, 2002 ; Charlier et al., 2003), du BPA, du TCS et du 4-n-nonylphénol (Pirard et al., 2012), de plusieurs métaux lourds PE comme le mercure, le plomb, le manganèse, l'arsenic et le cadmium (Pirard et al., 2014), de plusieurs hydrocarbures aromatiques polycycliques ainsi que de certains composés perfluorés (Pirard et al., données non publiées).

À ces différents PE, nous avons choisi d'ajouter d'autres classes chimiques sélectionnées sur base des critères suivants :

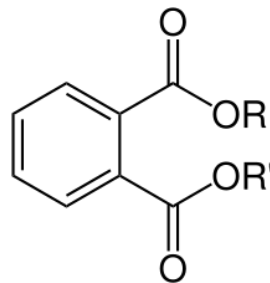
- (1) biomarqueurs de polluants non persistants qu'il conviendra de rechercher dans l'urine ;
- (2) biomarqueurs de structure chimique suffisamment proche pour permettre le développement d'une méthode analytique unique et originale ;
- (3) biomarqueurs présents à des concentrations mesurables dans l'urine (avec l'équipement disponible au laboratoire) pour une population non exposée professionnellement ;
- (4) biomarqueurs pour lesquels les standards de référence sont commercialisés ;
- (5) biomarqueurs peu ou pas encore mesurés en Belgique et en Province de Liège.

Compte tenu des critères énoncés ci-dessus, nous avons retenu pour ce travail les phtalates, les parabènes et la BP3. Etudier l'imprégnation de l'être humain à un mélange de ces composés pourrait également être utile à la mise en évidence des « *effets cocktails* » des PE.

### a) Phtalates

#### Sources de contamination

Les phtalates sont utilisés comme plastifiants, solubilisants et lubrifiants industriels (Wittassek et al., 2011). Ils sont couramment employés pour modifier la souplesse de certains plastiques, principalement le polychlorure de vinyle (PVC ; Wittassek et al., 2011). Les phtalates sont des diesters de l'acide phtalique (Figure 3) dont il existe de nombreux congénères avec des structures chimiques qui varient en fonction de la nature des groupements alkyles (R et R').

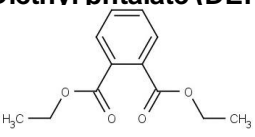
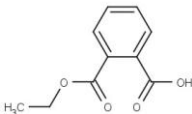
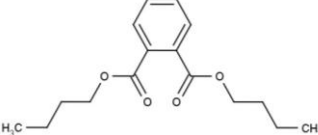
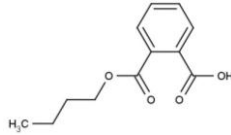
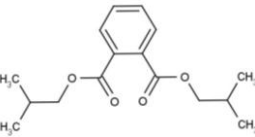
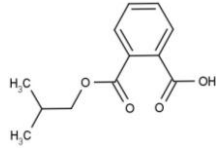
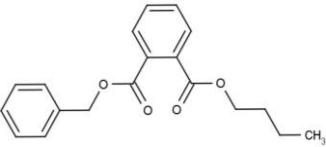
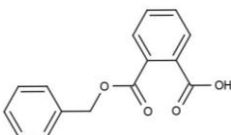
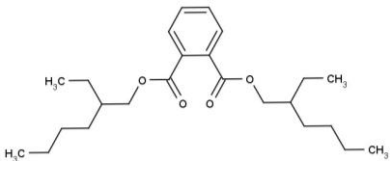
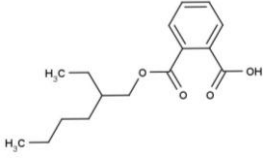
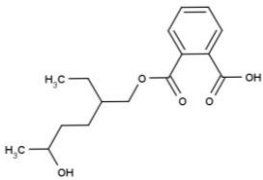
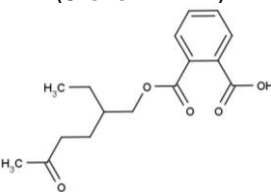


**Figure 3 :** Structure générale des phtalates ou diesters de l'acide phtalique.  
*R et R' : groupements alkyl.*

Les cinq phtalates retenus dans notre étude sont le diéthyl phtalate (DEP), le di-n-butyl phtalate (DnBP), le di-iso-butyl phtalate (DiBP), le benzylbutyl phtalate (BBzP) et le di-2-éthylhexyl phtalate (DEHP) dont les structures sont présentées dans le Tableau 1.



## Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens

Phtalate	Métabolite	Fue (%)
<b>Diéthyl phtalate (DEP)</b> 	<b>Monoéthyl phtalate (MEP)</b> 	-
<b>Di-n-butyl phtalate (DnBP)</b> 	<b>Mono-n-butyl phtalate (MnBP)</b> 	70.3
<b>Di-iso-butyl phtalate (DiBP)</b> 	<b>Mono-iso-butyl phtalate (MiBP)</b> 	69-84
<b>Benzylbutyl phtalate (BBzP)</b> 	<b>Monobenzyl phtalate (MBzP)</b> 	73
<b>Di-2-éthylhexyl phtalate (DEHP)</b> 	<b>Mono-2-éthylhexyl phtalate (MEHP)</b> 	5.9-6.2
	<b>Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate (5-OH-MEHP)</b> 	14.9-23.3
	<b>Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate (5-oxo-MEHP)</b> 	10.9-15.0

**Tableau 1 :** Phtalates, métabolites de phtalates et taux de récupération urinaire ( $F_{ue}$ ).

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

On retrouve ces phtalates dans des emballages et films en plastique, dans des matériaux de construction (câbles, lambris et châssis en PVC, revêtements de sols), au sein de composants d'automobiles, dans des meubles et revêtements de meubles, dans les vêtements imperméables, dans des rideaux de douche, dans certains jouets pour enfants, dans des cosmétiques (lotions, laques, parfums, savons, crèmes), dans divers produits industriels (colles, huiles, lubrifiants, pigments, solvants, adhésifs, enduits et encres), dans les composants de l'enrobage de certains comprimés, dans des poches de perfusion et dans d'autres matériaux médicaux ainsi que dans certains pesticides où ils sont utilisés comme substances actives ou comme co-formulants (ATSDR 1995, 2001, 2002). Les phtalates sont également utilisés comme intermédiaires de réaction au cours de divers processus de synthèse chimique, dans l'industrie du cuir, du caoutchouc et du béton, dans des composants photographiques et dans le propergol des fusées (ATSDR 1995, 2001, 2002). Les volumes de production annuelle des phtalates dans l'Union Européenne avoisinent le million de tonnes (ECB, 2004, 2007, 2008). Certains phtalates (DnBP, DiBP, BBzP, DEHP) intégrés dans l'annexe XIV de REACH (substances préoccupantes cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques, persistantes ou bioaccumulables) font l'objet de restrictions d'usage, nécessitent une autorisation spécifique et doivent être déclarés dans les articles importés (ECHA, 2015). Le DEP reste le seul phtalate autorisé dans les cosmétiques au sein de l'Union Européenne.

Les phtalates ne sont pas liés chimiquement aux polymères dans lesquels ils sont inclus. En conséquence, avec le temps, les frottements ou l'usure, ils en sont libérés et ils contaminent toutes les matrices environnementales entraînant une exposition humaine ubiquitaire (Wittassek et al., 2011 ; Fierens et al., 2012a ; Bekö et al., 2013 ; Kong et al., 2015 ; NHANES, 2015 ; CHMS, 2015 ; Becker et al., 2009 ; Frederiksen et al., 2013b ; Berman et al., 2013). Cette exposition résulte de l'ingestion d'aliments contaminés (Fierens et al., 2012a, Sioen et al., 2012), de l'inhalation de poussières ou de particules en suspension (Bekö et al., 2013 ; Fromme et al., 2013b) ainsi que de la résorption dermique lorsque des cosmétiques ou des produits d'hygiène corporelle sont appliqués sur l'épiderme (Bekö et al., 2013 ; Wormuth et al., 2006 ; Janjua et al., 2007, 2008a). À ces trois voies d'entrée dans l'organisme, s'ajoute également la voie parentérale, surtout pour le DEHP qui fut longtemps utilisé comme composant des poches de transfusion ou de perfusion.

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

Ainsi certains enfants prématurés ont été fortement exposés à ce PE dans les unités de soins intensifs néonatales (Calafat et al., 2004a ; Koch et al., 2005a, 2006 ; Weuve et al., 2006).

Les voies d'entrées des phtalates dans l'organisme sont variables. Pour le DEHP et le DEP, la majorité de l'exposition a lieu par ingestion d'aliments contaminés et par application de cosmétiques sur la peau (Wormuth et al., 2006 ; Fromme et al., 2013a ; Fromme et al., 2007a ; Sathyanarayana et al., 2008 ; Koch et al., 2013 ; Romero-Franco et al., 2011 ; Berman et al., 2013). Pour les DnBP, DiBP et BBzP les différentes voies d'entrée sont concernées en proportions mal définies (Fromme et al., 2007a, 2013a, 2013b ; Bekö et al., 2013 ; Koch et al., 2013 Wormuth et al., 2006 ; Clark et al., 2011). Selon certains auteurs, les contributions des différentes voies d'exposition semblent également varier pour un même congénère en fonction de l'âge (Wormuth et al., 2006). Par exemple, les jeunes enfants sont plus exposés à certains phtalates parce qu'ils mettent en bouche plus facilement des jouets en plastique (Wormuth et al., 2006).

### **Toxicocinétique**

Après une rapide absorption, les phtalates sont hydrolysés en monoesters puis métabolisés par des cytochromes P450 en dérivés hydroxy, cétone ou carboxyle (Tableau 1) avec production d'acide phtalique non majoritaire et non spécifique. L'élimination des métabolites a lieu principalement par voie urinaire, sous forme glucuroconjuguée ou libre. La demi-vie d'élimination est inférieure à une journée (Anderson et al., 2001, 2011 ; Koch et al., 2004, 2005b, 2012 ; Seckin et al., 2009). En raison de ces propriétés toxicocinétiques, l'exposition aux phtalates est classiquement mesurée par le dosage urinaire de leurs métabolites spécifiques, les monoesters et les monoesters oxydés (Wittassek et al., 2011 ; Silva et al., 2004). Ce dosage urinaire de métabolites possède plusieurs avantages comparés à l'analyse sanguine des composés parents. (1) Premièrement, les métabolites urinaires sont plus faciles à rechercher que les diesters sanguins car ils sont moins rapidement dégradés donc moins transitoires. (2) À l'inverse des phtalates sanguins, les produits de métabolisation urinaire ne peuvent résulter d'une contamination du matériel utilisé au laboratoire (Fromme et al., 2011 ; Blount et al., 2000). (3) Enfin, les diesters de phtalate sont facilement hydrolysés par des lipases non spécifiques que l'on peut

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

retrouver dans plusieurs compartiments biologiques dont le sang (Calafat et al., 2004b, 2013 ; Fromme et al., 2011 ; Kim et al., 2015 ; Blount et al., 2000). Si ces lipases ne sont pas inhibées directement après la récolte de l'échantillon sanguin, les concentrations pourraient être sous-estimées. Dans l'urine, ces enzymes ne sont pas présentes (Blount et al., 2000).

Nous avons fait le choix de sept métabolites de phtalates, le monoéthyl phtalate (MEP), le mono-n-butyl phtalate (MnBP), le mono-iso-butyl phtalate (MiBP), le monobenzyl phtalate (MBzP), le mono-2-éthylhexyl phtalate (MEHP), le mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate (5-OH-MEHP) et le mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate (5-oxo-MEHP). Le tableau 1 indique à quels produits parent correspondent ces métabolites ainsi que le pourcentage d'élimination urinaire en 24 heures (Anderson et al., 2001, 2011 ; Koch et al., 2004, 2005b, 2012 ; Seckin et al., 2009).

### **Effets perturbateurs endocriniens**

Chez le rat, les DiBP, DnBP, BBzP et DEHP sont capables d'inhiber la synthèse de testostérone fœtale au niveau des cellules de Leydig (Borch et al., 2004 ; Parks et al., 2000). Lorsqu'ils sont administrés durant la grossesse, les phtalates entraînent chez le jeune rat mâle plusieurs malformations du système urogénital dont la cryptorchidie, l'hypospadias et des lésions histologiques ou de l'agénésie de la prostate, de l'épididyme, des canaux déférents, des vésicules séminales ou des testicules (Gray et al., 1999, 2000 ; Mylchreest et al., 1999, 2000 ; Barlow et al., 2004). À ces anomalies s'ajoutent également de l'oligospermie avec réduction de la fertilité et de la fécondité, des modifications des taux sanguins de l'inhibine B et de la LH ainsi que l'apparition de signes de féminisation comme la réduction de la distance anogénitale ou la rétention du mamelon (Andrade et al., 2006 ; Gray et al., 1999, 2000 ; Mylchreest et al., 1999, 2000 ; Borch et al., 2004). Ce « *syndrome des phtalates* » décrit chez le rat présente de fortes similitudes avec le syndrome de dysgénésie testiculaire observé chez l'être humain, et qui associe hypospadias, cryptorchidie, réduction de la qualité du sperme et cancer du testicule (Sharpe et Skakkebaek, 2008). Les différents phtalates, agissant par des mécanismes d'action similaires, génèrent des effets additifs sur le système reproducteur masculin lorsqu'ils sont administrés simultanément chez l'animal (Howdeshell et al., 2008). De plus, des effets synergiques ont également été décrits

## Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens

---

lorsque des phtalates étaient co-administrés avec des pesticides anti-androgéniques bloquant directement le récepteur AR, comme la vinclozoline et le prochloraz (Christiansen et al., 2009). Chez le rat femelle, l'administration de phtalates anti-androgéniques durant le stade foetal entraîne une réduction de la fertilité et des malformations de l'utérus (Gray et al., 1999).

Chez l'être humain, l'exposition aux phtalates durant la grossesse a été associée à des effets anti-androgéniques chez le nouveau-né de sexe masculin et ceci en accord avec les observations réalisées chez l'animal, notamment des réductions de la distance anogénitale et des diminutions des taux circulants de testostérone (Swan et al., 2005, 2008 ; Bornehag et al., 2015 ; Bustamante-Montes et al., 2013 ; Suzuki et al., 2012 ; Huang et al., 2009 ; Main et al., 2006). Plusieurs études ont également rapporté une réduction de la qualité du sperme en association avec les niveaux d'exposition de plusieurs phtalates à l'âge adulte (Pant et al., 2014 ; Specht et al., 2014 ; Huang et al., 2014a ; Liu et al., 2012 ; Wirth et al., 2008 ; Hauser et al., 2006, 2007 ; Zhang et al., 2006 ; Jönsson et al., 2005 ; Duty et al., 2003 ; Hauser, 2008 ; Jurewicz et al., 2013).

En plus de leur action anti-androgénique, les phtalates sont également capables de se lier au récepteur aux œstrogènes et d'imiter l'action de ces derniers *in vitro* comme *in vivo* (Okubo et al., 2003 ; Takeuchi et al., 2005 ; Harris et al., 1997). Lors d'études épidémiologiques, l'exposition à certains phtalates a été associée à plusieurs pathologies œstrogéno-dépendantes responsables de troubles de la fertilité féminine, notamment le fibrome utérin, l'endométriose et la puberté précoce. Cependant, certaines réserves doivent être émises au sujet de ces travaux. Tout d'abord, la mesure des phtalates urinaires, qui a conduit à une corrélation positive avec la pathologie, a été obtenue sur base d'une mesure unique à l'âge adulte alors que les pathologies étudiées se développent sur de longues périodes et que les niveaux de biomarqueurs d'exposition présentent une variabilité intra-individuelle importante (OMS/PNUE, 2012 ; Frederiksen et al., 2013a). Ensuite, en ce qui concerne le fibrome utérin, la classification des patientes dans la première étude comme étant malades ou non-malades était basée sur un questionnaire (Weuve et al., 2010). Dans la seconde étude, le diagnostic était basé sur une laparotomie mais le nombre de participantes était relativement faible (36 cas et 29 témoins) (Huang et al., 2010). Le rôle des phtalates n'a d'ailleurs pas été confirmé

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

par une récente étude portant sur 495 femmes chez lesquelles le diagnostic était posé par laparotomie ou laparoscopie (Pollack et al., 2014). Selon Huang et al. (2014b), la présence de certains polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans la synthèse et l'action des œstrogènes pourrait moduler les effets des phtalates sur le développement du fibrome utérin, ce qui expliquerait ces résultats divergents. Concernant l'endométriose, si plusieurs études ont conclu à des associations positives entre les niveaux d'exposition aux phtalates et la présence de la pathologie (Buck Louis et al., 2013 ; Kim et al., 2011 ; Weuve et al., 2010 ; Reddy et al., 2006a, 2006b ; Cobellis et al., 2003), des résultats contraires ont également été rapportés (Itoh et al., 2009 ; Upson et al., 2013). Finalement, pour ce qui est de la puberté précoce, chez des jeunes filles de Puerto Rico et de Shangai, les niveaux sériques de différents phtalates étaient plus importants dans les groupes de patientes atteintes de puberté précoce que dans les groupes contrôles (Colon et al., 2000 ; Qiao et al., 2007 ; Kortenkamp et al., 2011). Si ces résultats ont été confirmés chez des jeunes filles taïwanaises (Chen et al., 2013), par contre aucune corrélation n'a été mise en évidence dans une étude réalisée aux Etats-Unis (Lomenick et al., 2010) et, à l'inverse, une association positive entre l'âge de survenue de la puberté et l'exposition aux phtalates a été rapportée chez des jeunes filles danoises (Frederiksen et al., 2012).

Les phtalates sont aussi capables d'agir sur l'axe thyroïdien en diminuant les taux circulants de T3 et de T4 chez l'animal (Boas et al., 2012) et chez l'Homme (Huang et al., 2007 ; Boas et al., 2012 ; Meeker et al., 2007 ; Johns et al., 2015). Les hormones thyroïdiennes, comme les hormones sexuelles, sont fortement impliquées dans le développement du cerveau et responsables du comportement de l'individu (Balthazart, 2011 ; Williams, 2008). La perturbation de ces systèmes hormonaux par les phtalates pourrait expliquer les associations retrouvées chez l'être humain entre l'exposition durant les stades fœtal et postnatal et les altérations du neurodéveloppement mental, psychomoteur et comportemental observées chez l'enfant, dont l'autisme, les troubles du comportement sexuel et les troubles de l'attention associés à de l'hyperactivité (Yolton et al., 2011 ; Swan et al., 2010 ; Engel et al., 2010 ; Cho et al., 2010 ; Kim et al., 2009 ; Miodovnik et al., 2011 ; Whyatt et al., 2012 ; Téllez-Rojo et al., 2013 ; Kobrosly et al., 2014).

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

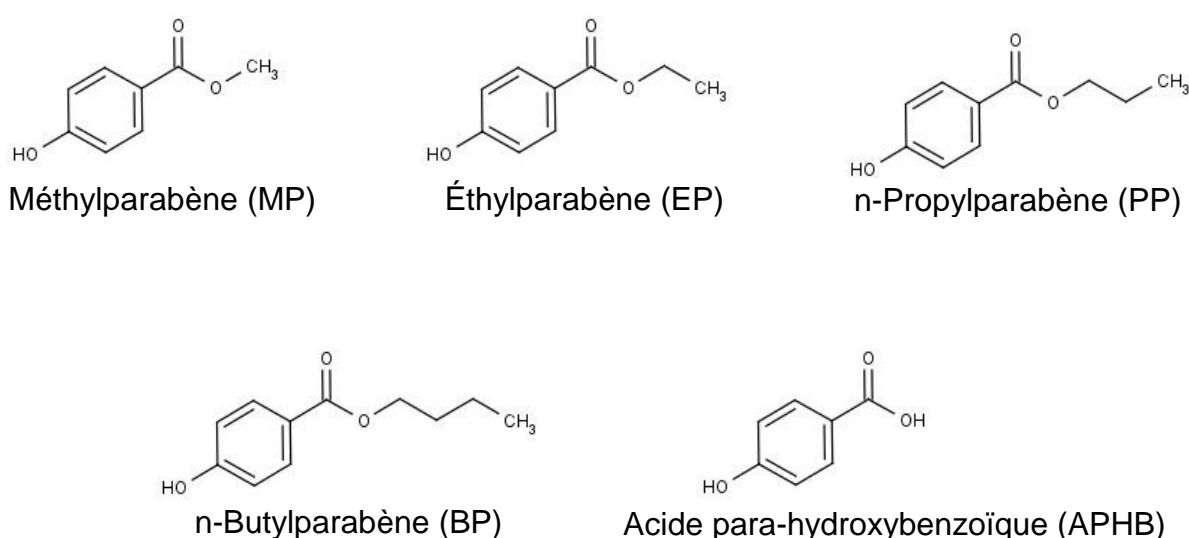
Les phtalates sont également suspectés d'être obésogènes et perturbateurs du métabolisme glucidique (OMS/PNUE, 2012). Il a d'ailleurs été montré que les phtalates sont capables de se lier au PPAR $\gamma$  qui est impliqué dans la différenciation des adipocytes (Desvergne et al., 2009). Lors d'études épidémiologiques, l'exposition aux phtalates à l'âge adulte et chez l'enfant a été associée à l'obésité et à l'insulinorésistance (Hatch et al., 2008 ; Stahlhut et al., 2007 ; Sun et al., 2014 ; Trasande et al., 2013 ; Dirinck et al., 2015).

Finalement, certains phtalates pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'asthme et de différentes allergies. Lorsqu'il est mis en contact avec du sang périphérique provenant d'individus allergiques, le MnBP augmente les taux d'IL4, une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'asthme (Steinke and Borish, 2001 ; Glue et al., 2002). D'autre part, l'administration du MEHP chez la souris potentialise les réactions allergiques, augmente le nombre d'éosinophiles et active les cellules helper du système immunitaire (Hansen et al., 2007). Ces mécanismes d'immunotoxicité auxquels s'ajoute la capacité des phtalates à générer des radicaux libres (North et al., 2014) supportent les observations épidémiologiques d'association entre la présence de PVC dans l'environnement de l'enfant et le développement de l'asthme (Shu et al., 2014) ainsi que les associations entre les niveaux de métabolites urinaires des phtalates et l'apparition de symptômes allergiques (Hoppin et al., 2013 ; Shiue 2013 ; Wang et al., 2014).

### b) Parabènes

#### Sources de contamination

Les parabènes sont des esters alkyliques de l'acide para-hydroxybenzoïque (APHB) (Figure 4) largement utilisés seuls ou en association comme conservateurs antimicrobiens dans de nombreux cosmétiques ou produits d'hygiène corporelle, dans des aliments et dans des médicaments (Błędzka et al., 2014 ; Boberg et al. 2010 ; Ma et al., 2013).



**Figure 4 :** Structure chimique des parabènes et de l'acide para-hydroxybenzoïque.

Ils sont également naturellement produits par une plante d'Asie, la chirette verte (*Andrographis paniculata*) et par certaines bactéries marines (Li et al., 2003 ; Peng et al., 2006). Les propriétés avantageuses des parabènes – action antimicrobienne à large spectre, faible toxicité, bonne solubilité dans l'eau, stabilité, faible coût, absence de goût, de couleur et d'odeur – en ont fait un des ingrédients les plus utilisés dans les cosmétiques (Błędzka et al., 2014). Ainsi, les parabènes seraient employés dans 32% à 80% des cosmétiques disponibles sur le marché et on les retrouve dans plus de 22.000 produits commerciaux différents (Błędzka et al., 2014 ; Pouillot et al., 2006 ; Eriksson et al., 2008 ; CIR, 2008). L'Union européenne a fixé à 0.4% la teneur maximale en parabènes dans les cosmétiques lorsqu'ils sont employés seuls et à 0.8% lorsque différents parabènes sont associés dans une



## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

même formulation (Official Journal of the European Union, 2009). En raison de leur utilisation intensive, les parabènes représentent des contaminants ubiquitaires détectables dans de nombreuses matrices environnementales comme les eaux de rivière (Peng et al., 2008 ; Kasprzyk-Hordern et al., 2008 ; Ramaswamy et al., 2011), les sols et les sédiments (Núñez et al., 2008 ; Pérez et al., 2012), l'air et les poussières à l'intérieur de nos habitats (Rudel et al., 2003 ; Wang et al., 2012). Cependant, il a été estimé que l'exposition par le biais de ces matrices environnementales représenterait moins de 0.002% de l'exposition humaine totale (Błędzka et al., 2014). Les sources majeures d'exposition aux parabènes seraient, d'une part, les médicaments (15-33%) et, d'autre part, les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle (66-85%) (Błędzka et al., 2014).

### **Toxicocinétique**

Après administration orale, les parabènes sont rapidement absorbés et presque complètement métabolisés par des estérases hépatiques en APHB (Ye et al., 2006a ; Darbre et Harvey, 2008). Après application dermique, ces composés traversent plus ou moins rapidement la peau en fonction de la nature du véhicule utilisé et de la longueur de la chaîne alkyle (Błędzka et al., 2014 ; Aubert et al., 2012 ; Pažoureková et al., 2013). Selon plusieurs études *in vivo*, une quantité comprise entre 15 et 75% de la dose appliquée sur la peau passerait dans la circulation sanguine (Cowan-Ellsberry et Robison 2009). Étant donné la faible activité estérasique au niveau cutané, la proportion de parabènes non métabolisés est plus importante lors de la résorption dermique que lors de la résorption orale (Błędzka et al., 2014). Les parabènes et l'APHB sont ensuite éliminés de l'organisme par voie urinaire, généralement en moins de 24 heures, sous forme libre ou après conjugaison à des radicaux glycines, glucuronides ou sulfates (Janjua et al., 2008a). À l'heure actuelle, il existe peu de données bibliographiques relatives au taux d'excrétion des parabènes dans l'urine après application dermique même si celui-ci a été évalué à 2% dans le cas du BP (Boberg et al., 2010). Une étude récente indique en outre qu'il existe d'autres voies de métabolisation que l'hydrolyse estérasique, avec formation de dérivés hydroxylés, les alkyles protocatéchuates (Wang et Kannan, 2013a). Le plus souvent, le biomonitoring d'exposition des parabènes se réalise par le dosage des composés inchangés dans l'urine (Ye et al., 2006a).

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

L'APHB n'est pas un biomarqueur de premier choix, d'une part, parce qu'il est naturellement présent dans certains vins et fruits faisant ainsi partie de notre alimentation, et d'autre part, parce que son dosage ne permet pas de faire la distinction entre les différents parabènes (Ye et al., 2006a ; Boberg et al., 2010 ; Den Hond et al., 2013).

### **Effets perturbateurs endocriniens**

La perturbation du système hormonal induite par les parabènes est expliquée par un effet agoniste sur les récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$ , avec une affinité de liaison proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle, et par un effet antagoniste sur le récepteur ERR $\gamma$ , lequel serait impliqué dans le développement de certains cancers du sein hormono-sensibles (Routledge et al., 1998 ; Gomez et al., 2005 ; Watanabe et al., 2013 ; Ijichi et al., 2011). En plus de leur action sur des récepteurs œstrogéniques, les parabènes peuvent inhiber les sulfotransférases impliquées dans le métabolisme des œstrogènes et donc augmenter les taux circulants d'œstradiol (Prusakiewicz et al., 2007). Van Meeuwen et al. (2008) ont observé que les parabènes sont aussi des inhibiteurs de l'aromatase, ce qui se traduit par des effets anti-œstrogéniques. Les effets œstrogéniques *in vitro*, qui ont été confirmés chez le poisson en mesurant la production de vitellogénine hépatique (Inui et al., 2003), font cependant l'objet de résultats contradictoires chez le rongeur (Darbre et al., 2002 ; Lemini et al., 2003 ; Routledge et al., 1998 ; Houssaini et al., 2000). Quoiqu'il en soit, ces effets œstrogéniques, lorsqu'ils existent, la stimulation par les parabènes de la prolifération des cellules tumorales MCF-7 et la présence des parabènes dans des tissus de cancer du sein, sont autant de raisons de suspecter une influence possible de ces composés dans le développement de ce type de cancer (Darbre et Harvey, 2008, 2014 ; Darbre et al., 2004 ; Darbre, 2009 ; Zhang et al., 2013).

En plus de leurs effets œstrogéniques, les parabènes induisent des effets anti-androgéniques *in vitro* et *in vivo*, notamment la réduction du nombre de spermatozoïdes, la diminution du taux sanguin de testostérone et des atteintes du système reproducteur masculin (Satoh et al., 2005 ; Chen et al., 2007 ; Oishi 2001, 2002a, 2002b), même si des résultats contradictoires ont été rapportés (Hoberman et al., 2008 ; Hossaini et al., 2000 ; Oishi 2004). Les travaux de Vo et al. (2010) et de

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

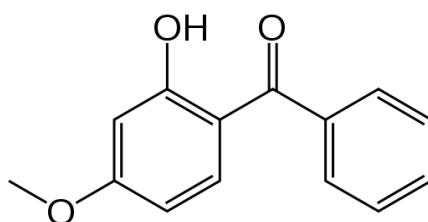
Kawaguchi et al. (2009), qui concernent respectivement l'exposition du rongeur durant la période prépubère et au stade fœtal, indiquent qu'il existerait une fenêtre de vulnérabilité de l'organisme aux parabènes. En fonction du moment d'exposition, ceux-ci pourraient influencer l'âge de la puberté, le bon développement du système reproducteur, les taux d'œstradiol et de thyroxine (Vo et al., 2010) ainsi que les capacités cognitives et comportementales de l'individu (Kawaguchi et al., 2009).

En plus des effets PE qu'ils peuvent induire, mais qui restent un sujet de controverse (Darbre et Harvey, 2008 ; Nohynek et al., 2013 ; Castelain et Castelain, 2012 ; Golden et al., 2005), les parabènes entraînent également un stress oxydant *in vitro* et chez l'animal (Nishizawa et al., 2006 ; Shah et Verma, 2011). Par ailleurs, ils pourraient potentialiser la toxicité des rayonnements ultraviolets sur la peau, remettant en question leur sécurité d'utilisation dans les crèmes solaires (Handa et al., 2006). Des effets additifs et synergiques ont été observés lors de l'exposition simultanée à plusieurs parabènes ou en cas d'association à d'autres PE comme l'octylphénol (Darbre et Harvey, 2008 ; Kim et al., 2012). Chez l'Homme, on retrouve certains effets décrits chez l'animal, notamment des dommages à l'ADN des spermatozoïdes (Meeker et al., 2011), une diminution des taux circulants d'hormones thyroïdiennes (Koeppe et al., 2013), un stress oxydant (Kang et al., 2013) et une sensibilisation aux allergènes (Savage et al., 2012).

### c) Benzophénone-3

#### Sources de contamination

La BP3 ou oxybenzophénone ou 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone (Figure 5), est un composé chimique biphénolique capable de bloquer les rayonnements ultraviolets de type A et B (Krause et al., 2012).



**Figure 5 :** Structure chimique de la benzophénone-3.

Elle est couramment retrouvée dans les crèmes solaires, mais aussi dans d'autres cosmétiques et elle est également employée comme additif dans des revêtements de surface en plastique, des polymères, des adhésifs, des contenants alimentaires ainsi que dans certaines huiles, peintures et vernis (Krause et al., 2012). En Union européenne, la BP3 est autorisée jusqu'à la concentration de 10% dans les crèmes solaires (Krause et al., 2012). En raison de son utilisation importante et sa relative stabilité dans l'eau, la BP3 contamine de nombreux environnements aquatiques (Kim et Choi, 2014).

L'exposition à la BP3 est démontrée par sa mesure directe dans l'urine (Ye et al., 2005a, 2005b). La grande majorité de la population présente des niveaux détectables de BP3 dans l'urine, même pendant des périodes de l'année où l'usage de crèmes solaires est relativement limité, ce qui laisse penser que d'autres sources et voies d'exposition peuvent intervenir (Calafat et al., 2008 ; Frederiksen et al., 2014 ; Wang et Kannan, 2013b). On a récemment évoqué que l'exposition humaine à la BP3 pourrait provenir de l'intérieur de nos habitations eu égard à la positivité de la BP3 dans les poussières de maisons en Asie et aux États-Unis (Wang et al., 2013 ; Kim et Choi, 2014).

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

### **Toxicocinétique**

L'absorption de la BP3, qui se fait majoritairement par voie dermique, est rapide et importante (Janjua et al., 2008b ; Gonzalez et al., 2006). Après pénétration dans l'organisme, la BP3 est métabolisée principalement en 2,4-dihydroxybenzophénone (ou benzophénone-1) par O-déméthylation et minoritairement par hydroxylation en d'autres métabolites dont la 2,2'-dihydroxy-4-méthoxybenzophénone (ou benzophénone-8) (Wang et Kannan, 2013b ; Watanabe et al., 2015 ; Kim et Choi, 2014). Ces métabolites sont, pour la plupart, utilisés également comme filtres anti-UV dans des crèmes solaires et d'autres cosmétiques (Wang et Kannan, 2013b). La BP3 et ses métabolites sont éliminés en quelques jours dans l'urine sous formes libre, glucuroconjuguée ou sulfoconjuguée (Ye et al., 2005b). Entre 1.2% et 8.7% de la BP3 appliquée sur la peau serait retrouvée intacte dans l'urine sous formes libre et conjuguée (Gonzalez et al., 2006).

### **Effets perturbateurs endocriniens**

Plusieurs études sur des modèles cellulaires ont montré que la BP3 est capable de se lier aux récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  pour produire des effets agonistes (Morohoshi et al., 2005 ; Gomez et al., 2005 ; Kunz et al., 2006 ; Schreurs et al., 2005 ; Schlumpf et al., 2001) et antagonistes (Kunz et Fent, 2006). *In vitro*, la BP3 possède également des activités anti-androgénique et antiprogestative bien que des résultats divergents ont été observés (Schreurs et al., 2005 ; Ma et al., 2003 ; Kunz et Fent, 2006). *In vivo*, la BP3 génère des effets œstrogéniques avec également des divergences dans les résultats obtenus (Kunz et al., 2006 ; Schlumpf et al., 2001). Lors d'une étude d'exposition à moyen terme chez le rongeur, il a été montré que la BP3 perturbait la durée des cycles menstruels et réduisait la densité du sperme (French, 1992). Finalement, la BP3 pourrait également troubler le fonctionnement du système thyroïdien en activant le récepteur TR et en modifiant l'expression de certains gènes au sein de la glande thyroïdienne chez l'animal (Schmutzler et al., 2007 ; Schlecht et al., 2004).

Chez l'être humain, l'exposition à la BP3 durant la grossesse a été associée à des modifications du poids du nouveau-né à la naissance – diminué chez les filles et augmenté chez les garçons – ainsi qu'à une augmentation de la circonférence de la

## **Partie II : Sélection des perturbateurs endocriniens**

---

tête chez les garçons (Wolff et al., 2008 ; Philippat et al., 2012). La benzophénone-1, un métabolite de la BP3, a été associée à l'endométriose dans une étude réalisée aux Etats-Unis sur 625 femmes (Kunisue et al., 2012).

## **Partie III : Développement analytique**

La partie analytique de ce travail a consisté à développer et valider une méthode pour rechercher et doser dans l'urine quatre parabènes (MP, EP, PP et BP), sept métabolites de phtalates (MEP, MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP) et la BP3. Aucune technique ne permettait jusque-là l'analyse simultanée de ces différents composés.

Le dosage urinaire de ces biomarqueurs se réalise généralement en trois étapes. La première de ces étapes consiste en une hydrolyse enzymatique des dérivés conjugués à l'aide d'une glucuronidase et/ou d'une sulfatase. La deuxième phase correspond à une extraction de l'échantillon urinaire, réalisée le plus souvent sur cartouches SPE. Enfin, au cours de la troisième étape, après concentration de l'extrait, les analytes sont séparés sur une colonne de chromatographie en phase liquide (HPLC ou UHPLC) couplée à une détection en spectrométrie de masse en tandem (Blount et al., 2000 ; Silva et al., 2003a, 2007 ; Chen et al., 2012a, 2012b ; Ye et al., 2005a, 2005b, 2006b ; Kato et al., 2005 ; Preuss et al., 2005 ; Koch et al., 2003a ; León et al., 2010a ; Frederiksen et al., 2011). Des méthodes de chromatographie gazeuse associée à la spectrométrie de masse existent également mais elles présentent comme désavantage de devoir réaliser une dérivation chromophore (Kondo et al., 2010 ; Tonya et al., 1998). Des méthodes analytiques par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrettes de diodes sont disponibles pour la BP3, mais elles présentent une moindre sensibilité et spécificité que les techniques par spectrométrie de masse (Vidal et al., 2007 ; Gonzalez et al., 2008 ; León et al., 2010b).

Le développement analytique a commencé par la configuration du spectromètre de masse. Tout d'abord, nous avons testé différents modes d'ionisation : électrospray, ionisation chimique à pression atmosphérique, production d'ions chargés positivement ou négativement. Ensuite, différentes colonnes de chromatographie en phase inverse et différents mélanges de phases mobiles ont été comparés pour obtenir la meilleure séparation des 12 composés suivis. Nous avons ensuite sélectionné la méthode d'extraction en phase solide présentant les meilleurs rendements et l'hydrolyse enzymatique la plus adaptée.

Les parabènes et la BP3 sont éliminés dans l'urine sous formes libre, glucuro- et sulfoconjuguée alors que les phtalates sont éliminés uniquement sous formes libre et glucuroconjuguée (Silva et al., 2003b ; Albro et al., 1982). Trois conditions



opératoires de préparation d'échantillon furent donc mises au point : (1) un traitement sans enzyme permettant de mesurer la fraction non conjuguée des biomarqueurs, (2) une hydrolyse à l'aide d'une  $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli* dégradant spécifiquement les glucuronides, et dont l'usage permet de quantifier les composés libres et glucuroconjugués ; (3) une hydrolyse par une  $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia* possédant des activités glucuronidase et sulfatase, ce qui permet de doser les biomarqueurs sous formes libre, sulfoconjuguée et glucuroconjuguée. Malheureusement, cette dernière enzyme,  $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*, possède également une activité lipase qui est responsable de l'apparition de monoesters de phtalate à partir des contaminants diesters présents dans l'environnement du laboratoire (Blount et al., 2000). C'est la raison pour laquelle, avant d'utiliser ce traitement enzymatique, nous avons dû vérifier si la production de contaminants monoesters était limitée et contrôlée. Pour cela, nous avons appliqué les trois conditions opératoires sur les urines de 25 sujets et, en plus de mesurer les proportions relatives de métabolites de phase II, nous avons comparé les résultats obtenus avec les  $\beta$ -glucuronidases d'*Escherichia coli* et d'*Helix pomatia* pour les différents monoesters de phtalate étudiés. L'intérêt de quantifier les proportions relatives de ces métabolites de phase II repose dans l'étude des processus de détoxification de l'organisme, lesquels peuvent varier dans certains groupes de la population les rendant potentiellement plus ou moins sensibles aux effets nocifs de ces composés (Kim et al., 2003).

La méthode développée a été validée analytiquement selon l'approche de l'erreur totale en respect des exigences de la norme ISO 17025 et des directives de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (Hubert et al., 2004, 2007a, 2007b). Les droites de calibration ont été réalisées en double et les points de validation en triple. L'ensemble du processus a été répété sur trois jours différents, et ce, pour chaque condition opératoire. Les paramètres de validation étudiés étaient la fonction de réponse, la linéarité, la justesse, la fidélité intra-essai et inter-essai, l'incertitude de mesure, l'exactitude, les limites de quantification inférieure et supérieure ainsi que la limite de détection. La spécificité était assurée par le temps de rétention chromatographique et le rapport entre les ions filles produits dans la cellule de collision du spectromètre de masse pour chaque biomarqueur et chaque standard interne.

L'annexe 1, qui est un résumé de la SOP employée au laboratoire, présente le mode opératoire de l'analyse selon les trois conditions enzymatiques. Les résultats de la validation analytique pour les conditions opératoires utilisant l'enzyme d'*Helix pomatia*, celle d'*Escherichia coli* et en absence d'enzyme sont présentés respectivement dans les annexes 2, 3 et 4. L'optimisation et la validation de la méthode d'analyse ainsi que son application aux 25 échantillons d'urine sont détaillés dans la Publication 3.

### Publication 3

Dewalque L, Pirard C, Dubois N, Charlier C. *Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2014 ; 949-950 : 37-47.



# Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry



Lucas Dewalque<sup>a,b,\*</sup>, Catherine Pirard<sup>a,b</sup>, Nathalie Dubois<sup>a,b</sup>, Corinne Charlier<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Clinical, Forensic and Environmental Toxicology, University of Liege (ULg), CHU (B35), 4000 Liege, Belgium

<sup>b</sup> Center for Interdisciplinary Research on Medicines (C.I.R.M.), University of Liege (ULg), CHU (B35), 4000 Liege, Belgium

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 September 2013

Received in revised form

19 December 2013

Accepted 2 January 2014

Available online 8 January 2014

### Keywords:

Parabens

Phthalate metabolites

Benzophenone-3

Urine

LC-MS/MS

## ABSTRACT

Phthalates, parabens and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone or benzophenone-3 are thought to act as endocrine disrupting chemicals, being able to disrupt the endocrine balance and therefore able to lead to some hormonal diseases. Numerous large-scale biomonitoring studies have detected the biomarkers of these compounds in more than 75% of the general population. To assess the exposure to these chemicals, we developed an analytical method based on a Solid Phase Extraction (SPE) prior to ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the simultaneous measurement of seven phthalate metabolites (monobenzyl phthalate, mono-n-butyl phthalate, mono-iso-butyl phthalate, mono-2-ethylhexyl phthalate, mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate, mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate, monoethyl phthalate), four parabens (methyl paraben, ethyl paraben, n-propyl paraben, n-butyl parabens) and benzophenone-3 in human urine. The distinction between unconjugated, glucuro- and sulfoconjugated forms was achieved using different enzymatic hydrolyses. The whole procedure was validated according to the total error approach, and was demonstrated to be linear (regression coefficient ranging from 0.987 to 0.998) and accurate (inter and intra assay precision <17.71%, relative bias <5.87%) in the dosing range of concentrations. The limits of quantification (LOQs) obtained ranged between 0.30 and 1.23 ng/ml depending on the analyte. The reliability of the method was proven in passing successfully the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS). Moreover, the urine from 25 volunteers were analyzed for the determination of glucuro-, sulfo- and free species separately. Phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 were positively detected in almost all urine samples, with detection rates ranging from 40 to 100%. Levels measured ranged from <LOQ to 2207 ng/ml varying widely depending on the compound and the individual. In our small participating population, most of the phthalate metabolites were excreted predominately as glucuroconjugated forms while parabens and benzophenone-3 were detected as glucuro- and sulfoconjugated species in variable proportions according to the target compound.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Phthalates, esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone or benzophenone-3 (BP3) are high-production chemicals [1–3] present in a broad range of everyday life products (Fig. 1). The phthalates are mostly used as plasticizer in plastics and more particularly in polyvinyl chloride

(PVC). They are commonly found in many household products, construction materials, solvents, lubricants, personal care products, textiles, food contact materials, etc. [1]. Parabens are widely employed as antimicrobial conservator in some cosmetics, sunscreens, foodstuffs and pharmaceutical preparations [4]. Benzophenone-3 is a broadband UV filter found in 59% of sunscreens in the United States [3] and also present in plastic surface coatings of food packaging as an UV stabilizer [5]. All these compounds are suspected to exhibit endocrine disruptive properties: they would be able to interact with the endocrine system causing alteration of the endocrine homeostasis and potentially lead to adverse health effects [2,6,7].

The endocrine disrupting chemicals (EDC) have been linked to various endocrine diseases such as some reproductive disorders,

\* Corresponding author at: Laboratory of Clinical, Forensic and Environmental Toxicology, BC+3, Porte 166, CHU (B35), 4000 Liege, Belgium. Tel.: +32 4 366 80 95; fax: +32 4 366 88 89.

E-mail addresses: [lucas.dewalque@ulg.ac.be](mailto:lucas.dewalque@ulg.ac.be) (L. Dewalque), [c.pirard@chu.ulg.ac.be](mailto:c.pirard@chu.ulg.ac.be) (C. Pirard), [nathalie.dubois@chu.ulg.ac.be](mailto:nathalie.dubois@chu.ulg.ac.be) (N. Dubois), [c.charlier@chu.ulg.ac.be](mailto:c.charlier@chu.ulg.ac.be) (C. Charlier).

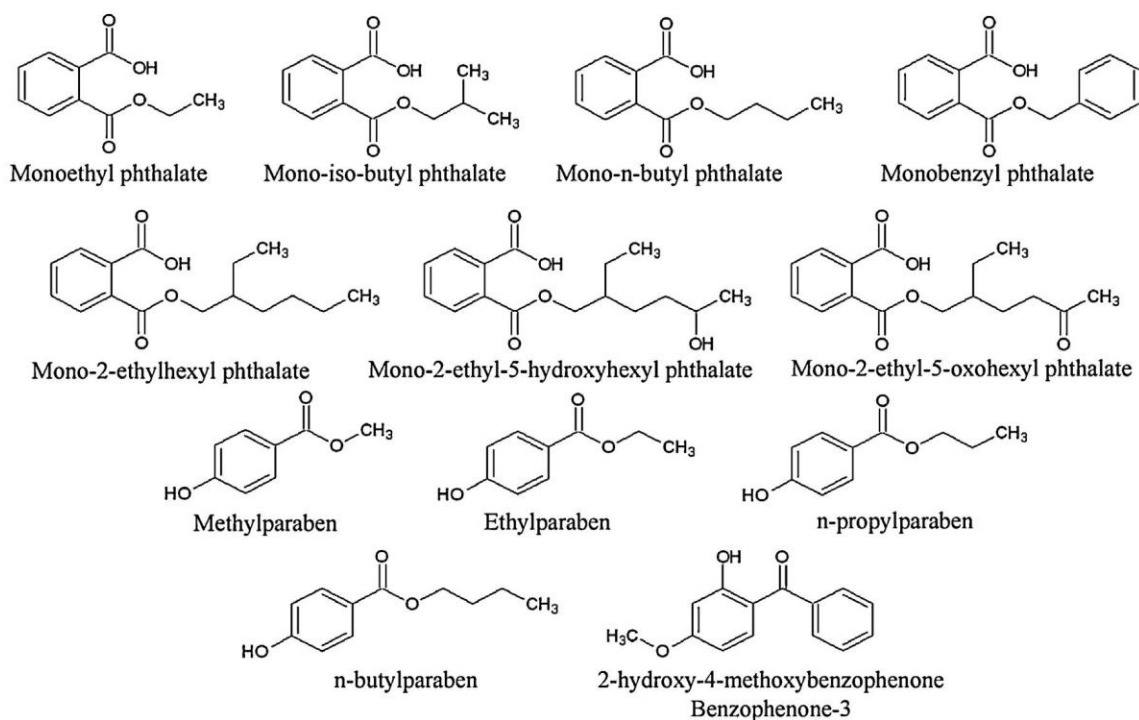


Fig. 1. Structure of the studied compounds.

infertility, hormone-dependant cancers, obesity, diabetes, neuro-developmental disorders [8,9]. For instance phthalate exposure was associated with insulin resistance and waist circumference [10], with DNA damages in human sperm and reduction of sperm quality [11,12], and with reduced anogenital distance [13] and premature thelarche [14]. Numerous studies have detected positively phthalates, parabens and BP3 in more than 75% of urine samples analyzed, demonstrating that the general population is widely exposed [15–17]. Since they are known to be excreted from human body as parents or metabolites in the urine, their urinary concentration would reflect their individual level exposure [15,16,18].

If the phthalate metabolites and parabens are commonly measured using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) [19–22], gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) could also be used, but requires further derivatization steps [23]. An online solid phase extraction (SPE) coupled with LC-MS method was previously developed [24–27], providing the non-negligible advantage of saving time but requiring specific and expensive devices. Besides the LC-MS methods [28–31], conventional high-performance liquid chromatography combined to diode array detection (HPLC-UV/DAD) or GC-MS are able to detect BP3 in urine samples [32–36].

The aim of this study was to develop and validate an analytical procedure to measure 7 phthalate metabolites including monohydrolyzed and oxidized compounds, 4 alkyl parabens and the BP3 in human urine. This method consisted in an enzymatic hydrolysis followed by offline SPE and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) detection. The validation process was performed using the total error approach on the three different enzymatic conditions in order to assess accurately the proportion of the free, glucuro- and sulfoconjugated species in real urine samples. This is, to our knowledge, the first method allowing the simultaneous determination of phthalate metabolites, parabens and BP3.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Monobenzyl phthalate (MBzP), monoethyl phthalate (MEP), mono-n-butyl phthalate (MnBP), mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate (5-OH-MEHP), mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate (5-oxo-MEHP), mono-iso-butyl phthalate (MiBP) and the isotope labeled  $^{13}\text{C}_4$  monobenzyl phthalate ( $^{13}\text{C}_4$  MBzP),  $^{13}\text{C}_4$  mono-n-butyl phthalate ( $^{13}\text{C}_4$  MnBP),  $^{13}\text{C}_4$  mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate ( $^{13}\text{C}_4$  5-oxo-MEHP),  $^{13}\text{C}_4$  monoethyl phthalate ( $^{13}\text{C}_4$  MEP),  $^{13}\text{C}_4$  mono-2-ethyl-5-hydroxyhexylphthalate ( $^{13}\text{C}_4$  5-OH-MEHP),  $^{13}\text{C}_4$  mono-2-ethylhexylphthalate ( $^{13}\text{C}_4$  MEHP) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA). The concentration of each individual commercial standard was 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in acetonitrile or in methyl tert-butyl ether. Methylparaben (MP), n-butylparaben (BP) and their respective labeled  $^{13}\text{C}_6$  methylparaben ( $^{13}\text{C}_6$  MP) and  $^{13}\text{C}_6$  n-butylparaben ( $^{13}\text{C}_6$  BP) were supplied in methanol at 1 mg/ml also by Cambridge Isotope Laboratories. Ethylparaben 99% (EP) and n-propylparaben >99% (PP) were bought from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), BP3 98% from Thermo Fisher Scientific (Geel, Belgium), while deuterated n-propylparaben-2,3,5,6-d4 (PP-d4), ethylparaben-2,3,5,6-d4 (EP-d4) and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-2',3'-4',5'-6'-d5 were purchased (98% chemical purity) from C/D/N Isotopes, Inc. (Quebec, Canada), all as crystalline materials.  $\beta$ -glucuronidase from *Helix pomatia* HP-2 (*H. pomatia*) and  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* IX-A (*E. coli*) were also purchased from Sigma Aldrich, while ammonium acetate p.a. was supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and sodium acetate (Normapur) by VWR International (Pennsylvania, USA). The SPE cartridges Bond Elut Certify LRC (130 mg, 10 ml) were obtained from Agilent Technologies (Agilent Technologies Belgium S.A./N.V., B-1831 Diegem). Acetonitrile, water, formic acid (99%) and glacial acetic acid

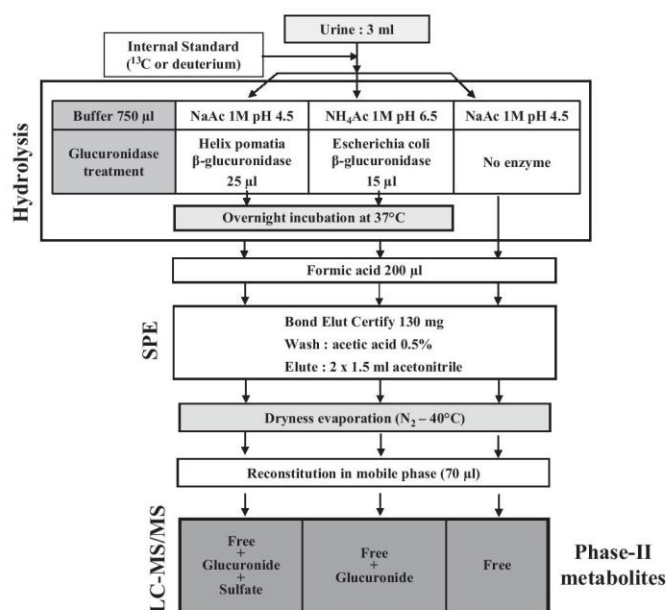


Fig. 2. Scheme of the different analytical steps.

were all LC/MS grade and bought from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Synthetic urine solution (Ricca Chemical) was obtained from Thomas-Scientific (Swedesboro, NJ, USA).

## 2.2. Stock standard solutions and determination of unknown samples

The internal standard solution was prepared by diluting all individual isotope labeled standard solutions or dissolving solids in acetonitrile to obtain a mixture of 5 mg/l. The native stock solution was prepared to obtain 10 mg/l in acetonitrile for all compounds except for BP3 and MP for which concentration was set at 40 mg/l. Note that when initial materials were bought as powder, successive dilutions in acetonitrile from a first 2 g/l solution were carried out to reach the above-mentioned concentrations. All standard solutions were stored at 4 °C. Their stability under these conditions was evaluated over 120 days at the end of which no degradation was observed. Similarly, extracted urine previously fortified was demonstrated to be stable at –20 °C over 7 days. The determination of unknown samples was carried out using calibration curves ranging from 0.5 to 200 ng/ml (except MP and BP3 from 2 to 800 ng/ml) in synthetic urine. When the concentration measured was above the highest calibration point, the analysis was rerun on diluted samples with synthetic urine. Each sequence of unknown samples included a procedural blank (constituted of synthetic urine) and two level home-made quality controls (10 and 100 ng/ml for each compound except BP3 and MP, 40 and 400 ng/ml).

## 2.3. Sample preparation

20 µl of the internal standard solution were added to 3 ml of urine centrifuged (3000 rpm, 5 min) prior to hydrolysis. In order to determine the free species, glucuronide and sulfate conjugates, two different hydrolysis conditions were optimized (with *H. pomatia* and *E. coli* glucuronidases) and validated, as well as a free enzyme condition. The hydrolysis and purification steps were schematized in Fig. 2 for the three different hydrolyses. A volume of 750 µl of ammonium acetate buffer (NH<sub>4</sub>Ac) 1 M or sodium acetate buffer (NaAc) 1 M buffers adjusted respectively to pH 6.5 and 4.5 using glacial acetic acid was added to the urine depending on the enzymatic hydrolysis. The enzymatic treatments were performed by

adding 15 µl of *E. coli* glucuronidase 1500 UI/ml or 25 µl of *H. pomatia* glucuronidase 200,000 UI/ml, and held at 37 °C overnight. The samples were then acidified using 200 µl of formic acid, centrifuged (3000 rpm, 5 min) and loaded on SPE Bond Elut Certify LRC preconditioned with 1.5 ml of acetonitrile and 1.5 ml of a 0.5% aqueous acetic acid solution. The cartridges were afterward washed with 1 ml of acetic acid (0.5%) and eluted twice with 1.5 ml of acetonitrile. The eluates were then evaporated until dryness under a nitrogen gentle flow at 40 °C and reconstituted in 70 µl of a 70:30 (v:v) water-acetonitrile (0.1% acetic acid) solution. Finally, the extracts were centrifuged (10,500 rpm, 5 min) one last time prior to UPLC-MS/MS analysis.

## 2.4. UPLC-MS/MS analysis

The analyses were performed using a Quattro Premier XE mass spectrometer coupled to an Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). The chromatograph was equipped with a Kinetex Phenyl-Hexyl column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) maintained at 35 °C. The injection volume was 5 µl. The mobile phases A and B consisted, respectively in water and acetonitrile both acidified by 0.1% of acetic acid. A constant flow of 0.55 ml/min was applied using the following gradient: the initial condition of 91% A linearly decreased to 85% A in 5 min. Then, phase A linearly decreased to 74% in 2 min, held for 1 min, linearly decreased to 49% during 6 min, and finally decreased to 20% in 1 min. The gradient returned to initial conditions in 1 min and was maintained for 4 min prior to the next injection.

The compounds were subsequently analyzed by tandem MS operated in negative electrospray (ESI) mode at 3.0 kV for all the compounds except for BP3 which was detected in positive mode at 4.0 kV. The source and desolvation temperatures were set at 120 °C and 350 °C, respectively. Nitrogen was used as cone and desolvation gas at a flow of 50 l/h and 800 l/h. The collision gas was argon (99.99997%, Air Liquide, Liege, Belgium) settled at a flow of 0.20 ml/min. Two transitions for each analyte and internal standard were monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Parent and daughter ions, cone voltage, collision energy, retention time and limits of acceptance for ion ratio of each analyte are listed in Table 1. Ion ratios were measured and compared to their acceptance limits in order to ensure compound identification. These acceptance limits for ion ratios were based on an European Commission decision [37].

## 2.5. Method validation

The analytical procedure was validated on the three different enzymatic conditions according to the total error approach in order to meet the ISO17025 and the guidelines of the French Society of Pharmaceutical Science and Techniques [38–41]. All validation results were computed using the E-nova software V3.0 (Arlenda, Liege, Belgium). The calibration curves as well as the validation samples were performed using synthetic urine fortified with the native stock solution in the concentration range reported in Table 1, and were analyzed in duplicate and triplicate respectively in a single day. These operations were replicated on three different days in order to evaluate the inter and intra assay precision. Moreover, the entire validation process was carried out for the *E. coli* and *H. pomatia* hydrolyses as well as for the free enzyme condition.

## 3. Results and discussion

Even if numerous analytical methods have already been reported for the determination of the urinary phthalate, paraben and BP3 biomarkers separately, the challenge was to gather these 3 classes of EDC in a single procedure. Therefore, only the critical

**Table 1**  
Retention time (RT), cone voltage (CV), MRM transitions, collision energy (CE), acceptance limits for ion ratio, concentration range for calibration and validation samples.

Compounds	RT (min)	CV (V)	1st transition (quantifier)	CE (V)	2nd transition (qualifier)	CE (V)	Acceptance Limits for Ion Ratio MRM1/MRM2	Concentration range for calibration (ng/ml)	Concentration range for validation (ng/ml)
Methyl paraben	4.16	24	150.7 > 92.0	21	150.7 > 136.0	14	1.820–1.973	2.0–800	0.2–800
Monoethyl phthalate	4.89	17	192.7 > 77.0	18	192.7 > 121.0	12	1.804–2.543	0.5–200	0.2–200
Ethyl paraben	6.84	23	164.7 > 92.0	22	164.7 > 137.0	14	1.393–1.569	0.5–200	0.2–200
n-propyl paraben	8.78	24	178.8 > 92.0	23	178.8 > 136.0	15	2.364–2.764	0.5–200	0.2–200
Mono-iso-butyl phthalate	8.85	18	220.8 > 77.0	20	220.8 > 134.0	13	1.608–2.024	0.5–200	0.2–200
Mono-n-butyl phthalate	9.10	18	220.8 > 77.0	20	220.8 > 177.1	10	3.512–4.949	0.5–200	0.2–200
Mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate	9.32	21	292.9 > 121.0	21	292.9 > 145.0	15	0.931–1.239	0.5–200	0.2–200
Mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate	9.63	19	290.9 > 120.9	20	290.9 > 143.0	14	0.968–1.215	0.5–200	0.2–200
Mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate	10.16	19	254.8 > 77.0	20	254.8 > 183.0	10	2.219–3.749	0.5–200	0.2–200
Monobenzyl phthalate	10.58	27	192.8 > 92.0	24	192.8 > 137.0	15	3.104–3.433	0.5–200	0.2–200
n-butyl paraben	12.93	21	228.9 > 105.0	22	228.9 > 151.0	21	2.064–2.454	2.0–800	0.2–800
2-hydroxy-4-methoxybenzophenone or benzophenone-3	13.66	20	276.9 > 134.0	15	276.9 > 77.0	23	1.651–1.853	0.5–200	0.2–200
Mono-2-ethylhexyl phthalate	4.16	24	156.8 > 98.0	21	156.8 > 142.0	14	1.453–2.051		
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> methyl paraben	4.89	17	196.8 > 79.0	18	196.8 > 123.0	12	3.259–3.946		
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> MEP	6.79	23	168.8 > 96.0	22	168.8 > 140.9	14	1.285–1.532		
Ethylparaben-2,3,5,6-d4	8.72	24	182.8 > 96.0	22	182.8 > 140.0	15	2.394–2.819		
n-propylparaben-2,3,5,6-d4	9.10	18	224.8 > 79.0	20	224.8 > 180.0	10	3.376–4.208		
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> MnBP	9.32	21	296.9 > 124.0	21	296.9 > 145.0	15	1.064–1.220		
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate	9.62	19	294.9 > 124.0	20	294.9 > 143.0	14	1.054–1.243		
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> 5oxo-MEHP	10.16	19	258.8 > 79.0	20	258.8 > 186.0	10	2.234–2.693		
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> MBzP	10.58	27	198.8 > 98.0	24	198.8 > 142.0	15	2.396–3.318		
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> n-butyl paraben	12.88	21	234.4 > 110.0	21	234.4 > 151.0	21	1.506–2.625		
2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-2,3,4,5,6-d5	13.65	20	281.0 > 137.0	15	281.0 > 79.0	23	1.612–2.020		
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-ethylhexylphthalate									

parameters, those which used to be different in the separate analyses, will be deeply studied. The parameters non-optimized in this work were directly found in the literature.

### 3.1. UPLC-MS/MS method development

Unlabeled and labeled standards of phthalate metabolites, parabens and BP3 were individually infused in acetonitrile at 1 mg/l in order to optimize the masses of the parent and daughter ions, the cone voltage and the collision energy, and therefore obtain the more intense signal. Unsurprisingly negative ESI was the most suitable ionization mode for all compounds except BP3 which was more efficiently ionized in positive mode [21,24–27,29–31,42]. These optimized parameters are reported in Table 1. Although it has already been demonstrated that negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) could be useful for the ionization of some phthalate monoesters and parabens [19,20,22], this technique did not provide the expected enhancement of the signal response during the different infusions carried out using the ESCi® Multi-Mode Ionization Source (Waters), which combines ESI and APCI. Similarly, positive APCI did not provide better signal response for BP3 in ESCi® mode in comparison to positive ESI. Therefore negative ESI mode was used during the LC run except between 12.25 and 13.25 min where a switch in positive mode occurred. The MS method was split into six time windows and the MRM dwell times were adjusted to maximize the sensitivity.

Several chromatographic conditions were compared to achieve the best separation of the different analytes. It's well-known that acidic compounds like phthalate monoesters need low pH mobile phases to suppress the ionic charge during the chromatography and to allow a minimum of retention on the analytical column and their consequent separation [20,21,24,25]. These acidic chromatographic conditions result in a reduction of the MS signal for phthalate monoesters and parabens usually detected in negative ionization mode. Therefore the initial idea was to find some chromatographic conditions suitable with the negative ESI mode, in

order words to achieve separation of all compounds using neutral mobile phases. For this purpose, several UPLC columns were evaluated using water and acetonitrile as mobile phases: Acquity BEH Phenyl (2.1 × 100 mm, 1.7 μm), Acquity BEH C18 (2.1 × 150 mm, 1.7 μm), Acquity BEH HILIC (2.1 × 150 mm, 1.7 μm), Acquity CSH C18 (1.0 × 100 mm, 1.7 μm) all from Waters, and the Kinetex Phenyl-Hexyl column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) from Phenomenex. As expected the 4 alkyl parabens and the BP3 were efficiently separated under neutral conditions on all columns tested (except for Acquity BEH HILIC column), and the signal was up to 2 fold higher than when eluting with acidic mobile phases. Unfortunately, none of these columns allowed the retention of the phthalate metabolites using neutral mobile phases likely because in these pH conditions, the carboxylic functions were negatively charged and thus compounds were not properly retained with non polar interactions usually occurring in reversed-phase LC [20,21,24,25]. Therefore the loss of sensitivity obtained when using acidic chromatographic conditions while subsequent ionization process is conducted by negative ESI is the price to pay for suitable separation of phthalate monoesters, parabens and BP3. The Kinetex Phenyl-Hexyl column was selected because of its better efficiency to separate both MiBP and MnBP isomers showing the same fragmentation in MRM mode (Table 1). Even then, a 14 min analysis run time was needed to ensure the separation of both isomers and to allow the switch between ESI– and ESI+ (Fig. 3). Different concentrations of acetic acid additive in mobile phases were also tested (0.01%, 0.1%, 0.5% and 1%), and the best compromise between loss of sensitivity and good first peak shape with unchanged retention times was obtained with the addition of 0.1% acetic acid. A chromatogram of an extracted urine sample fortified at 50 ng/ml obtained on the Kinetex Phenyl-Hexyl column using optimized chromatographic conditions is presented in Fig. 3 as well as the different time segments of MRM transitions. All other chromatographic parameters such as the mobile phase flow, the oven temperature or the injection volumes were set as their usual values during reported phthalate metabolite analysis [43,44].

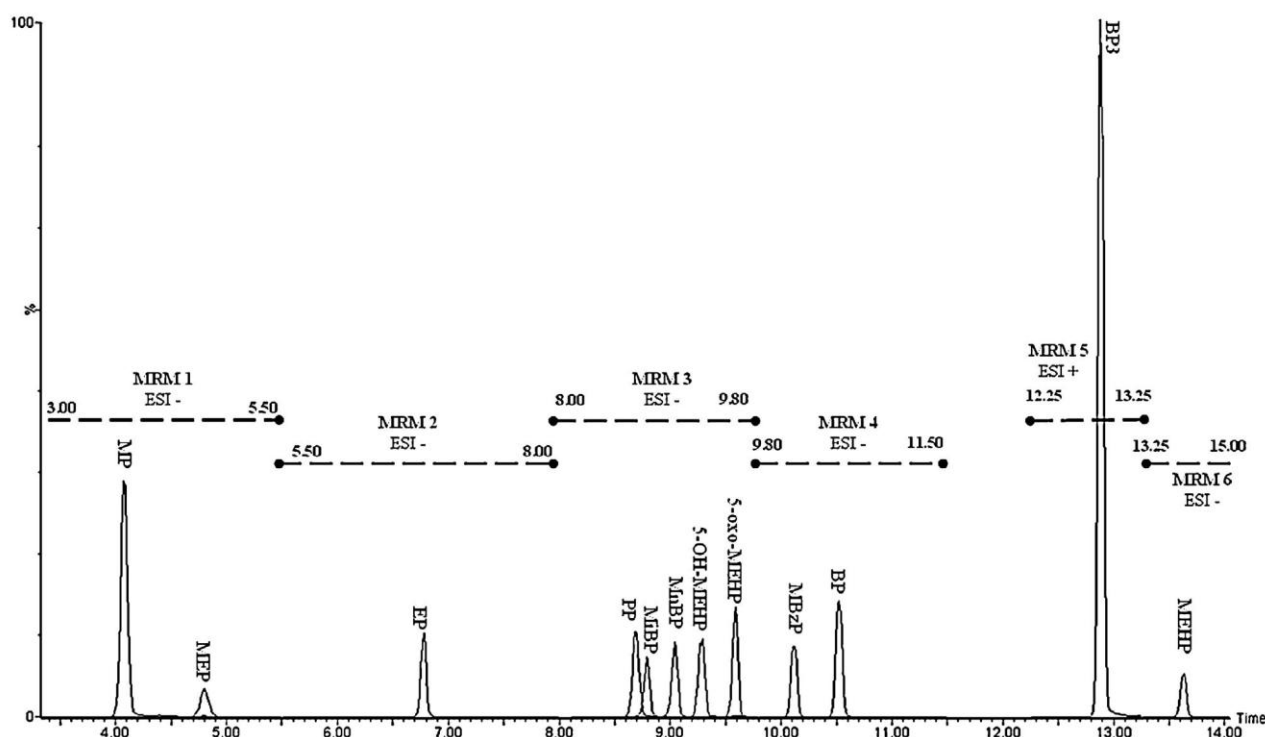
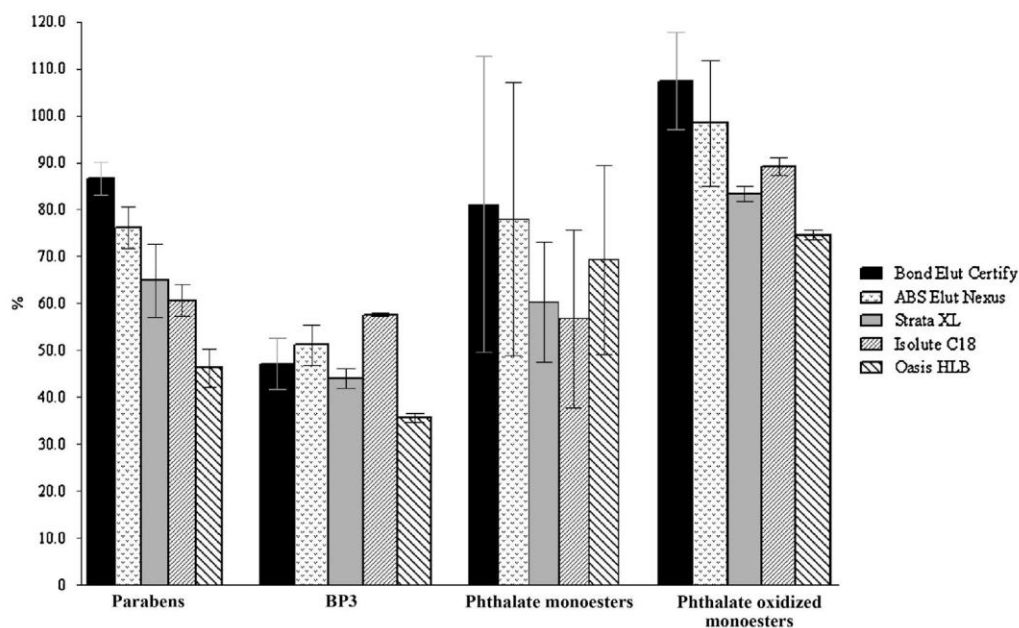


Fig. 3. Optimized chromatogram of an extracted urine sample fortified at 50 ng/ml, and time segments of the selected MRM transitions.





**Fig. 4.** SPE recoveries of phthalate metabolites (monoesters and oxidized), parabens and BP3 obtained with Bond Elut Certify LRC, ABS Elut Nexus, Strata XL, Isolute C18 and Oasis HLB cartridges.

### 3.2. Optimization of the extraction procedure

Online or offline SPE techniques are commonly used for the extraction of parabens, phthalate metabolites or BP3 from urine samples [19–22,24–31,42,45]. Since the extraction of these compounds used to be achieved using non-polar retention mechanism [19–21,29–31,42,45], 5 commercially available reversed-phase cartridges were compared: Strata XL (Phenomenex, Torrance, CA, USA), Oasis HLB (Waters, Milford, MA, USA), Isolute C18 (Biotage, Uppsala, Sweden) Bond Elut Certify LRC (Agilent Technologies Belgium S.A./N.V., B-1831 Diegem) and ABS Elut Nexus (Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, USA). These different cartridges previously conditioned (1.5 ml acetonitrile and 1.5 ml aqueous acetic 0.5%) were evaluated by extracting fortified urine samples buffered (750  $\mu$ l NaAc pH 4.5 1 M) and acidified (200  $\mu$ l formic acid). Before the elution with 3 ml of acetonitrile, a washing step consisting in 3 ml aqueous acetic acid (0.5%) was carried out [45]. The acidification of the urine sample to reach pH below 2.7 prior to the loading allowed to decrease anionic charges of the phthalate metabolites inducing an improvement of the non-polar retention mechanism and therefore avoiding their elution during the washing step. Fig. 4 presents the recovery rates obtained in triplicate with each cartridge for the 3 classes of chemicals. The ABS Elut Nexus and Bond Elut Certify LRC seemed to provide the best yields. Further optimization was carried out on the Bond Elut phase because of its slightly higher recoveries. Some additional washing steps including small proportions of organic solvent (methanol), from 5 to 40%, were tested in order to improve the quality of the final extract. Even with low proportions of methanol (5%), MP and MEP begun to be eluted from the cartridge. Consequently a single washing step involving full aqueous solvent (acetic acid 0.5%) was performed. Since no significant difference on the cleanness of the extract, on the matrix effects or on the SPE recoveries was observed according to the volume of acetic acid (1, 2 or 3 ml were tested), the washing step will be performed with 1 ml. On the other hand, this wash with acid aqueous solvent was required to avoid the formation of insoluble particles during reconstitution of the extract after the dryness evaporation. Other eluting solvents such as methanol or ethyl

acetate were evaluated alone or in combination with acetonitrile but no improvement were observed in the cleanness of the extract or in the recoveries. It should be noted that BP3 showed poor recovery rates (78%) following the evaporation and the reconstitution steps in the initial mobile phase prior to injection. The increase of the organic proportion for reconstitution improved the transfer from the dry extract to the injection vials, but since the initial LC conditions were predominantly aqueous (91%), this adversely affected the peak shape in the early chromatogram. Actually the 70:30 proportion (v:v) of acidified water:acetonitrile (acetic acid 0.1%) showed the best compromise between fair chromatogram and optimal BP3 transfer. No difference in terms of recoveries was observed according to the evaporation temperature (30 °C or 40 °C), therefore this final step was performed at 40 °C for saving time. The extraction yields were evaluated by comparing the area of each target compound on urine extracts fortified before and after the extraction. The mean recovery percentages and the standard deviations are presented in Table 2 for tests realized in triplicate at 10 and 50 ng/ml levels (40 and 200 ng/ml for MP and BP3). The recovery rates were very close to 100% for all compounds whatever the concentration except for BP3 which showed quite lower percentage

**Table 2**  
Recovery percentages (mean  $\pm$  standard deviation) in fortified urine for phthalate metabolites, parabens and BP3 ( $n=3$ ).

Compounds	10 ng/ml <sup>a</sup> (40 ng/ml) <sup>b</sup>	50 ng/ml <sup>a</sup> (200 ng/ml) <sup>b</sup>
MP	89.3 $\pm$ 8.5	91.4 $\pm$ 5.6
MEP	106.4 $\pm$ 2.9	97.7 $\pm$ 6.5
EP	101.5 $\pm$ 5.6	96.9 $\pm$ 4.5
PP	94.2 $\pm$ 4.4	102.2 $\pm$ 8.3
MiBP	99.2 $\pm$ 2.8	104.5 $\pm$ 3.8
MnBP	98.4 $\pm$ 4.3	101.9 $\pm$ 4.9
5-OH-MEHP	95.9 $\pm$ 4.4	103.7 $\pm$ 5.0
5-oxo-MEHP	95.7 $\pm$ 4.6	102.8 $\pm$ 8.1
MBzP	93.1 $\pm$ 4.0	103.6 $\pm$ 8.2
BP	96.6 $\pm$ 2.6	95.0 $\pm$ 7.4
BP3	75.8 $\pm$ 0.3	80.3 $\pm$ 8.0
MEHP	89.2 $\pm$ 3.5	91.7 $\pm$ 4.8

<sup>a</sup> Phthalate metabolites, EP, PP and BP.

<sup>b</sup> MP and BP3.

**Table 3**

Determination of free species or phase-II metabolites for parabens, benzophenone-3 and phthalate metabolites.

Enzyme	Conditions	Target metabolites	Target pollutants
No enzyme	NaAc 1 M pH 4.5	Free species (unconjugated)	Phthalates, parabens and BP3
E. Coli	NH4Ac 1 M pH 6.5	Free species and glucuroconjugated	Parabens and BP3
H. Pomatia	NaAc 1 M pH 4.5	Total metabolites: Free species and glucuroconjugated	Phthalates
		Total metabolites: Free species, glucuro- and sulfo-conjugated	Parabens and BP3

(ranging from 72 to 88%) likely because of the incomplete reconstitution after the final evaporation step as discussed above. Despite the different steps performed to improve the extract quality, some matrix effects still occurred. These latter were evaluated according to the post extraction addition method [46], and a signal suppression of 50% was observed for most of the compounds studied. This suppression has been already reported [19,21,27,30] and was more pronounced for compounds firstly eluted from the LC (MP, MEP and EP). Nevertheless, since the labeled compounds suffered from similar matrix effects than the unlabeled ones, the quantification based on isotope dilution was not affected.

### 3.3. Hydrolysis step

The hydrolysis of the conjugated metabolites for the simultaneous analysis of the phthalate, paraben and BP3 biomarkers was a critical step. While phthalate monoesters would be likely excreted as free and glucuronate metabolites [47], parabens and BP3 have already been detected in urine as free and both sulfate and glucuronate conjugates [18,48]. The enzymatic treatment to hydrolyze BP3 and paraben phase-II metabolites used to be carried out using a  $\beta$ -glucuronidase from *H. pomatia*, which was known to exhibit glucuronidase and sulfatase activities, and therefore was commonly used to quantify the amount of total metabolites [21,22,28,29,31]. On the other hand, this last mentioned enzyme has also been demonstrated to possess a lipase activity allowing the transformation of the phthalate diesters ubiquitously present in the lab environment into the corresponding monoesters [19]. Thus to avoid this external contamination,  $\beta$ -glucuronidase from *E. coli* was generally selected for the deconjugation of phthalate metabolites as it acts very specifically on the glucuronidate forms without other interfering activities [19,20,24–27].

Unfortunately the simultaneous complete hydrolysis of phthalate metabolites, BP3 and parabens could not be achieved using this enzymatic treatment since the paraben and BP3 sulfoconjugated species, which are thought to share for respectively 50% and 12.1% of the excreted metabolites [18,48,49], will remain unchanged and thus will be not considered for quantification [42]. The interest of the determination of each species of the phase-II metabolism lies in the increasing knowledge of the detoxification process which could be variable depending on the organism or the sub-population. For instance gender differences were previously observed for phase-II metabolite amounts of some environmental pollutants [50]. In the present work, 3 different hydrolyses were tested using conditions previously described [18,19,21,22,48], in order to determine the fraction of free, glucuro- and sulfoconjugated metabolites for our 3 classes of pollutant biomarkers as detailed in Table 3. The level of the total metabolites for parabens, BP3 (free forms, sulfate and glucuronate conjugates) and phthalates (free forms and glucuronate conjugates) could be evaluated using *H. pomatia*  $\beta$ -glucuronidase. *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase will be used to estimate the proportions of glucuronidate and free species for parabens and BP3. Therefore, the fraction of sulfoconjugated forms could be achieved in subtracting results from the *E. coli* treatment of the levels measured with *H. pomatia*  $\beta$ -glucuronidase. The determination of the distribution of all these phase-II metabolites would be feasible if the above-mentioned contamination of phthalate monoesters

with *H. pomatia* enzymatic treatment is under control. To evaluate this contamination, blank samples were hydrolyzed using the three different enzymatic conditions (enzyme free, enzymes from *E. coli* and *H. pomatia*) and compared for their phthalate metabolite contents. If all phthalate monoesters targeted were detected in all blanks, the levels of MnBP, MiBP and to a lesser extent MEP were slightly increased when using  $\beta$ -glucuronidase from *H. pomatia*, confirming the Blount's observations about the hydrolysis of phthalate diesters with this enzyme [19]. Nevertheless, these levels were low (less than 1 ng/ml) compared to the usual urine background concentrations [15–17], and should not affect the levels of real urine samples since the calibration curves took into account this small contamination. The levels of phthalate monoesters were determined in 25 real urine samples using  $\beta$ -glucuronidase from *H. pomatia* on one side and from *E. coli* on the other side. No significant difference was observed between results obtained with both conditions, relative standard deviations ranging from 0.1 to 9% according to the metabolites. This demonstrated the suitability of  $\beta$ -glucuronidase from *H. pomatia* for the simultaneously hydrolysis of all paraben, phthalate and BP3 metabolites in urine samples, enabling the measurement of their total metabolite contents in a single analysis.

### 3.4. Method validation

According to the validation process based on the total error approach, the linearity, the trueness, the precision (repeatability and intermediate precision), the uncertainty of measurement, the accuracy profile, the lower limits of quantification (LLOQ), the upper limits of quantification (ULOQ) and the limits of detection (LOD) were evaluated for each hydrolysis condition individually. Table 4 presents the results obtained with the *H. pomatia*  $\beta$ -glucuronidase enzymes. The validation for the 2 other enzymatic conditions led to very close results (not shown). The complete definition and the calculation of all these parameters were already described elsewhere [38–41].

#### 3.4.1. Specificity

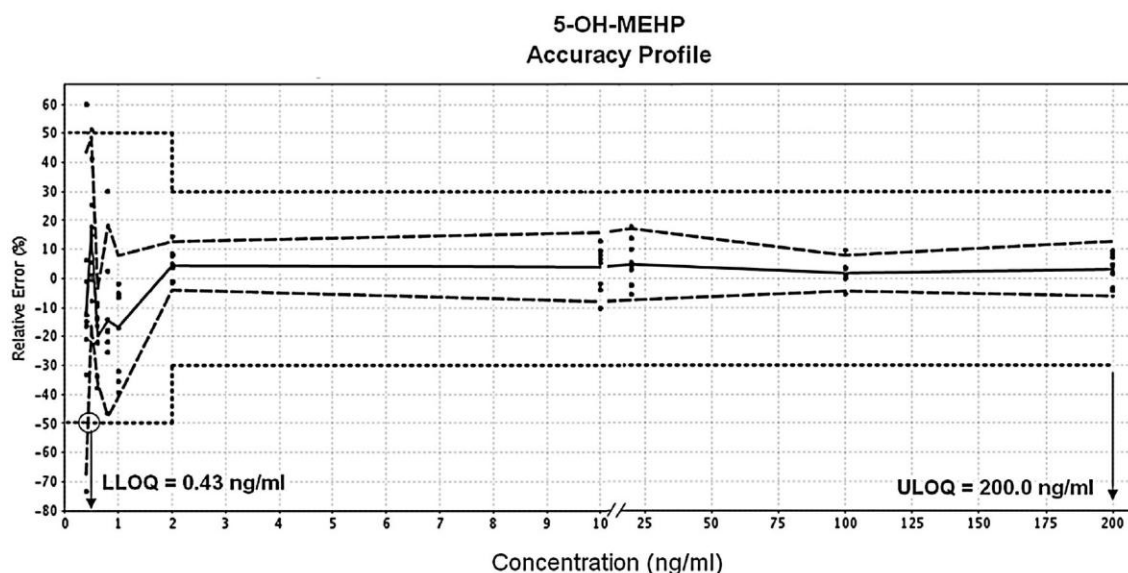
The specificity of the method was ensured by checking the relative retention times (deviation below 0.5% of the expected relative retention time). Moreover 2 transitions in the MRM mode were monitored for each analyte or internal standard, and the corresponding ion ratios should range in their acceptance limits according to the European guidelines [37]. Expected retention times, acceptance limits for ion ratios and parameters of the MRM transitions are summarized in Table 1.

#### 3.4.2. Response function and linearity

The most pertinent response function was selected for each target compound. Using the weighted or unweighted quadratic regression yield most of the time to the closest back-calculated concentrations of the levels initially introduced in the validation samples (for MEHP, MEP, MnBP, MiBP, MP, EP, PP, BP and BP3), while weighted linear regression was preferred as response function for MBzP, 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP. Linearity was observed in the working range of concentrations with the slopes

**Table 4**  
 Trueness, precision, uncertainty, limit of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ), upper limit of quantification (ULOQ), and response function for the urine determination of MP, EP, PP, nBP, MEP, MIBP, MBzP, 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP, MBzP, MEHP, BP3 with *Helix pomatia*  $\beta$  glucuronidase.

	Target Conc. (ng/ml)	MEP	EP	PP	MIBP	MnBP	5-OH-MEHP	5-oxo-MEHP	MBzP	BP	MEHP	Target Conc. (ng/ml)	MP	BP3
<i>Trueness</i>	2.0	9.35	8.05	0.83	5.20	7.67	4.30	-2.85	0.74	-5.87	3.44	8.0	3.14	6.57
<i>Relative bias (%)</i>	10.0	-5.20	5.63	7.84	1.68	-1.11	3.89	6.13	8.76	-2.77	1.48	40.0	4.79	-0.25
	20.0	6.59	8.66	13.71	4.89	3.12	4.79	1.44	6.09	7.10	4.60	80.0	5.65	0.71
	100.0	1.33	2.71	5.00	-2.67	-2.79	1.81	0.86	4.51	4.00	2.48	400.0	1.43	-5.84
	200.0	2.80	7.05	4.27	-2.37	-1.01	3.22	2.65	5.01	3.33	0.49	800.0	-0.92	1.87
<i>Intra assay precision</i>	2.0	8.25	10.00	14.07	17.30	7.99	5.30	6.97	7.83	9.01	9.37	8.0	6.51	4.63
<i>Repeatability (RSD%)</i>	10.0	4.69	3.39	2.78	6.96	9.51	7.56	6.33	3.32	2.69	6.01	40.0	3.74	2.18
	20.0	2.49	3.77	4.30	5.22	5.68	7.82	4.44	4.92	2.61	3.35	80.0	3.51	3.62
	100.0	4.05	6.49	4.59	5.21	3.06	3.96	4.31	6.11	4.06	3.45	400.0	5.68	5.71
	200.0	3.70	4.08	7.49	5.72	4.32	3.51	7.24	3.33	3.59	2.72	800.0	1.52	6.99
<i>Inter assay precision</i>	2.0	8.47	11.23	16.08	17.71	7.99	5.30	7.03	8.60	9.01	9.49	8.0	11.10	4.99
<i>Intermediate precision (RSD%)</i>	10.0	5.95	9.47	5.09	9.91	9.51	7.65	10.24	4.72	6.87	6.04	40.0	10.30	4.91
	20.0	7.92	9.14	4.75	7.21	7.20	7.82	6.66	4.92	9.47	4.91	80.0	5.79	5.65
	100.0	10.22	8.84	5.71	5.21	3.06	3.96	5.80	6.82	9.70	3.45	400.0	7.93	9.74
	200.0	11.37	10.19	12.49	8.57	6.73	5.21	7.24	7.05	8.82	4.11	800.0	8.87	11.92
<i>Uncertainty</i>	2.0	17.94	24.15	34.69	37.50	16.85	11.17	14.84	18.45	19.00	20.05	8.0	24.89	10.67
<i>Relative expanded Uncertainty (%)</i>	10.0	12.96	21.73	11.37	21.92	20.04	16.16	22.88	10.45	15.66	12.75	40.0	23.52	11.16
	20.0	18.13	20.82	10.19	15.92	15.73	16.48	14.81	10.37	21.72	10.90	80.0	12.96	12.58
	100.0	23.30	19.48	12.46	10.98	6.46	8.36	12.75	14.67	22.07	7.27	400.0	17.51	21.85
	200.0	26.02	23.22	27.96	19.03	14.99	11.56	15.26	15.96	20.09	9.15	800.0	20.44	26.73
<i>LOD (ng/ml)</i>		0.28	0.09	0.11	0.37	0.30	0.13	0.16	0.19	0.30	0.19		0.16	0.20
<i>LLOQ (ng/ml)</i>		0.94	0.30	0.36	1.23	0.99	0.43	0.53	0.61	1.00	0.62		0.79	0.67
<i>ULOQ (ng/ml)</i>		200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00		800.00	800.00
<i>Response function</i>		(1/X)	(1/X)	(1/X)	(1/X)	(1/X)	(1/X <sup>2</sup> )	(1/X <sup>2</sup> )	(1/X <sup>2</sup> )	(1/X)	(1/X <sup>2</sup> )		800.00	(1/X <sup>2</sup> )
		Quadratic	Quadratic	Quadratic	Quadratic	Quadratic	Linear	Linear	Linear	Quadratic	Linear		Quadratic	Quadratic



**Fig. 5.** Accuracy profile for 5-OH-MEHP using *H. pomatia*  $\beta$ -glucuronidase hydrolysis. The plain line is the relative bias, the dashed lines are the  $\beta$ -expectation tolerance limits (82.5%), and the dotted curves represent the acceptance limits fixed at  $\pm 50\%$  for concentrations lower than 2.0 ng/ml and  $\pm 30\%$  for concentrations higher than 2.0 ng/ml. The dots represent the relative back-calculated concentrations and are plotted with respect to their targeted concentrations.

and the intercepts close to 1 and 0 respectively, and the regression coefficient ranging from 0.9869 for BP3 to 0.9983 for MEHP.

#### 3.4.3. Trueness, precision and uncertainty of measurements

The trueness evaluated as the relative bias between the mean value obtained from the validation samples and the value accepted as true [38,39] is presented in Table 4 for each analytes at 2, 10, 20, 100 and 200 ng/ml for phthalate metabolites, EP, PP and BP, and at 8, 40, 80, 400 and 800 ng/ml for MP and BP3. The relative bias was below 15% for PP at 20 ng/ml, and below 10% for all other compounds whatever the target concentration.

The precision was determined in evaluating the intra assay precision as the relative standard deviation (RSD) within the triplicate analyses at each target level, and the inter assay precision as the RSD on analyses performed during the 3 different days. They ranged respectively between 1.5 and 17.3%, and between 3.1 and 17.7% for the intra and inter assay precision. The expanded uncertainty of measurements was defined as the 95% confidence interval around the concentration measured where the unknown true value can be observed [28,40,41]. The relative expanded uncertainties were calculated as the expanded uncertainties divided by the corresponding introduced concentrations, and did not exceed 37.50% for each analyte.

#### 3.4.4. Accuracy, limits of detection and quantification

The total error is the ability of the method to produce accurate results, and used to be evaluated through the accuracy, determined as the sum of the precision and the trueness [38,40,41,51]. An accuracy profile was drawn for each analyte (an example for 5-OH-MEHP is showed in Fig. 5) by joining the upper and lower intervals that would contain 82.5% of the future individual results ( $\beta$ -expectation tolerance intervals) and the acceptance limits set here at  $\pm 30\%$  (relative error) for concentrations above than 2.0 ng/ml, and  $\pm 50\%$  for levels below 2.0 ng/ml except for MiBP for which the latter threshold was set at 5.0 ng/ml. This means that the levels for which the  $\beta$ -expectation tolerance intervals obtained are outside the acceptance limits could not be measured with sufficient accuracy and therefore could not be included in the dosing range. According to this, the LLOQs and ULOQs were defined as the intersections between the acceptance limits and the  $\beta$ -expectation

tolerance intervals [38,40,41,51]. LODs were defined as LLOQs/3.3. The LLOQs and LODs are detailed in Table 4 for each compound, and ranged between 0.30 and 1.23 ng/ml, and 0.09 and 0.37 ng/ml, respectively, depending on the compound. These sensitivity limits were closed to those reported in the literature, which used to range from 0.1 to 1.2 ng/ml for phthalate metabolite and paraben analysis by LC-MS/MS [21,22,24,25,27,31] and from 0.04 to 0.30 ng/ml for BP3 when also analyzed by LC-MS/MS [28–30]. Moreover, the sensitivity limits in this work were consistent with the levels commonly found in most of the epidemiological studies [15–17,52].

#### 3.5. External quality control

Our lab participated to the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) 2013 program (<http://www.g-equas.de/>), in which human urine control materials 51-9A and 51-9B were analyzed in replicate ( $n=4$ ). The expected values for MiBP, MnBP, 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP, MBzP and MEHP ranged from 0.7 to 35.5 ng/ml and 9.6 to 109.0 ng/ml in the control materials 51-9A and 51-9B, respectively. Mean results obtained, RSD, and the reference values are gathered in Table 5. As already demonstrated during the validation process, the whole method was found to be repeatable with RSD ranging between 3 and 9%, and proved to be fairly reliable with regard to the bias from the assigned values which did not exceed 20% (ranging between 0.7 and 18%) except for MiBP which showed slightly higher deviation (28%). This would be likely due to the absence of specific labeled internal standard for this compound which was quantified using  $^{13}\text{C}$ -labeled MnBP. Nevertheless the bias from the reference value remained inside our acceptance limits set at 30% during our validation process.

#### 3.6. Application to real urine samples

This analytical procedure was applied on real urine samples from 25 anonymous Belgian donors. The free and the both glucuro- and sulfoconjugated species were determined using the 3 different hydrolysis conditions. Values below the LLOQ were replaced by LLOQ/2 as it was commonly reported for highly skewed data [53]. The urinary concentrations measured for all target metabolites are reported in Table 6. The phthalate metabolites and MP were

**Table 5**

Mean concentration of some phthalate metabolites in urine samples from an interlaboratory test (G-equis 51) and the associated reference values.

	Control mat. 51-9A				Control mat. 51-9B			
	This study (n=4)		Consensus		This study (n=4)		Consensus	
	Conc. (ng/ml)	RSD (%)	Conc. (ng/ml)	Diff. (%)	Conc. (ng/ml)	RSD (%)	Conc. (ng/ml)	Diff. (%)
MiBP	25.55	3.1	35.50	28.0%	79.24	3.1	109.00	27.3%
MnBP	15.94	6.1	17.60	9.4%	65.48	5.8	72.00	9.1%
5-OH-MEHP	18.94	7.7	23.07	17.9%	62.36	4.5	75.78	17.7%
5-oxo-MEHP	17.67	8.4	17.55	-0.7%	56.98	6.0	58.86	3.2%
MBzP	0.82	9.3	0.70	-17.1%	10.36	7.0	9.60	-7.9%
MEHP	3.76	6.1	3.27	-15.0%	14.93	6.7	14.42	-3.5%

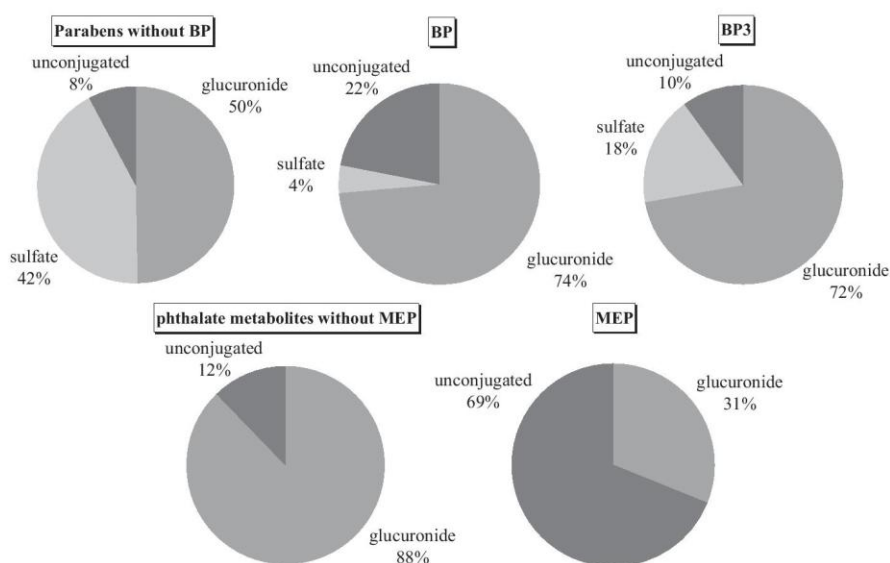
**Table 6**

Urinary levels of the total metabolites of parabens, BP3 and phthalates in some Belgian participants (n=25).

Compound	Median (ng/ml)	Range (ng/ml)	Positive samples (> LOD) (%)
MP	36.16	<LLOQ–2206.8	100
EP	3.25	<LLOQ–111.6	92
PP	0.79	<LLOQ–97.4	68
BP	<LLOQ	<LLOQ–14.0	40
MEP	20.46	3.0–1040.1	100
MiBP	15.87	3.2–468.4	100
MnBP	15.56	3.1–68.7	100
5-OH-MEHP	5.42	0.9–149.5	100
5-oxo-MEHP	4.55	0.8–119.1	100
MBzP	4.02	<LLOQ–21.2	100
MEHP	2.04	<LLOQ–17.4	100
BP3	0.77	<LLOQ–16.8	76

detected in all urine samples, while BP3 and the other parabens – EP, PP and BP – showed lower detection rates, from 92% for EP to 40% for BP. The levels measured ranged from <LLOQ to 2206.8 ng/ml, varying widely from one compound to another and from one individual to another. Paraben and phthalate metabolite levels measured seemed to be comparable to the range previously reported in other countries [15,17,52]. On the other hand, the BP3 levels in the Belgian donors tended to be lower than levels measured in some U.S. residents [16], and close to those detected in a Spanish population [52]. The proportions of the unconjugated and the phase-II conjugated metabolites were calculated with samples presenting concentration above LLOQ, and are shown in Fig. 6. The phthalate metabolites were mainly excreted as glucuroconjugated species (over 80%). Consistently to previous observations [42,54],

MEP was the exception with only 31% of the total metabolites detected corresponding to this glucuronate species, the remaining forms consisting in unconjugated forms. As expected [48] BP3 was mainly excreted as glucuroconjugated species, and to a lesser extend as sulfoconjugated and free metabolites. Parabens seemed to primarily undergo phase-II metabolism leading to both glucuro- and sulfoconjugated metabolites in roughly similar proportions, consistently with Ye's observations [18]. BP was the only paraben isomer nearly not excreted as sulfoconjugated species (an average of 4%). To our knowledge, the sulfoconjugated proportion of BP in human urine has not been reported yet [18,42]. Nevertheless it should be reminded that the population studied was size-limited and conclusions should be drawn with caution.

**Fig. 6.** Relative distribution of phase-II metabolites of parabens, phthalate metabolites and BP3 calculated with samples above LLOQ (n=25).

#### 4. Conclusion

The simultaneous analysis of 7 phthalate metabolites (mono-hydrolyzed and oxidized), 4 parabens and the BP3 in urine was achieved by UPLC-MS/MS. Beforehand enzymatic hydrolysis and extraction steps were developed to determine the distribution of unconjugated and phase-II conjugated metabolites excreted in urine. The optimized analytical method was validated according to the total error approach. The different validation parameters obtained demonstrated the suitability of the method to accurately quantify all analytes in the usual dosing ranges. The limits of detection and quantification were similar to other reported methods, and allowed the detection of phthalates, BP3 and parabens in almost all urine samples from the very small general population studied ( $n = 25$ ). In this population, urinary levels of phthalate metabolites and parabens were comparable to those measured in studies from other countries while BP3 levels were lower than those reported in a U.S. population. Globally, the distribution of unconjugated, glucuro- and sulfoconjugated metabolites observed were consistent with results from previous studies except for BP for which sulfoconjugated forms were unexpectedly detected.

#### References

- [1] R.U. Halden, *Annu. Rev. Public Health* 31 (2010) 179–194.
- [2] P.D. Darbre, P.W. Harvey, *J. Appl. Toxicol.* 28 (2008) 561–578.
- [3] Environmental Working Group, EWG's Skin Deep Cosmetic Database. Last access: July 2013. <http://www.ewg.org/skindeep/>
- [4] Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, *Int. J. Toxicol.* 27 (2008) 1–82.
- [5] T. Suzuki, S. Kitamura, R. Khotia, K. Sugihara, N. Fujimoto, S. Ohta, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (2005) 9–17.
- [6] K.J. Johnson, N.E. Heeger, K. Boekelheide, *Toxicol. Sci.* 129 (2012) 235–248.
- [7] M. Krause, A. Klit, M. Blomberg Jensen, T. Søbørg, H. Frederiksen, M. Schlumpf, W. Lichtensteiger, N.E. Skakkebaek, K.T. Drzewiecki, *Int. J. Androl.* 35 (2012) 424–436.
- [8] S. De Coster, N. van Larebeke, *J. Environ. Public Health* 2012 (2012) 1–52.
- [9] E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 293–342.
- [10] R.W. Stahlhut, E. van Wijngaarden, T.D. Dye, S. Cook, S.H. Swan, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 876–882.
- [11] R. Hauser, J.D. Meeker, S. Duty, M.J. Silva, A.M. Calafat, *Epidemiology* 17 (2006) 682–691.
- [12] R. Hauser, J.D. Meeker, N.P. Singh, M.J. Silva, L. Ryan, S. Duty, A.M. Calafat, *Hum. Reprod.* 22 (2007) 688–695.
- [13] S.H. Swan, K.M. Main, F. Liu, S.L. Stewart, R.L. Kruse, A.M. Calafat, C.S. Mao, J.B. Redmon, C.L. Ternand, S. Sullivan, J.L. Teague, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 1056–1061.
- [14] I. Colón, D. Caro, C.J. Bourdony, O. Rosario, *Environ. Health Perspect.* 108 (2000) 895–900.
- [15] M.J. Silva, D.B. Barr, J.A. Reidy, N.A. Malek, C.C. Hodge, S.P. Caudill, J.W. Brock, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 331–338.
- [16] A.M. Calafat, L.Y. Wong, X. Ye, J.A. Reidy, L.L. Needham, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 893–897.
- [17] A.M. Calafat, X. Ye, L.Y. Wong, A.M. Bishop, L.L. Needham, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 679–685.
- [18] X. Ye, A.M. Bishop, J.A. Reidy, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1843–1846.
- [19] B.C. Blount, K.E. Milgram, M.J. Silva, N.A. Malek, J.A. Reidy, L.L. Needham, J.W. Brock, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4127–4134.
- [20] M.J. Silva, N.A. Malek, C.C. Hodge, J.A. Reidy, K. Kato, D.B. Barr, L.L. Needham, J.W. Brock, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 789 (2003) 393–404.
- [21] M. Chen, L. Tao, E.M. Collins, C. Austin, C. Lu, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 904 (2012) 73–80.
- [22] X. Ye, Z. Kuklennyik, A.M. Bishop, L.L. Needham, A.M. Calafat, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 844 (2006) 53–59.
- [23] F. Kondo, Y. Ikai, R. Hayashi, M. Okumura, S. Takatori, H. Nakazawa, S. Izumi, T. Makino, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85 (2010) 92–96.
- [24] K. Kato, M.J. Silva, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2985–2991.
- [25] M.J. Silva, E. Samandar, J.L. Preau Jr., J.A. Reidy, L.L. Needham, A.M. Calafat, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 860 (2007) 106–112.
- [26] R. Preuss, H.M. Koch, J. Angerer, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 816 (2005) 269–280.
- [27] H.M. Koch, L.M. Gonzalez-Reche, J. Angerer, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 784 (2003) 169–182.
- [28] X. Ye, Z. Kuklennyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5407–5413.
- [29] Z. León, A. Chisvert, I. Tarazona, A. Salvador, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 831–843.
- [30] M. Chen, P. Zhu, B. Xu, R. Zhao, S. Qiao, X. Chen, R. Tang, D. Wu, L. Song, S. Wang, Y. Xia, X. Wang, *J. Anal. Toxicol.* 36 (2012) 608–615.
- [31] H. Frederiksen, N. Jørgensen, A.M. Andersson, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 21 (2011) 262–271.
- [32] L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 95–103.
- [33] V. Sarveiya, S. Risk, H.A. Benson, *J. Chromatogr. A* 803 (2004) 225–231.
- [34] H. Gonzalez, C.E. Jacobson, A.M. Wennberg, O. Larkö, A. Farbro, *Anal. Chem. Insights* 3 (2008) 1–7.
- [35] F. Tonya, B.J. Hall, J.S. Brodbelt, *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 195–203.
- [36] Z. León, A. Chisvert, A. Balaguer, A. Salvador, *Anal. Chim. Acta* 664 (2010) 178–184.
- [37] 2002/657/EC, Commission Decision Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results (notified under document number C(2002)3044), European Union Law, 2002.
- [38] N. Dubois, A.P. Paccou, B.G. De Backer, C.J. Charlier, *J. Anal. Toxicol.* 36 (2012) 25–29.
- [39] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 579–586.
- [40] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 70–81.
- [41] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 82–96.
- [42] N.R. Janjua, H. Frederiksen, N.E. Skakkebaek, H.C. Wulf, A.M. Andersson, *Int. J. Androl.* 31 (2008) 118–130.
- [43] N. Monfort, R. Ventura, G. Balcells, J. Segura, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 908 (2012) 113–121.
- [44] E. Langlois, A. LeBlanc, Y. Simard, C. Thellen, *J. Anal. Toxicol.* 36 (2012) 270–279.
- [45] G. Tranfo, L. Caporossi, E. Paci, C. Aragona, D. Romanzi, C. De Carolis, M. De Rosa, S. Capanna, B. Papaleo, A. Pera, *Toxicol. Lett.* 213 (2012) 15–20.
- [46] I. Marchi, V. Viette, F. Badoud, M. Fathi, M. Saugy, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4071–4078.
- [47] P.W. Albro, J.T. Corbett, J.L. Schroeder, S. Jordan, H.B. Matthews, *Environ. Health Perspect.* 45 (1982) 19–25.
- [48] X. Ye, Z. Kuklennyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 638–644.
- [49] M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 985–1015.
- [50] Y.H. Kim, C.S. Kim, S. Park, S.Y. Han, M.Y. Pyo, M. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 441–448.
- [51] E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 111–125.
- [52] L. Casas, M.F. Fernández, S. Llop, M. Guxens, F. Ballester, N. Olea, M.B. Irurzun, L.S. Rodríguez, I. Riaño, A. Tardón, M. Vrijheid, A.M. Calafat, J. Sunyer, *Environ. Int.* 37 (2011) 858–866.
- [53] R.W. Hornung, L.D. Reed, *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 5 (1990) 46–51.
- [54] M.J. Silva, D.B. Barr, J.A. Reidy, K. Kato, N.A. Malek, C.C. Hodge, D. 3rd Hurtz, A.M. Calafat, L.L. Needham, J.W. Brock, *Arch. Toxicol.* 77 (2003) 561–567.

**Partie IV : Contamination de la population  
générale par les phtalates, les parabènes  
et la benzophénone-3**

### a) La population générale

Les données relatives à la contamination de la population belge par les phtalates, parabènes et BP3 sont apparues dans la littérature en 2013. Parmi les études les plus intéressantes, on peut citer les travaux de Dirtu et al. (2013) et Dirinck et al. (2015) sur des patients obèses recrutés en Flandre chez lesquels plusieurs métabolites de phtalates ont été mesurés. Une autre étude a été effectuée chez 4 couples pour lesquels plusieurs récoltes urinaires ont été effectuées durant 6 jours pour y rechercher des parabènes et la BP3 (Koch et al., 2014). Le projet européen (DEMO)COPHES a mesuré l'exposition aux phtalates chez des couples mères-enfants (Schindler et al., 2014). Enfin, pour 3 phtalates et le APHB, métabolite majoritaire et non spécifique des parabènes, des valeurs d'exposition sont disponibles chez des adolescents flamands recrutés lors de l'étude FLEHS II (Geens et al., 2014 ; Den Hond et al., 2013).

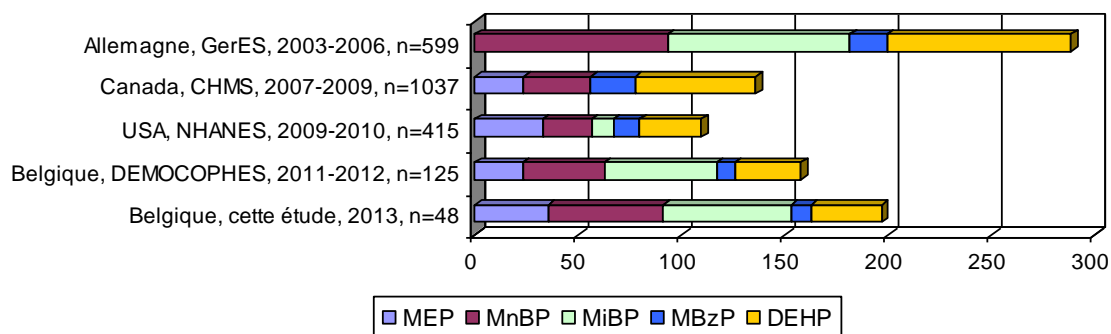
L'originalité de notre étude résulte de la mesure simultanée de l'exposition pour l'Homme aux phtalates, parabènes et BP3 dans une population générale couvrant toutes les classes d'âge et les deux sexes en Province de Liège. Nous avons recruté 261 individus, âgés de 1 à 85 ans. Chaque individu a fourni un échantillon d'urine et complété un questionnaire relatif à des données générales telles que l'âge, le sexe, la taille, le poids, le code postal du lieu de résidence et le statut tabagique. La créatinine, qui a été mesurée dans l'urine par méthode immunoenzymatique (Abbott®), est généralement utilisée pour corriger la dilution de l'urine même si cette démarche est loin de faire l'unanimité car l'excrétion rénale de la créatinine est influencée par plusieurs facteurs physiologiques et physiopathologiques, comme l'âge, le sexe, la grossesse, l'ethnicité, la masse musculaire, la fonction rénale et l'alimentation (Heymsfield et al., 1983 ; Perrone et al., 1992 ; Barr et al., 2005). De plus, l'élimination rénale des PE analysés dans notre travail n'est pas nécessairement identique à celle de la créatinine tant au niveau de la filtration glomérulaire, que de la sécrétion et de la réabsorption tubulaires. D'autres méthodes pour corriger la dilution de l'urine existent dans la littérature, par exemple l'utilisation de la gravimétrie spécifique ou de l'osmolarité urinaire (Philippat et al., 2013 ;



Frederiksen et al., 2013a, 2013b) mais elles ne sont apparemment pas plus intéressantes que la correction faite par la créatininurie.

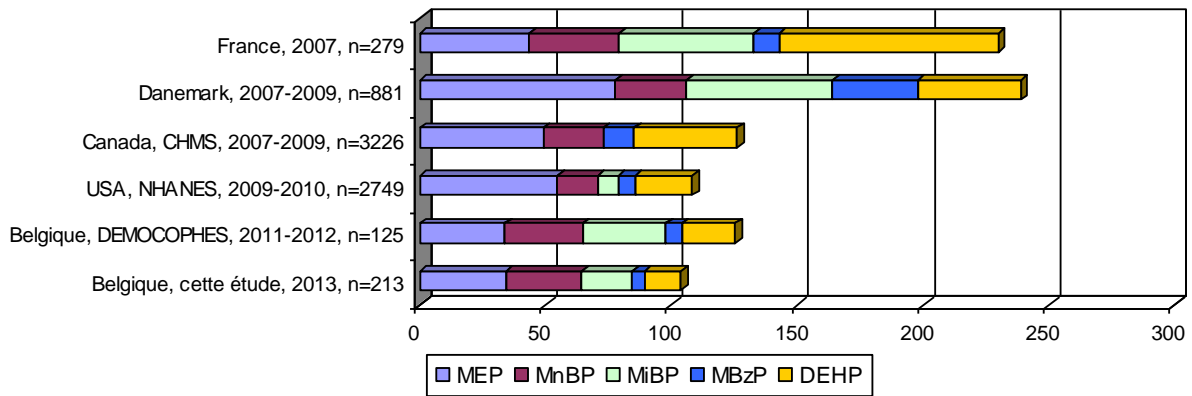
Les niveaux d'exposition retrouvés dans notre population ont été analysés en fonction de l'âge et du sexe. Des corrélations entre les concentrations urinaires des différents composés recherchés ont été calculées. Les résultats du dosage des PE dans notre population ont été comparés aux données publiées dans la littérature. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans la [Publication 4](#). De plus, plusieurs comparaisons des niveaux d'exposition retrouvés en province de Liège et ailleurs dans le monde sont illustrées ci-dessous.

Des figures 6 à 9, il ressort clairement que la contamination et les proportions relatives des différents composés au sein d'une même classe chimique sont très variables d'un pays à l'autre. Si l'exposition aux phtalates au sein de notre population liégeoise semble correspondre à celle des couples mères et enfants recrutés en Belgique durant l'étude (DEMO)COPHES, il n'en est pas de même pour les enfants originaires d'Allemagne et d'Amérique du Nord ni pour les adultes français et danois qui présentaient des niveaux d'exposition plus élevés (Figure 6 et 7).



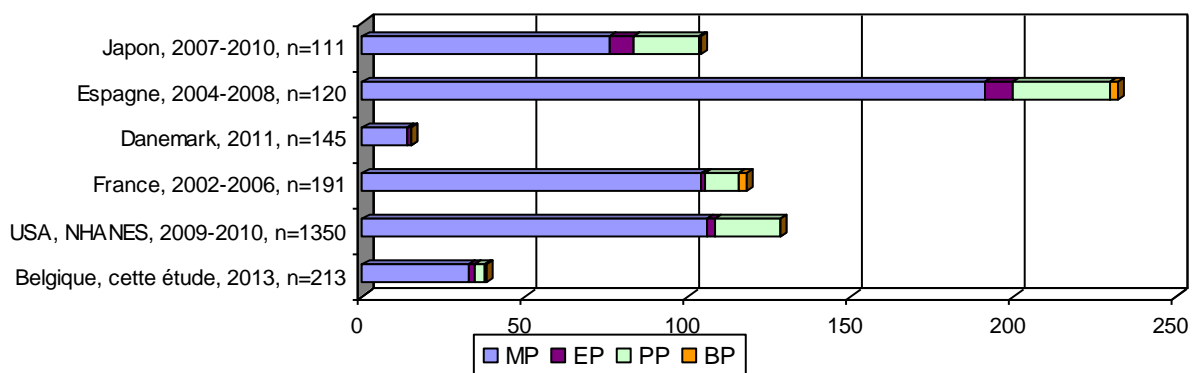
**Figure 6 :** Concentrations urinaires médianes des métabolites de phtalates, en µg/L, rapportées dans plusieurs études chez l'enfant (1 à 11 ans) (Becker et al., 2009 ; Saravanabhavan et al., 2013; DEMOCOPHES, 2013 ; NHANES, 2015). Le MiBP et le MEP n'ont pas été mesurés dans les études CHMS et GerES, respectivement. DEHP correspond à la somme des MEHP, 5-OH-MEHP et 5-oxo-MEHP.

## Partie IVa : La population générale



**Figure 7 :** Concentrations urinaires médianes des métabolites de phtalates, en  $\mu\text{g/L}$ , rapportées dans plusieurs études chez l'adulte (Saravanabhavan et al., 2013 ; DEMOCOPHES, 2013 ; NHANES, 2015; Zeman et al., 2013 ; Joensen et al., 2012). Le MiBP n'a pas été mesuré dans l'étude CHMS. DEHP correspond à la somme des MEHP, 5-OH-MEHP et 5-oxo-MEHP.

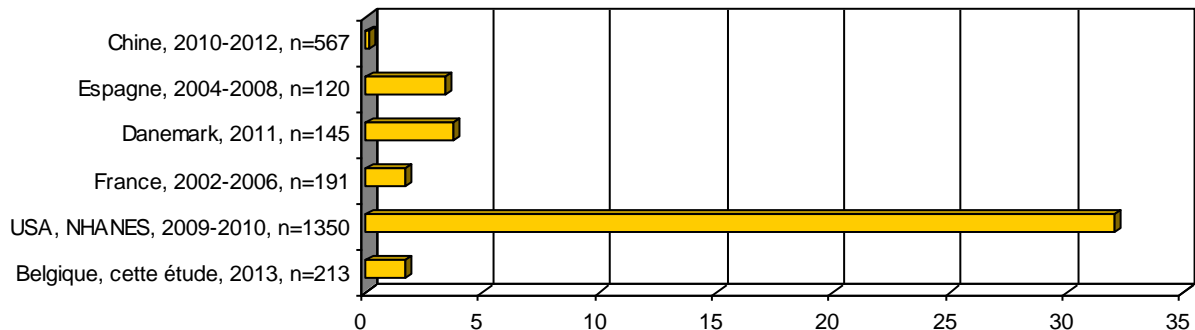
Dans un même ordre d'idée, en s'intéressant maintenant aux parabènes, nous avons observé une importante hétérogénéité des niveaux d'exposition (Figure 8). En effet, les femmes originaires du Danemark et de Belgique semblent être moins exposées que celles provenant du Japon, des États-Unis et d'autres pays de l'Union européenne (Figure 8).



**Figure 8 :** Concentrations urinaires médianes des parabènes, en  $\mu\text{g/L}$ , rapportées dans plusieurs études chez la femme (NHANES, 2015 ; Frederiksen et al., 2013b ; Philippat et al., 2012 ; Casas et al., 2011 ; Shirai et al., 2013).

Finalement, dans le cas de la BP3, les concentrations urinaires étaient relativement proches au sein des différentes populations européennes (médianes situées entre 1  $\mu\text{g/L}$  et 4  $\mu\text{g/L}$ ) (Figure 9). Des niveaux d'exposition bien plus

importants ont été observés dans l'étude américaine NHANES (médiane >30 µg/L) alors qu'ils étaient bien plus faibles en Chine (médiane <1 µg/L) (Figure 9).



**Figure 9 :** Concentrations urinaires médianes de la benzophénone-3, en µg/L, rapportées dans plusieurs études chez la femme (NHANES, 2015 ; Frederiksen et al., 2013b ; Philippat et al., 2012 ; Casas et al., 2011 ; Tang et al., 2013).

L'ensemble des résultats relatifs aux phtalates, parabènes et BP3 pourraient s'expliquer de différentes façons : soit en raison d'une législation particulière, soit en raison d'usages commerciaux différents selon les pays, ou encore à cause d'habitudes de vie spécifiques à chaque région. La comparaison des niveaux d'exposition de plusieurs populations reste cependant un exercice difficile. D'une part, parce qu'il a été montré que les niveaux urinaires de ces composés ont évolué lors de cette dernière décennie (Zota et al., 2014 ; Wittassek et al., 2007), mais, d'autre part, aussi parce qu'actuellement il n'existe pas ou peu de systèmes de comparaison inter-laboratoires pour l'analyse de ces PE.

## Publication 4

Dewalque L, Pirard C, Charlier C. *Measurement of urinary biomarkers of parabens, benzophenone-3, and phthalates in a Belgian population.* **Biomedical Research International 2014** ; 2014 : 649314.

## Research Article

# Measurement of Urinary Biomarkers of Parabens, Benzophenone-3, and Phthalates in a Belgian Population

Lucas Dewalque,<sup>1,2</sup> Catherine Pirard,<sup>1,2</sup> and Corinne Charlier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical, Forensic and Environmental Toxicology, University of Liege (ULg), CHU (B35), 4000 Liege, Belgium

<sup>2</sup>Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liege (ULg), CHU (B35), 4000 Liege, Belgium

Correspondence should be addressed to Lucas Dewalque; [lucas.dewalque@ulg.ac.be](mailto:lucas.dewalque@ulg.ac.be)

Received 19 November 2013; Accepted 15 January 2014; Published 25 February 2014

Academic Editor: Gérald E. Piérard

Copyright © 2014 Lucas Dewalque et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Parabens, benzophenone-3 (BP3), and phthalates are commonly used as antimicrobial conservator, UV-filter, and plasticizer, respectively, and are thought to exhibit endocrine disrupting properties. These endocrine disrupting activities have been recently assumed to lead to cutaneous malignant melanoma. Humans are exposed to these chemicals through different sources such as food, personal care products, or cosmetics. In this study, we measured urinary levels of 4 parabens, BP3, and 7 metabolites of phthalates in samples collected from 261 participants living in and around Liege (Belgium). The analyses were carried out by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using isotopic dilution. To the best of our knowledge, this is the first time that the urinary levels of these 3 classes of chemicals are reported for the same general population in Belgium. Most of the parabens, the BP3, and all the phthalate metabolites were detected in 82.8 to 100.0% of the samples. For most of these chemicals, the exposure patterns significantly differ not only between children and adults, but also between males and females, especially with higher concentrations of parabens and phthalate metabolites in female and children subjects, respectively.

## 1. Introduction

Numerous studies have demonstrated the alarming increase of cutaneous malignant melanomas (CMM) in Caucasian populations these last decades [1–5]. CMM is known to occur mainly in women aged between 15 and 34, although the higher incidence for this specific subpopulation is not well understood [1–3]. While genetic predispositions [4] or environmental factors such as natural or artificial ultraviolet light exposure could induce CMM [5], the exposure to man-made chemicals such as persistent organic pollutants or pesticides was suspected to explain the overall increasing CMM incidence [6–8] but strong evidence is still lacking. Focusing on environmental pollutants, the endocrine disrupting chemicals, which are known to interact with the hormonal homeostasis, are thought to act on estrogen receptor present in melanoma cells [9, 10] or alter HOX genes function which seem to be correlated with tumor progression [11, 12]. Furthermore, some authors recently hypothesized a link between the higher exposure to some endocrine disrupting

chemicals, namely, UV-filters and parabens, and the increasing incidence of CMM [10, 13]. In this paper, we tried to assess the human exposure of 3 classes of endocrine disruptors, namely, parabens, benzophenone-3 (BP3), and phthalates. For this purpose, we measured their urinary biomarkers.

Methyl- (MP), ethyl- (EP), n-propyl- (PP), and n-butylparaben (BP), which are some esters of the parahydroxybenzoic acid (PHBA), are widely used alone or in combination as an antimicrobial conservator in personal care products (cosmetics, shampoos, shaving products, lotions, etc.) but also in food, beverages, food packaging, and pharmaceutical preparations [14, 15]. When present in food, the parabens are orally absorbed and rapidly degraded by liver esterases to PHBA, which is rapidly eliminated in urine as unspecific biomarker [14]. After dermal application of personal care products containing parabens, most of them are degraded by some skin esterases and only a small fraction is available to cross the epidermis and reach the systemic circulation. The unchanged parabens are then excreted in urine as glucuronide, glycine, and sulfate conjugates and could be

therefore used as specific biomarkers to assess their exposure [14, 16, 17]. Although they used to be considered as slightly toxic, the parabens have been demonstrated to show *in vitro* and *in vivo* weak estrogenic activity [18–20]. They can also alter the reproductive functions in male rats and mice after *in utero* exposure [21–23]. The human health effects of the paraben exposure at environmental levels are still unknown and their toxicity remains controversial since several studies did not achieve to demonstrate the endocrine disruptor effects [15, 24, 25]. Nevertheless, parabens have been suspected to be involved in melanocytic lesions [13] because, on the one hand, they can interact with the estrogen receptor beta [26, 27] present in melanoma cells and therefore influence the development of the tumors [9], and on the other hand, they can potentiate UV-induced damage in keratinocyte through oxidative stress [28]. It has been shown that women used to be more exposed to parabens because of their more frequent use of personal care products [29, 30]. Moreover a higher incidence of CMM has been demonstrated in women [1–3]. Consequently, the potential involvement of parabens exposure in CMM incidence can be explored, although, until now, the influence of these endocrine disruptors on the physiopathology of melanoma has never been demonstrated.

BP3 used to be added in sunscreens and cosmetics as a UV-filter but was also introduced in plastic surface coatings and polymers as a UV-stabilizer [10, 31, 32]. Following dermal exposure, BP3 is absorbed through the skin [32] and eliminated in the urine mainly as glucuroconjugated species after phase I and phase II metabolism [32, 33]. Since glucuroconjugated forms are excreted in urine in large amount, unchanged BP3 used to be monitored after hydrolysis step as a specific biomarker [32, 33]. BP3 is known to exhibit estrogen agonist properties and androgen antagonist activities [31, 34, 35]. In biomonitoring studies, higher BP3 exposure has been observed in the female population, probably also due to its presence in personal care products [36].

Phthalates are commonly used as plasticizer especially in PVC but also as solubilizing and stabilizing agent in a broad range of other applications. They can be found in various everyday life products like children toys, cosmetics, and perfumes, as well as in building materials such as vinyl flooring, in food packaging, in adhesives, in clothes, or in medical materials and drugs [57]. Since phthalates are not chemically bound to the polymers, they can be released into the environment. Their exposure can therefore occur through various sources, mainly food but also through air dust, water, use of personal care products, or parenteral way for individuals undergoing medical procedures [61]. In some animal toxicity studies, phthalates were shown to influence the endogenous production of several hormones like testosterone, insulin-like factor 3, and follicle-stimulating hormone and thus could be related to functional and structural impairment of male reproduction and development [61]. The human exposure to phthalates has been associated with alteration of sperm quality [62], reduced anogenital distance in infant [63], neurodevelopment disorders [64], and increased waist circumference and insulin resistance [65]. The exposure assessment of phthalates is carried out using

biomonitoring approaches consisting in the measurement of their urinary metabolites, which are the corresponding monoesters oxidized or not [61].

This work is the first part of a larger study which will focus on the potential link between melanoma and exposure to endocrine disrupting chemicals. For this purpose, the establishment of some reference values in the Belgian general population is needed. Therefore, in order to determine these levels of background contamination, we measured urinary levels of 4 parabens (methyl-, ethyl-, propyl-, and butylparaben), BP3, and 7 metabolites of phthalates, namely, monoethyl phthalate (MEP), mono-n-butyl phthalate (MnBP), mono-iso-butyl phthalate (MiBP), monobenzyl phthalate (MBzP), mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate (5-OH-MEHP), and mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate (5-oxo-MEHP), in 261 people aged between 1 and 85, living in Liege or the surrounding areas.

## 2. Material and Methods

**2.1. Sample Collection.** This study was approved by the Hospital Faculty Ethics Committee of the University of Liege (Belgium). 261 healthy females and males aged from 1 to 85, living in Liege or in the surrounding areas and having no occupational activity related to phthalates, parabens, or BP3, signed free and informed consent. The participants filled in a short questionnaire including data about age, weight, size, smoking habits, and residence localization. For children, the consent and the questionnaire were filled in by the parents or the person in charge. The characteristics of the study population are detailed in Table 1. As summarized in this table, the participants were classified into 3 groups depending on their residence place and based on the Eurostat concept of the rural and urban communities [66]. Therefore these places of residence were defined according to the population density and the total number of inhabitants as densely populated ( $>500$  inhabitants/km<sup>2</sup> and  $\geq 50,000$  inhabitants), intermediately populated (between 100 and 500 inhabitants/km<sup>2</sup> and  $\geq 50,000$  inhabitants), and sparsely populated ( $\leq 100$  inhabitants/km<sup>2</sup> and  $< 50,000$  inhabitants). Spot urine samples were collected in 100 mL polypropylene containers previously screened for potential contamination of phthalate metabolites, BP3, and parabens. The sample collection was carried out from January to April 2013. Immediately after the collection, samples were aliquoted and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  since the phthalate metabolites were demonstrated to be stable in these conditions for at least one year [67] and parabens and BP3 for 6 months [68].

**2.2. Phthalate Metabolites, Parabens, and BP3 Analysis.** The optimization and validation of the analytical procedure for the simultaneous determination of the 7 phthalate metabolites, the 4 parabens, and the BP3 have been previously described [69]. Briefly, after the addition of internal standard and sodium acetate buffer to 3 mL of previously centrifuged urine, the samples were hydrolyzed overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  using *Helix pomatia* glucuronidase. Then samples were acidified

using 200  $\mu\text{L}$  of formic acid, centrifuged again, and the supernatants were loaded on the SPE Bond Elut Certify LRC cartridges which had previously been conditioned. The cartridges were then washed with acetic acid and eluted twice with acetonitrile. The eluate was then evaporated until dryness under a nitrogen gentle flow at 40°C and reconstituted in 70  $\mu\text{L}$  of a 70 : 30 (v:v) acidified water-acetonitrile solution. Finally, the extracts were centrifuged one last time prior to analysis, performed by UHPLC-MS/MS in positive electrospray mode (ESI) for BP3 and negative ESI for parabens and phthalate metabolites. The separation was carried out using a Kinetex Phenyl-Hexyl column 100  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  with acidified water and acetonitrile as mobile phases. The LC gradient, the specific parameters of the mass spectrometry, and the characteristics of the MS/MS transitions have been detailed elsewhere [69].

**2.3. Urinary Creatinine Determination.** The creatinine measurements were carried out using the automate ARCHITECT ci 4100 (Abbott, Illinois, USA) and the Abbott reagents and calibration kits. The analysis method was based on enzymatic chain reactions and absorbance measurements.

**2.4. Determination of Unknown Samples.** The determination of unknown samples was carried out using calibration curves ranging from 0.5 to 200  $\mu\text{g/L}$  (except MP and BP3 from 2 to 800  $\mu\text{g/L}$ ) in synthetic urine. When the concentration measured was above the highest calibration point, the analysis was rerun on diluted samples with synthetic urine. Each sequence of unknown samples included a procedural blank (constituted of synthetic urine) and two level home-made quality controls (10 and 100  $\mu\text{g/L}$  for each compound except BP3 and MP, 40, and 400  $\mu\text{g/L}$ ) [69]. Moreover, our lab participated and successfully passed the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) 2013 program, in which human urine control materials 51-9A and 51-9B were analyzed for MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, 5-OH-MEHP, and 5-oxo-MEHP [69].

**2.5. Statistical Analysis.** The values below our limits of detection (LOD) were treated as LOD/2 in the statistical analyses [37, 43, 47, 70]. Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney  $U$  test and Spearman's rank correlation were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, CA, USA) to compare biomarker levels measured according to the age group and the gender and to highlight associations. Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Washington, USA) was used to determine percentiles and geometric means (GM). Significance limit was set at 0.05.

### 3. Results and Discussion

Creatinine adjustment is commonly used to take into account the volume dilution in environmental biomonitoring studies. Actually several studies suggested that creatinine adjustment could induce bias when comparing different populations such as ethnical groups, pregnant women, neonatal, children, or the elderly for whom creatinine excretion could

TABLE 1: Demographic details on the studied population.

	Men	Women
<i>N</i> (%)	123 (47.1%)	138 (52.9%)
1 to 6 years	12	11
1 to 3 years	3	6
4 to 6 years	9	5
7 to 11 years	11	14
12 to 19 years	15	15
20 to 39 years	46	53
40 to 59 years	24	26
≥60 years	15	19
Average age (min–max) (years)	31.3 (2–75)	31.9 (1–85)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		
BMI < 18.5	23.5%	23.9%
18.5 ≤ BMI < 25	60.9%	46.0%
25 ≤ BMI < 30	11.7%	23.9%
BMI ≥ 30	3.9%	6.2%
Placed residence		
Densely populated	51.3%	51.1%
Intermediately populated	43.5%	40.6%
Sparsely populated	5.2%	8.3%
Smoker		
Yes/no	6.1%/93.9%	5.4%/94.6%

be impacted by physiological factor not directly related to their environmental exposure, for instance, renal function, muscle mass, sex, ethnicity, food consumption, and age [57, 59, 71–75]. For these reasons, creatinine adjustment is more and more discouraged in biomonitoring studies [76]. Therefore, the results are presented here in both  $\mu\text{g/L}$  and  $\mu\text{g/g}$  creatinine, but all statistical analyses and discussions were performed on unadjusted concentrations. For each of biomarkers measured, unadjusted urinary levels were highly or very highly correlated with their respective creatinine adjusted concentrations ( $r = 0.75\text{--}0.97$   $P < 0.001$ ) excepted for MEHP for which correlation was moderate ( $r = 0.56$   $P < 0.001$ ). The Mann-Whitney  $U$  test did not highlight any significant difference in biomarkers levels according to the place of residence. No statistics were performed on the influence of smoking habits because of the very small proportion of smokers in the studied population (Table 1).

GM, the percentiles (5th, 25th, 50th, 75th, and 95th), the range, and the frequencies of detection are detailed in Table 2 for the 261 participants. All subjects were categorized into six age groups (1–6; 7–11; 12–19; 20–39; 40–59; ≥60 years) including a minimum of 23 participants and homogeneously distributed according to the sex (Table 1). The median biomarker levels were also presented according to the different age groups in Table 3.

**3.1. Parabens.** MP was detected in all the urine samples at concentrations ranging from 0.3 to 7576  $\mu\text{g/L}$  and at a GM of 19.0  $\mu\text{g/L}$  (Table 2). EP and PP were positively detected in 96.6% and 83.1% of the urine samples, respectively, and their GM levels were 2.1  $\mu\text{g/L}$  and 1.5  $\mu\text{g/L}$ , ranging from <LOD

TABLE 2: Urinary concentrations of parabens, BP3, and phthalate metabolites ( $\mu\text{g/L}$  or  $\mu\text{g/g}$  creatinine): geometric means (GM), percentiles, ranges, and positivity rates.

	GM $\mu\text{g/L}$ ( $\mu\text{g/g}$ creat.)	Selected percentiles $\mu\text{g/L}$ ( $\mu\text{g/g}$ creat.)					Range $\mu\text{g/L}$ ( $\mu\text{g/g}$ creat.)	Positive samples (%) <sup>a</sup>	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )
		5th	25th	50th	75th	95th			
<b>MP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>19.0 (16.9)</b>	<b>1.1 (1.0)</b>	<b>4.3 (3.6)</b>	<b>16.1 (14.3)</b>	<b>75.2 (61.1)</b>	<b>462.6 (501.7)</b>	<b>0.30–7576.0 (0.23–3712.0)</b>	<b>100.0</b>	<b>0.16</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	10.1 (7.8)	1.0 (1.0)	3.3 (2.8)	7.7 (5.1)	26.9 (16.4)	223.4 (263.5)	0.30–2659.0 (0.23–2227.0)	100.0	
Female ( <i>n</i> = 138)	33.5 (33.5)**	1.0 (1.5)	11.0 (9.8)	32.4 (32.1)	115.1 (128.7)	630.6 (612.7)	0.37–7576.0 (0.28–3712.0)	100.0	
<b>EP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>2.1 (1.8)</b>	<b>0.1 (0.2)</b>	<b>0.6 (0.5)</b>	<b>1.7 (1.5)</b>	<b>6.5 (5.7)</b>	<b>67.7 (53.9)</b>	<b>&lt;LOD–887.3 (&lt;LOD–1033.0)</b>	<b>96.6</b>	<b>0.09</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	1.6 (1.3)	0.1 (0.1)	0.5 (0.4)	1.3 (1.0)	4.7 (3.5)	41.4 (26.4)	<LOD–887.3 (<LOD–592.3)	95.9	
Female ( <i>n</i> = 138)	2.6 (2.6)*	0.1 (0.2)	0.8 (0.7)	1.9 (2.1)	9.2 (8.8)	83.1 (90.5)	<LOD–452.8 (<LOD–1033.0)	97.1	
<b>PP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>1.5 (1.3)</b>	<b>&lt;LOD (&lt;LOD)</b>	<b>0.2 (0.2)</b>	<b>1.2 (1.0)</b>	<b>9.3 (8.4)</b>	<b>78.8 (89.2)</b>	<b>&lt;LOD–692.1 (&lt;LOD–415.1)</b>	<b>83.1</b>	<b>0.11</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	0.6 (0.5)	<LOD (<LOD)	0.1 (0.1)	0.5 (0.4)	2.2 (1.6)	20.2 (15.0)	<LOD–114.6 (<LOD–156.2)	76.4	
Female ( <i>n</i> = 138)	3.3 (3.3)***	<LOD (<LOD)	0.8 (0.6)	3.3 (3.5)	15.4 (19.6)	116.5 (215.1)	<LOD–692.1 (<LOD–415.1)	89.1	
<b>BP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>ND (ND)</b>	<b>&lt;LOD (&lt;LOD)</b>	<b>&lt;LOD (&lt;LOD)</b>	<b>&lt;LOD (&lt;LOD)</b>	<b>0.9 (0.8)</b>	<b>8.0 (8.5)</b>	<b>&lt;LOD–80.6 (&lt;LOD–63.5)</b>	<b>41.8</b>	<b>0.30</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	ND (ND)	<LOD (<LOD)	<LOD (<LOD)	<LOD (<LOD)	0.3 (0.2)	4.9 (3.8)	<LOD–19.4 (<LOD–12.4)	23.6	
Female ( <i>n</i> = 138)	ND (ND)***	<LOD (<LOD)	<LOD (<LOD)	0.5 (0.5)	1.7 (1.7)	11.1 (10.3)	<LOD–80.6 (<LOD–63.5)	58.0	
<b>MEP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>37.6 (33.3)</b>	<b>4.9 (5.7)</b>	<b>16.0 (14.7)</b>	<b>34.3 (30.6)</b>	<b>88.5 (68.4)</b>	<b>292.1 (251.8)</b>	<b>2.23–1904.0 (2.73–860.9)</b>	<b>100.0</b>	<b>0.28</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	40.2 (31.1)	5.2 (5.2)	15.6 (15.6)	34.3 (34.3)	93.9 (93.9)	731.9 (731.9)	2.65–1904.0 (2.65–1904.0)	100.0	
Female ( <i>n</i> = 138)	35.4 (35.4)	4.9 (4.9)	16.5 (16.5)	34.5 (34.5)	85.2 (85.2)	216.9 (216.9)	2.23–578.0 (2.23–578.0)	100.0	
<b>MnBP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>31.3 (27.7)</b>	<b>5.7 (7.1)</b>	<b>15.5 (14.7)</b>	<b>33.3 (26.1)</b>	<b>63.1 (53.4)</b>	<b>145.9 (112.6)</b>	<b>2.00–235.6 (3.63–422.0)</b>	<b>100.0</b>	<b>0.30</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	33.0 (25.5)	6.7 (6.9)	17.0 (12.1)	34.8 (26.1)	61.1 (46.9)	150.4 (91.1)	3.23–222.7 (3.63–143.1)	100.0	
Female ( <i>n</i> = 138)	29.8 (29.9)	5.3 (8.6)	14.9 (15.5)	31.4 (26.1)	63.4 (60.4)	116.5 (126.7)	2.00–235.6 (4.66–422.0)	100.0	
<b>MiBP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>26.2 (23.3)</b>	<b>5.9 (6.9)</b>	<b>14.3 (12.4)</b>	<b>24.3 (20.0)</b>	<b>45.9 (38.5)</b>	<b>154.4 (147.3)</b>	<b>2.04–608.4 (3.09–473.1)</b>	<b>100.0</b>	<b>0.37</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	24.9 (19.3)	5.7 (5.4)	13.5 (10.5)	24.3 (17.2)	43.4 (29.0)	99.6 (99.7)	2.46–504.9 (3.09–307.2)	100.0	
Female ( <i>n</i> = 138)	27.5 (27.5)	6.2 (8.6)	15.0 (14.3)	24.6 (22.4)	48.1 (50.5)	169.5 (174.3)	2.04–608.4 (5.93–473.1)	100.0	
<b>MBzP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>5.5 (4.9)</b>	<b>0.9 (1.2)</b>	<b>2.9 (2.3)</b>	<b>5.5 (4.4)</b>	<b>10.3 (9.1)</b>	<b>34.9 (28.5)</b>	<b>&lt;LOD–126.5 (&lt;LOD–102.0)</b>	<b>99.6</b>	<b>0.19</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	5.8 (4.5)	1.0 (1.0)	3.0 (3.0)	5.8 (5.8)	11.3 (11.3)	40.5 (40.5)	0.40–126.5 (0.65–102.0)	100.0	
Female ( <i>n</i> = 138)	5.2 (5.2)	0.8 (0.8)	2.6 (2.6)	5.3 (5.3)	10.1 (10.1)	34.3 (34.3)	<LOD–84.0 (<LOD–73.0)	99.3	
<b>MEHP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>2.7 (2.4)</b>	<b>1.1 (0.7)</b>	<b>1.7 (1.5)</b>	<b>2.7 (2.3)</b>	<b>4.1 (4.0)</b>	<b>8.7 (7.8)</b>	<b>0.58–20.0 (0.51–46.5)</b>	<b>100.0</b>	<b>0.19</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	3.0 (2.4)**	1.3 (0.7)	1.9 (1.5)	3.0 (2.1)	4.6 (3.6)	8.7 (6.8)	0.99–13.4 (0.51–9.7)	100.0	
Female ( <i>n</i> = 138)	2.5 (2.5)	1.0 (0.7)	1.5 (1.4)	2.2 (2.3)	3.8 (4.2)	8.7 (8.5)	0.58–20.0 (0.56–46.5)	100.0	
<b>5-OH-MEHP</b>									
All ( <i>n</i> = 261)	<b>8.6 (7.6)</b>	<b>1.8 (2.0)</b>	<b>4.7 (4.3)</b>	<b>9.0 (6.8)</b>	<b>15.3 (13.4)</b>	<b>36.7 (35.1)</b>	<b>0.31–113.0 (0.96–263.5)</b>	<b>100.0</b>	<b>0.13</b>
Male ( <i>n</i> = 123)	10.1 (7.8)**	2.5 (2.0)	5.6 (4.5)	9.9 (7.3)	19.4 (13.8)	37.3 (33.4)	1.33–59.3 (1.47–41.8)	100.0	
Female ( <i>n</i> = 138)	7.4 (7.4)	1.2 (1.8)	3.7 (4.1)	7.9 (6.5)	13.7 (12.2)	37.4 (36.4)	0.31–113.0 (0.96–263.5)	100.0	



TABLE 2: Continued.

	GM $\mu\text{g/L}$ ( $\mu\text{g/g creat.}$ )	5th	Selected percentiles $\mu\text{g/L}$ ( $\mu\text{g/g creat.}$ )	25th	50th	75th	95th	Range $\mu\text{g/L}$ ( $\mu\text{g/g creat.}$ )	Positive samples (%) <sup>a</sup>	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )
<b>5-oxo-MEHP</b>										
All ( <i>n</i> = 261)	<b>5.8 (5.1)</b>	<b>0.9 (1.4)</b>	<b>3.1 (2.8)</b>	<b>5.9 (4.8)</b>	<b>11.2 (8.7)</b>	<b>27.4 (23.4)</b>	<b>0.29-94.7 (0.67-220.7)</b>	<b>100.0</b>	<b>0.16</b>	
Male ( <i>n</i> = 123)	6.5 (5.0)	1.4 (1.4)	3.8 (2.7)	6.7 (4.8)	12.2 (9.0)	26.9 (21.9)	0.87-57.4 (0.67-36.8)	100.0		
Female ( <i>n</i> = 138)	5.3 (5.3)	0.8 (1.4)	2.9 (2.9)	5.6 (4.9)	10.2 (8.1)	35.2 (26.6)	0.29-94.7 (0.80-220.7)	100.0		
<b>BP3</b>										
All ( <i>n</i> = 261)	<b>1.3 (1.1)</b>	<b>&lt;LOD (&lt;LOD)</b>	<b>0.4 (0.3)</b>	<b>1.3 (1.0)</b>	<b>3.7 (3.1)</b>	<b>32.2 (30.1)</b>	<b>&lt;LOD-662.8 (&lt;LOD-414.2)</b>	<b>82.8</b>	<b>0.20</b>	
Male ( <i>n</i> = 123)	1.1 (0.8)	<LOD (<LOD)	0.3 (0.2)	0.9 (0.6)	3.1 (2.0)	34.5 (28.8)	<LOD-662.8 (<LOD-414.2)	82.1		
Female ( <i>n</i> = 138)	1.4 (1.4)	<LOD (<LOD)	0.4 (0.4)	1.7 (1.3)	3.8 (4.4)	32.7 (33.3)	<LOD-140.0 (<LOD-141.3)	83.3		

<sup>a</sup> samples above LOD (%).  
 \* *P* < 0.05; \*\* *P* < 0.01; \*\*\* *P* < 0.001.

TABLE 3: Paraben, BP3, and phthalate metabolite medians ( $\mu\text{g/L}$ ) in the different age groups.

Age groups (N)	1–6 (23)	7–11 (25)	12–19 (30)	20–39 (99)	40–59 (50)	$\geq 60$ (34)
MP	34.8	9.1	18.0	13.3	25.6	13.0
EP	2.3*	0.7	1.1	1.9*	2.2*	2.6*
PP	2.1	0.8	4.2	1.0	2.3	0.8
BP	0.8*	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BP3	1.8	1.4	3.6**	0.9	1.3	0.5
MEP	33.3	39.2	42.4	27.5	34.5	54.0
MnBP	59.0***	48.4*	40.9*	24.8	30.7	29.4
MiBP	59.5***	64.1***	33.6**	19.3	21.9	14.8
MBzP	10.2*	8.2*	8.4*	4.2	4.1	4.6
MEHP	3.4**	3.0*	3.7*	2.8*	2.2	1.8
5-OH-MEHP	21.7***	14.3**	13.7***	7.3	5.8	6.0
5-oxo-MEHP	17.1***	10.2***	9.5***	4.6	3.8	3.8

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

TABLE 4: Spearman's rank correlations between urinary phthalate metabolites, parabens, and BP3.

	MEP	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	5-OH-MEHP	5-oxo-MEHP	MP	EP	PP	BP	BP3
MEP	—											
MnBP	0.51***	—										
MiBP	0.32***	0.64***	—									
MBzP	0.44***	0.68***	0.60***	—								
MEHP	0.18***	0.35***	0.34***	0.42***	—							
5-OH-MEHP	0.27***	0.54***	0.56***	0.62***	0.69***	—						
5-oxo-MEHP	0.24***	0.54***	0.59***	0.60***	0.70***	0.96***	—					
MP	0.25***	0.20**	0.19**	0.14*	0.07 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	0.12*	—				
EP	0.35***	0.30***	0.19**	0.15*	0.04 <sup>ns</sup>	0.14*	0.08 <sup>ns</sup>	0.55***	—			
PP	0.25***	0.23***	0.17**	0.11 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	0.79***	0.48***	—		
BP	0.17**	0.35***	0.32***	0.24***	0.16**	0.24***	0.25***	0.51***	0.46***	0.53***	—	
BP3	0.25***	0.35***	0.37***	0.25***	0.15*	0.33***	0.33***	0.27***	0.28***	0.33***	0.37***	—

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns: not significant.

to 887  $\mu\text{g/L}$  and <LOD to 692  $\mu\text{g/L}$ , respectively. Unlike the other parabens, BP showed a poor detection rate (41%) which did not allow us to determine GM and perform statistics and showed globally lower urinary levels (from <LOD to 81  $\mu\text{g/L}$ ). Whatever the targeted paraben is, significantly higher levels were observed in the urine of women compared to men ( $P = 0.040$ – $<0.0001$ ). This observation was consistent with the NHANES study on the American general population [29] and was most likely related to the higher use by women of personal care products such as cosmetics which may contain parabens. Moreover, a recent study highlighted the association between fresh application of cosmetics and higher paraben exposure [30]. Focusing on the urinary paraben levels according to the age group (Table 3), EP levels were significantly lower in the age group of 7–11 years, while conversely BP concentrations were statistically higher in young children (1–6 years) compared to teenagers and young adults (12–39 years) and to the older group ( $\geq 60$  years). If higher EP levels in the adults could be probably explained by more important use of personal care products or pharmaceutical preparations containing EP, the reason why young children seemed to be more exposed to EP and

BP was unclear. On the other hand, the levels of the four studied parabens were correlated ( $r = 0.46$ – $0.79$   $P < 0.001$ ) and especially MP and PP ( $r = 0.79$   $P < 0.001$ ) as detailed in Table 4. This suggested potential common sources of exposure for the different parabens known to be used in combination in personal care products, pharmaceutical preparations, or food [15, 16]. Furthermore, MP and PP are reported to be more frequently combined parabens [16] and were also strongly correlated in other biomonitoring studies [29, 30, 37, 39, 41]. Conversely, Shirai et al. [43] did not observe such a significant correlation between parabens in Japanese pregnant women. The apparent inconsistency with the Asian study might be the result of different paraben use in commercial products from one country to another, yielding to different exposure between populations.

Table 5 gathers the urinary paraben results from different national large-scale biomonitoring studies for children and adults. The highest paraben concentrations in children urine were reported in four-year-old Spanish boys [37]. Excluding this Spanish study, the paraben levels found in our Belgian children seemed to be close to those usually measured in other countries except for MP detected, respectively, at higher

TABLE 5: Paraben and BP3 concentrations—medians (95th percentile) in  $\mu\text{g/L}$ —reported in human urine samples for children, males, and females.

Location (sampling years)	Population	Age (years)	N	MP	EP	PP	BP	BP3	Reference
<b>Belgium (2013)</b>	<b>Children</b>	<b>1-11</b>	<b>48</b>	<b>18.6 (581.1)</b>	<b>1.1 (13.7)</b>	<b>1.1 (96.9)</b>	<b>0.5 (5.7)</b>	<b>1.6 (15.2)</b>	<b>This study</b>
Spain (2005-2006)	Boys	4	30	150.0 (—)	8.1 (—)	21.5 (—)	1.2 (—)	1.9 (—)	[37]
USA (2009-2010)	Children	6-11	415	26.5 (873.0)	<LOD (11.5)	2.7 (114.0)	<LOD (2.2)	14.6 (1570.0)	[38]
Denmark (2011)	Children	6-11	143	3.0 (62.0)	0.4 (3.7)	1.7 (33.0)	<LOD (1.4)	1.8 (40.0)	[39]
China (2012)	Children	9-10	70	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	0.6 (6.4) <sup>‡</sup>	[40]
<b>Belgium (2013)</b>	<b>Males</b>	<b>1-75</b>	<b>123</b>	<b>7.7 (223.4)</b>	<b>1.3 (41.4)</b>	<b>0.5 (20.2)</b>	<b>&lt;LOD (4.9)</b>	<b>0.9 (34.5)</b>	<b>This study</b>
Denmark (2006)	Males	18-26	60	17.7 (2002.0) <sup>‡</sup>	2.0 (564.0) <sup>‡</sup>	3.6 (256.0) <sup>‡</sup>	0.2 (67.6) <sup>‡</sup>	— (—)	[41]
USA (2009-2010)	Males	≥6	1399	25.3 (727.0)	<LOD (36.4)	2.8 (134.0)	<LOD (2.7)	15.3 (610.0)	[38]
<b>Belgium (2013)</b>	<b>Females</b>	<b>1-85</b>	<b>138</b>	<b>32.4 (630.6)</b>	<b>1.9 (83.1)</b>	<b>3.3 (116.5)</b>	<b>0.5 (11.1)</b>	<b>1.7 (32.7)</b>	<b>This study</b>
France (2002-2006)	Pregnant women	—	191	104.3 (2689.7)	1.5 (38.2)	10.4 (267.7)	2.2 (63.6)	1.7 (143.0)	[42]
Spain (2004-2008)	Pregnant women	—	120	191.0 (—)	8.8 (—)	29.8 (—)	2.4 (—)	3.4 (—)	[37]
Japan (2007-2010)	Pregnant women	32.6 <sup>‡</sup>	111	75.8 (1361.0) <sup>‡</sup>	7.5 (593.0) <sup>‡</sup>	20.2 (2690.0) <sup>‡</sup>	0.6 (22.8) <sup>‡</sup>	— (—)	[43]
USA (2009-2010)	Females	≥6	1350	106.0 (1230.0)	2.0 (138.0)	20.2 (361.0)	0.3 (31.8)	32.0 (3200.0)	[38]
Puerto Rico (2010-2012)	Pregnant women	—	105	153.0 (1590.0)	— (—)	36.7 (493.0)	0.4 (36.4)	31.3 (2150.0)	[30]
China (2010-2012)	Pregnant women	≥18	567	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	0.1 (0.8)	[44]
Danemark (2011)	Mothers	31-52	145	14.0 (275.0)	0.9 (44.0)	<LOD (14.0)	<LOD (9.3)	3.7 (312.0)	[39]

—: no results/information.

<sup>‡</sup> maximum.

<sup>‡</sup> mean.

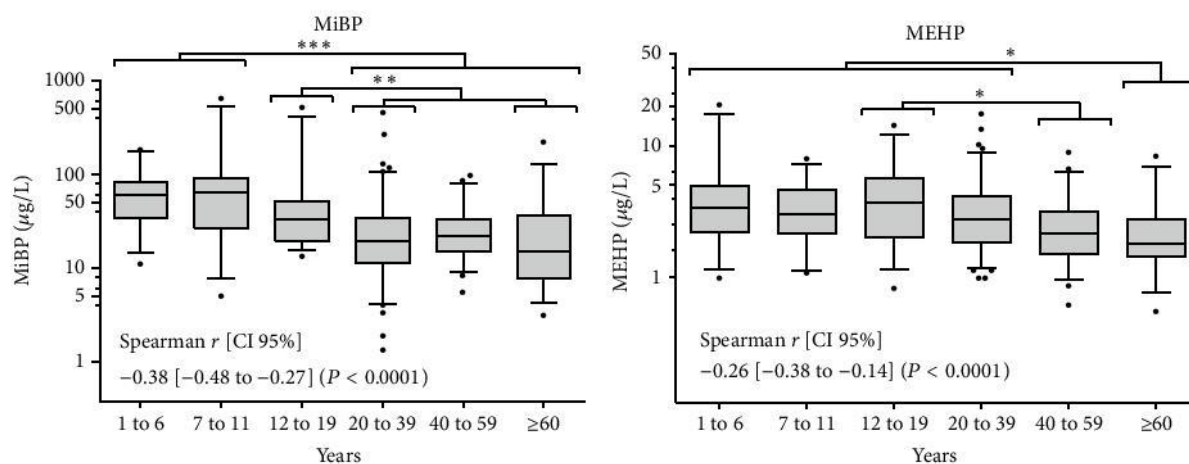


FIGURE 1: Urinary concentrations of MiBP and MEHP [ $\mu\text{g/L}$ ] according to the age groups. The lower and upper boundaries of the boxes represent the 25th and 75th percentile, respectively. The line within the box is the median level and the whiskers are the 5th and 95th percentiles. Spearman's rank correlations [95% confidence interval] between metabolite concentrations and age are mentioned. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

and lower urinary concentrations than in some Danish and American children [38, 39]. On the other hand, the Belgian men seemed to be less exposed to all parabens than the Danish or American male populations [38, 41]. Focusing on women results, more data used to be available on urinary paraben levels and more specifically for pregnant women. In the present study, the levels measured in the women urine were overall quite lower than those reported in French, Spanish, Japanese, American, or Puerto Rican women but slightly higher than those described in some Danish mothers [30, 37–39, 42, 43]. It is of note that the lower BP levels and detection rate were also observed in all biomonitoring surveys, and even if the use of specific paraben according to the application could be variable between countries, the profiles were consistent in all studies with MP sharing for 75 to 90%, followed by PP and EP.

**3.2. BP3.** BP3 was detected in 82.8% of analyzed samples with levels ranging from  $<\text{LOD}$  to  $662.8 \mu\text{g/L}$  and a GM level of  $1.3 \mu\text{g/L}$  (Table 2). Similar to parabens, since BP3 used to be frequently incorporated in personal care products, its urinary levels were demonstrated to be correlated with the use of cosmetics [30]. Nevertheless, no significant difference was observed between males and females in the present study ( $P = 0.086$ ) unlike in the NHANES study [36]. BP3 levels measured were significantly higher in adolescents (12–19 years) compared to adults (Table 3). This higher exposure for adolescents could not be reasonably explained. Besides the slight but significant correlation between BP3 and parabens ( $r = 0.27\text{--}0.37$   $P < 0.001$ ) already observed in a previous study [30], BP3 seemed to be weakly correlated with some phthalate metabolites, mainly MnBP, MiBP, 5-OH-MEHP, and 5-oxo-MEHP ( $r = 0.33\text{--}0.37$   $P < 0.001$ ). Although personal care products are known to be a source of exposure for both BP3 and parabens, other BP3 exposure routes have been suggested such as sunscreens or plastic surface coatings for food packaging [10, 31, 36]. We suspected this plastic

food packaging to be a common route of exposure for BP3 and phthalates, therefore explaining the correlation found between both chemicals classes. On the other hand, the phthalates and BP3 are used in a wide range of other applications in the everyday life, and therefore a weak correlation was not unexpected [10, 61].

Compared to other surveys (Table 5), BP3 levels measured in the present study were fairly similar to those observed in child or adult population from different countries [37, 42] except in USA or in Puerto Rico [30, 36, 39] where levels found were up to 10- to 20-fold higher. This higher exposure would most likely be the reflection of the higher use of BP3 in North America where, for instance, 59% of the sunscreens were reported to contain this chemical [77]. Conversely, the urinary BP3 levels observed in China were much lower than those measured in Belgium [40, 44].

**3.3. Phthalate Metabolites.** The phthalate metabolites were positively detected in nearly all urine samples analyzed (Table 2). The GM ranged from  $2.7$  to  $8.6 \mu\text{g/L}$  for MBzP, MEHP, 5-oxo-MEHP, and 5-OH-MEHP while higher levels were observed for MEP, MnBP, and MiBP with GM ranging between  $26.2$  and  $37.6 \mu\text{g/L}$ . We did not observe any significant difference in urinary phthalate metabolite concentrations between males and females except for the sum of the metabolites of the diethylhexylphthalate (MEHP, 5-oxo-MEHP, and 5-OH-MEHP) which was statistically higher in men ( $P = 0.0166$ ). The distribution of the metabolite levels is presented according to the age classification for MiBP and MEHP as an example in Figure 1. This figure details the significant differences which exist between the different age groups for both metabolites, while the global significant observations are shown in Table 3. As it was previously reported [47, 49, 78], the levels observed in children were quite higher than in adults. This reinforces the assumption raised by Silva et al. [78] about higher phthalate exposure for children relating to more time spent indoors and therefore the higher

TABLE 6: Phthalate metabolite concentrations—median (95th percentile) in  $\mu\text{g/L}$ —reported in human urine samples for children and adults.

Location (sampling years)	Population	Age (years)	N	MEP	MmBP	MiBP	MBzP	MEHP	5-OH-MEHP	5-oxo-MEHP	Reference
<b>Belgium (2013)</b>	<b>Children</b>	<b>1–11</b>	<b>48</b>	<b>35.6 (139.6)</b>	<b>55.7 (132.7)</b>	<b>61.8 (175.8)</b>	<b>9.7 (52.8)</b>	<b>3.1 (7.2)</b>	<b>18.7 (61.7)</b>	<b>12.3 (47.0)</b>	<b>This study</b>
Taiwan (2001–2002) <sup>a</sup>	Children	2–6	89	— (—)	87.9 (16455.0) <sup>†</sup>	21.9 (252.7) <sup>‡</sup>	3.8 (69.4) <sup>‡</sup>	8.1 (94.7) <sup>‡</sup>	39.6 (1014.0) <sup>‡</sup>	31.0 (761.0) <sup>‡</sup>	[45]
Germany (2003–2006)	Children	3–14	599	— (—)	93.4 (310.0)	88.1 (308.0)	18.1 (76.2)	6.7 (25.1)	46.0 (164.0)	36.3 (123.0)	[46]
Spain (2005–2006)	Children boys	4	30	32.4 (—)	30.2 (—)	41.9 (—)	33.0 (—)	6.2 (—)	57.4 (—)	44.6 (—)	[47]
Canada (2007–2009)	Children	6–11	1037	23.6 (210.7)	32.6 (168.2)	— (—)	21.4 (131.1)	6.4 (17.8)	31.6 (179.5)	20.3 (106.7)	[37]
USA (2009–2010)	Children	6–11	415	33.0 (288.0)	23.3 (124.0)	10.9 (55.4)	12.6 (87.8)	1.7 (8.9)	17.0 (75.1)	11.1 (48.4)	[38]
Denmark (2011)	Children	6–11	143	20.0 (68.0)	32.0 (99.0)	54.0 (193.0)	7.0 (31.0)	2.0 (10.0)	23.0 (89.0)	12.0 (40.0)	[39]
Korea (2011)	Children	0–6	392	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	14.9 (58.1)	80.3 (253.2)	83.3 (265.5)	[48]
Belgium (2011–2012)	Children	6–11	125	23.0 (169.0)	40.0 (122.0)	54.0 (362.0)	8.6 (27.0)	2.2 (8.7)	17.0 (31.0)	13.0 (22.0)	[49]
<b>Belgium (2013)</b>	<b>Males and females</b>	<b>12–85</b>	<b>213</b>	<b>34.3 (396.3)</b>	<b>30.2 (142.2)</b>	<b>20.1 (89.3)</b>	<b>4.6 (26.5)</b>	<b>2.5 (8.7)</b>	<b>7.4 (30.6)</b>	<b>4.9 (19.1)</b>	<b>This study</b>
Sweden (2001)	Mothers	23–39	38	35.0 (761.0) <sup>‡</sup>	46.0 (198.0) <sup>‡</sup>	16.0 (130.0) <sup>‡</sup>	13.0 (38.0) <sup>‡</sup>	9.0 (57.0) <sup>‡</sup>	15.0 (126.0) <sup>‡</sup>	11.0 (83.0) <sup>‡</sup>	[50]
Taiwan (2001–2002)	Pregnant women	31–39	100	— (—)	52.4 (928.0) <sup>‡</sup>	10.3 (269.0) <sup>‡</sup>	1.2 (55.0) <sup>‡</sup>	10.5 (218.0) <sup>‡</sup>	21.7 (617.0) <sup>‡</sup>	20.8 (645.0) <sup>‡</sup>	[45]
The Netherlands (2002–2006)	Pregnant women	18–41	99	117.0 (1150.0)	42.8 (197.0)	42.1 (249.0)	7.5 (95.8)	6.9 (82.8)	14.0 (86.2)	14.5 (104.0)	[51]
Peru (2004)	Pregnant women	14–46	79	32.2 <sup>‡</sup> (—)	9.3 <sup>‡</sup> (—)	1.2 <sup>‡</sup> (—)	1.1 <sup>‡</sup> (—)	1.6 <sup>‡</sup> (—)	4.1 <sup>‡</sup> (—)	3.1 <sup>‡</sup> (—)	[52]
Spain (2004–2008)	Pregnant women	17–43	120	755.0 (—)	27.5 (—)	29.9 (—)	10.5 (—)	4.4 (—)	17.3 (—)	15.7 (—)	[37]
Germany (2005) <sup>b</sup>	Males and females	14–60	399	— (—)	49.6 (171.5)	44.9 (182.6)	7.2 (45.6)	4.9 (21.7)	19.2 (21.7)	14.7 (56.0)	[53]
Japan (2005–2008)	Pregnant women	31.9 <sup>‡</sup>	149	6.0 (1067.0) <sup>‡</sup>	48.1 (504.0) <sup>‡</sup>	— (—)	3.5 (992.0) <sup>‡</sup>	4.4 (70.3) <sup>‡</sup>	8.6 (89.7) <sup>‡</sup>	9.2 (132.0) <sup>‡</sup>	[54]
Israel (2011)	Males and females	20–74	248	— (—)	279 (90.8) <sup>‡</sup>	37.6 (89.0) <sup>‡</sup>	4.3 (20.5) <sup>‡</sup>	11.2 (49.3) <sup>‡</sup>	30.4 (91.1) <sup>‡</sup>	17.1 (55.5) <sup>‡</sup>	[55]
Mexico 2007	Females	32–79	108	83.2 <sup>‡</sup> (—)	72.4 <sup>‡</sup> (—)	8.4 <sup>‡</sup> (—)	4.4 <sup>‡</sup> (—)	5.2 <sup>‡</sup> (—)	45.8 <sup>‡</sup> (—)	31.8 <sup>‡</sup> (—)	[56]
France 2007	Pregnant women	—	279	43.5 (600.7)	35.7 (201.1)	53.7 (274.1)	10.1 (88.7)	16.7 (266.6)	41.9 (605.1)	28.5 (427.9)	[57]
Denmark (2007–2009)	Males	19.5 <sup>‡</sup>	881	78.0 (1936.0)	28.0 (91.0)	58.0 (173.0)	34.0 (164.0)	4.0 (18.0)	23.0 (79.0)	14.0 (55.0)	[58]
Canada (2007–2009)	Males and females	6–49	3236	49.1 (824.2)	23.8 (120.9)	— (—)	12.3 (81.9)	3.5 (24.9)	23.4 (180.3)	14.0 (113.8)	[47]
USA (2009–2010)	Males and females	$\geq 6$	2749	54.9 (988.0)	15.9 (75.9)	8.3 (41.3)	6.7 (48.3)	1.5 (14.1)	12.9 (103.0)	8.0 (55.7)	[38]
China (2010)	Males and females	10–40	183	21.5 (1330.0) <sup>‡</sup>	61.2 (798.0) <sup>‡</sup>	56.7 (791.0) <sup>‡</sup>	0.6 (43.0) <sup>‡</sup>	2.1 (207.0) <sup>‡</sup>	11.3 (1120.0) <sup>‡</sup>	7.0 (564.0) <sup>‡</sup>	[59]
Korea (2011) <sup>c</sup>	Males, females, and mothers	20–39	562	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	9.5 (94.0)	27.6 (98.2)	21.1 (82.3)	[48]
Denmark (2011)	Mothers	31–52	145	29.0 (359.0)	20.0 (70.0)	36.0 (139.0)	4.0 (22.0)	1.7 (6.9)	12.0 (50.0)	6.1 (21.0)	[39]
Belgium (2011–2012)	Mothers	$\leq 45$	125	34.0 (240.0)	31.0 (119.0)	33.0 (175.0)	6.4 (23.0)	2.3 (9.1)	11.0 (51.0)	7.6 (13.0)	[49]
Italy (—) <sup>d</sup>	Males and females	19–58	157	59.0 (748.6)	24.2 (143.0)	— (—)	16.7 (102.9)	3.1 (13.4)	12.1 (49.4)	— (—)	[60]

N: number of participants.

<sup>†</sup> maximum.

<sup>‡</sup> arithmetic mean.

<sup>§</sup> geometric mean.

—: no results/information.

<sup>‡</sup> Percentile 90th.

<sup>a</sup> Arithmetic mean of 2–3 and 5–6 years groups medians.

<sup>b</sup> Urine collected over eight consecutive days for each participant except one for seven days.

<sup>c</sup> 12 h urine. Arithmetic mean of male, female, and mother medians.

<sup>d</sup> Arithmetic mean of female and male medians.

exposure to the phthalates potentially found in the household environment such as in carpets, vinyl flooring, pigments, or paints [79, 80]. Furthermore, children are known to have higher respiratory rates leading to higher exposure through indoor air and house dust [81, 82]. Their relatively higher food intake/body-weight ratio could also result in higher exposure than adults [78].

Some moderate to very high correlations were observed among the phthalate metabolites (Table 4). As expected, the three metabolites of diethylhexylphthalate (DEHP) were highly correlated ( $r = 0.69-0.96$   $P < 0.001$ ). A stronger association between both oxidized metabolites of DEHP was observed compared to the correlation between oxidized metabolites and MEHP. This is consistent with some previous studies [83, 84], and one of the reasons for this lower correlation rate might be explained by the differences in half-time elimination between oxidized DEHP metabolites and MEHP [61]. MiBP, MnBP, and MBzP were moderately to highly correlated ( $r = 0.60-0.68$   $P < 0.001$ ) but also with 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP ( $r = 0.54-0.62$   $P < 0.001$ ). MEP was moderately associated with MnBP and MBzP ( $r = 0.51$  and  $0.44 < 0.001$ , resp.) but weakly with other phthalate metabolites ( $r = 0.18-0.32$   $P < 0.001$ ). These results suggest that Belgians seemed to be exposed to some mixtures of phthalates through similar routes. Göen et al. [83] and Frederiksen et al. [85] also reported roughly comparable correlations between phthalate metabolites, but some correlation rates could slightly differ illustrating the variability of the exposure pattern of phthalates through the European countries.

During the past decade, numerous biomonitoring studies focused on the phthalate metabolites in the general population or in some specific subpopulations. A nonexhaustive comparison between different national large-scale studies in children and adults is presented in Table 6. The levels of the phthalate metabolites measured in the present study were fairly similar to those observed in the Belgian children and mothers recruited during the recent DEMOCOPHES study [49].

Focusing on the child population, the sum of the phthalate metabolites in the Belgian urine samples was comparable to those reported from Denmark [39], Taiwan [45], and Canada [47] but higher than in the CDC study [38] and lower in German [46] and Korean children [48]. Except in Spain where the highest phthalate metabolite levels were measured [37] either for children or adults, the levels measured in our adult participants seemed to be close to those reported in most of the other adult populations from Europe, Asia, or North America [38, 44, 47, 50, 54, 59, 60]. Nevertheless, quite higher urinary levels were reported in some studies such as in France, The Netherlands, Germany, or Mexico [51, 53, 56, 57] while very low urinary concentrations were measured in pregnant Peruvian women [52]. The urine of the present Belgian children and adults seemed to show a different phthalate metabolite profile, characterized by higher proportions of MnBP and MiBP compared to MEP for children and a higher MEP excretion rate for adults. This different profile could be related to a different exposure pattern for children and adults, with a higher exposure to

diethyl phthalate due to higher use of personal care products by adults [86] compared to children. For the latter, the potential contamination of the interior environment could be considered as an important pathway of exposure [78]. These exposure patterns observed could be country dependent and probably related to different food or lifestyle habits and specific commercial use of phthalates. For example, the Chinese adults [59] showed higher MiBP and MnBP levels than MEP while the French or Mexican women [56, 57] presented a greater level of the metabolites of DEHP compared to other phthalate biomarkers.

#### 4. Conclusion

This study reported for the first time, to the best of our knowledge, the simultaneous measurement of 7 phthalate metabolites, 4 parabens, and the BP3 in 261 participants from the Belgian general population aged from 1 to 85 years. Although this work presents several limitations in terms of representativeness such as a low sample number, limited sampling localization, and a small socioeconomic diversity, our results were close to the Belgian DEMOCOPHES references values [49]. As reported in other biomonitoring studies, we observed widely spread population exposure to these endocrine disruptor chemicals. The urinary paraben levels observed in the present study were statistically higher in women. Because the skin effects of alkyl parabens at environmental doses are still unknown, their potential interaction with CMM cells should be investigated considering that exposure for the women seemed to be higher due to the use of personal care products. EP, BP3, and phthalate metabolites (excepted MEP) showed significant different urinary levels according to the age groups. Higher exposure in younger age groups is a matter of concern since the disruption of hormonal balance during the development stage might have long-term consequences on their health. The results obtained in this study showed some important differences in terms of exposure levels and pattern among different countries but also among participants in the same population. The sum of the twelve targeted compounds ranged between 14.8 and 8575.2  $\mu\text{g/L}$  showing that the cumulative exposure might be 600 times higher from one individual to another. This is also a matter of concern since additive endocrine disrupting effects are to be expected [87].

#### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

#### References

- [1] K. B. Reed, J. D. Brewer, C. M. Lohse, K. E. Bringe, C. N. Pruitt, and L. E. Gibson, "Increasing incidence of melanoma among young adults: an epidemiological study in Olmsted County, Minnesota," *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 87, no. 4, pp. 328-334, 2012.
- [2] E. G. Little and M. J. Eide, "Update on the current state of melanoma incidence," *Dermatologic Clinics*, vol. 30, pp. 355-361, 2012.

- [3] P. Quatresooz, I. Uhoda, I. Fumal, C. Piérard-Franchimont, and G. E. Piérard, "Revisiting the gender-linked melanoma burden," *Dermatology*, vol. 209, no. 3, pp. 197–201, 2004.
- [4] J. Hansson, "Familial cutaneous melanoma," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 685, pp. 134–145, 2010.
- [5] M. Boniol, P. Autier, P. Boyle, and S. Gandini, "Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis," *British Medical Journal*, vol. 345, Article ID e4757, 2012.
- [6] R. P. Gallagher, A. C. MacArthur, T. K. Lee et al., "Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: a preliminary study," *International Journal of Cancer*, vol. 128, no. 8, pp. 1872–1880, 2011.
- [7] L. K. Dennis, C. F. Lynch, D. P. Sandler, and M. C. R. Alavanja, "Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural heath study," *Environmental Health Perspectives*, vol. 118, no. 6, pp. 812–817, 2010.
- [8] C. Fortes, S. Mastroeni, F. Melchi et al., "The association between residential pesticide use and cutaneous melanoma," *European Journal of Cancer*, vol. 43, no. 6, pp. 1066–1075, 2007.
- [9] A. N. Schmidt, L. B. Nanney, A. S. Boyd, L. E. King Jr., and D. L. Ellis, "Oestrogen receptor- $\beta$  expression in melanocytic lesions," *Experimental Dermatology*, vol. 15, no. 12, pp. 971–980, 2006.
- [10] M. Krause, A. Klit, M. Blomberg Jensen et al., "Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters," *International Journal of Andrology*, vol. 35, pp. 424–436, 2012.
- [11] K. Nakagawa, M. J. Lee, N. Sasaki, C. Hayashi, and H. Nishio, "Cadmium exposure induces expression of the HOXB8 gene in COS-7 cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 22, no. 6, pp. 1447–1451, 2008.
- [12] G. E. Piérard and C. Piérard-Franchimont, "HOX gene aberrant expression in skin melanoma: a review," *Journal of Skin Cancer*, vol. 2012, Article ID e707260, 4 pages, 2012.
- [13] P. D. Darbre and P. W. Harvey, "Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 28, no. 5, pp. 561–578, 2008.
- [14] M. G. Soni, I. G. Carabin, and G. A. Burdock, "Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, no. 7, pp. 985–1015, 2005.
- [15] Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, "Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products," *International Journal of Toxicology*, vol. 27, no. 4, pp. 1–82, 2008.
- [16] N. R. Janjua, H. Frederiksen, N. E. Skakkebaek, H. C. Wulf, and A.-M. Andersson, "Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans," *International Journal of Andrology*, vol. 31, no. 2, pp. 118–130, 2008.
- [17] X. Ye, A. M. Bishop, J. A. Reidy, L. L. Needham, and A. M. Calafat, "Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans," *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 12, pp. 1843–1846, 2006.
- [18] C. Lemini, R. Jaimez, M. E. Ávila, Y. Franco, F. Larrea, and A. E. Lemus, "In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 19, no. 2–6, pp. 69–79, 2003.
- [19] D. Pugazhendhi, G. S. Pope, and P. D. Darbre, "Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 25, no. 4, pp. 301–309, 2005.
- [20] R. Golden, J. Gandy, and G. Vollmer, "A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 35, no. 5, pp. 435–458, 2005.
- [21] S. Oishi, "Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 17, no. 1, pp. 31–39, 2002.
- [22] S. Oishi, "Effects of propyl paraben on the male reproductive system," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 40, no. 12, pp. 1807–1813, 2002.
- [23] K.-S. Kang, J.-H. Che, D.-Y. Ryu, T.-W. Kim, G.-X. Li, and Y.-S. Lee, "Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben)," *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 64, no. 3, pp. 227–235, 2002.
- [24] C. Taxvig, A. M. Vinggaard, U. Hass et al., "Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis?" *Toxicological Sciences*, vol. 106, no. 1, pp. 206–213, 2008.
- [25] A. M. Hoberman, D. K. Schreur, T. Leazer et al., "Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats," *Birth Defects Research B*, vol. 83, no. 2, pp. 123–133, 2008.
- [26] T. Okubo, Y. Yokoyama, K. Kano, and I. Kano, "ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER $\alpha$  and PR," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 39, no. 12, pp. 1225–1232, 2001.
- [27] E. Gomez, A. Pillon, H. Fenet et al., "Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks," *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, vol. 68, no. 4, pp. 239–251, 2005.
- [28] O. Handa, S. Kokura, S. Adachi et al., "Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes," *Toxicology*, vol. 227, no. 1–2, pp. 62–72, 2006.
- [29] A. M. Calafat, X. Ye, L.-Y. Wong, A. M. Bishop, and L. L. Needham, "Urinary concentrations of four parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006," *Environmental Health Perspectives*, vol. 118, no. 5, pp. 679–685, 2010.
- [30] J. D. Meeker, D. E. Cantonwine, L. O. Rivera-González et al., "Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico," *Environmental Science & Technology*, vol. 47, pp. 3439–3447, 2013.
- [31] T. Suzuki, S. Kitamura, R. Khota, K. Sugihara, N. Fujimoto, and S. Ohta, "Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 203, no. 1, pp. 9–17, 2005.
- [32] H. Gonzalez, A. Farbro, O. Larkö, and A.-M. Wennberg, "Per-cutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation," *British Journal of Dermatology*, vol. 154, no. 2, pp. 337–340, 2006.
- [33] X. Ye, Z. Kuklenyik, L. L. Needham, and A. M. Calafat, "Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in

- humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 383, no. 4, pp. 638–644, 2005.
- [34] C. Schlecht, H. Klammer, H. Jarry, and W. Wuttke, "Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats," *Toxicology*, vol. 205, no. 1-2, pp. 123–130, 2004.
- [35] M. Schlumpf, B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, and W. Lichtensteiger, "In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens," *Environmental Health Perspectives*, vol. 109, no. 3, pp. 239–244, 2001.
- [36] A. M. Calafat, L.-Y. Wong, X. Ye, J. A. Reidy, and L. L. Needham, "Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: national Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004," *Environmental Health Perspectives*, vol. 116, no. 7, pp. 893–897, 2008.
- [37] L. Casas, M. F. Fernández, S. Llop et al., "Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children," *Environment International*, vol. 37, no. 5, pp. 858–866, 2011.
- [38] Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals Updated Tables, <http://www.cdc.gov/exposurereport/>.
- [39] H. Frederiksen, J. K. Nielsen, T. A. Mørck et al., "Urinary excretion of phthalate metabolites, phenols and parabens in rural and urban Danish mother-child pairs," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 216, pp. 772–783, 2013.
- [40] L. Wang and K. Kannan, "Characteristic profiles of benzophenone-3 and its derivatives in urine of children and adults from the United States and China," *Environmental Science & Technology*, vol. 47, no. 21, pp. 12532–12538, 2013.
- [41] H. Frederiksen, N. Jørgensen, and A.-M. Andersson, "Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)," *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, vol. 21, no. 3, pp. 262–271, 2011.
- [42] C. Philippat, M. Mortamais, C. Chevrier et al., "Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth," *Environmental Health Perspectives*, vol. 120, no. 3, pp. 464–470, 2012.
- [43] S. Shirai, Y. Suzuki, J. Yoshinaga, H. Shiraishi, and Y. Mizumoto, "Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women," *Reproductive Toxicology*, vol. 35, pp. 96–101, 2013.
- [44] R. Tang, M. J. Chen, G. D. Ding et al., "Associations of prenatal exposure to phenols with birth outcomes," *Environmental Pollution*, vol. 178, pp. 115–120, 2013.
- [45] S. Lin, H.-Y. Ku, P.-H. Su et al., "Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan," *Chemosphere*, vol. 82, no. 7, pp. 947–955, 2011.
- [46] K. Becker, T. Göen, M. Seiwert et al., "GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 212, no. 6, pp. 685–692, 2009.
- [47] G. Saravanabhavan, M. Guay, E. Langlois, S. Giroux, J. Murray, and D. Haines, "Biomonitoring of phthalate metabolites in the Canadian population through the Canadian Health Measures Survey (2007–2009)," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 216, pp. 652–661, 2013.
- [48] N. R. Song, J. W. On, J. Lee et al., "Biomonitoring of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites of mother and child pairs in South Korea," *Environment International*, vol. 54, pp. 65–73, 2013.
- [49] National Report on Human Biomonitoring in Mothers and Children—Belgium 2013, <http://www.eu-hbm.info>.
- [50] J. Högberg, A. Hanberg, M. Berglund et al., "Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations," *Environmental Health Perspectives*, vol. 116, no. 3, pp. 334–339, 2008.
- [51] X. Ye, F. H. Pierik, R. Hauser et al., "Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, The Netherlands: the Generation R study," *Environmental Research*, vol. 108, no. 2, pp. 260–267, 2008.
- [52] E. A. Irvin, A. M. Calafat, M. J. Silva et al., "An estimate of phthalate exposure among pregnant women living in Trujillo, Peru," *Chemosphere*, vol. 80, no. 11, pp. 1301–1307, 2010.
- [53] H. Fromme, G. Bolte, H. M. Koch et al., "Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 210, no. 1, pp. 21–33, 2007.
- [54] Y. Suzuki, M. Niwa, J. Yoshinaga, Y. Mizumoto, S. Serizawa, and H. Shiraishi, "Prenatal exposure to phthalate esters and PAHs and birth outcomes," *Environment International*, vol. 36, no. 7, pp. 699–704, 2010.
- [55] T. Berman, R. Goldsmith, T. Göen et al., "Urinary concentrations of environmental contaminants and phytoestrogens in adults in Israel," *Environment International*, vol. 59, pp. 478–484, 2013.
- [56] M. Romero-Franco, R. U. Hernández-Ramírez, A. M. Calafat et al., "Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in Mexican women," *Environment International*, vol. 37, pp. 867–871, 2011.
- [57] F. A. Zeman, C. Boudet, K. Tack et al., "Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 216, pp. 271–279, 2013.
- [58] U. N. Joensen, H. Frederiksen, M. B. Jensen et al., "Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men," *Environmental Health Perspectives*, vol. 120, pp. 1397–1403, 2012.
- [59] Y. Guo, Q. Wu, and K. Kannan, "Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures," *Environment International*, vol. 37, no. 5, pp. 893–898, 2011.
- [60] G. Tranfo, B. Papaleo, L. Caporossi et al., "Urinary metabolite concentrations of phthalate metabolites in Central Italy healthy volunteers determined by a validated HPLC/MS/MS analytical method," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 216, pp. 481–485, 2013.
- [61] M. Wittassek, H. M. Koch, J. Angerer, and T. Brüning, "Assessing exposure to phthalates—the human biomonitoring approach," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 55, no. 1, pp. 7–31, 2011.
- [62] R. Hauser, J. D. Meeker, N. P. Singh et al., "DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites," *Human Reproduction*, vol. 22, no. 3, pp. 688–695, 2007.
- [63] S. H. Swan, K. M. Main, F. Liu et al., "Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 8, pp. 1056–1061, 2005.



- [64] S. M. Engel, A. Miodovnik, R. L. Canfield et al., "Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning," *Environmental Health Perspectives*, vol. 118, no. 4, pp. 565–571, 2010.
- [65] R. W. Stahlhut, E. van Wijngaarden, T. D. Dye, S. Cook, and S. H. Swan, "Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. Males," *Environmental Health Perspectives*, vol. 115, no. 6, pp. 876–882, 2007.
- [66] Direction générale Statistique et Information économique, Belgique. Typologie des communes selon 2 concepts différents : OCDE et EUROSTAT, <http://statbel.fgov.be>.
- [67] E. Samandar, M. J. Silva, J. A. Reidy, L. L. Needham, and A. M. Calafat, "Temporal stability of eight phthalate metabolites and their glucuronide conjugates in human urine," *Environmental Research*, vol. 109, no. 5, pp. 641–646, 2009.
- [68] X. Ye, A. M. Bishop, J. A. Reidy, L. L. Needham, and A. M. Calafat, "Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine," *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, vol. 17, no. 6, pp. 567–572, 2007.
- [69] L. Dewalque, C. Pirard, N. Dubois, and C. Charlier, "Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 949–950, pp. 37–47, 2014.
- [70] R. W. Hornung and L. D. Reed, "Estimation of average concentration in the presence of nondetectable values," *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, vol. 5, no. 1, pp. 46–51, 1990.
- [71] S. B. Heymsfield, C. Arteaga, and C. M. McManus, "Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 37, no. 3, pp. 478–494, 1983.
- [72] R. D. Perrone, N. E. Madias, and A. S. Levey, "Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts," *Clinical Chemistry*, vol. 38, no. 10, pp. 1933–1953, 1992.
- [73] D. B. Barr, L. C. Wilder, S. P. Caudill, A. J. Gonzalez, L. L. Needham, and J. L. Pirkle, "Urinary creatinine concentrations in the U.S. Population: implications for urinary biologic monitoring measurements," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 2, pp. 192–200, 2005.
- [74] D. K. James, P. J. Steer, C. P. Weiner, and B. Gonik :, *High Risk Pregnancy: Management Options*, Elsevier, Philadelphia, Pa, USA, 3rd edition, 2005.
- [75] J. D. Meeker, H. Hu, D. E. Cantonwine et al., "Urinary phthalate metabolites in relation to preterm birth in Mexico City," *Environmental Health Perspectives*, vol. 117, no. 10, pp. 1587–1592, 2009.
- [76] C. Schulz, J. Angerer, U. Ewers, U. Heudorf, and M. Wilhelm, "Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German Environmental Survey on Children 2003–2006 (GerES IV)," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 212, no. 6, pp. 637–647, 2009.
- [77] Environmental Working Group. EWG's Skin Deep Cosmetic Database, <http://www.ewg.org/skindeep/>.
- [78] M. J. Silva, D. B. Barr, J. A. Reidy et al., "Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. Population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2000," *Environmental Health Perspectives*, vol. 112, no. 3, pp. 331–338, 2004.
- [79] ATSDR, "Toxicological profile for di-n-butyl phthalate (DBP)," 2001, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp135.pdf>.
- [80] ATSDR, Toxicological profile for di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), 2002, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>.
- [81] K. Becker, M. Seiwert, J. Angerer et al., "DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 207, no. 5, pp. 409–417, 2004.
- [82] J. J. Adibi, R. M. Whyatt, P. L. Williams et al., "Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples," *Environmental Health Perspectives*, vol. 116, no. 4, pp. 467–473, 2008.
- [83] T. Göen, L. Dobler, J. Koschorreck et al., "Trends of the internal phthalate exposure of young adults in Germany—follow-up of a retrospective human biomonitoring study," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 215, pp. 36–45, 2011.
- [84] M. J. Silva, J. A. Reidy, J. L. Preau Jr., E. Samandar, L. L. Needham, and A. M. Calafat, "Measurement of eight urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment," *Biomarkers*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2006.
- [85] H. Frederiksen, N. Jørgensen, and A.-M. Andersson, "Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 34, no. 7, pp. 400–410, 2010.
- [86] D. Koniecki, R. Wang, R. P. Moody, and J. Zhu, "Phthalates in cosmetic and personal care products: concentrations and possible dermal exposure," *Environmental Research*, vol. 111, no. 3, pp. 329–336, 2011.
- [87] L. Earl Gray Jr., V. S. Wilson, T. Stoker et al., "Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals," *International Journal of Andrology*, vol. 29, no. 1, pp. 96–104, 2006.

### b) Estimation de l'apport quotidien en phtalates

Pour les phtalates, mais ni pour les parabènes ni pour la BP3, on trouve dans la littérature des formules permettant d'évaluer les doses journalières d'exposition sur base des concentrations urinaires. Ces doses journalières d'exposition peuvent alors être comparées aux DJA ou à la dose de référence (RfD) disponibles pour chaque phtalate (EFSA, 2005a, 2005b, 2005c), ce qui permet d'estimer si l'apport quotidien en phtalates est sans risque pour la santé. Bien entendu, ceci suppose que les DJA ont été définies sur base de critères rigoureux, objectifs et scientifiques. Il faut préciser qu'il n'existe pas de consensus sur les valeurs annoncées par l'EFSA. Par exemple, les DJA ont été établies sur base d'études *in vivo* dans lesquelles l'animal a été exposé uniquement par voie orale (EFSA, 2005a, 2005b, 2005c, US EPA, 1993).

Nous avons donc calculé les doses journalières d'exposition sur base des concentrations urinaires des métabolites de phtalates et en utilisant les taux de récupération dans l'urine décrits dans la littérature après administration orale du composé parent (Anderson et al., 2001 ; 2011 ; Seckin et al., 2009 ; Koch et al., 2004, 2005b, 2012 ; Kortenkamp and Faust, 2010). Pour chaque phtalate, un *hazard quotient* (HQ) a été calculé en divisant la dose journalière estimée par la DJA (Koch et al., 2003b, 2007, 2011). Le risque d'effets cumulatifs a été pris en considération pour chaque individu en définissant un *hazard index* (HI) qui est la somme des différents HQ des phtalates partageant les mêmes propriétés toxicologiques anti-androgéniques (Koch et al., 2011). Ainsi, en cas de HI supérieur à l'unité, on peut craindre que le mélange de phtalates auquel on est exposé n'engendre des effets anti-androgéniques significatifs (Koch et al., 2011).

Les résultats de ces calculs et leurs limitations sont discutés dans la Publication 5. Dans cette publication, nous avons également apprécié l'apport de phtalates par voie alimentaire en comparant les doses journalières estimées aux résultats obtenus en Flandre par Sioen et al. (2012) sur base de mesures de la contamination des aliments vendus en Belgique et sur base d'enquêtes relatives aux habitudes de consommation.

Certaines limitations inhérentes à cette mesure du risque méritent d'être mentionnées. Tout d'abord, les taux de récupération urinaire ( $F_{ue}$ ) employés dans le calcul des doses journalières d'exposition n'ont été déterminés que chez un nombre

## **Partie IVb : Estimation de l'apport quotidien en phtalates**

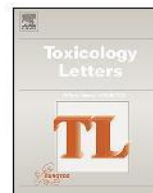
---

limité d'adultes (Anderson et al., 2001 ; 2011 ; Seckin et al., 2009 ; Koch et al., 2004, 2005b, 2012). Les valeurs de  $F_{ue}$  établies chez l'adulte pourraient donc être inexactes pour les enfants. Ensuite, ces  $F_{ue}$  ont été déterminés après administration orale de phtalates et, en conséquence, ne tiennent pas compte de la contamination par les voies dermique et pulmonaire (Wittassek et al., 2011). D'autre part, les doses journalières d'exposition sont évaluées dans ce travail sur base de mesures ponctuelles alors qu'il existe une importante variabilité des concentrations urinaires au cours de la journée (voir Partie IVc) (Fromme et al., 2007b ; Frederiksen et al., 2013a). Finalement, le HI n'a été calculé qu'à partir des niveaux urinaires de trois phtalates alors que la population générale est exposée simultanément à de nombreux composés anti-androgéniques tels que des pesticides, des polychlorobiphényles, du bisphénol A, du triclosan (Luccio-Camelo et Prins, 2011 ; Kortenkamp et Faust, 2010), etc. Certains des composés cités ci-dessus sont d'ailleurs capables de générer des effets synergiques chez l'animal lorsqu'ils sont associés à certains phtalates, alors que le calcul du HI repose sur un modèle cumulatif (Christiansen et al., 2009).

Nonobstant ces réserves, la mesure du risque par calcul du HI permet de qualifier globalement le niveau d'exposition des liégeois aux phtalates et par conséquent, leur toxicité éventuelle.

**Publication 5**

Dewalque L, Charlier C, Pirard C. *Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population.* **Toxicology Letters** 2014 ; 231: 161-168.



# Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population



Lucas Dewalque<sup>a,b,\*</sup>, Corinne Charlier<sup>a,b</sup>, Catherine Pirard<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Clinical, Forensic and Environmental Toxicology, University of Liege (ULg), CHU (B35), Liege 4000, Belgium

<sup>b</sup> Center for Interdisciplinary Research on Medicines (C.I.R.M.), University of Liege (ULg), CHU (B35), Liege 4000, Belgium

## HIGHLIGHTS

- Phthalate daily intakes were estimated for 261 Belgian participants.
- Cumulative risk assessment was performed for 4 phthalates in a Belgian population.
- 13 children out of the 52 were exceeding hazard index of 1.
- The dietary intake seemed to be the major route for DEHP exposure.

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 March 2014

Received in revised form 4 June 2014

Accepted 18 June 2014

Available online 23 June 2014

### Keywords:

Phthalate  
Daily intake  
Urine  
Belgium  
Hazard index

## ABSTRACT

The daily intakes (DI) were estimated in a Belgian general population for 5 phthalates, namely diethyl phthalate (DEP), di-*n*-butyl phthalate (DnBP), di-*iso*-butyl phthalate (DiBP), butylbenzyl phthalate (BBzP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), based on the urinary measurements of their corresponding metabolites. DI values ranged between <LOD and 59.65 µg/kg bw/day depending on the congener, and were globally higher for children than adults. They were compared to acceptable levels of exposure (tolerable daily intakes) to evaluate the hazard quotients (HQ), which highlight an intake above the dose considered as safe for values greater than 1. If very few of our Belgian participants exceeded this threshold for phthalates considered individually, 6.2% of the adults and 25% of the children showed an excessive hazard index (HI) which took into account the cumulative risk of adverse anti-androgenic effects. These results are of concern since these HI were based on only 3 phthalates (DEHP, DiBP and DnBP), and showed a median of 0.55 and 0.29 for children and adults respectively. The comparison with previously determined dietary intakes demonstrated that for DEHP, food intake was nearly the only route of exposure while other pathways occurred mainly for the other studied phthalates.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Diesters of 1,2-benzenedicarboxylic acid, or phthalates, have been highly produced for more than 50 years to be mainly used as plasticizer, especially in polyvinyl chloride (PVC). Phthalates are therefore present in a large range of everyday life products including construction materials, adhesives, toys, food packaging, house furnishing, clothes, medical materials, drugs and personal

care products (Wittassek et al., 2011). Because phthalates can be released from polymers in which they are incorporated, they have been measured in numerous environmental matrices, such as indoor air, house dust, surface water, soils but also in food products and a wide range of cosmetics (Bekö et al., 2013; Chen et al., 2012; Sioen et al., 2012; Fromme et al., 2013a,b; Wittassek et al., 2011). Human exposure can therefore occur through oral, dermal and inhalation pathways.

The increase knowledge of phthalate toxicokinetic have allowed scientists to assess the human exposure measuring specific metabolites in urine, mainly the corresponding monoesters or oxidized monoesters (Wittassek et al., 2011). These phthalate metabolites have been measured worldwide (Frederiksen et al., 2013a; Fromme et al., 2013a; Song et al., 2013; Zota et al., 2014) demonstrating that the general population is largely exposed to

\* Corresponding author at: Laboratory of Clinical, Forensic and Environmental Toxicology, BC+3, CHU (B35), Liege 4000, Belgium. Tel.: +32 4 366 80 95; fax: +32 4 366 88 89.

E-mail addresses: [lucas.dewalque@ulg.ac.be](mailto:lucas.dewalque@ulg.ac.be) (L. Dewalque), [c.charlier@chu.ulg.ac.be](mailto:c.charlier@chu.ulg.ac.be) (C. Charlier), [c.pirard@chu.ulg.ac.be](mailto:c.pirard@chu.ulg.ac.be) (C. Pirard).

these compounds. This biomonitoring approach has relevant advantages, integrating all routes and sources of exposure, and avoiding the external contamination due to the widespread presence of the phthalate diesters in the lab environment (Koch et al., 2011). Nevertheless, the phthalate urinary levels do not provide detailed information concerning exposure pathways. Moreover, the rate of absorption and metabolization might change according to the route of exposure, for instance avoiding first-pass metabolism after dermal resorption. Food consumption has been considered as the most important phthalate exposure pathway, especially for long-chain phthalates such as di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), but recently some studies suggested that other routes might be significantly involved for the short-chain compounds such as diethyl phthalate (DEP), di-*n*-butyl phthalate (DnBP), di-*iso*-butyl phthalate (DiBP) or benzylbutyl phthalate (BBzP) (Wormuth et al., 2006; Fromme et al., 2013a,b; Bekö et al., 2013).

This study presents an estimation of the daily intake (DI) for 5 phthalates in a Belgian general population, based on biomonitoring of their urinary metabolites in 261 participants aged between 1 and 85 years old (Dewalque et al., 2014a). This estimation, representing the total intake, was compared to Belgian dietary intakes estimated by Sioen et al. (2012); in order to explore the sources of phthalate exposure and therefore identify the non-diet contribution.

DnBP, DiBP, BBzP and DEHP are known to exhibit endocrine disrupting properties, especially anti-androgenic effects, inhibiting fetal testosterone synthesis (NRC, 2008; Howdeshell et al., 2008) and leading to impairment in reproductive system development (Gray et al., 2000). Moreover, their exposure has been associated in epidemiological studies with some health outcomes such as reduced anogenital distance (Swan et al., 2005), increase insulin resistance and abdominal obesity (Stahlhut et al., 2007), reduce sperm quality (Hauser et al., 2006, 2007) and neurobehavioral development impairment (Engel et al., 2010; Swan et al., 2010). For public health safety purpose, the European Food Safety Authorities (EFSA) (EFSA, 2005a,b,c) established some tolerable daily intake (TDI) values based on anti-androgenic outcomes in animal models, which aim to represent the phthalate levels of exposure considered as safe over a lifetime for humans. More recently, Kortenkamp and Faust (2010) also developed a reference dose for anti-androgenicity (RfD AA) based on the inhibition of the fetal testosterone synthesis. Risk assessment is commonly carried out by comparing the estimated chemical intakes of individual's to such acceptable level of exposure and, to a large extent is still focusing on single chemical. Nevertheless, since phthalate isomers have been demonstrated to exhibit similar toxicological actions, additive effects should be expected (Howdeshell et al., 2008). In this context, hazard index (HI) was recently introduced in the assessment of the phthalate cumulative risk of exposure (Kortenkamp and Faust, 2010; Koch et al., 2011; Søbørg et al., 2012; Kranich et al., 2014; Benson, 2009). Taking into account the cumulative adverse health effects of several phthalates based on similar toxicological endpoints, this index was evaluated by adding the ratios between DI and reference limits (TDI or RfD AA) for the different compounds. The aims of this study were (1) to estimate, in a Belgian general population, the DI of some phthalates based on their urinary measurement, (2) to investigate the diet contribution to the total exposure, (3) to assess the risk of exposure to phthalates by comparing their intake to well-recognized reference values, (4) to assess the risk of cumulative exposure based on anti-androgenic endpoints to several phthalate compounds and (5) finally to compare the risk assessment results in adults and children. Actually, several studies demonstrated that children are more exposed than adults to these environmental pollutants (Dewalque et al., 2014a; Song et al., 2013; Frederiksen et al., 2013a) consisting in a matter of concern regarding the potential

vulnerability of this sub-population to developmental and endocrine toxicity exerted by phthalates (Gray et al., 2000).

## 2. Material and methods

### 2.1. Study subjects and sampling

The study population and the sampling process were already described elsewhere (Dewalque et al., 2014a). Briefly, informed and consenting subjects provided a spot urine sample and filled in a short questionnaire including data about age, sex, weight, size, smoking habits and residence localization. The study population consisted in 138 females and 123 males living in Liege or in the surrounding areas (Belgium). The participants were between 1 and 85 years old, with average body mass index of 21.9 kg/m<sup>2</sup> and a minority (5.8%) of smokers. Directly after the urine collection carried out in the first trimester of 2013, the samples were aliquoted and frozen at –20 °C until analysis. In this paper, the participants were categorized in 2 groups, the children aged from 1 to 12 years old (*n* = 52) and the adults aged between 13 and 85 years old (*n* = 209).

### 2.2. Urine analysis

The urinary concentrations of 7 phthalate metabolites, namely monoethyl phthalate (MEP), mono-*n*-butyl phthalate (MnBP), mono-*iso*-butyl phthalate (MiBP), monobenzyl phthalate (MBzP), mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate (5-OH-MEHP) and mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate (5-oxo-MEHP), were measured in the spot urine collected from 261 Belgian participants using a solid phase extraction (SPE) and ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MSMS) method previously described (Dewalque et al., 2014b). Briefly, 3 mL of urine previously fortified with the corresponding <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-labeled compounds (excepted for MiBP which was quantified using <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-MnBP), were added to 0.75 mL sodium acetate buffer and 25 μL of a Helix pomatia glucuronidase solution, incubated overnight at 37 °C. Samples were then acidified with 200 μL of formic acid before being loaded on Bond Elut Certify LRC cartridges previously conditioned. After a wash step with 0.5% of acetic acid, target compounds were eluted with acetonitrile, evaporated until dryness at 40 °C under a gentle stream of nitrogen and reconstituted in 70 μL of mobile phases (water and acetonitrile 0.1% acetic acid both) to be injected (5 μL) on UHPLC–MSMS. The whole procedure was validated according to the total error approach, and yielded to limits of detection (LOD) ranging between 0.13 and 0.37 μg/L depending on the phthalate metabolite. The quantification was performed by isotope dilution and the determination of unknown samples was carried out using calibration curves ranging from 0.5 to 200 μg/L. Each sequence included a blank and two levels of home-made internal quality controls (QC) (10 and 100 μg/L). The variations of the measured concentrations were below 6.2% and 7.2% respectively for the low and high-level QC for each target compound.

### 2.3. Daily intake estimation

The estimation of the DI of the phthalate diesters was carried out for each individual using the volumetric model developed by Koch et al. (2003) with the following relation:

$$DI[\mu\gamma/\text{kg bw}/\text{day}] = \frac{UC_m[\mu\gamma/\text{L}] \times UV[\text{L}/\text{day}] \times MW_d[\mu\gamma/\mu\text{mol}]}{F_{UE} \times bw[\text{kg}] \times MW_m[\mu\gamma/\mu\text{mol}]}$$

**Table 1**  
Parameters for the daily intake estimation.

Compounds	Abbreviation	$F_{UE}$ (%)	References
Diethyl phthalate	DEP		By analogy to DnBP
Monoethyl phthalate	MEP	69.0	
Di- <i>n</i> -butyl phthalate	DnBP		Anderson et al., 2001
Mono- <i>n</i> -butyl phthalate	MnBP	69.0	
Di-iso-butyl phthalate	DiBP		Koch et al., 2012
Mono-iso-butyl phthalate	MiBP	70.3	
Benzylbutyl phthalate	BBzP		Anderson et al., 2001
Monobenzyl phthalate	MBzP	73.0	
Di-2-ethylhexyl phthalate	DEHP		Anderson et al., 2011
Mono-2-ethylhexyl phthalate	MEHP	6.2	32.0
Mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate	5-OH-MEHP	14.9	
Mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate	5-oxo-MEHP	10.9	

where  $UC_m$  was the volumetric concentration of the urinary metabolite,  $MW_d$  and  $MW_m$  were the molecular weights of phthalate diesters and metabolites respectively,  $bw$  was the body weight,  $UV$  was the human daily excretion volume of urine and  $F_{UE}$  was the excretion molar fraction.  $UV$  was set to 1.70, 1.60 and 1.65 L/day for respectively men, women, and adolescents (11–16 years old) (Remer et al., 2006; Perucca et al., 2007; Guo et al., 2011). For children,  $UV$  was set at 0.66 L/day (Remer et al., 2006; Aylward et al., 2009; Guo et al., 2011) when aged between 6 and 11 years old, and at 0.0222 L/kg bw/day for younger ones (Fromme et al., 2013b; Bekö et al., 2013).  $F_{UE}$  described the molar ratio between the excreted amount of phthalate metabolites in urine and the oral intake of the parent compound in 24 h. They were previously estimated after oral intake of deuterium or  $^{14}C$ -labeled phthalate diesters in human volunteers (Anderson et al., 2001, 2011; Koch et al., 2012) and their values are gathered in Table 1. Since until now no information concerning DEP metabolism in humans was available, the value initially estimated for DnBP was selected (Søborg et al., 2012; Wittassek et al., 2011). Because the DEHP exposure was monitored through 3 metabolites (MEHP, 5-OH-MEHP and 5-oxo-MEHP), the DI of the parent phthalate was calculated by summing their molar concentrations ( $UC_m/MW_m$ ).

#### 2.4. Cumulative risk assessment – hazard quotient and hazard index

Based on DI estimate, hazard quotients (HQ) were calculated for each participant as follows:

$$HQ = \frac{DI[\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}]}{\text{Reference limit value}[\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}]}$$

The selected reference limit values were the TDI based on impairment of germ cells and spermatozoa concentrations developed for DnBP, BBzP and DEHP by the EFSA (EFSA, 2005a,b,c), and the RfD AA proposed more recently for DnBP, DiBP, DEHP

and BBzP by Kortenkamp and Faust (2010); based on specific and sensitive anti-androgenic endpoints, such as suppression of fetal testosterone production and nipples retention (Table 2). There was no TDI provided by the EFSA for DiBP, but the DnBP value was assigned by analogy (Koch et al., 2011; Søborg et al., 2012).

Cumulative risk assessment was carried out by calculating HI for each participant with their own specific phthalate profile, as the sum of the different HQ based on similar toxicological endpoints (Kortenkamp and Faust, 2010; Bekö et al., 2013; Koch et al., 2011; US EPA, 1989). These HI are different from the “screening hazard index” calculated with reference values based on the most critical or sensitive effects and aimed to identify situations requiring deeper investigations in terms of risk assessment (US EPA, 1989). Since DEP is not regarded as an anti-androgenic compound, it was not included in this assessment (Gray et al., 2000). A HI below 1 indicates a little probability to observed adverse effects from the exposure to several chemicals (Benson, 2009). Values between 1 and 100, show that there is a potential for adverse effect, while values above or equal to 100 highlight a level of exposure reaching the no observed adverse effect limit or the benchmark doses used for the derivation of acceptable tolerance values (Benson, 2009). HI were separately calculated based on both acceptable tolerance values, the EFSA’s TDI and the RfD AA (Kortenkamp and Faust, 2010; EFSA, 2005a,b,c; Bekö et al., 2013; Koch et al., 2011), as follows:

$$HI_{TDI} = HQ_{DnBP\ TDI} + HQ_{DiBP\ TDI} + HQ_{DEHP\ TDI}$$

$$HI_{RfD\ AA} = HQ_{DnBP\ RfD\ AA} + HQ_{DiBP\ RfD\ AA} + HQ_{DEHP\ RfD\ AA} + HQ_{BBzP\ RfD\ AA}$$

#### 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Microsoft’s office excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, CA, USA). The

**Table 2**  
Daily intake estimated for children and adults [ $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ ].

	Children (1–12 years)					Adult (13–85 years)					TDI	RID AA
	Min	5th	50th	95th	Max	Min	5th	50th	95th	Max		
DEP	0.15	0.30	1.47	5.81	7.24	0.08	0.18	1.44	14.76	59.65	–	–
DnBP	0.15	0.47	2.38	7.25	9.15	0.10	0.24	1.29	6.29	10.90	10 <sup>a</sup>	100 <sup>d</sup>
DiBP	0.22	0.48	2.29	8.04	26.11	0.09	0.24	0.88	4.53	26.18	10 <sup>b</sup>	200 <sup>d</sup>
BBzP	0.05	0.09	0.42	1.73	2.07	<LOD	0.03	0.20	1.12	4.50	500 <sup>e</sup>	330 <sup>d</sup>
DEHP	0.50	1.25	3.37	10.63	21.12	0.21	0.39	1.43	6.77	17.51	50 <sup>a</sup>	30 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Based on germ cell development (EFSA, 2005a,b).

<sup>b</sup> Similar to DnBP (Koch et al., 2011; Søborg et al., 2012).

<sup>c</sup> Based on spermatozoa levels (EFSA, 2005c).

<sup>d</sup> Based on the inhibition of the fetal testosterone synthesis (Kortenkamp and Faust, 2010).

<sup>e</sup> Based on nipples retention (Kortenkamp and Faust, 2010).

non parametric Mann–Whitney U or Kruskal–Wallis tests were employed with significance limit set at 0.05. Values below the LOD were replaced by LOD/2 (Dewalque et al., 2014a).

### 3. Results and discussion

The detailed results of the urinary analyses were presented in another paper (Dewalque et al., 2014a). Briefly, phthalate metabolites were detected in all urine samples with the exception of one participant showing MBzP urinary concentration below the LOD. Geometric means were ranged from 2.7 to 37.6  $\mu\text{g/L}$  for the 7 phthalate metabolites measured. Statistically higher urinary levels were found in children for all metabolites excepted for MEP.

DI were calculated for each participant and are detailed for children and adults in Table 2. The highest DI estimated for children corresponded to DEHP intake (median 3.37  $\mu\text{g/kg bw/day}$ ) followed by DnBP (median 2.38  $\mu\text{g/kg bw/day}$ ), DiBP (median 2.29  $\mu\text{g/kg bw/day}$ ), DEP (median 1.47  $\mu\text{g/kg bw/day}$ ) and BBzP (median 0.42  $\mu\text{g/kg bw/day}$ ). Similarly to urinary metabolite levels, DI values were significantly lower for adults compared to children ( $p < 0.01$ ) for DEHP, DnBP, DiBP and BBzP, while no statistical difference was found for DEP ( $p = 0.96$ ). The estimated DI exceeded the EFSA's TDI value of 10  $\mu\text{g/kg bw/day}$  in one adult out of the 261 participants for DnBP, and in 5 adults and 2 children for DiBP. The TDI set for the other phthalates were not exceeded in our population. On the other hand, none of our participants exceeded the RfD AA established by Kortenkamp and Faust (2010) whatever the phthalate congeners. Unlike the other studied phthalates, DEP is not considered as an anti-androgenic compound (Gray et al., 2010). Therefore, it was compared to existing reference values based on growth rate and organ weight changes developed by the US EPA (1993) or the (WHO, 2003). Both reference values, 800  $\mu\text{g/kg bw/day}$  (US EPA, 1993) and 500  $\mu\text{g/kg bw/day}$  (WHO, 2003) were not exceeded in the studied population.

Comparison between the DI obtained from one study to another should be performed with caution because these estimations relied on several assumptions. In this manuscript we used the volumetric model developed by Koch et al. (2003); while other studies based their estimation on creatinine adjusted concentrations (David, 2000; Kohn et al., 2000), although the adjustment for urine dilution according to the creatinine content is still debated (Bekö et al., 2013; Langer et al., 2014; Dewalque et al., 2014a). Moreover, the value of  $F_{\text{UE}}$  employed in the DI relation could differ according to the toxicokinetic study from which they were derived from. For instance, Koch et al. (2004, 2005) determined a  $F_{\text{UE}}$  value for DEHP of 45% for the sum of MEHP,

5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP in a single subject orally exposed to the corresponding isotopic labeled compound, whereas more recently, the study of Anderson et al. (2011) carried out in 20 individuals provided a lower value (32%) for the same metabolites. This means that DI might be underestimated or overestimated depending on the value selected for the estimation. Furthermore, the exposure to DEHP is assessed through the urinary measurement of several excreted metabolites (Fromme et al., 2013b; Koch et al., 2003; Frederiksen et al., 2013a) and one can expect that the estimation of the DEHP DI will depend on the number of metabolites taken into account. In the present study, the DI evaluated using the sum of both oxidized metabolites (5-OH-MEHP and 5-oxo-MEHP), using the sum of both oxidized and the monoester, or using either the 5-OH-MEHP or 5-oxo-MEHP did not show significant differences ( $p = 0.86$ ). Conversely, using the MEHP alone in the DEHP DI calculation provided significantly lower value ( $p = 0.002–0.029$ ), demonstrating that as many metabolites as possible should be included in the DI estimation, and especially the oxidized metabolites.

When comparing with worldwide studies, the DI evaluated for our Belgian adults were globally similar to values observed in a previous Belgian study (Dirtu et al., 2013), but also close to those reported for Danish, Japanese or Taiwanese populations (Kranich et al., 2014; Frederiksen et al., 2013a; Suzuki et al., 2009; Lin et al., 2011). On the other hand, German, Chinese, French and American adults seemed to have higher phthalate intakes (Wittassek et al., 2007a; Guo et al., 2011; Zeman et al., 2013; David, 2000; Kohn et al., 2000; Calafat and McKee, 2006). Focusing on children, the estimated DI were similar than those determined in other European countries (Søeborg et al., 2012; Bekö et al., 2013; Frederiksen et al., 2013a; Koch et al., 2007; Wittassek et al., 2007b; Koch et al., 2011; Fromme et al., 2013a,b), but lower than in some Asian countries (Lin et al., 2011; Kim et al., 2014).

HQ were calculated for DnBP, DiBP, BBzP and DEHP using as acceptable tolerance value, the TDI (EFSA, 2005a,b,c) or the RfD AA (Kortenkamp and Faust, 2010) for each participant, and then summed to obtain HI (Table 3). Using the reference limit value set by the EFSA, HQ evaluated for both DnBP and DiBP contributed to 88% of the combined  $\text{HI}_{\text{TDI}}$  while DEHP contributed only for 12%. Conversely, DEHP was the main contributor of HI (75%), and DnBP and DiBP shared for only 25% using the approach based on the RfD AA. The  $\text{HI}_{\text{TDI}}$  was 3–4 fold higher than  $\text{HI}_{\text{RfD AA}}$  showing that cumulative exposure assessment results are, as expected, very dependent of the reference values taken into account. BBzP was not included in the  $\text{HI}_{\text{TDI}}$  calculation since its TDI is not based on the same toxicological outcomes (Table 2).

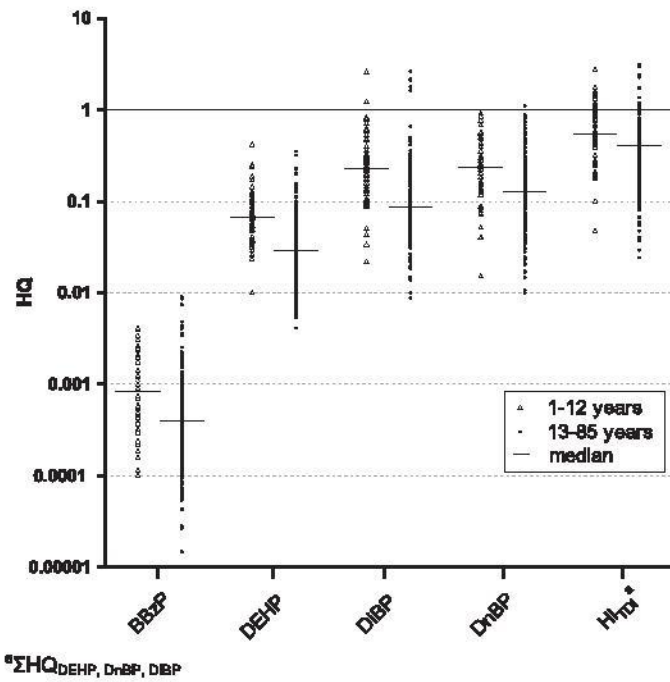
**Table 3**

Hazard quotients (HQ) and hazard indexes (HI) based on TDI (EFSA, 2005a,b,c) and RfD AA (Kortenkamp and Faust, 2010) for children and adults.

Children (1–12 years)	TDI			$N \geq 1$	RfD AA		
	50th	95th	Max		50th	95th	Max
$N = 52$							
HQ DnBP	0.24	0.72	0.91	0	0.02	0.07	0.09
HQ DiBP	0.23	0.80	2.61	2 (3.8%)	0.01	0.04	0.13
HQ BBzP	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.01	0.01
HQ DEHP	0.07	0.21	0.42	0	0.11	0.35	0.70
$\text{HI}^a$	0.55	1.56	2.80	13 (25.0%)	0.16	0.44	0.74
Adults (13–85 years)	TDI			$N \geq 1$	RfD AA		
$N = 209$	50th	95th	Max		50th	95th	Max
HQ DnBP	0.13	0.63	1.09	1 (0.5%)	0.01	0.06	0.11
HQ DiBP	0.09	0.45	2.62	5 (2.4%)	0.02	0.02	0.13
HQ BBzP	0.00	0.00	0.01	0	0.00	0.00	0.01
HQ DEHP	0.03	0.14	0.35	0	0.05	0.23	0.58
$\text{HI}^a$	0.29	1.03	3.12	13 (6.2%)	0.08	0.27	0.67

<sup>a</sup>  $\text{HI}_{\text{TDI}} = \text{HQ}_{\text{DnBP, DiBP, DEHP}}$ ;  $\text{HI}_{\text{RfD AA}} = \text{HQ}_{\text{DnBP, DiBP, DEHP, BBzP}}$





$^a \sum HQ_{DEHP, DnBP, DiBP}$

Fig. 1. Hazard quotients (HQ) and hazard indexes (HI) for children and adults based on EFSA's TDI (EFSA, 2005a,b,c).

Fig. 1 shows the risk for individual phthalate (HQ) and the cumulative risk based on the TDI approach for both adults and children. According to the definition, a HQ value exceeding 1 highlights an intake above the dose considered as acceptable in terms of health risk. Although for individual HQ, very few of our Belgian participants exceeded this threshold considered as safe, 13 out of the 209 adults and 13 out of the 52 children, representing 6.2% and 25% of both subgroups respectively, showed a  $HI_{TDI}$  higher than 1. These results are of concern since the  $HI_{TDI}$  evaluated by summing the HQ of only 3 phthalates (DEHP, DiBP and DnBP) showed a median of 0.55 and 0.29 for children and adults respectively. These high HI values warranted further investigations since several studies suggested that anti-androgenic effects of phthalate exposure on reproductive health could occur at all life stages (Swan et al., 2005; Hauser et al., 2007; Joensen et al., 2012) and because phthalates are not the only anti-androgenic chemicals to which humans are exposed. Actually, some environmental pollutants such as p,p'-DDE, polychlorobiphenyls, vinclozolin, linuron, triclosan, bisphenol A or parabens have been demonstrated to exhibit some anti-androgenic effects and therefore should be included in this cumulative risk assessment (Kortenkamp and Faust, 2010; Luccio-Camelo and Prins, 2011). For instance, the urinary parabens measured in this population (Dewalque et al., 2014a) presented detection rate and levels of the same order of magnitude than the phthalate metabolites. Moreover, similar profiles of exposure have also been reported for triclosan and bisphenol A in a Belgian population (Pirard et al., 2012). Due to the lack of toxicokinetic data concerning parabens, they could not be included up to now in this risk assessment but undoubtedly these environmental pollutants would significantly increase the HI values (Dewalque et al., 2014a; Søbørg et al., 2013).

Our results were consistent with other European studies observing for instance that from 20% to 25% of some German children (Koch et al., 2011; Fromme et al., 2013b) or 30% of children (Bekö et al., 2013) and 15% of children and adolescents living in Denmark (Søbørg et al., 2012) exceeded a  $HI_{TDI}$  of 1. Moreover, our HI values were comparable to those estimated in these studies, with higher values in children (Frederiksen et al.,

2013a; Koch et al., 2011; Søbørg et al., 2012; Bekö et al., 2013) compared to adults (Frederiksen et al., 2013a; Kranich et al., 2014), and higher with the EFSA's TDI approach compared to RfD AA (Kranich et al., 2014; Søbørg et al., 2012). Some authors included di-iso-nonyl phthalate and BBzP intake in the HI calculation, but their contributions were not significant (<1%) (Frederiksen et al., 2013a; Søbørg et al., 2012). On the other hand, Kranich et al. (2014) observed a lower  $HI_{TDI}$  for 33 Danish men, but they did not take into account DiBP in the calculation. To our opinion, although EFSA have not established yet a TDI for DiBP, this phthalate should be included in the cumulative risk assessment since, on the one hand, DiBP and DnBP have been demonstrated to exhibit similar effects because of their structural similarities (Borch et al., 2006; NRC, 2008), and on the other hand, because the DiBP exposure has increased in these last years in Europe (Wittassek et al., 2007a) and North America (Zota et al., 2014) as a substituent for DnBP (Koch et al., 2011).

Food has been reported as an important exposure pathway for phthalates for the general population (Wormuth et al., 2006). Therefore, we tried to assess the contribution of food intake in the total DI determined in the present work by comparing our DI to the phthalate dietary intakes recently reported for a Belgian population (Sioen et al., 2012). In their study, the authors linked food consumption data obtained in children (2.5–6.5 years old) and adults (>15 years old) from Flanders (the Dutch speaking part of Belgium) to the concentrations of 8 phthalates measured in different food product groups purchased in several Belgian markets in order to assess the long-term dietary exposure (Sioen et al., 2012). The reported median dietary intakes based on a probabilistic scenario, considering food preparation and with values below LOQ set to  $\frac{1}{2}$  LOQ, were compared to our estimated DI and are presented in Fig. 2 for children and adults separately. The contribution of food to the total intake seemed to not differ between children and adults. The dietary intake of DEHP estimated by Sioen et al. (2012) was roughly comparable to the DI determined in the present work, suggesting that the main route of exposure for this phthalate would be the dietary ingestion of contaminated foodstuff. These findings are widely contrasted with the results obtained for the other phthalates for which the major exposure seemed to occur through other pathways than food consumption. The different routes of exposure for DEHP compared to other congeners were already raised by Fromme et al. (2007a, 2013a) who analyzed duplicate diet and urine samples over seven days in German adults and infants, and by Koch et al. (2006) who reported an important decrease of DEHP urinary concentrations after a 48 h food privation, the levels of MiBP, MnBP and BBzP being not so influenced. Recently, Bekö et al. (2013) showed that indoor air and house dust might be a significant source of exposure to DEP, DnBP and DiBP for children. Furthermore, DEP and DnBP were demonstrated to cross the epidermis, suggesting that exposure might also occur after personal care products application (Janjua et al., 2008). On the other hand, our findings did not support Wormuth results (Wormuth et al., 2006), who concluded that food would contribute to at least a half of DnBP and DiBP exposure for children. Nevertheless, conclusion should be drawn with caution since these comparisons have several limitations: our assessment of the dietary intake contribution to the total exposure was based on results from different studies conducted at different time periods while temporal changes in phthalate metabolite concentrations have already been observed (Wittassek et al., 2007a; Zota et al., 2014). Moreover, both Belgian studies were not carried out in the same geographic localizations, and therefore the comparison laid on the assumption that food consumption habits and food contamination were not different between both populations.

This study of cumulative risk assessment has some weaknesses. Firstly, DI were estimated with  $F_{UE}$  derived from studies based on a

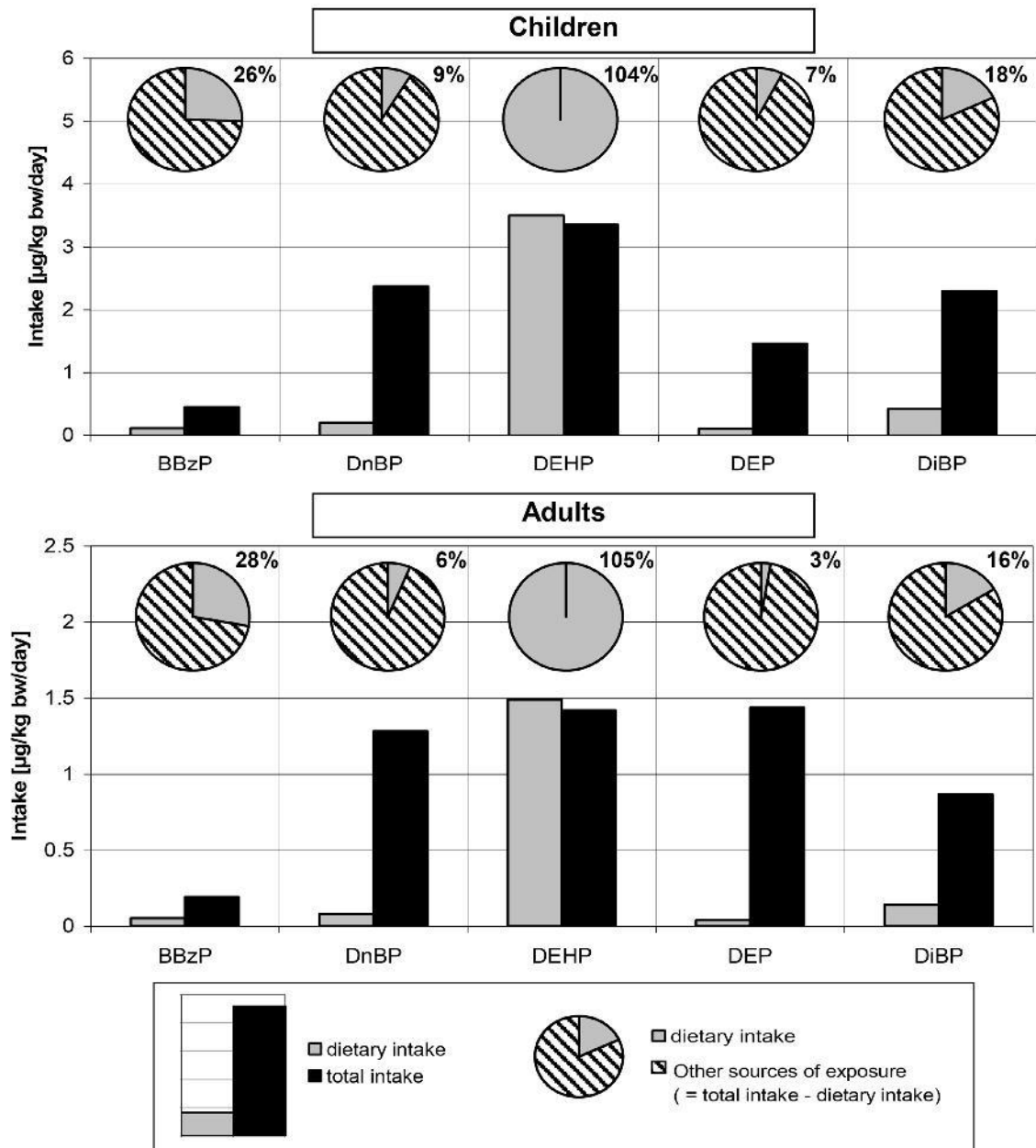


Fig. 2. Comparison between total daily intake estimated in the present study and median dietary intake previously reported (Sioen et al., 2012) for a Belgian population.

limited number of adult volunteers after an oral intake of isotopic labeled compounds (Koch et al., 2012; Anderson et al., 2001, 2011) and were maybe not appropriate for children. Secondly, the TDI and RfD AA determinations were based on animals exposed by gavage (EFSA, 2005a,b,c; Kortenkamp and Faust, 2010) and therefore did not take into account other routes of exposure. As demonstrated in the present work, if the oral ingestion of contaminated food would be a major route of exposure for DEHP, the intake of the other phthalates seemed to occur through other pathways. Therefore, after dermal or inhalation absorption, phthalates could avoid first-pass metabolism leading to a higher unmetabolized fraction available to physiological targets (Wittassek et al., 2011). Finally, the estimation of DI was based on urinary levels measured in spot urine samples and extrapolated to a daily excretion with an estimated urine volume excreted daily. This also implied that these spot samples were considered as representative in terms of daily phthalate levels excreted while more and more studies highlighted the within-person variability of the urinary

levels for these compounds (Fromme et al., 2007b; Frederiksen et al., 2013b). 24 h urine samples might be more appropriate but this collection is hard to implement in large-scale studies on the general population, especially for young children. Moreover, this sampling will not balance the day-to-day variability usually observed. Nevertheless, some works demonstrated that urine spot samples were appropriate to reflect the average exposure levels of a large-scale population, but the upper bound values should be handled with caution (Christensen et al., 2012; Aylward et al., 2012). This involves to interpret the risk assessment results at the scale of the population and not of the individual (Fromme et al., 2013b; Christensen et al., 2012; Kranich et al., 2014).

#### 4. Conclusion

In this study we assessed the DI of 5 phthalates in a Belgian population based on the urinary measurement of their metabolites. The subsequent HQ were evaluated for each participant by

comparing the DI obtained for DiBP, DnBP, BBzP and DEHP to some acceptable tolerance values based on anti-androgenic effects established by the EFSA (TDI) or Kortenkamp and Faust (2010). If very few participants exceeded the individual TDI for each phthalate, 25% of the children showed a HI, representing the cumulative risk for the anti-androgenic studied phthalates, above the threshold corresponding to an exposure considered as safe over a lifetime. This finding, based on the assumption of additive anti-androgenic effects of phthalates, laid on the estimation of the exposure for only 3 phthalates for which sufficient toxicokinetic data were available. Since the risk assessment presented in this paper is focusing on only a single chemical class of compounds and considering that other environmental pollutants such as bisphenol A or parabens are also known to exhibit some anti-androgenic properties, these results are alarming. Therefore, larger biomonitoring studies including pertinent biomarkers of exposure of other anti-androgenic compounds should be performed. On the other hand, the dietary intakes reported in a previous study conducted in Belgium were compared to the total DI estimated in this work. DEHP would be the only phthalate congener studied for which the main contributor to the daily exposure would be the ingestion of food. For all other congeners, dietary intake seemed to be a minor pathway of exposure, suggesting that other routes should occur. These findings warranted further investigations on the human exposure pathways to phthalates, which could help to specifically target and reduce the intake of these chemicals.

### Conflict of interest

No conflict of interest was declared.

### Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

### Acknowledgements

The authors greatly thank each participant of this study for their cooperation.

### References

- Anderson, W.A., Castle, L., Scotter, M.J., Massey, R.C., Springall, C., 2001. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit. Contam.* 18, 1068–1074.
- Anderson, W.A., Castle, L., Hird, S., Jeffery, J., Scotter, M.J., 2011. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2022–2029.
- Aylward, L.L., Hays, S.M., Gagné, M., Krishnan, K., 2009. Derivation of biomonitoring equivalents for di(2-ethylhexyl)phthalate (CAS no. 117-81-7). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 55, 249–258.
- Aylward, L.L., Kirman, C.R., Adgate, J.L., McKenzie, L.M., Hays, S.M., 2012. Interpreting variability in population biomonitoring data: role of elimination kinetics. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 398–408.
- Bekö, G., Weschler, C.J., Langer, S., Callesen, M., Toftum, J., Clausen, G., 2013. Children's phthalate intakes and resultant cumulative exposures estimated from urine compared with estimates from dust ingestion, inhalation and dermal absorption in their homes and daycare centers. *PLoS One* 8, e62442.
- Benson, R., 2009. 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.* 53, 90–101.
- Borch, J., Axelstad, M., Vinggaard, A.M., Dalgaard, M., 2006. Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-*n*-butyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicol. Lett.* 163, 183–190.
- Calafat, A.M., McKee, R.H., 2006. Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate] as a case study. *Environ. Health Perspect.* 114, 1783–1789.
- Chen, L., Zhao, Y., Li, L., Chen, B., Zhang, Y., 2012. Exposure assessment of phthalates in non-occupational populations in China. *Sci. Total Environ.* 427–428, 60–69.
- Christensen, K.L., Lorber, M., Koch, H.M., Kolossa-Gehring, M., Morgan, M.K., 2012. Population variability of phthalate metabolites and bisphenol A concentrations in spot urine samples versus 24- or 48-h collections. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 632–640.
- David, R.M., 2000. Exposure to phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* 108, A440.
- Dewalque, L., Pirard, C., Dubois, N., Charlier, C., 2014a. Measurement of urinary biomarkers of parabens, benzophenone-3 and phthalates in a Belgian population. *Biomed. Res. Int.* ID 649314.
- Dewalque, L., Pirard, C., Dubois, N., Charlier, C., 2014b. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 949–950, 37–47.
- Dirtu, A.C., Geens, T., Dirinck, E., Malarvannan, G., Neels, H., Van Gaal, L., Jorens, P.G., Covaci, A., 2013. Phthalate metabolites in obese individuals undergoing weight loss: urinary levels and estimation of the phthalates daily intake. *Environ. Int.* 59, 344–353.
- Engel, S.M., Miodovnik, A., Canfield, R.L., Zhu, C., Silva, M.J., Calafat, A.M., Wolff, M.S., 2010. Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning. *Environ. Health Perspect.* 118, 565–571.
- European Food Safety Authorities, 2005a. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 243, 1–20.
- European Food Safety Authorities, 2005b. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and material in contact with food (AFC) on a request from the commission related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 242, 1–17.
- European Food Safety Authorities, 2005c. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to butylbenzylphthalate (BBP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 241, 1–14.
- Frederiksen, H., Nielsen, J.K., Mørck, T.A., Hansen, P.W., Jensen, J.F., Nielsen, O., Andersson, A.M., Knudsen, L.E., 2013a. Urinary excretion of phthalate metabolites, phenols and parabens in rural and urban Danish mother-child pairs. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 772–783.
- Frederiksen, H., Kranich, S.K., Jørgensen, N., Taboureau, O., Petersen, J.H., Andersson, A.M., 2013b. Temporal variability in urinary phthalate metabolite excretion based on spot, morning, and 24-h urine samples: considerations for epidemiological studies. *Environ. Sci. Technol.* 47, 958–967.
- Fromme, H., Gruber, L., Schlummer, M., Wolz, G., Böhmer, S., Angerer, J., Mayer, R., Liebl, B., Bolte, G., 2007a. Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environ. Int.* 33, 1012–1020.
- Fromme, H., Bolte, G., Koch, H.M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R., Liebl, B., 2007b. Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 21–33.
- Fromme, H., Gruber, L., Schuster, R., Schlummer, M., Kiranoglu, M., Bolte, G., Völkel, W., 2013a. Phthalate and di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) intake by German infants based on the results of a duplicate diet study and biomonitoring data (INES 2). *Food Chem. Toxicol.* 53, 272–280.
- Fromme, H., Lahrz, T., Kraft, M., Fembacher, L., Dietrich, S., Sievering, S., Burghardt, R., Schuster, R., Bolte, G., Völkel, W., 2013b. Phthalates in German daycare centers: occurrence in air and dust and the excretion of their metabolites by children (LUPE 3). *Environ. Int.* 61, 64–72.
- Gray Jr., L.E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., 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. *Toxicol. Sci.* 58, 350–365.
- Guo, Y., Wu, Q., Kannan, K., 2011. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environ. Int.* 37, 893–898.
- Hauser, R., Meeker, J.D., Duty, S., Silva, M.J., Calafat, A.M., 2006. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* 17, 682–691.
- Hauser, R., Meeker, J.D., Singh, N.P., Silva, M.J., Ryan, L., Duty, S., Calafat, A.M., 2007. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum. Reprod.* 22, 688–695.
- Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., Gray Jr., 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.
- Janjua, N.R., Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E., Wulf, H.C., Andersson, A.M., 2008. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int. J. Androl.* 31, 118–130.
- Joensen, U.N., Frederiksen, H., Jensen, M.B., Lauritsen, M.P., Olesen, I.A., Lassen, T.H., Andersson, A.M., Jørgensen, N., 2012. Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men. *Environ. Health Perspect.* 120, 1397–1403.
- Kim, S., Kang, S., Lee, G., Lee, S., Jo, A., Kwak, K., Kim, D., Koh, D., Kho, Y.L., Kim, S., Choi, K., 2014. Urinary phthalate metabolites among elementary school children of Korea: sources, risks, and their association with oxidative stress marker. *Sci. Total Environ.* 472, 49–55.
- Koch, H.M., Drexler, H., Angerer, J., 2003. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 77–83.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., Angerer, J., 2004. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 78, 123–130.

- Koch, H.M., Bolt, H.M., Preuss, R., Angerer, J., 2005. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 79, 367–376.
- Koch, H.M., Müller, J., Wittassek, M., Angerer, J., 2006. Influence of Alimentary Abstinence on Body Burden to Phthalates, Poster presented at ISEE/ISEA Conference September 2006, Paris.
- Koch, H.M., Becker, K., Wittassek, M., Seiwert, M., Angerer, J., Kolossa-Gehring, M., 2007. Di-*n*-butylphthalate and butylbenzylphthalate – urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German Environmental Survey on children. *J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol.* 17, 378–387.
- Koch, H.M., Wittassek, M., Brüning, T., Angerer, J., Heudorf, U., 2011. Exposure to phthalates in 5–6 years old primary school starters in Germany – a human biomonitoring study and a cumulative risk assessment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 188–195.
- Koch, H.M., Christensen, K.L., Harth, V., Lorber, M., Brüning, T., 2012. Di-*n*-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP) metabolism in a human volunteer after single oral doses. *Arch. Toxicol.* 86, 1829–1839.
- Kohn, M.C., Parham, F., Masten, S.A., Portier, C.J., Shelby, M.D., Brock, J.W., Needham, L.L., 2000. Human exposure estimates for phthalates. *Environ. Health Perspect.* 108, A440–A442.
- Kortenkamp, A., Faust, M., 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. *Int. J. Androl.* 33, 463–474.
- Kranich, S.K., Frederiksen, H., Andersson, A.M., Jørgensen, N., 2014. Estimated daily intake and hazard quotients and indices of phthalate diesters for young danish men. *Environ. Sci. Technol.* 48, 706–712.
- Langer, S., Bekö, G., Weschler, C.J., Brive, L.M., Toftum, J., Callesen, M., Clausen, G., 2014. Phthalate metabolites in urine samples from Danish children and correlations with phthalates in dust samples from their homes and daycare centers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 78–87.
- Lin, S., Ku, H.Y., Su, P.H., Chen, J.W., Huang, P.C., Angerer, J., Wang, S.L., 2011. Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan. *Chemosphere* 82, 947–955.
- Luccio-Camelo, D.C., Prins, G.S., 2011. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 74–82.
- National Research Council, 2008. Phthalates and cumulative risk assessment. The Tasks Ahead. The National Academies Press, Washington, DC.
- Perucca, J., Bouby, N., Valeix, P., Bankir, L., 2007. Sex difference in urine concentration across differing ages, sodium intake, and level of kidney disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R700–R705.
- Pirard, C., Sagot, C., Deville, M., Dubois, N., Charlier, C., 2012. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ. Int.* 48, 78–83.
- Reimer, T., Fonteyn, N., Alexy, U., Berkemeyer, S., 2006. Longitudinal examination of 24-h urinary iodine excretion in schoolchildren as a sensitive, hydration status-independent research tool for studying iodine status. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 639–646.
- Sioen, I., Fierens, T., Van Holderbeke, M., Geerts, L., Bellemans, M., De Maeyer, M., Servaes, K., Vanermen, G., Boon, P.E., De Henauw, S., 2012. Phthalates dietary exposure and food sources for Belgian preschool children and adults. *Environ. Int.* 48, 102–108.
- Søeborg, T., Frederiksen, H., Andersson, A.M., 2012. Cumulative risk assessment of phthalate exposure of Danish children and adolescents using the hazard index approach. *Int. J. Androl.* 35, 245–252.
- Søeborg, T., Frederiksen, H., Andersson, A.M., 2013. Considerations for estimating daily intake values of non-persistent environmental endocrine disruptors based on urinary biomonitoring data. *Reproduction* 147, 455–463.
- Song, N.R., On, J.W., Lee, J., Park, J.D., Kwon, H.J., Yoon, H.J., Pyo, H., 2013. Biomonitoring of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites of mother and child pairs in South Korea. *Environ. Int.* 54, 65–73.
- Stahlhut, R.W., Van Wijngaarden, E., Dye, T.D., Cook, S., Swan, S.H., 2007. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult US males. *Environ. Health Perspect.* 115, 876–882.
- Suzuki, Y., Niwa, M., Yoshinaga, J., Watanabe, C., Mizumoto, Y., Serizawa, S., Shiraishi, H., 2009. Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. *Environ. Health Prev. Med.* 14, 180–187.
- Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Tennant, C.L., Sullivan, S., Teague, J.L., 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.* 113, 1056–1061.
- Swan, S.H., Liu, F., Hines, M., Kruse, R.L., Wang, C., Redmon, J.B., Sparks, A., Weiss, B., 2010. Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys. *Int. J. Androl.* 33, 259–269.
- US Environmental Protection Agency, 1989. Risk assessment guidance for superfund; volume I – human health evaluation manual. (Part A) EPA/540/1-89/002. Office of Emergency and Remedial Response. U.S. Environmental Protection Agency, Washington.
- US Environmental Protection Agency, 1993. Integrated risk information system (IRIS). Diethyl Phthalate (CASRN 84-66-2). National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC, USA. (access 29.01.14) <http://www.epa.gov/iris/>.
- Wittassek, M., Wiesmüller, G.A., Koch, H.M., Eckard, R., Dobler, L., Müller, J., Angerer, J., Schlüter, C., 2007a. Internal phthalate exposure over the last two decades – a retrospective human biomonitoring study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 319–333.
- Wittassek, M., Heger, W., Koch, H.M., Becker, K., Angerer, J., Kolossa-Gehring, M., 2007b. Daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children – a comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 35–42.
- Wittassek, M., Koch, H.M., Angerer, J., Brüning, T., 2011. Assessing exposure to phthalates – the human biomonitoring approach. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 31–37.
- World Health Organization, Diethyl phthalate. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Concise International Chemical Assessment Document 52. <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad52.pdf>, 2003 (access 29.01.14).
- Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M., Hungerbühler, K., 2006. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal.* 26, 803–824.
- Zeman, F.A., Boudet, C., Tack, K., Floch Barneaud, A., Brochot, C., Péry, A.R., Oleko, A., Vandentorren, S., 2013. Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 271–279.
- Zota, A.R., Calafat, A.M., Woodruff, T.J., 2014. Temporal trends in phthalate exposures: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2010. *Environ. Health Perspect.* 122, 235–241.

### c) Chrono-variabilité de l'exposition

Puisque les parabènes, la BP3 et les phtalates sont des PE rapidement éliminés de l'organisme (Ye et al., 2005b ; Wittassek et al., 2011 ; Janjua et al., 2008b), et que ces substances chimiques sont présentes, pour la plupart d'entre elles, dans plus de 70% des échantillons urinaires analysés, on peut légitimement se poser la question du caractère constant ou variable dans le temps de l'exposition. L'évaluation de celle-ci par l'analyse d'un prélèvement urinaire ponctuel est-elle donc pertinente ?

Plusieurs équipes ont essayé d'apporter une réponse à cette question en évaluant la chrono-variabilité d'élimination de ces PE (Hauser et al., 2004 ; Smith et al., 2012 ; Teitelbaum et al., 2008 ; Frederiksen et al., 2013a ; Fromme et al., 2007b ; Koch et al., 2014, Suzuki et al., 2009 ; Hoppin et al., 2002 ; Marcus et al., 2010 ; Preau et al., 2010 ; Baird et al., 2010). La majorité de ces études ont été réalisées aux États-Unis (Hauser et al., 2004 ; Smith et al., 2012 ; Teitelbaum et al., 2008 ; Hoppin et al., 2002 ; Marcus et al., 2010 ; Preau et al., 2010 ; Baird et al., 2010) et peu de données sont disponibles dans l'Union européenne (Frederiksen et al., 2013a ; Fromme et al., 2007b ; Koch et al., 2014). Sachant que les niveaux d'imprégnation peuvent fortement varier d'un pays à l'autre et que les sources et les voies d'exposition peuvent également différer selon les régions (Suzuki et al., 2009 ; Braun et al., 2012 ; Shirai et al., 2013 ; Frederiksen et al., 2010), nous pensons qu'il est capital d'apprécier la chrono-variabilité des biomarqueurs étudiés dans notre région. Il est probable que la variabilité intra-individuelle dépende du groupe étudié (pays, enfants, femmes enceintes, travailleurs exposés, etc).

Pour étudier cette chrono-variabilité, nous avons réalisé le dosage urinaire des PE sur des prélèvements récoltés à différents temps (chaque jour de J1 à J7 puis une fois par mois de M1 à M4) chez 32 participants issus de notre étude en population liégeoise et âgés de 20 à 73 ans.

Jusqu'ici, en Belgique, la chrono-variabilité d'élimination urinaire des parabènes et de la BP3 avait été étudiée sur une période de six jours (Koch et al., 2014) et rien n'avait été publié sur les phtalates. La reproductibilité des niveaux urinaires des différents biomarqueurs d'exposition a été évaluée par le calcul des coefficients de

## **Partie IVc : Chrono-variabilité de l'exposition**

---

corrélations intra-classes (ICC). Ceux-ci sont des outils numériques, facilement comparables entre eux, qui représentent la proportion de la variabilité totale expliquée par la variabilité entre les individus (Rosner et al., 2011). Nous avons également étudié la capacité d'une mesure urinaire ponctuelle à prédire correctement le niveau d'exposition d'un individu (faible, moyen ou élevé). Au total, ce travail (Publication 6) constitue la première étude belge relative à la variabilité à long terme des concentrations urinaires des PE étudiés. Nous y avons également comparé les ICCs obtenus dans cette étude avec ceux retrouvés dans la littérature. Aucune différence n'a pu être clairement mise en évidence lorsque les ICCs ont été catégorisés selon différentes variables comme le sexe, le pays d'origine, l'année de récolte des échantillons, la durée de l'étude et les gammes de niveaux d'exposition. Ce type de comparaison reste néanmoins limité par le faible nombre d'études disponibles à l'heure actuelle.

**Publication 6**

DEWALQUE L, PIRARD C, VANDEPAER S, CHARLIER C. *Temporal variability of urinary concentrations of phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in a Belgian adult population.* **Environmental Research** 2015 ; 142 : 414-423.



## Temporal variability of urinary concentrations of phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in a Belgian adult population



Lucas Dewalque<sup>a,b,\*</sup>, Catherine Pirard<sup>a,b</sup>, Sarah Vandepaer<sup>c</sup>, Corinne Charlier<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Clinical, Forensic and Environmental Toxicology, University of Liege (ULg), CHU (B35), B-4000 Liege, Belgium

<sup>b</sup> Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liege (ULg), CHU (B35), B-4000 Liege, Belgium

<sup>c</sup> Plateforme Technologique de Support en Méthodologie et Calcul Statistique, Catholic University of Louvain (UCL), B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 April 2015

Received in revised form

25 June 2015

Accepted 21 July 2015

#### Keywords:

Phthalates

Parabens

Benzophenone-3

Intra-individual variability

Urinary spot samples

### ABSTRACT

In the present study, we investigated the temporal within-person variability of the exposure biomarker for phthalates, parabens and benzophenone-3 (BP3) in 32 Belgian adults, each providing 11 urine spots during 4 months. We calculated the intraclass coefficient correlation (ICC), the sensitivity and the specificity to assess the temporal reproducibility and to investigate the predictive ability of the spot measurements for these classes of chemicals. Additionally, we explored the temporal variability of the estimation of the cumulative risk of exposure to phthalates (hazard index; HI). We observed fair ICC ranging from 0.55 to 0.68 for parabens, monoethyl phthalate (MEP), mono-iso-butyl phthalate (MiBP) and BP3, but lower ICC, from 0.20 to 0.49, for monobenzyl phthalate (MBzP), mono-n-butyl phthalate (MnBP), mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), mono-2-ethyl-5-oxo-hexyl phthalate (5-oxo-MEHP) and mono-2-ethyl-5-hydroxy-hexyl phthalate (5-OH-MEHP). The ICC estimated for HI (0.49) reflected a moderate reproducibility. The measurements in spot samples were moderate to good predictor of the 4-month level of exposure for parabens, MEP, MnBP, MiBP, BP3 and HI (sensitivity ranging from 0.67 to 0.77), but lower predictor for MEHP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP and MBzP (sensitivity ranging from 0.58 to 0.63). The sensitivity could be increased when several spot urinary levels were averaged to predict the long-term level of exposure. Globally, our results indicate that a single spot measurement seems to correctly represent the long-term exposure for parabens, BP3, MEP, MiBP and HI. Additional spot samples seemed to be needed for the proper exposure assessment of the other target compounds.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Phthalates are used as plasticizers and solvents in numerous daily life items, such as food contact materials, clothes, toys, construction materials, personal care products (PCP), medical and pharmaceutical products. Since phthalates are not chemically bound to polymers in which they are included, e.g. PVC, they could be released in the environment. Consequently, humans are ubiquitously exposed through inhalation, oral or dermal pathways (Wittassek et al., 2011). Once absorbed, phthalate diesters are rapidly metabolized to the corresponding monoesters and oxidized-monoesters, and are then eliminated in the urine (Anderson et al., 2001). Therefore, the human exposure assessment is commonly performed by measuring the phthalate metabolite concentrations

in the urine (Wittassek et al., 2011; Anderson et al., 2001). Several phthalates are known to be endocrine-disrupting chemicals (Howdeshell et al., 2008). Through the wide spectrum of phthalate effects, the toxicity of these compounds on male offspring has currently received the most attention (Wittassek et al., 2011; Howdeshell et al., 2008). Several phthalates have been demonstrated to act in male laboratory animals as anti-androgenic compounds through the inhibition of the fetal testosterone synthesis during the development stage. They could therefore induce genital malformations, low sperm quality and signs of feminization, constituting the phthalate syndrome (Howdeshell et al., 2008). Consistently, human phthalate exposure has already been associated with several pathologies, such as the reduction of the anogenital distance (Swan et al., 2005) or the reduction of sperm quality (Hauser et al., 2007).

Similarly to phthalates, parabens can be found in PCP, but also in foods and pharmaceutical products. Parabens are employed for their antimicrobial properties in a large range of consumer products (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2008). They also

\* Corresponding author at: Laboratory of Clinical, Forensic and Environmental Toxicology, University of Liege (ULg), CHU (B35), B-4000 Liege, Belgium. Fax: +32 4 366 88 89.

E-mail address: [lucas.dewalque@chu.ulg.ac.be](mailto:lucas.dewalque@chu.ulg.ac.be) (L. Dewalque).



present some endocrine-disrupting properties acting as weak estrogenic and anti-androgenic compounds, but up to now contradictory results have been reported (Darbre and Harvey, 2008; Hoberman et al., 2008). It is widely suspected that humans are mainly exposed through the dermal pathway after skin application of PCP (Darbre and Harvey, 2008). After crossing the skin barrier, parabens are degraded by esterases into unspecific metabolites and eliminated in the urine (Darbre and Harvey, 2008). However, a small fraction is also eliminated as unchanged species and can be monitored to quantify the individual exposure (Ma et al., 2013).

BP3 is a UV-filter mainly used in sunscreens, but also in polymers and packaging to protect their content from the UV rays (Gonzalez et al., 2006). BP3 is known to exhibit weak estrogenic properties *in vitro* (Schlumpf et al., 2001). Similarly to parabens, the BP3 exposure mainly occurs through the skin (Gonzalez et al., 2006), and is partly metabolized. The different metabolites are eliminated in urine concomitantly with the unchanged compound, which therefore could be measured to assess the individual exposure (Gonzalez et al., 2006).

Phthalates, parabens and BP3 are three chemical classes of non-persistent endocrine-disrupting pollutants eliminated from the human body within a day (Anderson et al., 2001; Ma et al., 2013; Gonzalez et al., 2006). However, since human exposure occurs daily, the question of the temporal representativeness of the urinary biomarker measurements could be raised (Dewalque et al., 2014a). To provide an answer, several studies have been carried out to assess the within-person variability of phthalates, parabens and BP3 biomarkers (Hauser et al., 2004; Smith et al., 2012; Teitelbaum et al., 2008; Frederiksen et al., 2013; Koch et al., 2014; Fromme et al., 2007). However, to our knowledge, only a few studies were performed in European countries (Frederiksen et al., 2013; Koch et al., 2014; Fromme et al., 2007). After more than 10 years of experience in human biomonitoring of phthalates, parabens and BP3, levels as well as patterns of exposure observed differ from one country or specific group of individuals to another according to local specific habits or commercial applications (Suzuki et al., 2009; Frederiksen et al., 2010; Shirai et al., 2013; Braun et al., 2012). Consequently, it cannot be assumed that the within-person variability of these urinary biomarkers will be similar in different targeted populations.

For these reasons, we present here the results of a within-person variability study carried out on the urine of 32 Belgian adults over a 4-month period. The target compounds were 7 phthalate metabolites and 4 parabens, namely monoethyl phthalate (MEP), mono-n-butyl phthalate (MnBP), mono-iso-butyl phthalate (MiBP), monobenzyl phthalate (MBzP), mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), mono-2-ethyl-5-oxo-hexyl phthalate (5-oxo-MEHP), mono-2-ethyl-5-hydroxy-hexyl phthalate (5-OH-MEHP), methylparaben (MP), ethylparaben (EP), n-propylparaben (PP) and n-butylparaben (BP), and also BP3. The aims of this work were, firstly, to investigate the temporal reproducibility of their urinary concentrations to evaluate whether the observed concentrations remained consistent through time or were highly dependent on day-to-day habits. Secondly, we compared the urinary biomarker variability occurring within a week and over months. Thirdly, we investigated the level of confidence which can be attributed to the predictive ability of one or several spot samples to classify the long-term exposure into low, medium, high and very-high levels. Finally, we used the results of this study to evaluate the variability of the estimated hazard index (HI) which commonly quantifies the risk of cumulative exposure of several phthalates exerting similar toxicity (Benson, 2009; Dewalque et al., 2014b). The purpose was to evaluate if HI could reasonably be used to identify individuals with an increased risk of cumulative exposure over time.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study population and sampling protocol

32 Belgian adults from the general population participating to the previous study (Dewalque et al., 2014a) were asked to provide 11 spot urine samples, collected in polypropylene cups, during 4 months between February and July 2013. The sampling was performed in two phases: firstly, single spot voids were randomly collected each day during a week and were named from D1 to D7. Secondly, from day 30, spots were collected monthly (M1–M4) with a mean interval ( $\pm$  SD) of 30.2 ( $\pm$  1.7) days. The timing in urine collection was not taken into consideration. Samples were kept at 5 °C before being shipped within 24 h to the laboratory. Spots were then aliquoted and stored at –20 °C until they were analyzed. The volunteers consisted in 12 males and 20 females aged between 20 and 73 years (mean: 37.7 years; median: 35 years). This study was approved by the Hospital Faculty Ethics Committee of the University of Liege (Belgium).

### 2.2. Urine analysis

The urinary creatinine content was immediately measured using Architect kits (Abbott, Illinois, USA) before the aliquoting and storage. The samples were analyzed for 12 biomarkers of exposure, namely MEP (metabolite of diethyl phthalate; DEP), MnBP (metabolite of di-n-butyl phthalate; DnBP), MiBP (metabolite of di-iso-butyl phthalate; DiBP), MBzP (metabolite of benzylbutyl phthalate; BBzP), MEHP (metabolite of di-2-ethylhexyl phthalate; DEHP), 5-oxo-MEHP (metabolite of DEHP), 5-OH-MEHP (metabolite of DEHP), MP, EP, PP, BP and BP3. The analytical procedure, consisting in an enzymatic hydrolysis and a solid phase extraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry, has been previously described (Dewalque et al., 2014c).

### 2.3. Cumulative risk assessment

The risk of cumulative exposure to phthalates was assessed through the estimation of HI, defined as the sum of the hazard quotients (HQ) of DnBP, DiBP and DEHP based on similar toxicological endpoints (Benson, 2009; Dewalque et al., 2014b; Bekö et al., 2013; Kranich et al., 2014). These HQ were calculated for each participant as the ratio between the estimated daily intake (EDI), based on metabolite urine levels (Anderson et al., 2001; Anderson et al., 2011; Koch et al., 2012), and the corresponding tolerable daily intake (TDI; European Food Safety Authorities, 2005a, 2005b, 2005c). The estimations of HI, HQ and EDI have already been thoroughly detailed elsewhere (Dewalque et al., 2014b) and are summarized in Table S1.

### 2.4. Statistical analysis

#### 2.4.1. Descriptive analysis

Statistical analyses were performed with JMP 10.0.0 (SAS Institute, Carry, NC), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, USA), RStudio 0.98.945 (Rstudio, Boston, MA) and Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA). Measured concentrations below the limits of detection (LOD) were replaced by the corresponding LOD/2 (Dewalque et al., 2014a, 2014c; Hornung and Reed, 1990). All statistical analyses were performed on log<sub>10</sub>-transformed values to better approximate a normal distribution. Correlations between biomarkers in the same sample were highlighted using Pearson test. The significance limit was set at 0.05. All following variability analyses were performed with both volumetric and creatinine-adjusted concentrations. The variability analyses described in the following sections were also conducted with HI. In that case, this

index based on the exposure levels of three phthalates, was considered and presented as if it was an additional biomarker.

#### 2.4.2. Variability analysis

To assess the within-subject reproducibility of each urinary biomarker, we determined intraclass coefficient correlations (ICC), calculated by dividing the between-subject variance ( $\sigma_b^2$ ) by the total variance which is the sum of the within-subject variance ( $\sigma_w^2$ ) and  $\sigma_b^2$  (Rosner, 2011). The maximum likelihood estimates of variance components ( $\sigma_w^2$  and  $\sigma_b^2$ ) and covariances were obtained using random-effect models for subjects (Peck et al., 2010) while ICC 95% confidence intervals (95% CI) were calculated according Hankinson et al. (Hankinson et al., 1995). ICC, ranging between 0 (no reproducibility) and 1 (perfect reproducibility), used to reflect a poor degree of reliability when below 0.40, a moderate to good reliability when ranging between 0.40 and 0.75, and an excellent reliability when above 0.75 (Rosner, 2011). ICC were determined based on all spot samples, but also when considering only the 6 spots of the short-term variability (D2, D3, D4, D5, D6 and D7), and when based on the 5 spots of the long-term variability (D1, M1, M2, M3 and M4). The aim was to compare the reproducibility of the biomarker concentrations over a week against over several months. Furthermore, we estimated the variance components covering a larger group of individuals in order to better represent the between-subject variability (Hauser et al., 2004) by including the biomarker results of the 261 Belgian participants recruited during a previous study (Dewalque et al., 2014a). The comparison between two ICC was performed with chi-square test with one degree of freedom and was computed as follows (Hankinson et al., 1995):

$$\chi^2 = \frac{(ICC_1^{-1} - ICC_2^{-1})^2}{\text{Var}(ICC_1^{-1}) + \text{Var}(ICC_2^{-1})}$$

$\text{Var}(ICC^{-1})$  is the variance of  $ICC^{-1}$ ,  $ICC_1$  and  $ICC_2$  corresponding to the different ICC to be compared.

#### 2.4.3. Surrogate category analysis

To evaluate the predictive ability of spot samples for a 4-month exposure, sensitivity, specificity and surrogate category analyses were performed (Hauser et al., 2004; Braun et al., 2012). For each collection day, tertiles were calculated based on the exposure values of the 32 spots of the day concerned. Then these tertiles allowed to classify each spot (the surrogate sample) of the corresponding collection day into low, medium or high predicted level of exposure. A geometric mean (GM) of the 11 repeat urine samples was calculated for each participant to represent the 4-month level of exposure. These GM were then classified according to the GM-specific tertiles into 3 groups. All associations between the predicting (surrogate sample) and the observed exposure (GM) were aggregated into a  $3 \times 3$  table which was then reduced by summing low and medium groups to form a contingency table ( $2 \times 2$ ) in order to calculate sensitivity, specificity and positive predictive value (PPV; (Hauser et al., 2004; Smith et al., 2012; Braun et al., 2012)). As previously mentioned (Braun et al., 2012), the drawback of this analysis is that the observed and predicted values are not independent. To overcome this limitation, we calculated for each surrogate sample a specific GM excluding this spot on one hand, and on the other hand, we performed the sensitivity analysis with tertile cut points obtained during a previously reported study on a Belgian general population (Dewalque et al., 2014a). In order to investigate the potential improvement in exposure ranking using multiple spot samples, sensitivity analyses were also performed using surrogate samples calculated as the mean of 2, 3 or 4 spots (Hauser et al., 2004), representing approximately more than 1700, 5200 and 10,500 different possible associations between predicted and observed values respectively.

Beside analyses with tertiles, we assessed the ability of surrogate samples to identify individuals with very high level of long-term exposure. For this purpose, we investigated the sensitivity and specificity of surrogate sample to correctly predict the 4-month average level of exposure based on 95<sup>th</sup> percentile.

Finally, we conducted a surrogate category analysis (Hauser et al., 2004; Braun et al., 2012; Peck et al., 2010; Townsend et al., 2013) where the participants were attributed to low, medium or high group according to day-specific tertile for each sample time. Afterward, in each group, the mean of the GM of the 11 repeat urine samples of each participant was calculated and  $\log_{10}$  back-transformed to obtain a group-specific GM. In a collection day, a monotonic increase of these group-specific GM across the 3 tertile categories indicates that the surrogate sample is reasonably representative of the 4-month average level of exposure (Hauser et al., 2004; Braun et al., 2012; Peck et al., 2010; Townsend et al., 2013).

### 3. Results

#### 3.1. Descriptive statistics and phthalate risk assessment

351 urine spot samples were collected from the 32 subjects, only one sample was missing at M4. MP, EP and all the phthalate metabolites monitored were detected in almost all urine samples. PP and BP3 were detected in the urine of 76.1% and 76.4% of the participants respectively, while BP was less frequently detected (34.2%). The detailed urinary levels are reported in Table S2. The correlations between biomarkers were quite similar to those reported in our recent Belgian general population (data not shown; Dewalque et al., 2014a). The EDI exceeded the TDI or the reference dose (RfD) for DnBP, DEP and DiBP in 1, 2 and 7 spots respectively (Table S3). HI taking account of three phthalates (DiBP, DnBP and DEHP) exceeded the unitary threshold in 10 samples out of the 351 collected spots (Table S3).

#### 3.2. Variability analysis

The range of biomarker concentration was wide among all collected spots but also within individuals, showing that besides the important between-subject variability there was also significant within-person variability. In order to quantify this variability, we calculated  $\sigma_w^2$ ,  $\sigma_b^2$  and ICC for biomarkers as well as for HI (Table 1). A moderate to good reproducibility was observed for all target parabens, BP3, MEP and MiBP with ICC ranging from 0.55 to 0.68. On the other side, MBzP, MEHP, 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP presented a poor degree of reliability with low ICC (0.20–0.37) while MnBP was intermediate (0.39–0.46). As expected, since it was based on DiBP, DnBP and DEHP EDI, HI presented ICC in the same order of magnitude (0.49) as the corresponding metabolites. When ICC was computed for males and females separately (Table S4), a better reproducibility was observed in males for PP and MEP; however, this was not statistically significant ( $p=0.19$  and  $0.24$ , respectively). ICC obtained when based on 6 days or on 4 months were not significantly different for all target biomarkers ( $p=0.06$ – $1.00$ ), which could mean that reproducibility in short or in long-term period were similar. The maximum likelihood estimates and ICC obtained using exposure values of both variability participants and the Belgian general population recruited during a previous study are presented in Table 1. Although similar ICC values were obtained using volumetric or creatinine-adjusted concentrations ( $p=0.33$ – $0.96$ ) in the variability study, a better reproducibility was observed in the whole population with a significant increase for MnBP, MiBP, MBzP, 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP when levels were corrected for creatinine content

**Table 1**  
 Variance components and intraclass coefficient correlation (ICC) estimated using volumetric or creatinine-adjusted concentrations for parabens, phthalate metabolites, benzophenone-3 and hazard index obtained from 351 samples collected during 4 months in 32 participants (A) and obtained including volunteers from a larger Belgian general population (B).

Analyte	Variable component	A. Variability study (N=32, n=351)				B. Variability and population study (N=261, n=581)				$\chi^2$ test between A and B		
		Volumetric concentration	Creatinine-adjusted concentration	p-value <sup>a</sup>	Volumetric concentration	Creatinine-adjusted concentration	p-value <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>	p-value <sup>d</sup>			
MP	ICC [95% CI]	[0.44 -0.74]	0.59	[0.48 -0.77]	0.679	0.54	[0.46 -0.65]	0.62	[0.54 -0.71]	0.260	0.910	0.779
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.101)	0.370	( $\pm$ 0.100)	( $\pm$ 0.100)	0.356	( $\pm$ 0.054)	0.409	( $\pm$ 0.056)	( $\pm$ 0.020)	( $\pm$ 0.020)	( $\pm$ 0.020)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.024)	0.255	( $\pm$ 0.020)	( $\pm$ 0.020)	0.301	( $\pm$ 0.023)	0.255	( $\pm$ 0.020)	( $\pm$ 0.020)	( $\pm$ 0.020)	( $\pm$ 0.020)
	ICC [95% CI]	[0.48 -0.76]	0.66	[0.55 -0.81]	0.465	0.62	[0.55 -0.71]	0.69	[0.63 -0.77]	0.178	0.704	0.608
EP	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.091)	0.360	( $\pm$ 0.096)	( $\pm$ 0.096)	0.385	( $\pm$ 0.053)	0.431	( $\pm$ 0.054)	( $\pm$ 0.015)	( $\pm$ 0.015)	( $\pm$ 0.015)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.019)	0.188	( $\pm$ 0.015)	( $\pm$ 0.015)	0.237	( $\pm$ 0.019)	0.189	( $\pm$ 0.015)	( $\pm$ 0.015)	( $\pm$ 0.015)	( $\pm$ 0.015)
	ICC [95% CI]	[0.55 -0.81]	0.68	[0.58 -0.82]	0.777	0.66	[0.59 -0.74]	0.70	[0.64 -0.77]	0.384	0.944	0.728
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.174)	0.659	( $\pm$ 0.175)	( $\pm$ 0.175)	0.669	( $\pm$ 0.086)	0.741	( $\pm$ 0.090)	( $\pm$ 0.090)	( $\pm$ 0.090)	( $\pm$ 0.090)
BP	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.028)	0.313	( $\pm$ 0.025)	( $\pm$ 0.025)	0.347	( $\pm$ 0.027)	0.314	( $\pm$ 0.025)	( $\pm$ 0.025)	( $\pm$ 0.025)	( $\pm$ 0.025)
	ICC [95% CI]	[0.47 -0.76]	0.64	[0.53 -0.79]	0.571	0.60	[0.52 -0.70]	0.66	[0.59 -0.74]	0.304	0.821	0.743
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.052)	0.236	( $\pm$ 0.063)	( $\pm$ 0.063)	0.209	( $\pm$ 0.030)	0.265	( $\pm$ 0.034)	( $\pm$ 0.034)	( $\pm$ 0.034)	( $\pm$ 0.034)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.011)	0.136	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)	0.140	( $\pm$ 0.011)	0.136	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)
MEP	ICC [95% CI]	[0.44 -0.74]	0.55	[0.44 -0.74]	0.964	0.44	[0.37 -0.55]	0.47	[0.40 -0.58]	0.621	0.151	0.334
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.070)	0.200	( $\pm$ 0.055)	( $\pm$ 0.055)	0.151	( $\pm$ 0.023)	0.139	( $\pm$ 0.021)	( $\pm$ 0.021)	( $\pm$ 0.021)	( $\pm$ 0.021)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.016)	0.163	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)	0.192	( $\pm$ 0.014)	0.155	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)
	ICC [95% CI]	[0.28 -0.61]	0.46	[0.35 -0.67]	0.470	0.54	[0.47 -0.64]	0.73	[0.68 -0.79]	0.002	0.141	0.022
MnBP	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.018)	0.038	( $\pm$ 0.011)	( $\pm$ 0.011)	0.109	( $\pm$ 0.015)	0.119	( $\pm$ 0.014)	( $\pm$ 0.014)	( $\pm$ 0.014)	( $\pm$ 0.014)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.008)	0.045	( $\pm$ 0.004)	( $\pm$ 0.004)	0.093	( $\pm$ 0.007)	0.044	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)
	ICC [95% CI]	[0.49 -0.77]	0.64	[0.54 -0.80]	0.636	0.61	[0.55 -0.70]	0.76	[0.71 -0.81]	0.006	0.843	0.152
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.031)	0.076	( $\pm$ 0.020)	( $\pm$ 0.020)	0.119	( $\pm$ 0.015)	0.130	( $\pm$ 0.014)	( $\pm$ 0.014)	( $\pm$ 0.014)	( $\pm$ 0.014)
MBzP	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.006)	0.042	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)	0.075	( $\pm$ 0.006)	0.042	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)
	ICC [95% CI]	[0.18 -0.51]	0.37	[0.27 -0.60]	0.325	0.54	[0.46 -0.66]	0.74	[0.69 -0.80]	0.004	0.040	0.010
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.012)	0.028	( $\pm$ 0.008)	( $\pm$ 0.008)	0.126	( $\pm$ 0.019)	0.141	( $\pm$ 0.016)	( $\pm$ 0.016)	( $\pm$ 0.016)	( $\pm$ 0.016)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.008)	0.049	( $\pm$ 0.004)	( $\pm$ 0.004)	0.105	( $\pm$ 0.008)	0.049	( $\pm$ 0.004)	( $\pm$ 0.004)	( $\pm$ 0.004)	( $\pm$ 0.004)
5-oxo-MEHP	ICC [95% CI]	[0.17 -0.50]	0.20	[0.13 -0.47]	0.541	0.40	[0.32 -0.55]	0.59	[0.52 -0.70]	0.026	0.163	0.023
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.012)	0.014	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	0.074	( $\pm$ 0.014)	0.085	( $\pm$ 0.012)	( $\pm$ 0.012)	( $\pm$ 0.012)	( $\pm$ 0.012)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.009)	0.058	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	0.110	( $\pm$ 0.008)	0.058	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)
	ICC [95% CI]	[0.18 -0.51]	0.20	[0.13 -0.47]	0.502	0.41	[0.32 -0.54]	0.58	[0.51 -0.68]	0.028	0.172	0.024
5-OH-MEHP	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.013)	0.016	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	0.077	( $\pm$ 0.014)	0.085	( $\pm$ 0.012)	( $\pm$ 0.012)	( $\pm$ 0.012)	( $\pm$ 0.012)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.009)	0.062	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	0.112	( $\pm$ 0.008)	0.061	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)
	ICC [95% CI]	[0.15 -0.48]	0.28	[0.19 -0.52]	0.526	0.34	[0.25 -0.52]	0.43	[0.34 -0.58]	0.332	0.250	0.183
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.005)	0.021	( $\pm$ 0.007)	( $\pm$ 0.007)	0.026	( $\pm$ 0.006)	0.040	( $\pm$ 0.008)	( $\pm$ 0.008)	( $\pm$ 0.008)	( $\pm$ 0.008)
MEHP	ICC [95% CI]	[0.49 -0.77]	0.59	[0.48 -0.77]	0.948	0.65	[0.58 -0.74]	0.70	[0.64 -0.77]	0.369	0.540	0.224
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.082)	0.244	( $\pm$ 0.066)	( $\pm$ 0.066)	0.377	( $\pm$ 0.050)	0.389	( $\pm$ 0.049)	( $\pm$ 0.049)	( $\pm$ 0.049)	( $\pm$ 0.049)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.016)	0.167	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)	0.203	( $\pm$ 0.016)	0.169	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)
	ICC [95% CI]	[0.38 -0.69]	0.49	[0.48 -0.65]	0.55	0.55	[0.48 -0.65]	0.65	[0.48 -0.65]	0.495	0.495	0.495
BP3	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.022)	0.080	( $\pm$ 0.022)	( $\pm$ 0.022)	0.098	( $\pm$ 0.013)	0.141	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)	( $\pm$ 0.013)
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.007)	0.080	( $\pm$ 0.007)	( $\pm$ 0.007)	0.080	( $\pm$ 0.006)	0.080	( $\pm$ 0.006)	( $\pm$ 0.006)	( $\pm$ 0.006)	( $\pm$ 0.006)
	ICC [95% CI]	[0.30 -0.63]	0.41	[0.30 -0.63]	0.031	0.38	[0.30 -0.53]	0.41	[0.30 -0.53]	0.005	0.765	0.765
	$\sigma^2_b$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.009)	0.031	( $\pm$ 0.009)	( $\pm$ 0.009)	0.027	( $\pm$ 0.005)	0.044	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)	( $\pm$ 0.005)
Creatinine	ICC [95% CI]	[0.30 -0.63]	0.41	[0.30 -0.63]	0.031	0.38	[0.30 -0.53]	0.41	[0.30 -0.53]	0.005	0.765	0.765
	$\sigma^2_w$ ( $\pm$ SE)	( $\pm$ 0.004)	0.045	( $\pm$ 0.004)	( $\pm$ 0.004)	0.044	( $\pm$ 0.003)	0.044	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)	( $\pm$ 0.003)

a:  $\chi^2$  test comparing ICC obtained with volumetric and creatinine-adjusted concentrations in the variability study.  
 b:  $\chi^2$  test comparing ICC obtained with volumetric and creatinine-adjusted concentrations when general population results were included.  
 c:  $\chi^2$  test comparing ICC obtained with volumetric concentrations when including or not general population study.  
 d:  $\chi^2$  test comparing ICC obtained with creatinine-adjusted concentrations when including or not general population study.  
 N is the number of participants, n is the total number of urine samples.  $\sigma^2_b$ : between-subject variance.  $\sigma^2_w$ : within-subject variance. SE: standard error.

**Table 2**  
 Surrogate sample ability to predict the average 4-month level of exposure (sensitivity, specificity and positive predictive value) to parabens, phthalates, BP3 and hazard index (HI) based either on top tertile (A, B and C) or on 95<sup>th</sup> percentile of the distribution (D) for volumetric concentrations.

	Classification method	Sensitivity (95% CI) <sup>1</sup>			Specificity (95% CI) <sup>2</sup>			Positive predictive value (95% CI) <sup>3</sup>		
MP	A. Top tertile	0.75	(0.67–0.83)		0.87	(0.83–0.91)		0.75	(0.67–0.83)	
	B. Top tertile and independant GM	0.73	(0.65)	(– 0.80)	0.86	(0.81)	(– 0.90)	0.73	(0.65)	(– 0.80)
	C. Reference population top tertile	0.73	(0.65)	(– 0.82)	0.87	(0.83)	(– 0.91)	0.69	(0.60)	(– 0.77)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.36	(0.16)	(– 0.56)	0.96	(0.94)	(– 0.98)	0.36	(0.16)	(– 0.56)
EP	A. Top tertile	0.77	(0.69)	(– 0.84)	0.88	(0.84)	(– 0.92)	0.78	(0.70)	(– 0.85)
	B. Top tertile and independant GM	0.76	(0.68)	(– 0.84)	0.88	(0.84)	(– 0.92)	0.77	(0.69)	(– 0.84)
	C. Reference population top tertile	0.76	(0.69)	(– 0.84)	0.87	(0.82)	(– 0.91)	0.78	(0.70)	(– 0.85)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.32	(0.12)	(– 0.51)	0.95	(0.93)	(– 0.98)	0.32	(0.12)	(– 0.51)
PP	A. Top tertile	0.76	(0.68)	(– 0.84)	0.88	(0.84)	(– 0.92)	0.77	(0.69)	(– 0.84)
	B. Top tertile and independant GM	0.76	(0.68)	(– 0.84)	0.88	(0.84)	(– 0.92)	0.77	(0.69)	(– 0.84)
	C. Reference population top tertile	0.70	(0.61)	(– 0.80)	0.89	(0.85)	(– 0.92)	0.67	(0.58)	(– 0.77)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.45	(0.25)	(– 0.66)	0.96	(0.94)	(– 0.98)	0.45	(0.25)	(– 0.66)
BP	A. Top tertile	0.74	(0.66)	(– 0.81)	0.92	(0.89)	(– 0.96)	0.83	(0.76)	(– 0.90)
	B. Top tertile and independant GM	0.71	(0.63)	(– 0.79)	0.91	(0.87)	(– 0.95)	0.80	(0.73)	(– 0.88)
	C. Reference population top tertile	0.81	(0.72)	(– 0.89)	0.88	(0.84)	(– 0.92)	0.69	(0.60)	(– 0.78)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.41	(0.20)	(– 0.61)	0.96	(0.94)	(– 0.98)	0.41	(0.20)	(– 0.61)
MEP	A. Top tertile	0.72	(0.64)	(– 0.80)	0.86	(0.81)	(– 0.90)	0.73	(0.65)	(– 0.80)
	B. Top tertile and independant GM	0.70	(0.62)	(– 0.78)	0.85	(0.80)	(– 0.89)	0.71	(0.63)	(– 0.79)
	C. Reference population top tertile	0.75	(0.66)	(– 0.85)	0.91	(0.88)	(– 0.95)	0.71	(0.61)	(– 0.81)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.59	(0.39)	(– 0.80)	0.97	(0.96)	(– 0.99)	0.59	(0.39)	(– 0.80)
MnBP	A. Top tertile	0.67	(0.58)	(– 0.75)	0.83	(0.78)	(– 0.88)	0.67	(0.58)	(– 0.75)
	B. Top tertile and independant GM	0.60	(0.51)	(– 0.69)	0.79	(0.74)	(– 0.84)	0.60	(0.51)	(– 0.69)
	C. Reference population top tertile	0.55	(0.25)	(– 0.84)	0.95	(0.92)	(– 0.97)	0.25	(0.08)	(– 0.42)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.36	(0.16)	(– 0.56)	0.96	(0.94)	(– 0.98)	0.36	(0.16)	(– 0.56)
MiBP	A. Top tertile	0.72	(0.64)	(– 0.80)	0.85	(0.81)	(– 0.90)	0.72	(0.64)	(– 0.80)
	B. Top tertile and independant GM	0.66	(0.57)	(– 0.74)	0.82	(0.77)	(– 0.87)	0.66	(0.57)	(– 0.74)
	C. Reference population top tertile	0.81	(0.68)	(– 0.95)	0.96	(0.93)	(– 0.98)	0.65	(0.50)	(– 0.80)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.86	(0.72)	(– 1.01)	0.99	(0.98)	(– 1.00)	0.86	(0.72)	(– 1.01)
MBzP	A. Top tertile	0.58	(0.50)	(– 0.67)	0.79	(0.74)	(– 0.84)	0.59	(0.50)	(– 0.68)
	B. Top tertile and independant GM	0.53	(0.44)	(– 0.62)	0.77	(0.71)	(– 0.82)	0.54	(0.45)	(– 0.63)
	C. Reference population top tertile	0.60	(0.30)	(– 0.90)	0.94	(0.92)	(– 0.97)	0.23	(0.07)	(– 0.39)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.43	(0.22)	(– 0.64)	0.96	(0.94)	(– 0.98)	0.41	(0.20)	(– 0.61)
MEHP	A. Top tertile	0.58	(0.49)	(– 0.66)	0.78	(0.73)	(– 0.83)	0.58	(0.49)	(– 0.66)
	B. Top tertile and independant GM	0.55	(0.46)	(– 0.64)	0.77	(0.71)	(– 0.82)	0.55	(0.46)	(– 0.64)
	C. Reference population top tertile	0.55	(0.25)	(– 0.84)	0.86	(0.83)	(– 0.90)	0.12	(0.03)	(– 0.20)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.18	(0.02)	(– 0.34)	0.95	(0.92)	(– 0.97)	0.18	(0.02)	(– 0.34)
5-oxo-MEHP	A. Top tertile	0.63	(0.54)	(– 0.71)	0.81	(0.76)	(– 0.86)	0.63	(0.54)	(– 0.72)
	B. Top tertile and independant GM	0.58	(0.50)	(– 0.67)	0.79	(0.74)	(– 0.84)	0.59	(0.50)	(– 0.68)
	C. Reference population top tertile	0.60	(0.30)	(– 0.90)	0.89	(0.86)	(– 0.93)	0.14	(0.04)	(– 0.25)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.38	(0.17)	(– 0.59)	0.96	(0.94)	(– 0.98)	0.36	(0.16)	(– 0.56)
5-OH-MEHP	A. Top tertile	0.63	(0.54)	(– 0.71)	0.81	(0.76)	(– 0.86)	0.63	(0.54)	(– 0.72)
	B. Top tertile and independant GM	0.57	(0.48)	(– 0.66)	0.78	(0.73)	(– 0.83)	0.57	(0.48)	(– 0.66)
	C. Reference population top tertile	–	–	–	0.89	(0.86)	(– 0.92)	0.00	(0.00)	(– 0.00)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.19	(0.02)	(– 0.36)	0.95	(0.92)	(– 0.97)	0.18	(0.02)	(– 0.34)
BP3	A. Top tertile	0.75	(0.67)	(– 0.83)	0.87	(0.83)	(– 0.91)	0.75	(0.67)	(– 0.83)
	B. Top tertile and independant GM	0.70	(0.62)	(– 0.78)	0.84	(0.80)	(– 0.89)	0.70	(0.62)	(– 0.78)
	C. Reference population top tertile	0.78	(0.68)	(– 0.88)	0.93	(0.90)	(– 0.96)	0.73	(0.62)	(– 0.83)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.68	(0.49)	(– 0.88)	0.98	(0.96)	(– 0.99)	0.68	(0.49)	(– 0.88)
HI	A. Top tertile	0.71	(0.63)	(– 0.79)	0.85	(0.80)	(– 0.89)	0.71	(0.63)	(– 0.79)
	B. Top tertile and independant GM	0.63	(0.55)	(– 0.72)	0.81	(0.76)	(– 0.86)	0.63	(0.55)	(– 0.72)
	C. Reference population top tertile	0.86	(0.72)	(– 1.01)	0.95	(0.93)	(– 0.97)	0.54	(0.38)	(– 0.71)
	D. 95 <sup>th</sup> percentile	0.73	(0.54)	(– 0.91)	0.98	(0.97)	(– 1.00)	0.73	(0.54)	(– 0.91)

A: spot samples (surrogate samples) were used to predict the average 4-month level of exposure (geometric means of 10–11 participant's spots) with specific-day and specific-GM tertiles.

B: spot samples (surrogate samples) were used to predict the average 4-month level of exposure (geometric means of 9–10 participant's spots, excluding the surrogate sample) with specific-day and specific-GM tertiles.

C: spot samples (surrogate samples) were used to predict the average 4-month level of exposure (geometric means of 10–11 participant's spots) with general population tertiles (12).

D: spot samples (surrogate samples) were used to predict the average 4-month level of exposure (geometric means of 10–11 participant's spots) with specific-day and specific-GM 95<sup>th</sup> percentiles.

1: sensitivity is defined as the rate of participants with high 4-month value of exposure (GM) correctly identified with a high surrogate sample (> tertile 2 or > 95<sup>th</sup> percentile).

2: specificity is defined as the rate of participants with low-medium 4-month value of exposure (GM) correctly identified with a low-medium surrogate sample ( $\leq$  tertile 2 or  $\leq$  95<sup>th</sup> percentile).

3: positive predictive value is defined as the rate of high surrogate samples correctly identifying participants with 4-month high level of exposure (> tertile 2 or > 95<sup>th</sup> percentile).

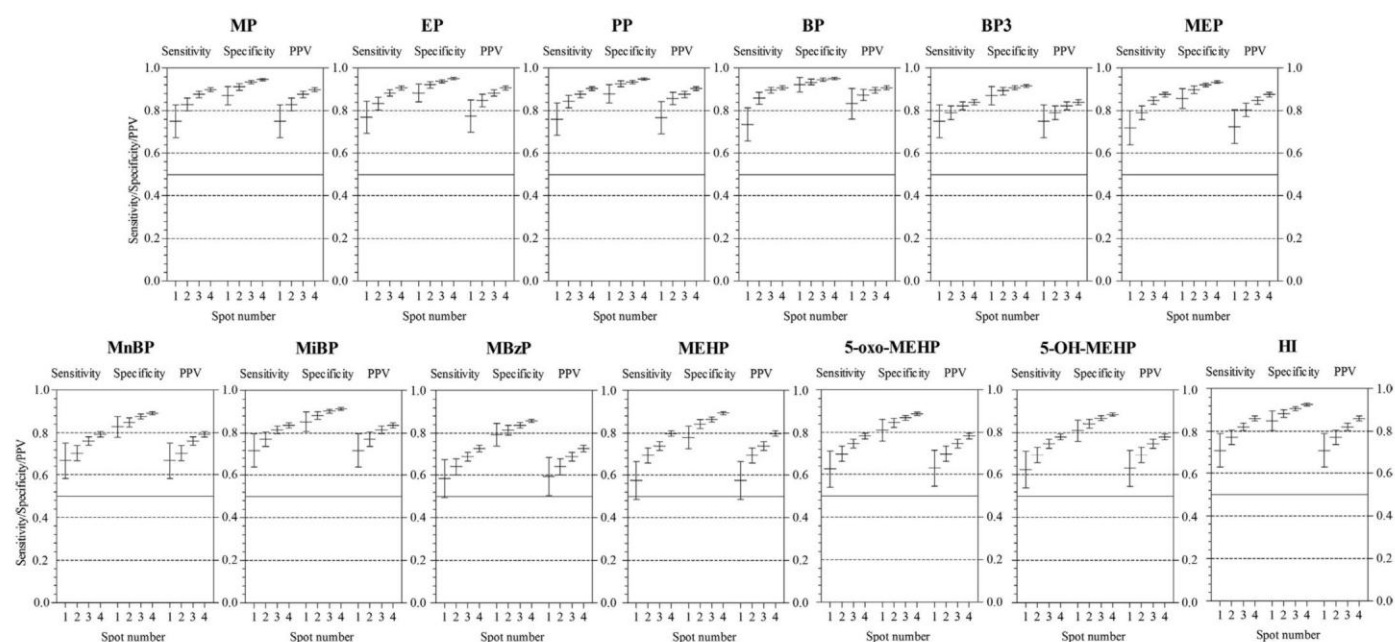
/: calculation was not feasible due to unbalanced contingency tables.

( $p = < 0.01$ – $0.03$ ). The inclusion of the general population in the variability study provided minor improvement except when creatinine adjustment was used for MnBP, MBzP, 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP ( $p = 0.01$ – $0.02$ ).

Thereafter, a sensitivity analysis was performed to assess the 4-month predictive ability of surrogate samples based on tertile cut points (Table 2). The sensitivity, specificity and PPV obtained with uncorrected and creatinine-corrected concentrations were similar (data not shown). Parabens, BP3, MEP, MnBP and MiBP presented an acceptable sensitivity ranging from 0.67 to 0.77. A lower sensitivity was generally observed for MEHP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP and MBzP (0.58–0.63) while HI was intermediate (0.71). PPV and sensitivity results were close and the specificity was good to excellent (0.78–0.90) for the target biomarkers and the HI estimation (Table 2). Interestingly, these results were unchanged when we used, as observed level of exposure, a GM computed independently of the surrogate sample (Table 2). The ability of the surrogate samples to predict very high level of exposure, defined as greater than the 95<sup>th</sup> percentile, is also presented in Table 2. Similar or better sensitivity, specificity and PPV were only observed for BP3, MiBP and HI while the other parameters were negatively impacted when using the 95<sup>th</sup> percentile as cut point (sensitivity = 0.18–0.59). Similarly, sensitivities were either drastically reduced, or showed larger confidence intervals or even were incalculable for MnBP, MBzP, MEHP, 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP when external tertiles obtained from the larger Belgian population were employed (Table 2). This observation is the consequence of some differences

in the distribution of the level of exposure between the whole population (Dewalque et al., 2014a) and the present study. On the other side, parabens, MEP, MiBP and BP3 sensitivity were not affected or were increased by the use of the population tertile (0.72–0.86), while specificity was globally similar or reduced (0.78–0.92). Finally, as illustrated in Fig. 1, the sensitivity and PPV were proportionally improved by the number of spot urine samples used to predict the 4-month level of exposure. However, at least 3 or 4 samples were generally needed to observe a clear improvement of the sensitivity, while specificity was less influenced.

The surrogate category analysis showed monotonic increase of the group-specific GM across the low, medium and high groups with between 1 and 3 exceptions for MEP, MBzP, 5-oxo-MEHP, BP3 and BP (data not shown). The consistency between one spot to another was assessed by counting the number of samples falling in the same tertile group for each participant. Focusing on uncorrected concentrations and excluding BP because of its low detection rate, between 2 and 5 participants had the totality of their samples in the same tertile group for parabens, MEP, MiBP and BP3, while only one participant had all 11 spots in the same tertile group for MnBP and none had this condition for the other phthalate metabolites (Table S5). Half of the participants had at least 8 spots on the 11 into the same tertile category for parabens, MEP and BP3. On the other side, only 19% up to 38% of the participants had 8 or more spots found in the same group for the other phthalate metabolites (Table S5).



**Fig. 1.** Phthalate metabolite, paraben, BP3 and HI sensitivity, specificity and positive predictive value (PPV) obtained with surrogate samples constituted of 1, 2, 3 or 4 spots based on top tertile distribution (volumetric concentration). The line is the sensitivity, specificity or PPV while whiskers are the 95% confidence interval.

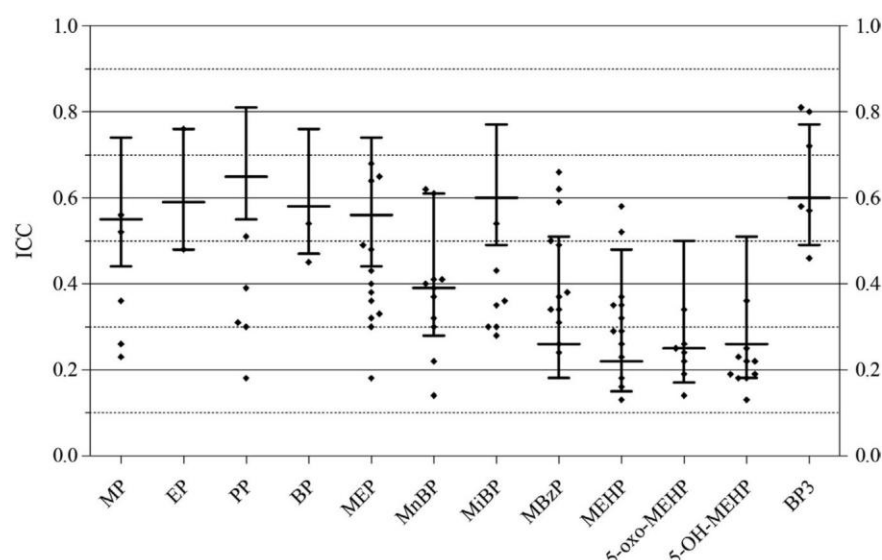
#### 4. Discussion

The major outcome of this work is that beyond the huge variability of urinary biomarker concentrations, the intra-individual variability appeared to be a minor contributor to the total variability for parabens, BP3, MEP and MiBP. In other words, this means that for these compounds a certain degree of reproducibility is occurring. On the other side, MnBP, MBzP, MEHP, 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP presented a higher intra-individual variability than the between-subject variability. According to Rosner et al. (Rosner, 2011), whereas moderate ICC ( $\geq 0.40$ ) could indicate a sufficient reproducibility of biomarker levels to perform epidemiological studies, low ICC affects the exposure classification and proportionally reduces the relative risk (Adibi et al., 2008; Fisher et al., 2015). We observed acceptable levels of reliability for parabens, MiBP, MEP and BP3 allowing the performance of some association studies between pathology and exposure, even for an exposure window of several months, e.g. the impacts on the fetal development during pregnancy or the influence on sperm production during adulthood (Swan et al., 2005; Hauser et al., 2007). Interestingly, we did not find any difference in biomarker reproducibility between short and long-term variability which is supporting the use of spot urine samples to assess the long-term individual level of exposure. We assumed that the source of the low observed within-person variability for parabens, BP3 and MEP could be related to consistent day-to-day individual habits in daily applications of PCP and cosmetics to the skin. Moreover, the slow absorption through the skin barrier and the avoidance of the digestive first-pass metabolism would lead to the reduction of peak and valley concentrations (Braun et al., 2012). This assumption is reinforced by the low reproducibility observed for DEHP metabolites since the DEHP major route of exposure is known to be the ingestion of contaminated food, and since the alimentation habits used to be more day-to-day heterogeneous (Wittassek et al., 2011). This has also been reported for other food contaminants such as bisphenol A (Teitelbaum et al., 2008). The strong correlations found between DEHP, BBzP and DnBP metabolites suggested that the routes of exposure should be similar, and therefore the lower reproducibility observed for MnBP and MBzP were expected. On the other hand, women are suspected to be more exposed to PCP constituents such as parabens or DEP (Dewalque et al., 2014a), and therefore the similarity in variability of their biomarker according to gender was unexpected, and the reason for this lack of significant difference remains unclear.

Comparison with the available literature should be interpreted cautiously. First of all, the majority of the available studies investigating the intra-individual variability of phthalate, paraben and BP3 biomarkers have been carried out in some US populations (Hauser et al., 2004; Smith et al., 2012; Teitelbaum et al., 2008; Braun et al., 2012; Peck et al., 2010; Townsend et al., 2013; Adibi et al., 2008; Hoppin et al., 2002; Marcus et al., 2010; Preau et al., 2010; Baird et al., 2010; Meeker et al., 2011; Meeker et al., 2012; Philippat et al., 2013; Ferguson et al., 2014; Watkins et al., 2014) and only very few were performed outside the USA, for instance in Puerto Rico (Meeker et al., 2013; Cantonwine et al., 2014), Canada (Fisher et al., 2015), Asia (Suzuki et al., 2009; Engel et al., 2014) or in the European Union (Frederiksen et al., 2013; Koch et al., 2014; Fromme et al., 2007). The level of exposure, the distribution and the correlations between pollutants have already been demonstrated to vary from one country to another, highlighting the dependence of local commercial applications or the legislations in force on the sources and pathways of exposure to these pollutants (Dewalque et al., 2014a; Suzuki et al., 2009; Shirai et al., 2013). Secondly, many variability studies have been conducted on specific populations, such as pregnant women (Suzuki et al., 2009; Braun et al., 2012; Adibi et al., 2008; Philippat et al., 2013; Ferguson et al.,

2014; Meeker et al., 2013; Cantonwine et al., 2014), targeted ethnic communities (Peck et al., 2010; Hoppin et al., 2002), healthcare professionals (Townsend et al., 2013), young children (Teitelbaum et al., 2008; Watkins et al., 2014) or participants recruited during consultations in fertility clinics (Hauser et al., 2004; Smith et al., 2012; Braun et al., 2012; Meeker et al., 2011; Meeker et al., 2012). Therefore, physiological and behavioral differences influencing toxicokinetic and exposure cannot be excluded. Thirdly, since chemical legislations and temporal trends in level of exposure are evolving (Wittassek et al., 2011), attention should also be paid concerning the year of the different studies used for comparison. Finally, there is a great heterogeneity between study designs, in which participants were followed from days to years collecting between 2 and 74 samples consisting in spots, first morning or 24-h urines (Hoppin et al., 2002; Preau et al., 2010; Watkins et al., 2014). All these reasons could explain the different results reported in the literature, which are illustrated in Fig. 2. We did not observe clear visual clustering in the different ICC values when categorizing studies according to the countries, the study designs or the population groups. Interestingly, most of the ICC values obtained for MEHP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP, MnBP, MBzP, EP, BP and BP3 were included or very close to our ICC 95% CI (Fig. 2). Conversely, PP, MiBP and MP reproducibility seemed generally better in our population, while reported values for MEP were highly scattered (Fig. 2). All these differences between the reproducibility studies clearly underline the need for local validation of biomarker variability, as previously suggested by Braun et al. (Braun et al., 2012) and Suzuki et al. (Suzuki et al., 2009).

Beside of reproducibility analyses, we investigated the representativeness and the predictive ability of spot samples versus a 4-month average level of exposure. Surrogate category analysis showed that, with the exception of a few collection days for MEHP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP, MBzP and BP3, surrogate samples were relatively representative of the 4-month level of exposure. Similarly to the reproducibility analysis, two groups of biomarkers were emerging regarding the sensitivity. On the one hand, parabens, BP3, MEP and MiBP presented the highest sensitivity, with only 23–28% of the participants highly exposed not matching with the high surrogate samples, and, on the other hand MEHP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP, MBzP and MnBP showed a lower sensitivity, with an error rate of 33–42%. Moreover, specificity was generally important and PPV followed the sensitivity values. Although according to Braun et al. (Braun et al., 2012), one of the drawbacks of this analysis is that the assumed 4-month level of exposure is not independent of the surrogate samples, similar results were observed when calculating an independent GM excluding the surrogate sample. These results indicated that a single spot would allow identifying a significant proportion of the highest exposed individuals to parabens, DEP, DiBP and BP3. Therefore, for these individuals, specific awareness could be raised in order to reduce their exposure, for example in avoiding PCP containing parabens (Koch et al., 2014) or excluding plastic material in contact with food (Rudel et al., 2011). Unfortunately, 3 or 4 spots were required for MEHP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP, MBzP and MnBP to reach similar level of sensitivity. Therefore, collection of several samples should be suggested for the three corresponding phthalates, but required additional efforts for the participants and the study drivers. Consistent sensitivity results were observed by Smith et al. (Smith et al., 2012) in pregnant women for MP, PP and BP, as well as by Hauser et al. (Hauser et al., 2004) and Braun et al. (Braun et al., 2012) for phthalates. By contrast, Adibi et al. (Adibi et al., 2008) and Fisher et al. (Fisher et al., 2015) found better sensitivity and lower specificity for the monitored phthalate metabolites. However, it should be noted that the groups of exposure were defined by the GM obtained from some large-scale human biomonitoring studies (Adibi et al., 2008; Fisher et al., 2015). To our



**Fig. 2.** Literature comparison of ICC for parabens, phthalate metabolites and BP3. Dots are ICC reported elsewhere (Hauser et al., 2004; Smith et al., 2012; Frederiksen et al., 2013; Koch et al., 2014; Fromme et al., 2007; Suzuki et al., 2009; Braun et al., 2012; Kranich et al., 2014; Peck et al., 2010; Townsend et al., 2013; Adibi et al., 2008; Fisher et al., 2015; Hoppin et al., 2002; Marcus et al., 2010; Preau et al., 2010; Baird et al., 2010; Meeker et al., 2011; Meeker et al., 2012; Philippat et al., 2013; Watkins et al., 2014; Meeker et al., 2013; Cantonwine et al., 2014; Engel et al., 2014). Lines are the ICC obtained in this study and whiskers are their 95% confidence interval.

knowledge, this study is the first to report a sensitivity analysis for BP3 and EP. Beyond the classification into low, medium or high level of exposure, we also explored the ability of a surrogate sample to identify a very high level of long-term exposure (> 95<sup>th</sup> percentile). The surrogate samples failed to highlight the upper 5% of exposure, except for MiBP and BP3. These results tend to demonstrate that if some individuals could have repeatable very high level of exposure for MiBP and BP3, peaks of exposure are more often occurring for the other target compounds, consistently with results previously reported (Preau et al., 2010).

Several phthalates are known to exert similar toxicity and to produce cumulative effects in laboratory animals (Howdeshell et al., 2008). Therefore, the assessment of the human cumulative risk of exposure has been previously performed using HI (Benson, 2009; Bekö et al., 2013). In this study, we calculated the HI based on the EDI of 3 anti-androgenic phthalates, DnBP, DiBP and DEHP, and using TDI developed by the EFSA as the acceptable value of exposure. Few spots presented a HI value greater than one which is considered as the level of cumulative exposure for which no increased risk is expected, consistent with results reported in other adult populations (Dewalque et al., 2014b; Kranich et al., 2014). When studying the HI variability, we observed that the reproducibility, sensitivity and PPV were at least moderate, while the specificity was good. Conversely to individual phthalates, fair results were obtained for the identification of participants with very high HI (> 95<sup>th</sup> percentile). These results indicate that some individuals could be highly or very-highly exposed over several months to some mixtures of phthalates and thus could present an increased risk of cumulative exposure. Therefore, HI could be proposed for the identification of the individuals requiring an intervention to reduce their exposure to phthalates (Rudel et al., 2011). Nevertheless, this tool presents several limitations. Firstly, EDI assumed that a single spot is representative of 24-h exposure (Dewalque et al., 2014b) while daily variations are known to occur (Preau et al., 2010). Secondly, TDI were derived from animal studies exposed by gavage and, therefore, do not take into account all the possible routes of exposure (European Food Safety Authorities, 2005a, 2005b, 2005c). Thirdly, EDI was calculated on the basis of human toxicokinetic data obtained after oral administration of

phthalates in a limited number of adult volunteers, and therefore, metabolite urine recoveries are only representative of the digestive pathway (Anderson et al., 2001; Anderson et al., 2011). Finally, in this study, HI were determined only based on 3 phthalates, while humans are known to be exposed to several other anti-androgenic pollutants, e.g. parabens, BP3, bisphenol A and pesticides (Kortenkamp and Faust, 2010). Moreover, synergistic effects between phthalates and pesticides have been reported (Christiansen et al., 2009) and are not included in the HI cumulative model. In this risk assessment, parabens and BP3 were not included because, until now, there is too much lack of knowledge and too many uncertainties on the toxicokinetics of these compounds (Ma et al., 2013; Søeborg et al., 2013).

Another weakness of this variability study is the limited number of participants, which did not cover all ages, social and ethnic categories usually found in a general Belgian population. Nevertheless, the levels and ranges of exposure, as well as the detection frequencies and the correlations between biomarkers observed in the present study were similar to those previously reported for a larger Belgian population (Dewalque et al., 2014a; DEMOCOPHES, 2012). Moreover, the between-subject variability estimated in including a larger population was similar for parabens, MEP, MiBP and BP3. On the other side, most of the other phthalate metabolites showed increased ICC, meaning that the variability found between the 32 participants was smaller than the one occurring in a larger population. While the use of the general population tertiles instead of day-specific tertiles to perform sensitivity analysis provided similar results for parabens, MEP, MiBP and BP3, the sensitivity was reduced or incalculable for the other phthalate metabolites. However, some of these differences could be related to the presence of children in the general population. Usually they are more highly exposed to phthalates and this could slightly shift the distribution (Dewalque et al., 2014a). A better reproducibility seemed to be obtained by using the creatinine-adjustment for some phthalates when the larger population was included. Nevertheless, results should be interpreted with caution because the creatinine correction is still debated since its production and elimination are influenced by several physiological and pathological factors potentially found inside a population aged from 1 to 85 years, as previously discussed (Dewalque et al., 2014a).

In conclusion, the major purpose of this study was to locally validate the human biomonitoring of parabens, BP3 and phthalates in terms of within-person variability before performing epidemiological and interventional studies. The crossing of the reproducibility and predictive analyses showed that the spot urine samples could provide imperfect but acceptable estimates of the exposure level of an individual for parabens, BP3, MEP and MiBP, while increasing number of participants or samples by participants could be required to achieve similar level of efficiency for MnBP, MBzP, MEHP, 5-oxo-MEHP and 5-OH-MEHP. For the first time, we also presented here the temporal variability of the cumulative risk of exposure to several phthalates. Globally, HI presented fair reproducibility and predictive ability of high and very-high levels of exposure which could justify its use in public health monitoring.

## Acknowledgments

We greatly thank Bernadette Govaerts, from Institut de Statistique, Biostatistique et Sciences Actuarielles (Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium), Céline Bugli, from Plateforme technologique de Support en Méthodologie et Calcul Statistique (Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium) and Professor Adelin Albert, from the Department of Biostatistics (University of Liege, Liege, Belgium), for their contribution to this work.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.07.015>.

## References

- Adibi, J.J., Whyatt, R.M., Williams, P.L., Calafat, A.M., Camann, D., Herrick, R., Nelson, H., Bhat, H.K., Perera, F.P., Silva, M.J., Hauser, R., 2008. Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples. *Environ. Health Perspect.* 116, 467–473.
- Anderson, W.A., Castle, L., Scotter, M.J., Massey, R.C., Springall, C., 2001. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit. Contam.* 18, 1068–1074.
- Anderson, W.A., Castle, L., Hird, S., Jeffery, J., Scotter, M.J., 2011. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2022–2029.
- Baird, D.D., Saldana, T.M., Nepomnaschy, P.A., Hoppin, J.A., Longnecker, M.P., Weinberg, C.R., Wilcox, A.J., 2010. Within-person variability in urinary phthalate metabolite concentrations: measurements from specimens after long-term frozen storage. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 20, 169–175.
- Bekö, G., Weschler, C.J., Langer, S., Callesen, M., Toftum, J., Clausen, G., 2013. Children's phthalate intakes and resultant cumulative exposures estimated from urine compared with estimates from dust ingestion, inhalation and dermal absorption in their homes and daycare centers. *PLoS One* 8, e62442.
- Benson, R., 2009. 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.* 53, 90–101.
- Braun, J.M., Smith, K.W., Williams, P.L., Calafat, A.M., Berry, K., Ehrlich, S., Hauser, R., 2012. Variability of urinary phthalate metabolite and bisphenol A concentrations before and during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 120, 739–745.
- Cantonwine, D.E., Cordero, J.F., Rivera-González, L.O., Anzalota Del Toro, L.V., Ferguson, K.K., Mukherjee, B., Calafat, A.M., Crespo, N., Jiménez-Vélez, B., Padilla, I. Y., Alshawabkeh, A.N., Meeker, J.D., 2014. Urinary phthalate metabolite concentrations among pregnant women in Northern Puerto Rico: distribution, temporal variability, and predictors. *Environ. Int.* 62, 1–11.
- 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.
- Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2008. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *Int. J. Toxicol.* 27, 1–82.
- Darbore, P.D., Harvey, P.W., 2008. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.* 28, 561–578.
- DEMOCOPHES–National Report on Human Biomonitoring in Mothers and Children – Belgium, 2012; (<http://www.eu-hbm.info>).
- Dewalque, L., Pirard, C., Charlier, C., 2014a. Measurement of urinary biomarkers of parabens, benzophenone-3, and phthalates in a Belgian population. *Biomed. Res. Int.* 649314.
- Dewalque, L., Charlier, C., Pirard, C., 2014b. Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population. *Toxicol. Lett.* 231, 161–168.
- Dewalque, L., Pirard, C., Dubois, N., Charlier, C., 2014c. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 949–950, 37–47.
- Engel, L.S., Buckley, J.P., Yang, G., Liao, L.M., Satagopan, J., Calafat, A.M., Matthews, C. E., Cai, Q., Ji, B.T., Cai, H., Engel, S.M., Wolff, M.S., Rothman, N., Zheng, W., Xiang, Y.B., Shu, X.O., Gao, Y.T., Chow, W.H., 2014. Predictors and variability of repeat measurements of urinary phenols and parabens in a cohort of shanghai women and men. *Environ. Health Perspect.* 122, 733–740.
- European Food Safety Authorities, 2005a. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 243, 1–20.
- European Food Safety Authorities, 2005b. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and material in contact with food (AFC) on a request from the commission related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 242, 1–17.
- European Food Safety Authorities, 2005c. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to butylbenzylphthalate (BBP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 241, 1–14.
- Ferguson, K.K., McElrath, T.F., Ko, Y.A., Mukherjee, B., Meeker, J.D., 2014. Variability in urinary phthalate metabolite levels across pregnancy and sensitive windows of exposure for the risk of preterm birth. *Environ. Int.* 70, 118–124.
- Fisher, M., Arbuckle, T.E., Mallick, R., LeBlanc, A., Hauser, R., Feeley, M., Koniecki, D., Ramsay, T., Provencher, G., Bérubé, R., Walker, M., 2015. Bisphenol A and phthalate metabolite urinary concentrations: Daily and across pregnancy variability. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 25, 231–239.
- Frederiksen, H., Jørgensen, N., Andersson, A.M., 2010. Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 34, 400–410.
- Frederiksen, H., Kranich, S.K., Jørgensen, N., Taboureau, O., Petersen, J.H., Andersson, A.M., 2013. Temporal variability in urinary phthalate metabolite excretion based on spot, morning, and 24-h urine samples: considerations for epidemiological studies. *Environ. Sci. Technol.* 47, 958–967.
- Fromme, H., Bolte, G., Koch, H.M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R., Liebl, B., 2007. Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 21–33.
- Gonzalez, H., Farbro, A., Larkö, O., Wennberg, A.M., 2006. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *Br. J. Dermatol.* 154, 337–340.
- Hankinson, S.E., Manson, J.E., Spiegelman, D., Willett, W.C., Longcope, C., Speizer, F. E., 1995. Reproducibility of plasma hormone levels in postmenopausal women over a 2–3-year period. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4, 649–654.
- Hauser, R., Meeker, J.D., Park, S., Silva, M.J., Calafat, A.M., 2004. Temporal variability of urinary phthalate metabolite levels in men of reproductive age. *Environ. Health Perspect.* 112, 1734–1740.
- Hauser, R., Meeker, J.D., Singh, N.P., Silva, M.J., Ryan, L., Duty, S., Calafat, A.M., 2007. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum. Reprod.* 22, 688–695.
- Hoberman, A.M., Schreier, D.K., Leazer, T., Daston, G.P., Carthew, P., Re, T., Loretz, L., Mann, P., 2008. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 83, 123–133.
- Hoppin, J.A., Brock, J.W., Davis, B.J., Baird, D.D., 2002. Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ. Health Perspect.* 110, 515–518.
- Hornung, R.W., Reed, L.D., 1990. Estimation of average concentration in the presence of nondetectable values. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 5, 46–51.
- Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., Gray Jr., 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.
- Koch, H.M., Christensen, K.L., Harth, V., Lorber, M., Brüning, T., 2012. Di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP) metabolism in a human volunteer after single oral doses. *Arch. Toxicol.* 86, 1829–1839.
- Koch, H.M., Aylward, L.L., Hays, S.M., Smolders, R., Moos, R.K., Cocker, J., Jones, K., Warren, N., Levy, L., Bevan, R., 2014. Inter- and intra-individual variation in urinary biomarker concentrations over a 6-day sampling period. Part 2: Personal care product ingredients. *Toxicol. Lett.* 231, 261–269.
- Kortenkamp, A., Faust, M., 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. *Int. J. Androl.* 33, 463–474.



- Kranich, S.K., Frederiksen, H., Andersson, A.M., Jørgensen, N., 2014. Estimated daily intake and hazard quotients and indices of phthalate diesters for young Danish men. *Environ. Sci. Technol.* 48, 706–712.
- Ma, W.L., Wang, L., Guo, Y., Liu, L.Y., Qi, H., Zhu, N.Z., Gao, C.J., Li, Y.F., Kannan, K., 2013. Urinary concentrations of parabens in chinese young adults: implications for human exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 611–618.
- Marcus, M., Christensen, K.Y., Manatunga, A., Rudra, C.B., Brock, J.W., Small, C.M., 2010. Variability of phthalate monoester levels in daily first-morning urine from adult women: a pilot study. *Rev. Environ. Health* 25, 359–368.
- Meeker, J.D., Yang, T., Ye, X., Calafat, A.M., Hauser, R., 2011. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ. Health Perspect.* 119, 252–257.
- Meeker, J.D., Calafat, A.M., Hauser, R., 2012. Urinary phthalate metabolites and their biotransformation products: predictors and temporal variability among men and women. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 376–385.
- Meeker, J.D., Cantonwine, D.E., Rivera-González, L.O., Ferguson, K.K., Mukherjee, B., Calafat, A.M., Ye, X., Anzalota Del Toro, L.V., Crespo-Hernández, N., Jiménez-Vélez, B., Alshawabkeh, A.N., Cordero, J.F., 2013. Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3439–3447.
- Peck, J.D., Sweeney, A.M., Symanski, E., Gardiner, J., Silva, M.J., Calafat, A.M., Schantz, S.L., 2010. Intra- and inter-individual variability of urinary phthalate metabolite concentrations in Hmong women of reproductive age. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 20, 90–100.
- Philippat, C., Wolff, M.S., Calafat, A.M., Ye, X., Bausell, R., Meadows, M., Stone, J., Slama, R., Engel, S.M., 2013. Prenatal exposure to environmental phenols: concentrations in amniotic fluid and variability in urinary concentrations during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 121, 1225–1231.
- Preau Jr, J.L., Wong, L.Y., Silva, M.J., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2010. Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: an observational study. *Environ. Health Perspect.* 118, 1748–1754.
- Rosner, B., 2011. *Fundamentals of biostatistics*. Brooks/Cole, Boston, MA.
- Rudel, R.A., Gray, J.M., Engel, C.L., Rawsthorne, T.W., Dodson, R.E., Ackerman, J.M., Rizzo, J., Nudelman, J.L., Brody, J.G., 2011. Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention. *Environ. Health Perspect.* 119, 914–920.
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109, 239–244.
- Shirai, S., Suzuki, Y., Yoshinaga, J., Shiraishi, H., Mizumoto, Y., 2013. Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women. *Reprod. Toxicol.* 35, 96–101.
- Smith, K.W., Braun, J.M., Williams, P.L., Ehrlich, S., Correia, K.F., Calafat, A.M., Ye, X., Ford, J., Keller, M., Meeker, J.D., Hauser, R., 2012. Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 120, 1538–1543.
- Suzuki, Y., Niwa, M., Yoshinaga, J., Watanabe, C., Mizumoto, Y., Serizawa, S., Shiraishi, H., 2009. Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. *Environ. Health Prev. Med.* 14, 180–187.
- Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S., Teague, J.L., 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.* 113, 1056–1061.
- Søberg, T., Frederiksen, H., Andersson, A.M., 2013. Considerations for estimating daily intake values of non-persistent environmental endocrine disruptors based on urinary biomonitoring data. *Reproduction* 147, 455–463.
- Teitelbaum, S.L., Britton, J.A., Calafat, A.M., Ye, X., Silva, M.J., Reidy, J.A., Galvez, M.P., Brenner, B.L., Wolff, M.S., 2008. Temporal variability in urinary concentrations of phthalate metabolites, phytoestrogens and phenols among minority children in the United States. *Environ. Res.* 106, 257–269.
- Townsend, M.K., Franke, A.A., Li, X., Hu, F.B., Eliassen, A.H., 2013. Within-person reproducibility of urinary bisphenol A and phthalate metabolites over a 1 to 3 year period among women in the Nurses' Health Studies: a prospective cohort study. *Environ. Health* 12, 80.
- Watkins, D.J., Eliot, M., Sathyanarayana, S., Calafat, A.M., Yolton, K., Lanphear, B.P., Braun, J.M., 2014. Variability and predictors of urinary concentrations of phthalate metabolites during early childhood. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8881–8890.
- Wittassek, M., Koch, H.M., Angerer, J., Brüning, T., 2011. Assessing exposure to phthalates—the human biomonitoring approach. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 31–37.

**Publication 6 - Appendix A. Supplementary material**

Temporal variability of urinary concentrations of phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in a Belgian adult population.

Lucas DEWALQUE, Catherine PIRARD, Sarah VANDEPAER, Corinne CHARLIER

**Contents**

**Table S1** - Estimation of the cumulative risk of exposure to phthalates.

**Table S2** - Phthalate metabolite, paraben and BP3 volumetric [ $\mu\text{g/L}$ ] and creatinine-adjusted concentrations [ $\mu\text{g/g creatinine}$ ] in 351 urine samples collected over a 120 day period in 32 Belgian participants.

**Table S3** - Estimated daily intakes (EDI) of phthalates and hazard index (HI) obtained from the 351 urine samples collected over a 120-day period in 32 Belgian participants.

**Table S4** - Intraclass coefficient correlation (ICC) obtained in female and male participants using volumetric concentrations for parabens, phthalate metabolites, BP3 and hazard index (HI).

**Table S5** - Number of participants having spot samples included in the same tertile group (low, medium and high) for volumetric concentrations.

**Supplementary material references**

**Table S1**

Estimation of the cumulative risk of exposure to phthalates.

Calculated parameter [unit]	Equation	Required parameter [unit]	Reference
<b>EDI [µg/kg bw/day]</b> Estimated daily intake	$EDI = \frac{C_v \times UV \times MW_d}{bw \times F_{UE} \times MW_m}$	<p><math>C_v</math> [µg/L] is the biomarker volumetric concentration. UV [L/day] is the 24 h average urine volume equal to 1.60 L/day and 1.70 L/day for adult women and men respectively. Bw [kg] is the body weight. Height [cm]. <math>MW_d</math> and <math>MW_m</math> [µg/µmol] are the molecular weight of phthalate diesters and metabolites respectively. <math>F_{ue}</math> is the excretion molar fraction, equal to 0.69, 0.70, 0.73 and 0.32 for MnBP, MiBP, MBzP and the molar sum of the three followed DEHP metabolites, respectively. It is assumed to be 0.69 for MEP by analogy to DnBP.</p>	(1-6)
<b>HI</b> Hazard index	$HI = \frac{EDI_{DnBP}}{TDI_{DnBP}} + \frac{EDI_{DiBP}}{TDI_{DnBP}} + \frac{EDI_{DEHP}}{TDI_{DEHP}}$	<p>TDI is the tolerable daily intake [µg/kg bw/day]. TDI are 10 and 50 µg/kg bw/day for DnBP and DEHP, respectively.</p>	(7, 8)

## Partie IVc : Chrono-variabilité de l'exposition

**Table S2**

Phthalate metabolite, paraben and BP3 volumetric [ $\mu\text{g/L}$ ] and creatinine-adjusted concentrations [ $\mu\text{g/g creatinine}$ ] in 351 urine samples collected over a 120 day period in 32 Belgian participants.

	N > LOD (%)	GM (95% CI)		Percentile		Range		
				50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>	Min	-	Max
<b>Uncorrected for creatinine [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>								
MP	99,7%	13,0	(10.7-15.8)	10,4	299,6	<LOD	-	2206,8
EP	98,3%	2,0	(1.7-2.4)	1,6	45,1	<LOD	-	306,0
PP	76,1%	0,9	(0.7-1.1)	0,7	47,9	<LOD	-	604,6
BP	34,2%	<LOD	(<LOD-0.4)	<LOD	6,6	<LOD	-	32,5
MEP	100,0%	25,3	(21.5-29.8)	20,4	473,5	1,1	-	1946,4
MnBP	100,0%	12,6	(11.5-13.9)	12,5	58,0	1,3	-	290,1
MiBP	100,0%	11,9	(10.7-13.2)	10,6	88,2	1,9	-	468,4
MBzP	99,7%	2,5	(2.3-2.7)	2,6	10,0	<LOD	-	29,1
5-oxo-MEHP	100,0%	3,1	(2.8-3.4)	3,3	11,6	0,2	-	119,1
5-OH-MEHP	100,0%	4,2	(3.8-4.6)	4,2	15,8	0,2	-	149,5
MEHP	99,1%	2,0	(1.9-2.2)	1,9	4,8	<LOD	-	18,8
BP3	76,4%	0,8	(0.7-1.0)	0,8	19,7	<LOD	-	99,8
<b>Corrected for creatinine [<math>\mu\text{g/g creatinine}</math>]</b>								
MP	99,7%	11,0	(9.1-13.3)	11,1	179,4	<LOD	-	706,2
EP	98,3%	1,7	(1.4-2.0)	1,3	33,6	<LOD	-	230,2
PP	76,1%	0,7	(0.6-0.9)	0,7	31,3	<LOD	-	204,0
BP	34,2%	<LOD	(<LOD-0.3)	<LOD	4,7	<LOD	-	28,1
MEP	100,0%	21,4	(18.5-24.7)	17,0	267,1	1,2	-	1047,0
MnBP	100,0%	10,7	(10.0-11.4)	10,1	34,0	2,3	-	231,7
MiBP	100,0%	10,0	(9.2-10.9)	8,7	47,0	1,8	-	496,5
MBzP	99,7%	2,1	(2.0-2.3)	2,0	6,3	<LOD	-	14,0
5-oxo-MEHP	100,0%	2,6	(2.5-2.8)	2,4	7,3	0,7	-	170,9
5-OH-MEHP	100,0%	3,5	(3.3-3.8)	3,3	10,2	0,8	-	214,5
MEHP	99,1%	1,7	(1.6-1.8)	1,7	4,7	<LOD	-	25,0
BP3	76,4%	0,7	(0.6-0.8)	0,6	12,6	<LOD	-	101,8

## Partie IVc : Chrono-variabilité de l'exposition

**Table S3**

Estimated daily intakes (EDI) of the phthalates and hazard index (HI) obtained from the 351 urine samples collected over a 120-day period in 32 Belgian participants.

	Percentile		Maximum	TDI <sup>1</sup> (RfD)	N ≥ TDI/RfD (%)
	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>			
<b>Estimated daily intake [µg/kg bw/day]</b>					
DEP	0,84	18,58	70,36	(800)	0,0
DnBP	0,57	2,39	12,79	10	0,3
DiBP	0,47	4,44	26,18	10 <sup>2</sup>	2,0
BBzP	0,11	0,41	1,10	500	0,0
DEHP	0,99	3,35	31,83	50	0,0
<b>Hazard index</b>					<b>N ≥ 1 (%)</b>
HI	0,14	0,74	3,06		2,8

1 : (7-10)

2 : TDI of DnBP was attributed to DiBP by analogy.

**Table S4**

Intraclass coefficient correlation (ICC) obtained in female and male participants using volumetric concentrations for parabens, phthalate metabolites, BP3 and hazard index (HI).

	ICC		<i>p-value</i> <sup>a</sup>
	Female (N=20, n=219)	Male (N=12, n=132)	
MP	0,51	0,48	0,85
EP	0,53	0,47	0,72
PP	0,52	0,71	0,19
BP	0,50	0,29	0,29
MEP	0,47	0,64	0,24
MnBP	0,38	0,42	0,82
MiBP	0,63	0,47	0,35
MBzP	0,29	0,22	0,65
MEHP	0,22	0,11	0,49
5-oxo-MEHP	0,26	0,25	0,90
5-OH-MEHP	0,26	0,27	0,96
BP3	0,62	0,54	0,61
HI	0,50	0,44	0,72

a:  $\chi^2$  test comparing ICC obtained in male and female participants.

N is the number of participants, n is the total number of urine samples.

**Table S5**

Number of participants having spot samples included in the same tertile group (low, medium and high) for volumetric concentrations.

Number of spot in the same tertile group - <b>N (%)</b>	MP	EP	PP	BP	MEP	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	5-oxo-MEHP	5-OH-MEHP	BP3
11	2 (6%)	4 (13%)	5 (16%)	13 (41%)	2 (6%)	1 (3%)	5 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6%)
≥10	6 (19%)	8 (25%)	9 (28%)	16 (50%)	7 (22%)	4 (13%)	6 (19%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	9 (28%)
≥9	10 (31%)	12 (38%)	14 (44%)	21 (66%)	12 (38%)	8 (25%)	10 (31%)	4 (13%)	5 (16%)	7 (22%)	6 (19%)	11 (34%)
≥8	17 (53%)	19 (59%)	21 (66%)	27 (84%)	14 (44%)	12 (38%)	11 (34%)	9 (28%)	6 (19%)	8 (25%)	8 (25%)	15 (47%)
≥7	21 (66%)	22 (69%)	24 (75%)	30 (94%)	22 (69%)	17 (53%)	13 (41%)	14 (44%)	12 (38%)	14 (44%)	15 (47%)	20 (63%)
≥6	27 (84%)	28 (88%)	30 (94%)	31 (97%)	29 (91%)	23 (72%)	23 (72%)	19 (59%)	22 (69%)	20 (63%)	23 (72%)	26 (81%)

### Supplementary material references

1. Perucca, J.; Bouby, N.; Valeix, P.; Bankir, L. Sex difference in urine concentration across differing ages, sodium intake, and level of kidney disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, 292, R700–R705.
2. Koch, H.M.; Becker, K.; Wittassek, M.; Seiwert, M.; Angerer, J.; Kolossa-Gehring, M. Di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate - urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German Environmental Survey on children. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2007**, 17, 378–387.
3. Anderson, W.A.; Castle, L.; Scotter, M.J., Massey, R.C., Springall, C. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit. Contam.* **2001**, 18, 1068–1074.
4. Koch, H.M.; Christensen, K.L.; Harth, V.; Lorber, M.; Brüning, T. Di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP) metabolism in a human volunteer after single oral doses. *Arch. Toxicol.* **2012**, 86, 1829–1839.
5. Anderson, W.A.; Castle, L.; Hird, S.; Jeffery, J.; Scotter, M.J. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, 49, 2022–2029.
6. Dewalque, L.; Charlier, C.; Pirard C. Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population. *Toxicol. Lett.* **2014**, 231, 161–168.
7. European Food Safety Authorities. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *EFSA J.* **2005**, 243, 1–20.
8. European Food Safety Authorities. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and material in contact with food (AFC) on a request from the commission related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. *EFSA J.* **2005**, 242, 1–17.
9. European Food Safety Authorities. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to butylbenzylphthalate (BBP) for use in food contact materials. *EFSA J.* **2005**, 241, 1–14.
10. *Integrated risk information system (IRIS). Diethyl Phthalate (CASRN 84-66-2)*; United State Environmental Protection Agency; National Center for Environmental Assessment; Office of Research and Development: Washington, DC, 1993. <http://www.epa.gov/iris/>.

## **Partie V : Discussion et perspectives**



La méthode analytique sur laquelle s'appuie notre travail permet de doser simultanément 12 biomarqueurs urinaires d'exposition aux phtalates, parabènes et BP3. Les techniques publiées dans la littérature n'autorisent pas cette approche globale (Blount et al., 2000 ; Silva et al., 2003a ; Chen et al., 2012a, 2012b ; Ye et al., 2005a, 2005b, 2006b ; Kato et al., 2005 ; Silva et al., 2007 ; Preuss et al., 2005 ; Koch et al., 2003a ; León et al., 2010a ; Frederiksen et al., 2011). La première étape du développement analytique a consisté à mettre au point les conditions SPE et UHPLC-MS/MS permettant de détecter ces trois classes de PE dans l'urine avec suffisamment de sensibilité pour la réalisation d'études épidémiologiques. Dans une deuxième phase, trois conditions de préparation d'échantillon ont été comparées, l'une sans hydrolyse et deux autres avec hydrolyse enzymatique par  $\beta$ -glucuronidases d'*Helix pomatia* ou d'*Escherichia coli*. Le but était, d'une part, de s'assurer que l'utilisation de la  $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia* ne générât pas des contaminants monoesters de phtalates en quantités trop importantes, et, d'autre part, de mesurer les proportions relatives des biomarqueurs sous formes libre, sulfoconjuguée et glucuroconjuguée. Globalement, les résultats obtenus étaient en accord avec les données présentes dans la littérature (Janjua et al., 2008a ; Ye et al., 2005a, 2005b, 2006b ; Silva et al., 2003a), à savoir une élimination urinaire des polluants majoritairement sous forme conjuguée à l'exception du MEP qui est éliminé principalement sous forme libre.

Après avoir validé la méthode analytique, nous avons effectué une étude relative à la contamination des individus habitant en province de Liège avec des résultats supérieurs aux limites de détection pour la majorité des biomarqueurs chez presque tous les participants. L'exposition liégeoise aux phtalates, parabènes et BP3 est donc ubiquitaire. La comparaison de nos résultats avec d'autres données belges a permis de constater que les concentrations urinaires des métabolites de phtalates mesurées en province de Liège étaient similaires à celles retrouvées chez les enfants et les mères belges de l'étude (DEMO)COPHES (DEMOCOPHES, 2013). Par contre, les adolescents de l'étude flamande FLEHS semblaient plus exposés au BBzP et au DEHP (Geens et al., 2014).

Notre étude épidémiologique a mis en évidence que l'importance du niveau d'exposition est variable d'un individu à l'autre. Par exemple, les concentrations urinaires des différents parabènes étaient significativement plus élevées chez les

femmes que chez les hommes, peut-être parce que la femme utilise plus fréquemment des cosmétiques contenant des parabènes. Le sexe n'est pas un élément clairement discriminant pour les autres PE, même si cela est surprenant pour les DEP, DiBP, DnBP ou BP3 également présents dans divers cosmétiques. D'autres études avaient d'ailleurs établi une corrélation positive entre l'utilisation de cosmétiques et le niveau de contamination par ces produits chez la femme (Romero-Franco et al., 2011 ; Lewis et al., 2013 ; Meeker et al., 2013). Le niveau d'exposition peut aussi varier en fonction de l'âge. C'est le cas dans notre population où tous les métabolites de phtalates, sauf le MEP, étaient présents à des concentrations supérieures chez les enfants. Pour certains, cette caractéristique épidémiologique s'explique par le fait que, par rapport au poids corporel, les apports alimentaires (contamination digestive) et la fréquence respiratoire (contamination pulmonaire) sont plus importants chez l'enfant (Silva et al., 2004). Une autre explication réside dans le fait que, passant plus de temps à l'intérieur des maisons et portant à la bouche divers jouets et articles de puériculture en plastique, l'enfant pourrait être plus exposé que l'adulte (Silva et al., 2004). Les niveaux urinaires de BP3 et de certains parabènes étaient également variables selon l'âge mais ceci est plus difficilement interprétable.

Ces observations interpellent, notamment et surtout parce que les populations les plus vulnérables aux PE sont les femmes en âge de procréer et les enfants (OMS/PNUE, 2012), surexposés aux parabènes pour les femmes et aux phtalates pour les enfants. Les parabènes et les phtalates interfèrent avec la production et l'effet des hormones des systèmes reproducteur et thyroïdien (Morohoshi et al., 2005 ; Kunz et Fent, 2006 ; Schmutzler et al., 2007 ; Gomez et al., 2005 ; Oishi 2001 ; Vo et al., 2010 ; O'Connor et al., 2002 ; Borch et al., 2004), lesquels sont impliqués dans la croissance de l'individu, dans le développement cognitif et comportemental, dans les mécanismes biochimiques de la puberté et de la fertilité. De façon inquiétante, de plus en plus d'équipes ont réussi à associer les niveaux d'exposition à ces composés à des perturbations de ces fonctions physiologiques (Wolff et al., 2008 ; Philippat et al., 2012 ; Meeker et al., 2011 ; Koeppe et al., 2013 ; Pant et al., 2014 ; Specht et al., 2014 ; Huang et al., 2014a ; Liu et al., 2012 ; Wirth et al., 2008 ; Hauser et al., 2006, 2007 ; Zhang et al., 2006 ; Jönsson et al., 2005 ; Duty et al., 2003 ; Hauser, 2008). Une autre observation intéressante résultant de notre

étude épidémiologique est l'existence de corrélations, parfois importantes, entre les différents parabènes et entre les différents phtalates, ce qui révèle des sources communes d'exposition. Certains phtalates et certains parabènes sont connus pour être associés dans divers produits commerciaux (Wittassek et al., 2011 ; Boberg et al., 2010). Parmi les PE étudiés, plusieurs partagent les mêmes mécanismes d'action, ce qui laisse penser qu'une exposition simultanée pourrait générer des effets additifs ou synergiques chez l'être humain comme cela a été observé chez l'animal (Howdeshell et al., 2008 ; Christiansen et al., 2009).

Pour évaluer, mieux que par des mesures urinaires, le risque potentiel d'effets additifs lié à l'exposition simultanée à plusieurs phtalates, nous avons traduit leurs concentrations urinaires en doses d'exposition journalière. Cette méthodologie repose sur la connaissance de la toxicocinétique des phtalates (pour les parabènes et la BP3, l'absence de données toxicocinétiques ne permet pas la même estimation). Les doses journalières estimées pour chaque phtalate ont été comparées aux DJA publiées par l'EFSA ou, dans le cas du DEP, à la RfD de l'US EPA (EFSA, 2005a, 2005b, 2005c ; US EPA 1993). Peu de dépassements de ces valeurs seuils ont été observés pour les différents phtalates considérés isolément. Par contre, le nombre de dépassements des valeurs seuils était important lorsque les doses journalières d'exposition aux phtalates partageant le même mécanisme d'action biochimique étaient additionnées. Chez 25% des enfants âgés de 1 à 12 ans nous avons observé des dépassements de ces valeurs seuils. Il faut souligner que cette mesure de risque ne tenait compte que de trois phtalates anti-androgéniques alors qu'il existe de nombreux autres polluants qui possèdent également des propriétés anti-androgéniques et auxquels la population est couramment exposée comme par exemple, le BPA, le DDE, certains PCBs, certains parabènes, la BP3, la vinclozoline, le linuron, etc. (Pirard et al., 2012 ; Kortenkamp et Faust, 2010 ; NHANES, 2015). De plus, cette façon de calculer le risque ne prend en considération que les effets additifs alors que des effets synergiques ont été observés chez le rongeur lors de la co-administration de phtalates et de pesticides à des doses inférieures aux différentes NOAEL (Christiansen et al., 2009).

Dans le but d'évaluer si une analyse urinaire, quel que soit le moment où l'urine est prélevée, est représentative du niveau d'exposition chronique d'un individu, nous avons réalisé une étude de chrono-variabilité de l'exposition. À ce jour, aucune étude

de ce type n'avait été réalisée en Belgique. Trente-deux individus originaires de la province de Liège ont participé à cette étude en fournissant un échantillon d'urine prélevé à n'importe quel moment de la journée chaque jour pendant une semaine, puis une fois par mois pendant 4 mois. Même si les taux urinaires des différents composés semblaient variables, la valeur prédictive d'une mesure aléatoire de ces biomarqueurs urinaires est satisfaisante pour la BP3, les différents parabènes ainsi que pour le MEP et le MiBP. Des études épidémiologiques recourant à l'analyse d'un seul prélèvement urinaire pour évaluer l'exposition sont donc pertinentes (Abidi et al., 2008 ; Fisher et al., 2015 ; Rosner et al., 2011). Dans le cas des BBzP, DEHP et DnBP, la reproductibilité et la valeur prédictive d'une analyse aléatoire étaient plus faibles. Par ailleurs, l'utilisation de la créatininurie pour corriger la dilution de l'urine n'a pas permis d'améliorer significativement la reproductibilité des résultats. L'appréciation du risque d'effets cumulatifs par le calcul d'un HI à partir d'une analyse effectuée sur un échantillon d'urine prélevé de façon aléatoire est également prédictive du risque d'effets cumulatifs chroniques.

Comment expliquer que la valeur prédictive d'une mesure aléatoire soit correcte pour certains PE (BP3, parabènes, DEP, DiBP) et moins satisfaisante pour d'autres (BBzP, DEHP, DnBP) ? Les parabènes, la BP3, le MEP et MiBP sont couramment utilisés dans les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle (Wittassek et al., 2011 ; Boberg et al., 2010 ; Kim et al., 2014), ce qui explique que leur utilisation répétée, associée à un passage ralenti lors de l'absorption à travers la barrière cutanée, réduit l'influence des effets pics et vallées et conduit à un niveau plus constant d'exposition. Par contre, pour les polluants dont la source principale est l'alimentation, les niveaux d'exposition sont moins constants et dès lors, la reproductibilité du dosage des biomarqueurs urinaires est moins satisfaisante. Pour les DEHP, les travaux de Koch et al. (2013) et de Fromme et al. (2007a, 2013a) illustrent l'importance de la voie alimentaire comme source de contamination. Les variations importantes des niveaux urinaires des biomarqueurs du DEHP pourraient alors être le signe d'une alimentation variée ou de l'hétérogénéité du degré de contamination des aliments, ce qui a déjà été démontré pour le BPA (Sioen et al., 2012 ; Meeker et al., 2013 ; Philippat et al., 2013). Si, pour le DnBP et le BBzP, la littérature scientifique n'identifie pas de source d'exposition majoritaire (Fromme et al., 2007a, 2013a ; Bekö et al., 2013 ; Clark et al., 2011 ; Wormuth et al., 2006), nos

travaux indiquent, par les corrélations importantes entre les métabolites des DnBP et BBzP et ceux du DEHP, que ces trois composés pourraient partager une voie commune d'exposition, probablement alimentaire.

Si on ne considère que les plus hautes valeurs d'exposition, il est intéressant également de déterminer si elles correspondent à un pic de contamination passager ou si elles reflètent une imprégnation importante à long terme. Nous avons montré que les dosages de MiBP et BP3 et le calcul des HI à partir d'un échantillon urinaire aléatoire permet de classer correctement l'individu comme étant fortement et chroniquement exposé au DiBP, à la BP3 et au cocktail de phtalates pris en considération pour le calcul du HI. Pour les autres composés étudiés, nous avons plutôt observé des pics d'exposition transitoires. Ces fortes expositions sur de courtes durées n'en sont pas moins préoccupantes étant donné la vulnérabilité de certaines populations, comme les femmes enceintes et les enfants, aux effets des PE. Ceci soulève la question de l'extrapolation des résultats d'expérimentation animale à l'Homme, puisque l'exposition des animaux de laboratoire est réalisée à dose constante.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus dans notre étude – pourcentage élevé de contamination de la population, taux urinaires parfois importants, effets cumulatifs de certains PE – et des données de la littérature établissant une relation entre l'imprégnation de l'Homme et certaines pathologies, la réduction de l'exposition humaine aux PE doit être une priorité absolue. L'OMS/PNUE (2012) et de nombreux scientifiques (par exemple, The 2013 Berlaymont Declaration on Endocrine Disrupters) conseillent également l'application du principe de précaution et la réduction de l'exposition. Pour atteindre cet objectif, on doit caractériser le plus précisément possible les différentes sources d'exposition potentielle de l'Homme.

Certaines sources ont été identifiées en mettant en relation les taux urinaires de biomarqueurs de PE et les conditions de vie des 2 jours qui précèdent le prélèvement. Par exemple, les parabènes, la BP3 et les phtalates, surtout DiBP, DEP et DnBP, ont été associés, principalement chez les femmes, à l'utilisation récente de cosmétiques avec, pour le DEP, des concentrations de biomarqueurs proportionnelles au nombre de produits appliqués sur la peau (Sathyanarayana et al., 2008 ; Romero-Franco et al., 2011 ; Lewis et al., 2013 ; Meeker et al., 2013 ; Parlett et al., 2013 ; Duty et al., 2005 ; Cantonwine et al., 2014 ; Berman et al., 2009 ;

DEMOCOPHES, 2013 ; Just et al., 2010 ; Buckley et al., 2012). Certains médicaments contiennent du DnBP ou du DiBP et constituent ainsi une autre source de contamination (Seckin et al., 2009 ; Hernández-Díaz et al., 2009, 2013). La consommation de certains aliments est également corrélée à la présence dans l'urine de métabolites des DEHP, DnBP et BBzP ainsi que de certains parabènes mais dans une moindre mesure et de façon moins significative (Kim et al., 2014 ; Saravanabhavan et al., 2013 ; Cantonwine et al., 2014 ; Mervish et al., 2014). Qu'en est-il de l'influence de la conservation ou de la cuisson (au microonde) des aliments dans des récipients en plastique ? Certaines études en font une source de contamination par les phtalates (Cantonwine et al., 2014 ; Yan et al., 2009 ; Chen et al., 2008 ; Colacino et al., 2011 ; Kim et al., 2014) mais ce n'est pas le cas de tous les travaux publiés (Mervish et al., 2014 ; Lewis et al., 2013). En Belgique, les aliments sont généralement contaminés en phtalates (Fierens et al., 2012a, 2012b ; Sioen et al., 2012), mais l'origine de cette contamination est plutôt à rechercher du côté du processus de fabrication que de la conservation dans du plastique (Fierens et al., 2012b, 2013 ; Van Holderbeke et al., 2014). Enfin, l'intérieur de nos maisons est également contaminé par des phtalates, notamment suite à des travaux de rénovation ainsi qu'à l'utilisation de matériaux de construction en PVC (Buckley et al., 2012 ; DEMOCOPHES, 2013). De façon plus intéressante encore, on a établi une corrélation entre les niveaux de phtalates dans l'air ou dans les poussières et les concentrations urinaires de leur(s) métabolite(s) (Langer et al., 2014 ; Fromme et al., 2013b ; Just et al., 2010).

Les sources d'exposition des parabènes et de la BP3 ont été moins étudiées que celles des phtalates. Si la plupart des auteurs s'accordent pour reconnaître que les cosmétiques constituent la voie d'exposition majeure pour les parabènes en absence de prise de médicaments (Błędzka et al., 2014 ; Boberg et al., 2010 ; CIR, 2008), la situation n'est pas aussi claire pour la BP3, utilisée principalement dans les crèmes solaires. Cependant la fréquence de positivité de ce biomarqueur dans l'urine est très importante dans la population liégeoise alors qu'il est peu probable qu'elle utilise des crèmes solaires durant toute l'année. D'autres sources d'exposition sont évoquées pour expliquer cette imprégnation ubiquitaire, comme les cosmétiques (Krause et al., 2012 ; Wang et Kannan, 2013b), l'eau contaminée (Kim et Choi,

2014), l'environnement intérieur de nos maisons (Wang et al., 2013 ; Kim et Choi, 2014) ou la contamination alimentaire.

Pour démontrer la relation entre l'exposition aux PE et la contamination des individus, des mesures de PE devraient être réalisées d'une part dans l'environnement direct de l'individu (les aliments, l'air et les poussières de maisons, les cosmétiques) et d'autre part dans une matrice biologique. Cette démarche permettrait de comparer l'exposition totale, obtenue par le biais du biomonitoring humain, avec les apports par les différentes voies d'exposition. Cette approche nécessiterait cependant de bonnes connaissances de la toxicocinétique des composés étudiés ainsi que de la relation entre la dose d'exposition et les niveaux de biomarqueurs (Søeborg et al., 2014). Ceci a déjà été appliqué aux phtalates par plusieurs auteurs allemands et danois qui ont étudié la contribution des aliments et de l'environnement intérieur de nos maisons à l'exposition totale (Fromme et al., 2007a, 2013a, 2013b ; Bekö et al., 2013).

Afin de réduire le risque lié à l'exposition aux PE, plusieurs équipes ont mis en place des études d'intervention. Ji et al. (2010) ont mis en évidence une réduction significative des taux urinaires des métabolites des DEP, DnBP, DiBP et DEHP après 5 jours de régime végétarien et de vie bouddhique dans un temple Coréen. Dans un environnement plus occidental, Rudel et al. (2011) ont réussi à diminuer les niveaux urinaires des BPA et DEHP, mais pas des autres phtalates (BBzP, DnBP, DEP et diméthyle phtalate), lors d'une alimentation exclusive par des produits frais n'ayant pas été en contact avec des plastiques. Une autre étude dans laquelle des femmes enceintes ne consommaient que des aliments frais n'a pas réussi à démontrer un impact de ce mode d'alimentation sur les niveaux d'exposition aux phtalates (Barrett et al., 2015). Dans un autre groupe de volontaires, les auteurs ont testé l'impact de la distribution d'une brochure explicative fournissant divers conseils d'éviction des sources d'exposition aux phtalates et BPA (par exemple, éviter les plastiques de type PVC) sur le niveau de contamination des participants, mais sans résultat (Sathyanarayana et al., 2013).

Pour les parabènes, une étude récente a montré que le remplacement des cosmétiques contenant ces PE par d'autres qui n'en contiennent pas a permis, de façon assez logique, de réduire l'exposition à ces composés (Koch et al., 2014). Toujours dans cette étude, en ce qui concerne la BP3, elle a été détectée dans la

majorité des urines récoltées alors qu'elle n'était pas indiquée dans la liste des ingrédients contenus dans les cosmétiques, soit parce que les listes d'ingrédients ne sont pas complètes, soit parce que d'autres sources d'exposition interviennent (Koch et al., 2014).

En conclusion, la réduction de l'exposition humaine aux PE est un problème difficile et non résolu. Les différentes études d'intervention évoquées portaient sur de petits nombres de sujets et n'envisageaient généralement qu'une seule voie d'entrée dans l'organisme. Même si elles sont difficiles à mettre en œuvre, des études d'intervention plus structurées devraient être envisagées prévoyant la suppression simultanée des diverses sources d'exposition : utilisation de produits frais, éviction de certains plastiques lors de la cuisson des aliments, réduction du nombre de cosmétiques utilisés, utilisation de cosmétiques sans parabènes, phtalates et BP3, choix de matériaux de construction sans phtalates, diminution des taux ambiants de polluants par nettoyage et aération plus fréquents de nos habitats, etc. Toutes ces propositions restent cependant des alternatives qui ne remplacent pas l'élimination de ces PE du marché. Celle-ci reste probablement le moyen le plus sûr et le plus efficace de réduire l'exposition des populations, comme cela a été illustré pour les DnBP et DEHP pour lesquels les niveaux d'imprégnation humaine durant les deux dernières décennies étaient fortement corrélés à leur volume de production annuel (Wittassek et al., 2011).

Même si la démonstration d'une relation directe entre l'exposition de l'Homme aux différents PE et l'apparition de certaines pathologies reste difficile à établir, il n'empêche que la plupart des travaux effectués par les scientifiques indépendants indique une suspicion assez forte de relation de cause à effet. Les pathologies les plus souvent incriminées sont l'hypofertilité, les anomalies du système génital, la puberté précoce, le cancer du sein, etc. Pour ces raisons, même si les enjeux économiques liés à la commercialisation des PE sont colossaux, il nous paraît plus important encore d'en bannir l'usage.



## Références

Adibi JJ, Whyatt RM, Williams PL, Calafat AM, Camann D, Herrick R, Nelson H, Bhat HK, Perera FP, Silva MJ, Hauser R. Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples. *Environ Health Perspect* **2008** ; 116 : 467-473.

Agas D, Sabbieti MG, Marchetti L. Endocrine disruptors and bone metabolism. *Arch Toxicol* **2013**; 87 :735-751.

Aksglaede L, Sorensen K, Petersen JH, Skakkebaek NE, Juul A. Recent decline in age at breast development: The Copenhagen puberty study. *Pediatrics* **2009** ; 123 : E932-E939.

Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect* **1982** ; 45 : 19-25.

Anderson WA, Castle L, Scotter MJ, Massey RC, Springall C. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit Contam* **2001** ; 18 : 1068-1074.

Anderson WA, Castle L, Hird S, Jeffery J, Scotter MJ. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food Chem Toxicol* **2011** ; 49 : 2022-2029.

Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Gericke C, Grote K, Golombiewski A, Sterner-Kock A, Chahoud I. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology* **2006** ; 228 : 85-97.

Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* **2006** ; 147 : S43-49.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for Diethyl Phthalate (DEP) **1995**.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for di-n-butyl phthalate (DBP) **2001**.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) **2002**.

Aubert N, Ameller T, Legrand JJ. Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food Chem Toxicol* **2012** ; 50 : 445-454.

Baird DD, Saldana TM, Nepomnaschy PA, Hoppin JA, Longnecker MP, Weinberg CR, Wilcox AJ. Within-person variability in urinary phthalate metabolite

concentrations: measurements from specimens after long-term frozen storage. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2010** ; 20 : 169-175.

Balthazart J. Minireview: Hormones and human sexual orientation. *Endocrinology* **2011** ; 152 : 2937-2947.

Barlow NJ, McIntyre BS, Foster PM. Male reproductive tract lesions at 6, 12, and 18 months of age following in utero exposure to di(nbutyl)phthalate. *Toxicol Pathol* **2004** ; 32 : 79-90.

Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. Population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect* **2005** ; 113 : 192-200.

Barrett ES, Velez M, Qiu X, Chen SR. Reducing Prenatal Phthalate Exposure Through Maternal Dietary Changes: Results from a Pilot Study. *Matern Child Health J* **2015** ; doi10.1007/s10995-015-1707-0.

Barthold JS. Undescended testis: current theories of etiology. *Curr Opin Urol* **2008** ; 18 : 395-400.

Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PF. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* **2010** ; 88 : 31-38.

Becker K, Göen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Müller J, Wittassek M, Schulz C, Kolossa-Gehring M. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* **2009** ; 212 : 685-692.

Bekö G, Weschler CJ, Langer S, Callesen M, Toftum J, Clausen G. Children's phthalate intakes and resultant cumulative exposures estimated from urine compared with estimates from dust ingestion, inhalation and dermal absorption in their homes and daycare centers. *PLoS One* **2013** ; 8 : e62442.

Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect* **2007** ; 115 : 138-145.

Berenbaum SA, Beltz AM. Sexual differentiation of human behavior: effects of prenatal and pubertal organizational hormones. *Front Neuroendocrinol* **2011** ; 32 : 183-200.

Berman T, Hochner-Celnikier D, Calafat AM, Needham LL, Amitai Y, Wormser U, Richter E. Phthalate exposure among pregnant women in Jerusalem, Israel: results of a pilot study. *Environ Int* **2009** ; 35 : 353-357.

Berman T, Goldsmith R, Göen T, Spungen J, Novack L, Levine H, Amitai Y, Shohat T, Grotto I. Urinary concentrations of environmental contaminants and phytoestrogens in adults in Israel. *Environ Int* **2013** ; 59 : 478-484.

Bernal J. Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm* **2005** ; 71 : 95-122.

Błędzka D, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ Int* **2014** ; 67 : 27-42.

Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, Malek NA, Reidy JA, Needham LL, Brock JW. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* **2000** ; 72 : 4127-4134.

Boas M, Feldt-Rasmussen U, Main KM. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol* **2012** ; 355 : 240-248.

Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* **2010** ; 30 : 301-312.

Boisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen HE, Haavisto AM, Schmidt IM, Chellakooty M, Damgaard IN, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek NE, Toppari J. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* **2004** ; 363 : 1264-1269.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* **2007** ; 22 : 1506-1512.

Bonfeld-Jørgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* **2007** ; 115 : 69-76.

Borch J, Ladefoged O, Hass U, Vinggaard AM. 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. *Reprod Toxicol* **2004** ; 18 : 53-61.

Bornehag CG, Carlstedt F, Jönsson BA, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, Jonsson C, Janson S, Swan SH. Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environ Health Perspect* **2015** ; 123 : 101-107.

Braun JM, Smith KW, Williams PL, Calafat AM, Berry K, Ehrlich S, Hauser R. Variability of urinary phthalate metabolite and bisphenol A concentrations before and during pregnancy. *Environ Health Perspect* **2012** ; 120 : 739-745.

Brown SB, Hankinson SE. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids* **2014** ; pii : S0039-128X(14)00306-7.

Buck Louis GM, Peterson CM, Chen Z, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, Varner MW, Kennedy A, Giudice L, Fujimoto VY, Sun L, Wang L, Guo Y, Kannan K. Bisphenol A and phthalates and endometriosis: the Endometriosis: Natural History, Diagnosis and Outcomes Study. *Fertil Steril* **2013** ; 100 : 162-169.

Buckley JP, Palmieri RT, Matuszewski JM, Herring AH, Baird DD, Hartmann KE, Hoppin JA. Consumer product exposures associated with urinary phthalate levels in pregnant women. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2012** ; 22 : 468-475.

Bustamante-Montes LP, Hernández-Valero MA, Flores-Pimentel D, García-Fábila M, Amaya-Chávez A, Barr DB, Borja-Aburto VH. Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns. *J Dev Orig Health Dis* **2013** ; 4 : 300-306.

Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* **2004a** ; 113 : e429-434.

Calafat AM, Slakman AR, Silva MJ, Herbert AR, Needham LL. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2004b** ; 805 : 49-56.

Calafat AM, Wong LY, Ye X, Reidy JA, Needham LL. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003--2004. *Environ Health Perspect* **2008** ; 116 : 893-897.

Calafat AM, Koch HM, Swan SH, Hauser R, Goldman LR, Lanphear BP, Longnecker MP, Rudel RA, Teitelbaum SL, Whyatt RM, Wolff MS. Misuse of blood serum to assess exposure to bisphenol A and phthalates. *Breast Cancer Res* **2013** ; 15 : 403.

Cantonwine DE, Cordero JF, Rivera-González LO, Anzalota Del Toro LV, Ferguson KK, Mukherjee B, Calafat AM, Crespo N, Jiménez-Vélez B, Padilla IY, Alshawabkeh AN, Meeker JD. Urinary phthalate metabolite concentrations among pregnant women in Northern Puerto Rico: distribution, temporal variability, and predictors. *Environ Int* **2014** ; 62 : 1-11.

Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* **2011** ; 73 : 135-162.

Casas L, Fernández MF, Llop S, Guxens M, Ballester F, Olea N, Irurzun MB, Rodríguez LS, Riaño I, Tardón A, Vrijheid M, Calafat AM, Sunyer J; INMA Project. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. *Environ Int* **2011** ; 37 : 858-866.

Castelain F, Castelain M. Parabens: a real hazard or a scare story? *Eur J Dermatol* **2012** ; 22 : 723-727.

Chalubinski M, Kowalski ML. Endocrine disruptors--potential modulators of the immune system and allergic response. *Allergy* **2006** ; 61 : 1326-1335.

Charlier CJ, Plomteux GJ. Determination of organochlorine pesticide residues in the blood of healthy individuals. *Clin Chem Lab Med* **2002** ; 40 : 361-364.

- Charlier C, Dubois N, Cucchiaro S, Plomteux G. Analysis of polychlorinated biphenyl residues in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **2003** ; 27 : 74-77.
- Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol* **2007** ; 221 : 278-284.
- Chen ML, Chen JS, Tang CL, Mao IF. The internal exposure of Taiwanese to phthalate--an evidence of intensive use of plastic materials. *Environ Int* **2008** ; 34 : 79-85.
- Chen M, Tao L, Collins EM, Austin C, Lu C. Simultaneous determination of multiple phthalate metabolites and bisphenol-A in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2012a** ; 904 : 73-80.
- Chen M, Zhu P, Xu B, Zhao R, Qiao S, Chen X, Tang R, Wu D, Song L, Wang S, Xia Y, Wang X. Determination of nine environmental phenols in urine by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **2012b** ; 36 : 608-615.
- Chen CY, Chou YY, Wu YM, Lin CC, Lin SJ, Lee CC. Phthalates may promote female puberty by increasing kisspeptin activity. *Hum Reprod* **2013** ; 28 : 2765-2773.
- Cho SC, Bhang SY, Hong YC, Shin MS, Kim BN, Kim JW, Yoo HJ, Cho IH, Kim HW. Relationship between environmental phthalate exposure and the intelligence of school-aged children. *Environ Health Perspect* **2010** ; 118 : 1027-1032.
- Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Kortenkamp A, Hass U. Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environ Health Perspect* **2009** ; 117 : 1839-1846.
- Chryssikopoulos A. The relationship between the immune and endocrine systems. *Ann N Y Acad Sci* **1997** ; 816 : 83-93.
- Clark KE, David RM, Guinn R, Kramarz KW, Lampi MA, Staples CA. Modeling Human Exposure to Phthalate Esters: A Comparison of Indirect and Biomonitoring Estimation Methods. *Hum Ecol Risk Assess* **2011** ; 17 : 923-965.
- Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Petraglia F. High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* **2003** ; 18 : 1512-1515.
- Colacino JA, Soliman AS, Calafat AM, Nahar MS, Van Zomeren-Dohm A, Hablas A, Seifeldin IA, Rozek LS, Dolinoy DC. Exposure to phthalates among premenstrual girls from rural and urban Gharbiah, Egypt: a pilot exposure assessment study. *Environ Health* **2011** ; 10 : 40.

Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* **2000** ; 108 : 895-900.

Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R, Pfeifer M, Pignatelli D, Pugeat M, Yildiz BO; ESE PCOS Special Interest Group. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur J Endocrinol* **2014** ; 171 : P1-29.

Corona G, Baldi E, Maggi M. Androgen regulation of prostate cancer: where are we now? *J Endocrinol Invest* **2011**; 34 : 232-243.

Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (CIR). Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol* **2008** ; 27 : 1-82.

Cowan-Ellsberry CE, Robison SH. Refining aggregate exposure: example using parabens. *Regul Toxicol Pharmacol* **2009** ; 55 : 321-329.

Crofton KM. Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures. *Int J Androl* **2008** ; 31 : 209-223.

Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* **2011** ; 378 : 31-40.

Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Horton RA, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *J Appl Toxicol* **2002** ; 22 : 219-226.

Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol* **2004** ; 24 : 5-13.

Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol* **2008** ; 28 : 561-578.

Darbre PD. Underarm antiperspirants/deodorants and breast cancer. *Breast Cancer Res* **2009** ; 11 : S5.

Darbre PD, Harvey PW. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J Appl Toxicol* **2014** ; 34 : 925-938.

De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* **2012** ; 2012 : 713696.

Déchaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perrière AB, Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* **1999** ; 64 : 328-334.

DEMOCOPHES. National Report on Human Biomonitoring in Mothers and Children—Belgium **2013**, <http://www.eu-hbm.info>. Consulté le 03 mars 2015.

Den Hond E, Paulussen M, Geens T, Bruckers L, Baeyens W, David F, Dumont E, Loots I, Morrens B, de Belleaux BN, Nelen V, Schoeters G, Van Larebeke N, Covaci A. Biomarkers of human exposure to personal care products: results from the Flemish Environment and Health Study (FLEHS 2007-2011). *Sci Total Environ* **2013** ; 463-464 : 102-110.

Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* **2009** ; 304 : 43-48.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* **2009** ; 30 : 293-342.

Dirinck E, Dirtu AC, Geens T, Covaci A, Van Gaal L, Jorens PG. Urinary phthalate metabolites are associated with insulin resistance in obese subjects. *Environ Res* **2015** ; 137 : 419-423.

Dirtu AC, Geens T, Dirinck E, Malarvannan G, Neels H, Van Gaal L, Jorens PG, Covaci A. Phthalate metabolites in obese individuals undergoing weight loss: Urinary levels and estimation of the phthalates daily intake. *Environ Int* **2013** ; 59 : 344-353.

Dodson RE, Nishioka M, Standley LJ, Perovich LJ, Brody JG, Rudel RA. Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environ Health Perspect* **2012** ; 120 : 935-943.

Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* **2003** ; 14 : 269-277.

Duty SM, Ackerman RM, Calafat AM, Hauser R. Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters. *Environ Health Perspect* **2005** ; 113 : 1530-1535.

Engel SM, Miodovnik A, Canfield RL, Zhu C, Silva MJ, Calafat AM, Wolff MS. Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning. *Environ Health Perspect* **2010** ; 4 : 565-571.

Eriksson E, Andersen HR, Ledin A. Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *J Hazard Mater* **2008** ; 156 : 240-259.



Euling SY, Selevan SG, Pescovitz OH, Skakkebaek NE. Role of environmental factors in the timing of puberty. *Pediatrics* **2008** ; 121 : S167-S171.

European Chemicals Agency. <http://echa.europa.eu/web/guest/regulations/reach>, Consulté le 09 février **2015**.

European Chemicals Bureau. European Union Risk Assessment Report for dibutyl phthalate (with addendum 2004), Ispra, Italy **2004**.

European Chemicals Bureau. European Union Risk Assessment Report for BenzylButyl Phthalate (Final Report 2007), Ispra, Italy **2007**.

European Chemicals Bureau. European Union Risk Assessment Report for Bis(2-ethylhexyl) phthalate (Final Report 2008), Ispra, Italy **2008**.

European Food Safety Authorities. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *EFSA J* **2005a** ; 243 : 1-20.

European Food Safety Authorities. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and material in contact with food (AFC) on a request from the commission related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. *EFSA J* **2005b** ; 242 : 1-17.

European Food Safety Authorities. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to butylbenzylphthalate (BBP) for use in food contact materials. *EFSA J* **2005c** ; 241 : 1-14.

Fierens T, Servaes K, Van Holderbeke M, Geerts L, De Henauw S, Sioen I, Vanermen G. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food Chem Toxicol* **2012a** ; 50 : 2575-2583.

Fierens T, Van Holderbeke M, Willems H, De Henauw S, Sioen I. Phthalates in Belgian cow's milk and the role of feed and other contamination pathways at farm level. *Food Chem Toxicol* **2012b** ; 50 : 2945-2953.

Fierens T, Van Holderbeke M, Willems H, De Henauw S, Sioen I. Transfer of eight phthalates through the milk chain--a case study. *Environ Int* **2013** ; 51 : 1-7.

Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* **2004** ; 127 : 305-315.

Fisher M, Arbuckle TE, Mallick R, LeBlanc A, Hauser R, Feeley M, Koniecki D, Ramsay T, Provencher G, Bérubé R, Walker M. Bisphenol A and phthalate metabolite urinary concentrations: Daily and across pregnancy variability. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2015** ; 25 : 231-239.

Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson AM. Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **2010** ; 34 : 400-410.

Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson AM. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2011** ; 21 : 262-271.

Frederiksen H, Sørensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen CP, Petersen JH, Skakkebaek NE, Andersson AM, Juul A. High urinary phthalate concentration associated with delayed pubarche in girls. *Int J Androl* **2012** ; 35 : 216-226.

Frederiksen H, Kranich SK, Jørgensen N, Taboureau O, Petersen JH, Andersson AM. Temporal variability in urinary phthalate metabolite excretion based on spot, morning, and 24-h urine samples: considerations for epidemiological studies. *Environ Sci Technol* **2013a** ; 47 : 958-967.

Frederiksen H, Nielsen JK, Mørck TA, Hansen PW, Jensen JF, Nielsen O, Andersson AM, Knudsen LE. Urinary excretion of phthalate metabolites, phenols and parabens in rural and urban Danish mother-child pairs. *Int J Hyg Environ Health* **2013b** ; 216 : 772-783.

Frederiksen H, Jensen TK, Jørgensen N, Kyhl HB, Husby S, Skakkebæk NE, Main KM, Juul A, Andersson AM. Human urinary excretion of non-persistent environmental chemicals: an overview of Danish data collected between 2006 and 2012. *Reproduction* **2014** ; 147 : 555-565.

French JE. NTP technical report on the toxicity studies of 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (CAS No. 131-57-7) Administered Topically and in Dosed Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxic Rep Ser* **1992** ; 21 : 1-E14.

Fromme H, Gruber L, Schlummer M, Wolz G, Böhmer S, Angerer J, Mayer R, Liebl B, Bolte G. Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environ Int* **2007a** ; 33 : 1012-1020.

Fromme H, Bolte G, Koch HM, Angerer J, Boehmer S, Drexler H, Mayer R, Liebl B. Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health* **2007b** ; 210 : 21-33.

Fromme H, Gruber L, Seckin E, Raab U, Zimmermann S, Kiranoglu M, Schlummer M, Schwegler U, Smolic S, Völkel W; HBMnet. Phthalates and their metabolites in breast milk--results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environ Int* **2011** ; 37 : 715-722.

Fromme H, Gruber L, Schuster R, Schlummer M, Kiranoglu M, Bolte G, Völkel W. Phthalate and di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) intake by German infants based on the results of a duplicate diet study and biomonitoring data (INES 2). *Food Chem Toxicol* **2013a** ; 53 : 272-280.

Fromme H, Lahrz T, Kraft M, Fembacher L, Dietrich S, Sievering S, Burghardt R, Schuster R, Bolte G, Völkel W. Phthalates in German daycare centers: occurrence in air and dust and the excretion of their metabolites by children (LUPE 3). *Environ Int* **2013b** ; 61 : 64-72.

Geens T, Bruckers L, Covaci A, Schoeters G, Fierens T, Sioen I, Vanermen G, Baeyens W, Morrens B, Loots I, Nelen V, de Belleaux BN, Larebeke NV, Hond ED. Determinants of bisphenol A and phthalate metabolites in urine of Flemish adolescents. *Environ Res* **2014** ; 134 : 110-117.

Glue C, Millner A, Bodtger U, Jinquan T, Poulsen LK. In vitro effects of monophthalates on cytokine expression in the monocytic cell line THP-1 and in peripheral blood mononuclear cells from allergic and non-allergic donors. *Toxicol In Vitro* **2002** ; 16 : 657-662.

Golden R, Gandy J, Vollmer G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Crit Rev Toxicol* **2005** ; 35 : 435-458.

Gomez E, Pillon A, Fenet H, Rosain D, Duchesne MJ, Nicolas JC, Balaguer P, Casellas C. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *J Toxicol Environ Health A* **2005** ; 68 : 239-251.

Gonzalez H, Farbrot A, Larko O, Wennberg AM. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *Br J Dermatol* **2006** ; 154 : 337-340.

Gonzalez H, Jacobson CE, Wennberg AM, Larkö O, Farbrot A. Solid-phase extraction and reverse-phase HPLC: application to study the urinary excretion pattern of benzophenone-3 and its metabolite 2,4-dihydroxybenzophenone in human urine. *Anal Chem Insights* **2008** ; 3 : 1-7.

Gray LE, Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p '-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health* **1999** ; 15 : 94-118.

Gray LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DNR, Parks L. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* **2000** ; 58 : 350-365.

Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, Yoshida N, Yoshikawa T. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology* **2006** ; 227 : 62-72.

Hansen JS, Larsen ST, Poulsen LK, Nielsen GD. Adjuvant effects of inhaled mono-2-ethylhexyl phthalate in BALB/cJ mice. *Toxicology* **2007** ; 232 : 79-88.

- Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: moving from biological concepts to interventions and policy. *Int J Gynaecol Obstet* **2011** ; 115 : S3-5.
- Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* **1997** ; 105 : 802-811.
- Hatch EE, Nelson JW, Qureshi MM, Weinberg J, Moore LL, Singer M, Webster TF. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. *Environ Health* **2008** ; 7 : 27.
- Hauser R, Meeker JD, Park S, Silva MJ, Calafat AM. Temporal variability of urinary phthalate metabolite levels in men of reproductive age. *Environ Health Perspect* **2004** ; 112 : 1734-1740.
- Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* **2006** ; 17 : 682-691.
- Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S, Calafat AM. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* **2007** ; 22 : 688-695.
- Hauser R. Urinary phthalate metabolites and semen quality: a review of a potential biomarker of susceptibility. *Int J Androl* **2008** ; 31 : 112-117.
- Hernández-Díaz S, Mitchell AA, Kelley KE, Calafat AM, Hauser R. Medications as a potential source of exposure to phthalates in the U.S. population. *Environ Health Perspect* **2009** ; 117 : 185-189.
- Hernández-Díaz S, Su YC, Mitchell AA, Kelley KE, Calafat AM, Hauser R. Medications as a potential source of exposure to phthalates among women of childbearing age. *Reprod Toxicol* **2013** ; 37 : 1-5.
- Hess AP, Nayak NR, Giudice LC. Oviduct and endometrium: cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press/Elsevier **2006** : 337-382.
- Heymsfield SB, Arteaga C, McManus CM. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am J Clin Nutr* **1983** ; 37 : 478-494.
- Hoberman AM, Schreur DK, Leazer T, Daston GP, Carthew P, Re T, Loretz L, Mann P. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **2008** ; 83 : 123-133.
- Hoppin JA, Brock JW, Davis BJ, Baird DD. Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect* **2002** ; 110 : 515-518.

Hoppin JA, Jaramillo R, London SJ, Bertelsen RJ, Salo PM, Sandler DP, Zeldin DC. Phthalate exposure and allergy in the U.S. Population: results from NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect* **2013** ; 121 : 1129-1134.

Hossaini A, Larsen JJ, Larsen JC. Lack of oestrogenic effects of food preservatives (parabens) in uterotrophic assays. *Food Chem Toxicol* **2000** ; 38 : 319-323.

Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambright CR, Rider CV, Blystone CR, Hotchkiss AK, Gray LE Jr. 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 : 153-165.

Huang PC, Kuo PL, Guo YL, Liao PC, Lee CC. Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Hum Reprod* **2007** ; 22 : 2715-2722.

Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* **2009** ; 35 : 14-20.

Huang PC, Tsai EM, Li WF, Liao PC, Chung MC, Wang YH, Wang SL. Association between phthalate exposure and glutathione S-transferase M1 polymorphism in adenomyosis, leiomyoma and endometriosis. *Hum Reprod* **2010** ; 25 : 986-994.

Huang LP, Lee CC, Fan JP, Kuo PH, Shih TS, Hsu PC. Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate relation to sperm motility, reactive oxygen species generation, and apoptosis in polyvinyl chloride workers. *Int Arch Occup Environ Health* **2014a** ; 87 : 635-646.

Huang PC, Li WF, Liao PC, Sun CW, Tsai EM, Wang SL. Risk for estrogen-dependent diseases in relation to phthalate exposure and polymorphisms of CYP17A1 and estrogen receptor genes. *Environ Sci Pollut Res Int* **2014b** ; 21 : 13964-13973.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I. *J Pharm Biomed Anal* **2004** ; 36 : 579-586.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II. *J Pharm Biomed Anal* **2007a** ; 45 : 70-81.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. *J Pharm Biomed Anal* **2007b** ; 45 : 82-96.

Hurst CH, Waxman DJ. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci* **2003** ; 74 : 297-308.

Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Fujimura T, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Estrogen-related receptor  $\gamma$  modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2011** ; 123 : 1-7.

International Programme on Chemical Safety (IPCS). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva, Switzerland, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety **2002**.

Inui M, Adachi T, Takenaka S, Inui H, Nakazawa M, Ueda M, Watanabe H, Mori C, Iguchi T, Miyatake K. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology* **2003** ; 194 : 43-50.

Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology* **2010** ; 151 : 2433-2442.

Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, Sasaki H, Tanaka T, Tsugane S. Urinary phthalate monoesters and endometriosis in infertile Japanese women. *Sci Total Environ* **2009** ; 408 : 37-42.

Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today* **2011** ; 93 : 34-50.

Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol* **2007** ; 41 : 5564-5570.

Janjua NR, Frederiksen H, Skakkebaek NE, Wulf HC, Andersson AM. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int J Androl* **2008a** ; 31 : 118-130.

Janjua NR, Kongshoj B, Andersson AM, Wulf HC. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2008b** ; 22 : 456-461.

Ji K, Lim Kho Y, Park Y, Choi K. Influence of a five-day vegetarian diet on urinary levels of antibiotics and phthalate metabolites: a pilot study with "Temple Stay" participants. *Environ Res* **2010** ; 110 : 375-382.

Joensen UN, Frederiksen H, Blomberg Jensen M, Lauritsen MP, Olesen IA, Lassen TH, Andersson AM, Jørgensen N. Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men. *Environ Health Perspect* **2012** ; 120 : 1397-1403.

Johns LE, Ferguson KK, Soldin OP, Cantonwine DE, Rivera-González LO, Del Toro LV, Calafat AM, Ye X, Alshawabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD. Urinary phthalate metabolites in relation to maternal serum thyroid and sex hormone levels during pregnancy: a longitudinal analysis. *Reprod Biol Endocrinol* **2015** ; 13 : 4.

Jönsson BA, Richthoff J, Rylander L, Giwercman A, Hagmar L. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology* **2005** ; 16 : 487-493.

Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, Skakkebaek NE, Toppari J. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl* **2011** ; 34 : E37-E48.

Jørgensen N, Joensen UN, Jensen TK, Jensen MB, Almstrup K, Olesen IA, Juul A, Andersson AM, Carlsen E, Petersen JH, Toppari J, Skakkebaek NE. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open* **2012** ; 2 : e000990.

Jung D, Becher H, Edler L, Flesch-Janys D, Gurn P, Konietzko J, Manz A, Pöpke O. Elimination of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane in occupationally exposed persons. *J Toxicol Environ Health* **1997** ; 51 : 23-34.

Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hawuła W, Jakubowski L, Hanke W. Human urinary phthalate metabolites level and main semen parameters, sperm chromatin structure, sperm aneuploidy and reproductive hormones. *Reprod Toxicol* **2013** ; 42 : 232-241.

Just AC, Adibi JJ, Rundle AG, Calafat AM, Camann DE, Hauser R, Silva MJ, Whyatt RM. Urinary and air phthalate concentrations and self-reported use of personal care products among minority pregnant women in New York city. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2010** ; 20 : 625-633.

Kalfa N, Philibert P, Sultan C. Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *Int J Androl* **2009** ; 32 : 187-197.

Kang S, Kim S, Park J, Kim HJ, Lee J, Choi G, Choi S, Kim S, Kim SY, Moon HB, Kim S, Kho YL, Choi K. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. *Sci Total Environ* **2013** ; 461-462 : 214-221.

Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res* **2008** ; 42 : 3498-3518.

Kato K, Silva MJ, Needham LL, Calafat AM. Determination of 16 phthalate metabolites in urine using automated sample preparation and on-line preconcentration/high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **2005** ; 77 : 2985-2991.

Kawaguchi M, Irie K, Morohoshi K, Watanabe G, Taya K, Morita M, Kondo Y, Imai H, Himi T. Maternal isobutyl-paraben exposure alters anxiety and passive avoidance test performance in adult male rats. *Neurosci Res* **2009** ; 65 : 136-140.

Kester MH, Bulduk S, van Toor H, Tibboel D, Meini W, Glatt H, Falany CN, Coughtrie MW, Schuur AG, Brouwer A, Visser TJ. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters. *J Clin Endocrinol Metab* **2002** ; 87 : 1142-1150.

Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G, Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: Reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* **2002** ; 94 : 606-616.

Kim YH, Kim CS, Park S, Han SY, Pyo MY, Yang M. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun* **2003** ; 312 : 441-448.

Kim BN, Cho SC, Kim Y, Shin MS, Yoo HJ, Kim JW, Yang YH, Kim HW, Bhang SY, Hong YC. Phthalates exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder in school-age children. *Biol Psychiatry* **2009** ; 10 : 958-963

Kim SH, Chun S, Jang JY, Chae HD, Kim CH, Kang BM. Increased plasma levels of phthalate esters in women with advanced-stage endometriosis: a prospective case-control study. *Fertil Steril* **2011** ; 95 : 357-359.

Kim YR, Jung EM, Choi KC, Jeung EB. Synergistic effects of octylphenol and isobutyl paraben on the expression of calbindin-D<sub>9k</sub> in GH3 rat pituitary cells. *Int J Mol Med* **2012** ; 29 : 294-302.

Kim S, Choi K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environ Int* **2014** ; 70 : 143-157.

Kim S, Kang S, Lee G, Lee S, Jo A, Kwak K, Kim D, Koh D, Kho YL, Kim S, Choi K. Urinary phthalate metabolites among elementary school children of Korea: sources, risks, and their association with oxidative stress marker. *Sci Total Environ* **2014** ; 472 : 49-55.

Kim S, Lee J, Park J, Kim HJ, Cho G, Kim GH, Eun SH, Lee JJ, Choi G, Suh E, Choi S, Kim S, Kim YD, Kim SK, Kim SY, Kim S, Eom S, Moon HB, Kim S, Choi K. Concentrations of phthalate metabolites in breast milk in Korea: Estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. *Sci Total Environ* **2015** ; 508 : 13-19.

Kobrosly RW, Evans S, Miodovnik A, Barrett ES, Thurston SW, Calafat AM, Swan SH. Prenatal phthalate exposures and neurobehavioral development scores in boys and girls at 6-10 years of age. *Environ Health Perspect* **2014** ; 122 : 521-528.



- Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003a** ; 784 : 169-182.
- Koch HM, Drexler H, Angerer J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health* **2003b** ; 206 : 77-83.
- Koch HM, Bolt HM, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* **2004** ; 78 : 123-130.
- Koch HM, Angerer J, Drexler H, Eckstein R, Weisbach V. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. *Int J Hyg Environ Health* **2005a** ; 208 : 489-498.
- Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* **2005b** 79, 367-376.
- Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* **2006** ; 29 : 155-165.
- Koch HM, Becker K, Wittassek M, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M. Di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate - urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German Environmental Survey on children. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2007** ; 17 : 378-387.
- Koch HM, Wittassek M, Brüning T, Angerer J, Heudorf U. Exposure to phthalates in 5–6 years old primary school starters in Germany – a human biomonitoring study and a cumulative risk assessment. *Int J Hyg Environ Health* **2011** ; 214 : 188-195.
- Koch HM, Christensen KL, Harth V, Lorber M, Brüning T. Di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP) metabolism in a human volunteer after single oral doses. *Arch Toxicol* **2012** ; 86 : 1829-1839.
- Koch HM, Lorber M, Christensen KL, Pälme C, Koslitz S, Brüning T. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *Int J Hyg Environ Health* **2013** ; 216 : 672-681.
- Koch HM, Aylward LL, Hays SM, Smolders R, Moos RK, Cocker J, Jones K, Warren N, Levy L, Bevan R. Inter- and intra-individual variation in urinary biomarker concentrations over a 6-day sampling period. Part 2: Personal care product ingredients. *Toxicol Lett* **2014** ; 231 : 261-269.

Koeppe ES, Ferguson KK, Colacino JA, Meeker JD. Relationship between urinary triclosan and paraben concentrations and serum thyroid measures in NHANES 2007–2008. *Sci Total Environ* **2013** ; 445-446 : 299-305.

Kolarik B, Naydenov K, Larsson M, Bornehag CG, Sundell J. The association between phthalates in dust and allergic diseases among Bulgarian children. *Environ Health Perspect* **2008** ; 116 : 98-103.

Kolossa-Gehring M, Becker K, Conrad A, Lüdecke A, Riedel S, Seiwert M, Schulz C, Szewzyk R. German Environmental Survey for Children (GerES IV)--first results. *Int J Hyg Environ Health* **2007** ; 210 : 535-540.

Kondo F, Ikai Y, Hayashi R, Okumura M, Takatori S, Nakazawa H, Izumi S, Makino T. Determination of five phthalate monoesters in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* **2010** ; 85 : 92-96.

Kong L, Kadokami K, Wang S, Duong HT, Chau HT. Monitoring of 1300 organic micro-pollutants in surface waters from Tianjin, North China. *Chemosphere* **2015** ; 122 : 125-130.

Kortenkamp A, Backhaus T, Faust M. State of the Art Report on Mixture Toxicity. Study contract number 070307/2007/485103/ETU/D.1. Europa **2009**.

Kortenkamp A, Faust M. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. *Int J Androl* **2010** ; 33 : 463-474.

Kortenkamp A, Martin O, Faust M, Evans R, McKinlay R, Orton F, Rosivatz E. State of the art assessment of endocrine disrupters. Final report. European Commission, Directorate-General for the Environment (Project Contract No.070307/2009/550687/SER/D3) **2011**.

Krause M, Klit A, Blomberg Jensen M, Søbørg T, Frederiksen H, Schlumpf M, Lichtensteiger W, Skakkebaek NE, Drzewiecki KT. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *Int J Androl* **2012** ; 35 : 424-436.

Kunisue T, Chen Z, Buck Louis GM, Sundaram R, Hediger ML, Sun L, Kannan K. Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in U.S. women and their association with endometriosis. *Environ Sci Technol* **2012** ; 46 : 4624-4632.

Kunz PY, Fent K. Multiple hormonal activities of UV-filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquat Toxicol* **2006** ; 79 : 305-324.

Kunz PY, Galicia HF, Fent K. Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV-filters in fish. *Toxicol Sci* **2006** ; 90 : 349-361.

Langer S, Bekö G, Weschler CJ, Brive LM, Toftum J, Callesen M, Clausen G. Phthalate metabolites in urine samples from Danish children and correlations with

- phthalates in dust samples from their homes and daycare centers. *Int J Hyg Environ Health* **2014** ; 217 : 78-87.
- Lemini C, Jaimez R, Avila ME, Franco Y, Larrea F, Lemus AE. In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol Ind Health* **2003** ; 19 : 69-79.
- León Z, Chisvert A, Tarazona I, Salvador A. Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. *Anal Bioanal Chem* **2010a** ; 398 : 831-843.
- León Z, Chisvert A, Balaguer A, Salvador A. Development of a fully automated sequential injection solid-phase extraction procedure coupled to liquid chromatography to determine free 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulphonic acid in human urine. *Anal Chim Acta* **2010b** ; 664 : 178-184.
- Lewis RC, Meeker JD, Peterson KE, Lee JM, Pace GG, Cantoral A, Téllez-Rojo MM. Predictors of urinary bisphenol A and phthalate metabolite concentrations in Mexican children. *Chemosphere* **2013** ; 93 : 2390-2398.
- Li W, Sun Y, Joseph J, Fitzloff JF, Fong HH, van Breemen RB. p-Hydroxybenzoic acid alkyl esters in *Andrographis paniculata* herbs, commercial extracts, and formulated products. *J Agric Food Chem* **2003** ; 51 : 524-529.
- Liu L, Bao H, Liu F, Zhang J, Shen H. Phthalates exposure of Chinese reproductive age couples and its effect on male semen quality, a primary study. *Environ Int* **2012** ; 42 : 78-83.
- Liu Y, Mei C, Liu H, Wang H, Zeng G, Lin J, Xu M. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem Biophys Res Commun* **2014** ; 451 : 592-598.
- Lomenick JP, Calafat AM, Melguizo Castro MS, Mier R, Stenger P, Foster MB, Wintergerst KA. Phthalate exposure and precocious puberty in females. *J Pediatr* **2010** ; 156 : 221-225.
- Luccio-Camelo DC, Prins GS. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2011** ; 127 : 74-82.
- Lund L, Engebjerg MC, Pedersen L, Ehrenstein V, Norgaard M, Sørensen HT. Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977-2005. *Eur Urol* **2009** ; 55 : 1022-1026.
- Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M. UV-filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicol Sci* **2003** ; 74 : 43-50.

Ma WL, Wang L, Guo Y, Liu LY, Qi H, Zhu NZ, Gao CJ, Li YF, Kannan K. Urinary concentrations of parabens in Chinese young adults: implications for human exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* **2013** ; 65 : 611-618.

Mahoney MM, Padmanabhan V. Developmental programming: impact of fetal exposure to endocrine-disrupting chemicals on gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor mRNA in sheep hypothalamus. *Toxicol Appl Pharmacol* **2010** ; 247 : 98-104.

Marcus M, Christensen KY, Manatunga A, Rudra CB, Brock JW, Small CM. Variability of phthalate monoester levels in daily first-morning urine from adult women: a pilot study. *Rev Environ Health* **2010** ; 25 : 359-368.

Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, Schmidt IM, Suomi AM, Virtanen HE, Petersen DV, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek NE. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* **2006** ; 114 : 270-276.

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* **2012** ; 55 : 395-407.

Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. *Environ Health Perspect* **2007** ; 115 : 1029-1034.

Meeker JD, Yang T, Ye X, Calafat AM, Hauser R. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect* **2011** ; 119 : 252-257.

Meeker JD, Cantonwine DE, Rivera-González LO, Ferguson KK, Mukherjee B, Calafat AM, Ye X, Anzalota Del Toro LV, Crespo-Hernández N, Jiménez-Vélez B, Alshawabkeh AN, Cordero JF. Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico. *Environ Sci Technol* **2013** ; 47 : 3439-3447.

Mervish N, McGovern KJ, Teitelbaum SL, Pinney SM, Windham GC, Biro FM, Kushi LH, Silva MJ, Ye X, Calafat AM, Wolff MS; BCERP. Dietary predictors of urinary environmental biomarkers in young girls, BCERP, 2004-7. *Environ Res* **2014** ; 133 : 12-19.

Milligan SR, Khan O, Nash M. Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen Comp Endocrinol* **1998** ; 112 : 89-95.

Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, Calafat AM, Wolff MS. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology* **2011** ; 32 : 261-267.

Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, Shiraishi F, Koda T, Morita M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicol In Vitro* **2005** ; 19 : 457-469.

Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, Foster PM. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by Di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol* **1999** ; 156 : 81-95.

Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PM. Dose dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci.* **2000** ; 55 : 143-151.

NAS/NRC. Report of the oversight committee. In: Biologic markers in reproductive toxicology. Washington, DC: National Academy of Sciences, National Research Council, National Academy **1989**.

National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals (NHANES Survey). <http://www.cdc.gov/exposurereport/>. Consulté le 03 mars 2015.

Nishizawa C, Takeshita K, Ueda J, Nakanishi I, Suzuki KT, Ozawa T. Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. *Free Radic Res* **2006** ; 40 : 233-240.

Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: fact or urban legend? *Toxicol Lett* **2013** ; 223 : 295-305.

North ML, Takaro TK, Diamond ML, Ellis AK. Effects of phthalates on the development and expression of allergic disease and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* **2014** ; 112 : 496-502.

Núñez L, Tadeo JL, García-Valcárcel AI, Turiel E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2008** ; 1214 : 178-182.

Ocaña-González JA, Villar-Navarro M, Ramos-Payán M, Fernández-Torres R, Bello-López MA. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. *Anal Chim Acta* **2015** ; 858 : 1-15.

O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci* **2002** ; 69 : 92-108.

Official Journal of the European Union Regulation (EC) no 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November **2009** on cosmetic products ; L 342 : 59-209.

Oishi S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health* **2001** ; 17 : 31-39.

- Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol* **2002a** ; 76 : 423-429.
- Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* **2002b** ; 40 : 1807-1813.
- Oishi S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol* **2004** ; 42 : 1845-1849.
- Okubo T, Suzuki T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. Estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diesters and monoesters by MCF-7 cell proliferation assay in vitro. *Biol Pharm Bull* **2003** ; 26 : 1219-1224.
- Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* **2007** ; 115 : 1298-1305.
- Pant N, Kumar G, Upadhyay AD, Patel DK, Gupta YK, Chaturvedi PK. Reproductive toxicity of lead, cadmium, and phthalate exposure in men. *Environ Sci Pollut Res Int* **2014** ; 21 : 11066-11074.
- Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE Jr. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* **2000** ; 58 : 339-349.
- Parlett LE, Calafat AM, Swan SH. Women's exposure to phthalates in relation to use of personal care products. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2013** ; 23 : 197-206.
- Patterson DG Jr, Fingerhut MA, Roberts DW, Needham LL, Sweeney MH, Marlow DA, Andrews JS Jr, Halperin WE. Levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Am J Ind Med* **1989** ; 16 : 135-146.
- Pažoureková S, Hojerová J, Klimová Z, Lucová M. Dermal absorption and hydrolysis of methylparaben in different vehicles through intact and damaged skin: using a pig-ear model in vitro. *Food Chem Toxicol* **2013** ; 59 : 754-765.
- Pearce MS, Korada M, Day J, Turner S, Allison D, Kibirige M, Cheetham TD. Increasing Incidence, but Lack of Seasonality, of Elevated TSH Levels, on Newborn Screening, in the North of England. *J Thyroid Res* **2010** ; 2010 : 101948.
- Pearce MS, Baxter LR, Parker L. Paternal Occupational Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals as a Risk Factor for Leukaemia in Children: A Case-Control Study from the North of England. *Advances in Epidemiology* **2014** ; 2014 : ID323189.
- Peng X, Adachi K, Chen C, Kasai H, Kanoh K, Shizuri Y, Misawa N. Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. *Appl Environ Microbiol* **2006** ; 72 : 5556-5561.

Peng X, Yu Y, Tang C, Tan J, Huang Q, Wang Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Sci Total Environ* **2008** ; 397 : 158-166.

Pérez RA, Albero B, Miguel E, Sánchez-Brunete C. Determination of parabens and endocrine-disrupting alkylphenols in soil by gas chromatography–mass spectrometry following matrix solid-phase dispersion or in-column microwave-assisted extraction: a comparative study. *Anal Bioanal Chem* **2012** ; 402 : 2347-2357.

Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* **1992** ; 38 : 1933-1953.

Philippat C, Mortamais M, Chevrier C, Petit C, Calafat AM, Ye X, Silva MJ, Brambilla C, Pin I, Charles MA, Cordier S, Slama R. Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environ Health Perspect* **2012** ; 120 : 464-470.

Philippat C, Wolff MS, Calafat AM, Ye X, Bausell R, Meadows M, Stone J, Slama R, Engel SM. Prenatal exposure to environmental phenols: concentrations in amniotic fluid and variability in urinary concentrations during pregnancy. *Environ Health Perspect* **2013** ; 121 : 1225-1231.

Pirard C, Sagot C, Deville M, Dubois N, Charlier C. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ Int* **2012** ; 48 : 78-83.

Pirard C, Koppen G, De Cremer K, Van Overmeire I, Govarts E, Dewolf MC, Van De Mierop E, Aerts D, Biot P, Casteleyn L, Kolossa-Gehring M, Schwedler G, Angerer J, Koch HM, Schindler BK, Castaño A, Esteban M, Schoeters G, Den Hond E, Sepai O, Exley K, Horvat M, Bloemen L, Knudsen LE, Joas R, Joas A, Van Loco J, Charlier C. Hair mercury and urinary cadmium levels in Belgian children and their mothers within the framework of the COPHES/DEMOCOPHES projects. *Sci Total Environ* **2014** ; 472 : 730-740.

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* **2007** ; 164 : 942-948.

Pollack AZ, Buck Louis GM, Chen Z, Sun L, Trabert B, Guo Y, Kannan K. Bisphenol A, benzophenone-type ultraviolet filters, and phthalates in relation to uterine leiomyoma. *Environ Res* **2014** ; 137 : 101-107.

Pouillot A, Polla BS, Polla AS. Conservateurs en cosmetologie : mise au point sur les parabènes. *J Méd Esth et Chir Derm* **2006** ; 33 : 187-190.

Preau Jr JL, Wong LY, Silva MJ, Needham LL, Calafat AM. Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: an observational study. *Environ Health Perspect* **2010** ; 118 : 1748-1754.

Preuss R, Koch HM, Angerer J. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005** ; 816 : 269-280.

Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology* **2007** ; 232 : 248-256.

Qiao L, Zheng L, Cai D. Study on the di-n-butyl phthalate and di-2-ethylhexyl phthalate level of girl serum related with precocious puberty in Shanghai. *Wei Sheng Yan Jiu* **2007** ; 36 : 93-95.

Ramaswamy BR, Shanmugam G, Velu G, Rengarajan B, Larsson DG. GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. *J Hazard Mater* **2011** ; 186 : 1586-1593.

Reddy BS, Rozati R, Reddy BV, Raman NV. Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG*. **2006a** ; 113 : 515-520.

Reddy BS, Rozati R, Reddy S, Kodampur S, Reddy P, Reddy R. High plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and phthalate esters in women with endometriosis: a prospective case control study. *Fertil Steril* **2006b** ; 85 : 775-779.

Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada (CHMS survey). <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/chms-ecms/index-eng.php>. Consulté le 03 mars **2015**.

Richiardi L, Bellocco R, Adami HO, Torrang A, Barlow L, Hakulinen T, Rahu M, Stengrevics A, Storm H, Tretli S, Kurtinaitis J, Tyczynski JE, Akre O (2004). Testicular cancer incidence in eight Northern European countries: Secular and recent trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2004** ; 13 : 2157-2166.

Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J (2012). Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod* **2013** ; 28 : 462-470.

Romero-Franco M, Hernández-Ramírez RU, Calafat AM, Cebrián ME, Needham LL, Teitelbaum S, Wolff MS, López-Carrillo L. Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in Mexican women. *Environ Int* **2011** ; 37 : 867-871.

Rosner B. Fundamentals of biostatistics. Brooks/Cole: Boston, M.A., **2011**.

Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol* **1998** ; 153 : 12-19.

Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol* **2003** ; 37 : 4543-4553.



Rudel RA, Gray JM, Engel CL, Rawsthorne TW, Dodson RE, Ackerman JM, Rizzo J, Nudelman JL, Brody JG. Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention. *Environ Health Perspect* **2011** ; 119 : 914-920.

Sandborgh-Englund G, Adolfsson-Erici M, Odham G, Ekstrand J. Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. *J Toxicol Environ Health A* **2006** ; 69 : 1861-1873.

Saravanabhavan G, Guay M, Langlois É, Giroux S, Murray J, Haines D. Biomonitoring of phthalate metabolites in the Canadian population through the Canadian Health Measures Survey (2007–2009). *Int J Hyg Environ Health* **2013** ; 216 : 652-661.

Sathyanarayana S, Karr CJ, Lozano P, Brown E, Calafat AM, Liu F, Swan SH. Baby care products: possible sources of infant phthalate exposure. *Pediatrics* **2008** ; 121 : e260-268.

Sathyanarayana S, Alcedo G, Saelens BE, Zhou C, Dills RL, Yu J, Lanphear B. Unexpected results in a randomized dietary trial to reduce phthalate and bisphenol A exposures. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2013** ; 23 : 378-384.

Satoh K, Nonaka R, Ohyama K, Nagai K. Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-Eco-Screen system). *J Health Sci* **2005** ; 51 : 557-568.

Savage JH, Matsui EC, Wood RA, Keet CA. Urinary levels of triclosan and parabens are associated with aeroallergen and food sensitization. *J Allergy Clin Immunol* **2012** ; 130 : 453-460.

Schindler BK, Esteban M, Koch HM, Castano A, Koslitz S, Cañas A, Casteleyn L, Kolossa-Gehring M, Schwedler G, Schoeters G, Hond ED, Sepai O, Exley K, Bloemen L, Horvat M, Knudsen LE, Joas A, Joas R, Biot P, Aerts D, Lopez A, Huetos O, Katsonouri A, Maurer-Chronakis K, Kasparova L, Vrbík K, Rudnai P, Naray M, Guignard C, Fischer ME, Ligočka D, Janasik B, Reis MF, Namorado S, Pop C, Dumitrascu I, Halzlova K, Fabianova E, Mazej D, Tratnik JS, Berglund M, Jönsson B, Lehmann A, Crettaz P, Frederiksen H, Nielsen F, McGrath H, Nesbitt I, De Cremer K, Vanermen G, Koppen G, Wilhelm M, Becker K, Angerer J. The European COPHES/DEMOCOPHES project: towards transnational comparability and reliability of human biomonitoring results. *Int J Hyg Environ Health* **2014** ; 217 : 653-661.

Schlecht C, Klammer H, Jarry H & Wuttke W. Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology* **2004** ; 205 : 123-130.

Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect* **2001** ; 109 : 239-244.

- Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, Nobis I, Bacinski A, Mentrup B, Ambrugger P, Grüters A, Malendowicz LK, Christoffel J, Jarry H, Seidlovà-Wuttke D, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine disruptors and the thyroid gland – a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect* **2007** ; 115 : 77-83.
- Schreurs RH, Sonneveld E, Jansen JH, Seinen W, van der Burg B. Interaction of polycyclic musks and UV-filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicol Sci* **2005** ; 83 : 264-272.
- Seckin E, Fromme H, Völkel W. Determination of total and free mono-n-butyl phthalate in human urine samples after medication of a di-n-butyl phthalate containing capsule. *Toxicol Lett* **2009** ; 188 : 33-37.
- Shah KH, Verma RJ. Butyl p-hydroxybenzoic acid induces oxidative stress in mice liver — an in vivo study. *Acta Pol Pharm* **2011** ; 68 : 875-879.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* **2008** ; 89 : e33-38.
- Shirai JH, Kissel JC. Uncertainty in estimated half-lives of PCBs in humans: impact on exposure assessment. *Sci Total Environ* **1996** ; 187 : 199-210.
- Shirai S, Suzuki Y, Yoshinaga J, Shiraishi H, Mizumoto Y. Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women. *Reprod Toxicol* **2013** ; 35 : 96-101.
- Shiue I. Association of urinary arsenic, heavy metal, and phthalate concentrations with food allergy in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2006. *Ann Allergy Asthma Immunol* **2013** ; 111 : 421-423.
- Shu H, Jonsson BA, Larsson M, Nanberg E, Bornehag CG. PVC flooring at home and development of asthma among young children in Sweden, a 10-year follow-up. *Indoor Air* **2014** ; 24 : 227-235.
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* **2002** ; 36 : 1751-1756.
- Silva MJ, Malek NA, Hodge CC, Reidy JA, Kato K, Barr DB, Needham LL, Brock JW. Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003a** ; 789 : 393-404.
- Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Kato K, Malek NA, Hodge CC, Hurtz D 3rd, Calafat AM, Needham LL, Brock JW. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol* **2003b** ; 77 : 561-567

Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, Brock JW, Needham LL, Calafat AM. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect* **2004** ; 112 : 331-338.

Silva MJ, Samandar E, Preau JL Jr, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007** ; 860 : 106-112.

Sioen I, Fierens T, Van Holderbeke M, Geerts L, Bellemans M, De Maeyer M, Servaes K, Vanermen G, Boon PE, De Henauw S. Phthalates dietary exposure and food sources for Belgian preschool children and adults. *Environ Int* **2012** ; 48 : 102-108.

Skakkebaek NE. Normal reference ranges for semen quality and their relations to fecundity. *Asian J Androl* **2010** ; 12 : 95-98.

Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol* **2011**; 31 : 337-343.

Smith D. Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. *Int J Epidemiol* **1999** ; 28 : 179-188.

Smith KW, Braun JM, Williams PL, Ehrlich S, Correia KF, Calafat AM, Ye X, Ford J, Keller M, Meeker JD, Hauser R. Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. *Environ Health Perspect* **2012** ; 120 : 1538-1543.

Søeborg T, Frederiksen H, Andersson AM. Considerations for estimating daily intake values of nonpersistent environmental endocrine disruptors based on urinary biomonitoring data. *Reproduction* **2014** ; 147 : 455-463.

Specht IO, Toft G, Hougaard KS, Lindh CH, Lenters V, Jönsson BA, Heederik D, Giwercman A, Bonde JP. Associations between serum phthalates and biomarkers of reproductive function in 589 adult men. *Environ Int* **2014** ; 66 : 146-156.

Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* **2007** ; 115 : 876-882.

Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH. Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both. *Environ Health Perspect* **2009** ; 117 : 784-789.

Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma — Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Resp Res* **2001** ; 2 : 66-70.

Sun Q, Cornelis MC, Townsend MK, Tobias DK, Eliassen AH, Franke AA, Hauser R, Hu FB. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate

metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ Health Perspect* **2014** ; 122 : 616-623.

Suzuki Y, Niwa M, Yoshinaga J, Watanabe C, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H. Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. *Environ Health Prev Med* **2009** ; 14 : 180-187.

Suzuki Y, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H. Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *Int J Androl* **2012** ; 35 : 236-244.

Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL; Study for Future Families Research Team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* **2005** ; 113 : 1056-1061.

Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res* **2008** ; 108 : 177-184.

Swan SH, Liu F, Hines M, Kruse RL, Wang C, Redmon JB, Sparks A, Weiss B. Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys. *Int J Androl* **2010** ; 33 : 259-269.

Takeuchi S, Iida M, Kobayashi S, Jin K, Matsuda T, Kojima H. Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology* **2005** ; 210 : 223-233.

Tang R, Chen MJ, Ding GD, Chen XJ, Han XM, Zhou K, Chen LM, Xia YK, Tian Y, Wang XR. Associations of prenatal exposure to phenols with birth outcomes. *Environ Pollut* **2013** ; 178 : 115-120.

Teitelbaum SL, Britton JA, Calafat AM, Ye X, Silva MJ, Reidy JA, Galvez MP, Brenner BL, Wolff MS. Temporal variability in urinary concentrations of phthalate metabolites, phytoestrogens and phenols among minority children in the United States. *Environ Res* **2008** ; 106 : 257-269.

Téllez-Rojo MM, Cantoral A, Cantonwine DE, Schnaas L, Peterson K, Hu H, Meeker JD. Prenatal urinary phthalate metabolites levels and neurodevelopment in children at two and three years of age. *Sci Total Environ* **2013** ; 461-462 : 386-390.

Tena-Sempere M. Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function. *Int J Androl* **2010** ; 33 : 360-368.

The 2013 Berlaymont Declaration on Endocrine Disrupters. [http://www.brunel.ac.uk/\\_data/assets/pdf\\_file/0005/300200/The\\_Berlaymont\\_Declaration\\_on\\_Endocrine\\_Disrupters.pdf](http://www.brunel.ac.uk/_data/assets/pdf_file/0005/300200/The_Berlaymont_Declaration_on_Endocrine_Disrupters.pdf). Consulté le 05 juillet 2015.

The TEDX List of Potential Endocrine Disruptors, <http://endocrinedisruption.org/endocrine-disruption/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/overview>. Consulté le 03 mars **2015**.

Thuresson K, Hoglund P, Hagmar L, Sjodin A, Bergman A, Jakobsson K. Apparent half-lives of hepta- to decabrominated diphenyl ethers in human serum as determined in occupationally exposed workers. *Environ Health Perspect* **2006** ; 114 : 176-181.

Tonya F, Hall BJ, Brodbelt JS, Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC–MS. *Anal Chim Acta* **1998** ; 371 : 195-203.

Toppari J, Juul A. Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers. *Mol Cell Endocrinol* **2010** ; 324 : 39-44.

Toppari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **2010** ; 88 : 910-919.

Trasande L, Spanier AJ, Sathyanarayana S, Attina TM, Blustein J. Urinary phthalates and increased insulin resistance in adolescents. *Pediatrics* **2013** ; 132 : e646-655.

Trasande L, Zoeller RT, Hass U, Kortenkamp A, Grandjean P, Myers JP, DiGangi J, Bellanger M, Hauser R, Legler J, Skakkebaek NE, Heindel JJ. Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European union. *J Clin Endocrinol Metab* **2015** ; 100 : 1245-1255.

Tremblay MS, Katzmarzyk PT, Willms JD. Temporal trends in overweight and obesity in Canada, 1981-1996. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2002** ; 26 : 538-543.

United Nations Environment Programme, World Health Organization (OMS/ PNUE, 2012). State of the science of endocrine disrupting chemicals. **2012**.

Upton K, Sathyanarayana S, De Roos AJ, Thompson ML, Scholes D, Dills R, Holt VL. Phthalates and risk of endometriosis. *Environ Res* **2013** ; 126 :91-97.

US Environmental Protection Agency. Integrated risk information system (IRIS). Diethyl Phthalate (CASRN 84-66-2). National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC, USA **1993**.

Uzumcu M, Zama AM, Oruc E. Epigenetic mechanisms in the actions of endocrine-disrupting chemicals: gonadal effects and role in female reproduction. *Reprod Domest Anim* **2012** ; 47 : 338-347.

Van Holderbeke M, Geerts L, Vanermen G, Servaes K, Sioen I, De Henauw S, Fierens T. Determination of contamination pathways of phthalates in food products sold on the Belgian market. *Environ Res* **2014** ; 134 : 345-352.

van Meeuwen JA, van Son O, Piersma AH, de Jong PC, van den Berg M. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics *Toxicol Appl Pharmacol* **2008** ; 230 : 372-382.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low dose effects and non monotonic dose responses. *Endocr Rev* **2012** ; 33 : 378-455.

Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **2014** ; 10 : 261-275.

Vidal L, Chisvert A, Canals A, Salvador A. Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis. *J Chromatogr A* **2007** ; 1174 : 95-103.

Vinggaard AM, Hnida C, Breinholt V, Larsen JC. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol In Vitro* **2000** ; 14 : 227-234.

Vo TT, Yoo YM, Choi KC, Jeung EB. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reprod Toxicol* **2010** ; 29 : 306-316.

Wang L, Liao C, Liu F, Wu Q, Guo Y, Moon HB, Nakata H, Kannan K. Occurrence and human exposure of p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), and their hydrolysis products in indoor dust from the United States and three East Asian countries. *Environ Sci Technol* **2012** ; 46 : 11584-11593.

Wang L, Asimakopoulos AG, Moon HB, Nakata H, Kannan K. Benzotriazole, benzothiazole, and benzophenone compounds in indoor dust from the United States and East Asian countries. *Environ Sci Technol* **2013** ; 47 : 4752-4759.

Wang L, Kannan K. Alkyl protocatechuates as novel urinary biomarkers of exposure to p-hydroxybenzoic acid esters (parabens). *Environ Int* **2013a** ; 59 : 27-32.

Wang L, Kannan K. Characteristic profiles of benzophenone-3 and its derivatives in urine of children and adults from the United States and China. *Environ Sci Technol* **2013b** ; 47 : 12532-12538.

Wang IJ, Lin CC, Lin YJ, Hsieh WS, Chen PC.. Early life phthalate exposure and atopic disorders in children: a prospective birth cohort study. *Environ Int* **2014** ; 62 : 48-54.

Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Ohta S, Kitamura S. Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and androgen receptor. *Food Chem Toxicol* **2013** ; 57 : 227-234.

Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sanoh S, Sugihara K, Kitamura S, Ohta S. Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes

and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicol Appl Pharmacol* **2015** ; 282 : 119-128.

Weuve J, Sánchez BN, Calafat AM, Schettler T, Green RA, Hu H, Hauser R. Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environ Health Perspect* **2006** ; 114 : 1424-1431.

Weuve J, Hauser R, Calafat AM, Missmer SA, Wise LA. Association of exposure to phthalates with endometriosis and uterine leiomyomata: findings from NHANES, 1999-2004. *Environ Health Perspect* **2010** ; 118 : 825-832.

Whyatt RM, Liu X, Rauh VA, Calafat AM, Just AC, Hoepner L, Diaz D, Quinn J, Adibi J, Perera FP, Factor-Litvak P. Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and child mental, psychomotor, and behavioral development at 3 years of age. *Environ Health Perspect* **2012** ; 120 : 290-295.

Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol* **2008** ; 20 : 784-794.

Wingate M, Mulvihill B, Kirby RS, Pettygrove S, Cunniff C, Meaney F, Schulz E, Miller L, Robinson C, Quintana G, Kaiser MY, Lee LC, Landa R, Newschaffer C, Constantino J, Fitzgerald R, Zahorodny W, Daniels J, Giarelli E, Pinto-Martin J, Levy SE, Nicholas J, Charles J, Zimmerman J, Maenner MJ, Durkin M, Rice C, Baio J, Van Naarden Braun K, Phillips K, Doernberg N, Yeargin-Allsopp M. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2008 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ* **2012** ; 61 : 1-19.

Wirth JJ, Rossano MG, Potter R, Puscheck E, Daly DC, Paneth N, Krawetz SA, Protas BM, Diamond MP. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality. *Syst Biol Reprod Med* **2008** ; 54 : 143-154.

Wittassek M, Wiesmüller GA, Koch HM, Eckard R, Dobler L, Müller J, Angerer J, Schlüter C. Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health* **2007** ; 210 : 319-333.

Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Brüning T. Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res* **2011** ; 55 : 7-31.

Wolff MS, Engel SM, Berkowitz GS, Ye X, Silva MJ, Zhu C, Wetmur J, Calafat AM. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* **2008** ; 116 : 1092-1097.

Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal* **2006** ; 26 : 803-824.

Yan X, Calafat A, Lashley S, Smulian J, Ananth C, Barr D, Silva M, Ledoux T, Hore P, Robson MG. Phthalates Biomarker Identification and Exposure Estimates in a Population of Pregnant Women. *Hum Ecol Risk Assess* **2009** ; 15 : 565-578.

Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine. *Anal Chem* **2005a** ; 77 : 5407-5413.

Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2005b** ; 383 : 638-644.

Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ Health Perspect* **2006a** ; 114 : 1843-1846.

Ye X, Kuklennyik Z, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2006b** ; 844 : 53-59.

Yesair DW, Feder PI, Chin AE, Naber SJ, Kuiper-Goodman T, Scott CS, Robinson PE. 1986. Development, evaluation and use of a pharmacokinetic model for hexachlorobenzene. *IARC Sci Publ* **1986** ; 77 : 297-318.

Yolton K, Xu Y, Strauss D, Altaye M, Calafat AM, Khoury J. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicol Teratol* **2011** ; 33 : 558-566.

Zeman FA, Boudet C, Tack K, Floch Barneaud A, Brochot C, Péry AR, Oleko A, Vandentorren S. Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *Int J Hyg Environ Health* **2013** ; 216 : 271-279.

Zhang YH, Zheng LX, Chen BH. Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai: a cross-sectional study. *Biomed Environ Sci* **2006** ; 19 : 205-209.

Zhang Z, Sun L, Hu Y, Jiao J, Hu J. Inverse antagonist activities of parabens on human oestrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ): in vitro and in silico studies. *Toxicol Appl Pharmacol* **2013** ; 270 : 16-22.

Ziegler AG, Pflueger M, Winkler C, Achenbach P, Akolkar B, Krischer JP, Bonifacio E. Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children. *J Autoimmun* **2011** ; 37 : 3-7.

Zota AR, Calafat AM, Woodruff TJ. Temporal trends in phthalate exposures: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2010. *Environ Health Perspect* **2014** ; 122 : 235-241.



# Annexes

## DISCIPLINE Biologie clinique / Secteur Toxicologie

Procédure opératoire standard : *GEN.ANA.PRO.A01*

### Modèle de procédure analytique

Version :	1
Nombre de pages :	-

Date de publication :	<b>20/09/2013</b>
-----------------------	-------------------

	<b>Auteurs</b>	<b>Evaluateurs</b>	<b>Approbateur final</b>
<b>Nom</b>	DEWALQUE Lucas	PIRARD Catherine	CHARLIER Corinne
<b>Fonction</b>		SCAQ.RSP (Responsable du Secteur Commun Assurance Qualité), BCL.AQ.RQD (Responsable AQ de Discipline Biologie Clinique), PAT.AQ.RQD (Responsable AQ de Discipline Anatomie et Cytologie Pathologiques), GNT.AQ.RQD (Responsable AQ de Discipline Génétique)	CG.BUR (Bureau du Conseil de Gouvernance)

#### Modifications

Cette annexe est une adaptation de la SOP TOX.PPB.ANA présentant les trois conditions opératoires pour l'analyse des métabolites de phase II. Les dossiers de validations sont présentés dans les annexes 2, 3 et 4.

[Détail des modifications dans Vivaldi](#)

### Table des matières

1 LOCALISATION.....	172
2 DENOMINATION.....	172
3 PRINCIPE.....	172
4 REACTIFS.....	172
4.1 Réactifs commerciaux .....	172
4.2 Réactifs préparés en laboratoire.....	173
4.3 Stockage .....	173
5 MATERIAUX DE REFERENCE .....	174
6 APPAREILLAGE ET PETIT MATERIEL DE LABORATOIRE.....	175
6.1 Analyseur .....	175
6.2 Petit matériel de laboratoire.....	175
7 SECURITE .....	175
8 ECHANTILLON .....	175
8.1 Nature de l'échantillon .....	175
8.2 Préparation de l'échantillon .....	175
8.3 Conservation de l'échantillon.....	181
8.4 Interférences .....	181
8.5 Volume nécessaire pour réaliser l'analyse .....	181
9 FREQUENCE DES DOSAGES ET DELAIS DE REPONSE .....	181
9.1 Fréquences .....	181
9.2 Délais de réponse.....	181
10 MODE OPERATOIRE .....	182
11 EXPRESSION DES RESULTATS.....	182
12 CONTROLE DE QUALITE .....	182
13 BIBLIOGRAPHIE .....	182
14 INTERET DU DOSAGE.....	183
15 EXEMPLE DE DROITES DE CALIBRATION .....	184
16 PARAMETRES DE VALIDATION.....	185
16.1 Evaluation de l'effet matrice .....	186
16.2 Spécificité .....	187

### 1 LOCALISATION

Service: Toxicologie clinique, médico-légale, de l'environnement et en entreprise.  
Laboratoire : Toxicologie.  
Locaux: N° 62 et 66.

### 2 DENOMINATION

Dosage quantitatif de 7 métabolites de phtalates, de 4 parabènes et de la benzophénone-3 dans l'urine par LC-MS/MS.

### 3 PRINCIPE

Après ajout de standards internes, l'échantillon urinaire subit une hydrolyse enzymatique et une extraction en phase solide sur cartouche Bond Elut Certify. L'éluat est évaporé à sec sous flux d'azote puis reconstitué dans un mélange eau/acétonitrile acidifié avec de l'acide acétique. Cette solution est injectée sur une LC-MS/MS. La méthode analytique permet le dosage quantitatif de 7 métabolites de phtalates, de 4 parabènes et de la benzophénone-3 dans l'urine. L'utilisation de trois conditions opératoires différentes (sans  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli* et  $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*) permet de quantifier les proportions relatives des composés étudiés sous formes libre, glucuroconjuguée et sulfoconjuguée.

### 4 REACTIFS

#### 4.1 Réactifs commerciaux

##### ***$\beta$ -glucuronidase Helix pomatia HP-2***

Fabricant : SIGMA-ALDRICH  
Référence : G7017

##### ***$\beta$ -glucuronidase Escherichia coli***

Fabricant : SIGMA-ALDRICH  
Référence : G7396

##### ***Acétate de sodium Normapur***

Fabricant : VWR Int.  
Référence : 27653.292

##### ***Acide acétique glacial***

Fabricant : Merck  
Référence : 1.00063.1000

##### ***Eau LC/MS***

Fabricant : BIOSOLVE  
Référence : 23217802

##### ***Acétonitrile LC/MS***

Fabricant : BIOSOLVE  
Référence : 01207802

### **Acide formique UPLC/MS**

Fabricant : BIOSOLVE

Référence : 06917832

### **Synthetic urine solution Ricca Chemical**

Fabricant : Thomas-Scientific

Référence : 83611

## **4.2 Réactifs préparés en laboratoire**

### **Acétate de sodium 1 M pH 4.5**

Peser 8.203 g d'acétate de sodium (MM=82.03 g/mol), les introduire dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter au trait avec de l'H<sub>2</sub>O LC/MS. Ajuster à pH 4.5 avec de l'acide acétique glacial 100% anhydre.

### **Acétate d'ammonium 1M pH 6.5**

Peser 7.708 g d'acétate d'ammonium (MM= 77,08 g/mol), les introduire dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter au trait avec de l'H<sub>2</sub>O LC/MS. Ajuster à pH 6.5 avec de l'acide acétique glacial 100% anhydre.

### **Acide acétique 0.5 % dans H<sub>2</sub>O LC/MS**

Dans un ballon jaugé de 500 ml, introduire un peu d'H<sub>2</sub>O LC/MS. Ajouter 2.5 ml d'acide acétique glacial 100% anhydre et compléter au trait avec de l'H<sub>2</sub>O LC/MS.

### **Phase mobile A : Acide acétique 0.1 % dans H<sub>2</sub>O LC/MS**

Dans un ballon jaugé de 1 L, introduire un peu d'H<sub>2</sub>O LC/MS. Ajouter 1 ml d'acide acétique glacial 100% anhydre et compléter au trait avec de l'H<sub>2</sub>O LC/MS.

### **Phase mobile B : Acide acétique 0.1 % dans acétonitrile LC/MS**

Dans un ballon jaugé de 500 ml, introduire un peu d'acétonitrile LC/MS. Ajouter 0.5 ml d'acide acétique glacial 100% anhydre et compléter au trait avec de l'acétonitrile LC/MS.

### **Solution de reprise : acide acétique 0.1 % dans H<sub>2</sub>O LC/MS / Acide acétique 0.1 % dans acétonitrile LC/MS (7/3 : V/V)**

Prélever 7 ml de phase mobile A, les introduire dans un tube à essais et ajouter 3 ml de phase mobile B.

### **Solution $\beta$ -glucuronidase *Escherichia coli* 1400 U/ml**

Diluer la poudre lyophilisée dans du tampon acétate d'ammonium 1M pH 6.5 pour obtenir une solution à 1400 U/ml de  $\beta$ -glucuronidase *Escherichia coli*.

## **4.3 Stockage**

Toutes les solutions sont conservées à température ambiante à l'exception des  $\beta$ -glucuronidases qui sont conservées à 4°C.

## 5 MATERIAUX DE REFERENCE

Composé	Fabricant	Concentration	Solvant	Référence
Monobenzyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	ULM-6149-MT-1.2
Monoéthyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	ULM-4585-MT-1.2
Mono-n-butyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	ULM-6148-MT-1.2
Mono-2-éthylhexyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	ULM-4583-MT-1.2
Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	ULM-4662-MT-1.2
Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	ULM-4663-MT-1.2
Mono-iso-butyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	ULM-7919-MT-1.2
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> monobenzyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	CLM-4591-MT-1.2
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-n-butyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	CLM-4590-MT-1.2
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	CLM-6640-MT-1.2
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> monoéthyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	CLM-4586-MT-1.2
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	CLM-6641-MT-1.2
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthylhexyl phtalate	Cambridge Isotope Laboratories	100 mg/L	Méthyl tert-butyl éther	CLM-6640-MT-1.2
Méthylparabène	Cambridge Isotope Laboratories	1 g/L	Méthanol	ULM-8250-1.2
n-butylparabène	Cambridge Isotope Laboratories	1 g/L	Méthanol	ULM-8287-1.2
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> méthylparabène	Cambridge Isotope Laboratories	1 g/L	Méthanol	CLM-8249-1.2
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> n-butylparabène	Cambridge Isotope Laboratories	1 g/L	Méthanol	CLM-8285-1.2
Éthylparabène	Sigma-Aldrich	Poudre 99%	-	111988
n-propylparabène	Sigma-Aldrich	Poudre >99%	-	P53357
Benzophénone-3	Thermo Fisher Scientific	Poudre 98%	-	10580551
n-propylparabène-2,3,5,6-d <sub>4</sub>	C/D/N Isotopes	Poudre 98%	-	D-7114
Éthylparabène-2,3,5,6-d <sub>4</sub>	C/D/N Isotopes	Poudre 98%	-	D-7237
2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone-2',3'-4',5'-6'-d <sub>5</sub>	C/D/N Isotopes	Poudre 98%	-	D-7066

Les matériaux de référence sous forme liquide sont conservés à 4°C. Ceux sous forme solide sont conservés à température ambiante.

## 6 APPAREILLAGE ET PETIT MATERIEL DE LABORATOIRE

### 6.1 Analyseur

UHPLC Acquity® Waters  
Quattro Premier® Waters

Voir **TOX.LCMS01.APP**

### 6.2 Petit matériel de laboratoire

- Pipettes de 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl + embouts pour pipettes.
- Tubes à essais ordinaires.
- Agitateur, vortex et centrifugeuse.
- Evaporateur.
- Four.
- Vials avec réducteurs et bouchons à visser.

## 7 SECURITE

Normes de sécurité en vigueur lors de la manipulation d'échantillons biologiques (voir **GEN/SBIO/PRO**) et lors de la manipulation de réactifs et de produits chimiques (voir **GEN/SCHI/PRO**).

## 8 ECHANTILLON

### 8.1 Nature de l'échantillon

Echantillon d'urine.

### 8.2 Préparation de l'échantillon

1. Préparation des solutions standards :

#### N-BUTYLPARABÈNE

##### **Solution fille de n-butylparabène à 250 mg/L**

Pour 1 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 1 g/L	250 µl
Acétonitrile	750 µl

#### ÉTHYLPARABÈNE

##### **Solution mère d'éthylparabène à 2 g/L**

Pour 10 ml de solution : peser 20.2 mg d'éthylparabène 99 %, les introduire dans un tube à essais et ajouter 10 ml d'acétonitrile.

### ***Solution fille d'éthylparabène à 250 mg/L***

Pour 2 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 2 g/L	250 µl
Acétonitrile	1750 µl

### **N-PROPYLPARABÈNE**

#### ***Solution mère de n-propylparabène à 2 g/L***

Pour 10 ml de solution : peser 20 mg de n-propylparabène >99 %, les introduire dans un tube à essais et ajouter 10 ml d'acétonitrile.

#### ***Solution fille de n-propylparabène à 250 mg/L***

Pour 2 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 2 g/L	250 µl
Acétonitrile	1750 µl

### **BENZOPHÉNONE-3**

#### ***Solution mère de benzophénone-3 à 2 g/L***

Pour 10 ml de solution : peser 20.4 mg de benzophénone-3 98 %, les introduire dans un tube à essais et ajouter 10 ml d'acétonitrile.

#### ***Solution fille de benzophénone-3 à 1 g/L***

Pour 2 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 2 g/L	1000 µl
Acétonitrile	1000 µl



**7 METABOLITES DE PHTALATE + 4 PARABÈNES + BENZOPHÉNONE-3**

***Solution mère 1 à 10 mg/L (à 40 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)***

Composé	Volume
Monobenzyl phtalate (100 mg/L)	25 µl
Monoéthyl phtalate (100 mg/L)	25 µl
Mono-n-butyl phtalate (100 mg/L)	25 µl
Mono-2-éthylhexyl phtalate (100 mg/L)	25 µl
Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate (100 mg/L)	25 µl
Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate (100 mg/L)	25 µl
Mono-iso-butyl phtalate (100 mg/L)	25 µl
Méthylparabène (1 g/L)	10 µl
Solution fille de n-butylparabène à 250 mg/L	10 µl
Solution fille d'éthylparabène à 250 mg/L	10 µl
Solution fille de n-propylparabène à 250 mg/L	10 µl
Solution fille de benzophénone-3 à 1 g/L	10 µl
Acétonitrile	25 µl

Cette solution est stable à 4°C pour, au moins, une durée de 120 jours.

***Solution mère 2 à 3 mg/L (à 12 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)***

Composé	Volume
Solution mère 1 (10 ou 40 mg/L)	120 µl
Acétonitrile	280 µl

***Solution mère 3 à 0.3 mg/L (à 1.2 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)***

Composé	Volume
Solution mère 2 (3 ou 12 mg/L)	35 µl
Acétonitrile	315 µl

***Solution mère 4 à 0.05 mg/L (à 0.2 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)***

Composé	Volume
Solution mère 3 (0.3 ou 1.2 mg/L)	25 µl
Acétonitrile	125 µl

### 2. Préparation des solutions de standards internes :

#### **$^{13}\text{C}_6$ MÉTHYLPARABÈNE**

##### ***Solution fille de $^{13}\text{C}_6$ méthylparabène à 100 mg/L***

Pour 1 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 1 g/L	100 $\mu\text{l}$
Acétonitrile	900 $\mu\text{l}$

#### **$^{13}\text{C}_6$ N-BUTYLPARABÈNE**

##### ***Solution fille de $^{13}\text{C}_6$ n-butylparabène à 100 mg/L***

Pour 1 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 1 g/L	100 $\mu\text{l}$
Acétonitrile	900 $\mu\text{l}$

#### **N-PROPYLPARABÈNE-2,3,5,6-d<sub>4</sub>**

##### ***Solution mère de n-propylparabène-2,3,5,6-d<sub>4</sub> à 2 g/L***

Pour 10 ml de solution : peser 20.4 mg de n-propylparabène-2,3,5,6-d<sub>4</sub> 98 %, les introduire dans un tube à essais et ajouter 10 ml d'acétonitrile.

##### ***Solution fille de n-propylparabène-2,3,5,6-d<sub>4</sub> à 100 mg/L***

Pour 1 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 2 g/L	50 $\mu\text{l}$
Acétonitrile	950 $\mu\text{l}$

#### **ÉTHYLPARABÈNE-2,3,5,6-d<sub>4</sub>**

##### ***Solution mère d'éthylparabène-2,3,5,6-d<sub>4</sub> à 2 g/L***

Pour 10 ml de solution : peser 20.4 mg d'éthylparabène-2,3,5,6-d<sub>4</sub> 98 %, les introduire dans un tube à essais et ajouter 10 ml d'acétonitrile.

**Solution fille d'éthylparabène-2,3,5,6-d<sub>4</sub> à 100 mg/L**

Pour 1 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 2 g/L	50 µl
Acétonitrile	950 µl

**2-HYDROXY-4-METHOXYBENZOPHÉNONE-2',3'-4',5'-6'-d<sub>5</sub>**

**Solution mère de 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone-2',3'-4',5'-6'-d<sub>5</sub> à 2 g/L**

Pour 10 ml de solution : peser 20.4 mg de 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone-2',3'-4',5'-6'-d<sub>5</sub> 98 %, les introduire dans un tube à essais et ajouter 10 ml d'acétonitrile.

**Solution fille de 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone-2',3'-4',5'-6'-d<sub>5</sub> à 100 mg/L**

Pour 1 ml de solution :

Composé	Volume
Solution mère à 2 g/L	50 µl
Acétonitrile	950 µl

**Solution fille 1 de standards internes à 5 mg/L**

Composé	Volume
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> monobenzyl phtalate (100 mg/L)	100 µl
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-n-butyl phtalate (100 mg/L)	100 µl
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate (100 mg/L)	100 µl
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> monoéthyl phtalate (100 mg/L)	100 µl
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate (100 mg/L)	100 µl
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthylhexyl phtalate (100 mg/L)	100 µl
Solution fille de <sup>13</sup> C <sub>6</sub> méthylparabène à 100 mg/L	100 µl
Solution fille de <sup>13</sup> C <sub>6</sub> n-butylparabène à 100 mg/L	100 µl
Solution fille de n-propylparabène-2,3,5,6-d <sub>4</sub> à 100 mg/L	100 µl
Solution fille d'éthylparabène-2,3,5,6-d <sub>4</sub> à 100 mg/L	100 µl
Solution fille de 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone-2',3'-4',5'-6'-d <sub>5</sub> à 100 mg/L	100 µl
Acétonitrile	900 µl

Cette solution est stable à 4°C pour, au moins, une durée de 120 jours.

## Annexe 1 : Mode opératoire

### 3. Droite de calibration :

C (µg/L)	BLC	0.5	1	2	5	10	20	50	100	200	
<b>C méthylparabène et benzophénone-3 (µg/L)</b>	<b>BLC</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	
Urine synthétique	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	µl
<b>Solution mère 1 à 10 mg/L</b> (à 40 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	µl
<b>Solution mère 2 à 3 mg/L</b> (à 12 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)	-	-	-	-	-	-	20	50	100	-	µl
<b>Solution mère 3 à 0.3 mg/L</b> (à 1.2 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)	-	-	-	20	50	100	-	-	-	-	µl
<b>Solution mère 4 à 0.05 mg/L</b> (à 0.2 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)	-	30	60	-	-	-	-	-	-	-	µl

### 4. Préparation des contrôles maisons :

<b>C (µg/L)</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	
<b>C méthylparabène et benzophénone-3 (µg/L)</b>	<b>40</b>	<b>400</b>	
Urine synthétique	3000	3000	µl
<b>Solution mère 2 à 3 mg/L</b> (à 12 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)	-	100	µl
<b>Solution mère 3 à 0.3 mg/L</b> (à 1.2 mg/L en méthylparabène et en benzophénone-3)	100	-	µl

### 5. Technique d'extraction :

Centrifuger les urines ±5 minutes à 3000 tours/minutes.

Dans un tube à essais :

Standard, contrôle ou échantillon		3000 µl
Solution fille 1 de SI à 5 mg/L		20 µl
<b><i>Helix pomatia</i></b> <b>Acétate de sodium</b> <b>1 M pH 4.5</b> 750 µl	<b><i>Escherichia coli</i></b> <b>Acétate d'ammonium</b> <b>1 M pH 6.5</b> 750 µl	<b>Sans β-glucuronidase</b> <b>Acétate de sodium</b> <b>1 M pH 4.5</b> 750 µl
<b>β-glucuronidase</b> <b><i>Helix pomatia</i></b> 25 µl	<b>β-glucuronidase</b> <b><i>Escherichia coli</i> 1400 U/ml</b> 15 µl	- -
<b>Mélanger à la main (en retournant le portoir plusieurs fois)</b>		
<b>Mettre à l'étuve à 40°C pendant une nuit</b>		-
Acide formique		200 µl
<b>Centrifuger ±5 minutes à 3000 tours/minutes</b>		

## Annexe 1 : Mode opératoire

Extraction sur colonnes Agilent Technologies Bond Elut Certify 10cc (130 mg)  
(référence : 12113050)

Conditionnement	
Acétonitrile	1.5 ml
Acide acétique 0.5 %	1.5 ml
Chargement de l'échantillon	
Lavage	
Acide acétique 0.5 %	1 ml
Séchage	
Elution	
Acétonitrile	1.5 ml
Acétonitrile	1.5 ml
Evaporer jusqu'à sec sous azote à max 40°C	
Solution de reprise : H <sub>2</sub> O / Acétonitrile (7/3 : V/V) 0.1 % HAc	70 µl
Transfert des 70 µl dans un tube Eppendorf	
Centrifuger	
Mise en vial avec réducteur et bouchon UPLC	

### 8.3 Conservation de l'échantillon

Conservation des échantillons d'urine à -20°C pendant plusieurs mois (au moins 1 an pour les phtalates et 6 mois pour les parabènes et la benzophénone-3). Les extraits d'urine conservés à -20°C sont stables au moins 7 jours.

### 8.4 Interférences

Sans objet.

### 8.5 Volume nécessaire pour réaliser l'analyse

3 ml d'urine.

## 9 FREQUENCE DES DOSAGES ET DELAIS DE REPONSE

### 9.1 Fréquences

Ce dosage est réalisé une fois par mois.

### 9.2 Délais de réponse

1 mois.

## 10 MODE OPERATOIRE

- LCMS01

UHPLC-MS/MS Acquity® Waters - Quattro Premier® Waters

Voir *TOX.LCMS01.APP*

**PROJET :** PHTALATE\_LD.PRO

**INLET METHOD :** Kinetetex\_inlet1reduit\_test

**MS FILE :** 130306\_MRM\_istd

**MS TUNE FILE:** PHTALATES130201

**QUANLYNX METHOD :** PhtaParaBP3\_targetlynx

**RINCAGE :** RINCAGE\_ORG\_ACN\_small

**VOLUME INJECTION :** 5 µl

**RUN :** 20 min

**FLOW :** 0.55 ml/min

**PHASES MOBILES :**

**VOIE A2 :** Acide acétique 0.1 % dans H<sub>2</sub>O LC/MS

**VOIE B2 :** Acide acétique 0.1 % dans acétonitrile LC/MS

**VOIE A1 :** H<sub>2</sub>O LC/MS

**VOIE B1 :** Acétonitrile LC/MS

**COLONNE :** Kinetex 1.7 µm Phenyl-Hexyl 100 Å, 100 x 2.1 mm COLUMN

Fabricant : PHENOMENEX

Référence : 00D-4500-AN

**TEMPERATURE COLONNE :** 35°C

## 11 EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en µg/L.

## 12 CONTROLE DE QUALITE

Interne :

*Contrôles « maisons »*

Externe :

*G-EQUAS (2 échantillons 1 fois par an)*

## 13 BIBLIOGRAPHIE

Dewalque L, Pirard C, Dubois N, Charlier C. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2014 ; 949-950 : 37-47.

Dewalque L, Pirard C, Charlier C. Measurement of urinary biomarkers of parabens, benzophenone-3, and phthalates in a Belgian population. Biomedical Research International 2014; 2014: 649314.

### 14 INTERET DU DOSAGE

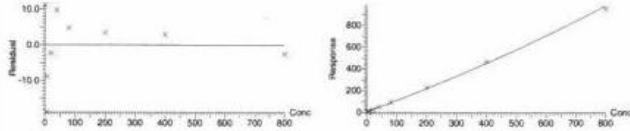
Les phtalates, les parabènes et la benzophénone-3 sont des polluants environnementaux possédant des propriétés de perturbateurs endocriniens. Les impacts qu'ils peuvent avoir sur la santé de l'Homme sont encore mal définis. Ils sont cependant suspectés d'être impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies hormono-dépendantes, comme par exemples, les cancers de glandes endocrines (sein, prostate, testicule...), les troubles de la fertilité (qualité du sperme, endométriose...), les troubles métaboliques (diabète, obésité, troubles thyroïdiens...), etc. Le dosage de ces biomarqueurs dans la matrice urinaire permet de mesurer l'exposition environnementale d'un individu à ces composés perturbateurs endocriniens.

15 EXEMPLES DE DROITE DE CALIBRATION

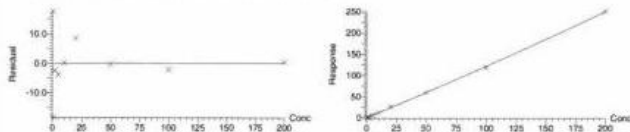
Dataset: C:\MassLynx\PHALATES LD.PRO\SampleDB\131114\_ENDO\_IFES\_GERI\_GEUAS.qld  
 Last Altered: Friday, November 15, 2013 10:00:55 Paris, Madrid  
 Printed: Friday, November 15, 2013 10:04:21 Paris, Madrid

Method: C:\MassLynx\PHALATES LD.PRO\MethDB\ParaBP3\_targetlynx.mdb 15 Nov 2013 09:34:28  
 Calibration: 15 Nov 2013 09:59:47

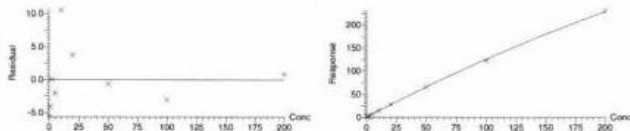
Compound name: MeP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.989587  
 Calibration curve:  $0.000245871 \cdot x^2 + 1.0255 \cdot x + 3.14364$   
 Response type: Internal Std ( Ref 13 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x<sup>2</sup>, Axis trans: None



Compound name: MEP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.999325  
 Calibration curve:  $0.000313416 \cdot x^2 + 1.19987 \cdot x + 0.0434271$   
 Response type: Internal Std ( Ref 14 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

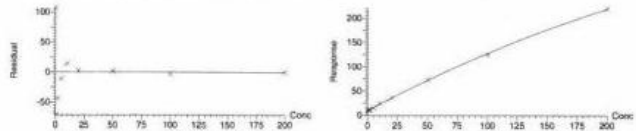


Compound name: EP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.999268  
 Calibration curve:  $-0.00110515 \cdot x^2 + 1.36896 \cdot x + 0.136625$   
 Response type: Internal Std ( Ref 15 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

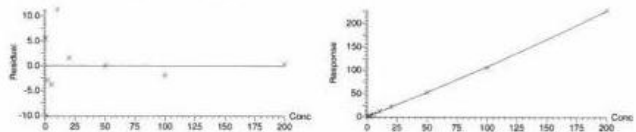


Dataset: C:\MassLynx\PHALATES LD.PRO\SampleDB\131114\_ENDO\_IFES\_GERI\_GEUAS.qld  
 Last Altered: Friday, November 15, 2013 10:00:55 Paris, Madrid  
 Printed: Friday, November 15, 2013 10:04:21 Paris, Madrid

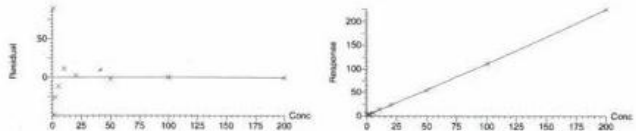
Compound name: PrP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.993496  
 Calibration curve:  $-0.00133928 \cdot x^2 + 1.31859 \cdot x + 9.24054$   
 Response type: Internal Std ( Ref 16 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: MnBP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.999522  
 Calibration curve:  $0.000616119 \cdot x^2 + 1.00868 \cdot x + 0.664199$   
 Response type: Internal Std ( Ref 17 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

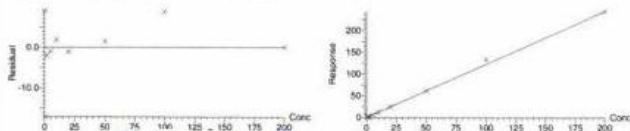


Compound name: MBP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.999897  
 Calibration curve:  $0.000295922 \cdot x^2 + 1.05442 \cdot x + 1.42294$   
 Response type: Internal Std ( Ref 17 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: None, Axis trans: None

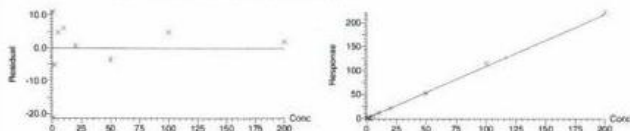


Dataset: C:\MassLynx\PHALATES LD.PRO\SampleDB\131114\_ENDO\_IFES\_GERI\_GEUAS.qld  
 Last Altered: Friday, November 15, 2013 10:00:55 Paris, Madrid  
 Printed: Friday, November 15, 2013 10:04:21 Paris, Madrid

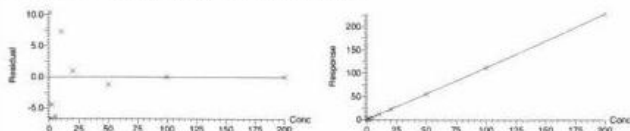
Compound name: **5-OXO-MEHP**  
 Correlation coefficient:  $r = 0.996268$ , R<sup>2</sup> = 0.992549  
 Calibration curve:  $1.22485 \cdot x + 0.194651$   
 Response type: Internal Std ( Ref 18 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x<sup>2</sup>, Axis trans: None



Compound name: **5-OH-MEHP**  
 Correlation coefficient:  $r = 0.994336$ , R<sup>2</sup> = 0.985701  
 Calibration curve:  $1.08368 \cdot x + 0.0425779$   
 Response type: Internal Std ( Ref 19 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x<sup>2</sup>, Axis trans: None

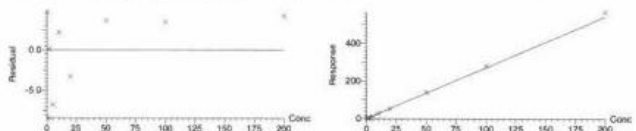


Compound name: nBP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.999745  
 Calibration curve:  $0.000171685 \cdot x^2 + 1.1049 \cdot x + 0.00184069$   
 Response type: Internal Std ( Ref 20 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

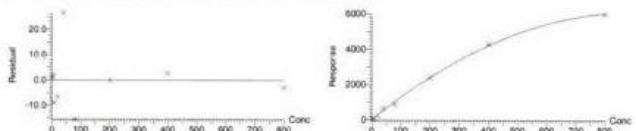


Dataset: C:\MassLynx\PHALATES LD.PRO\SampleDB\131114\_ENDO\_IFES\_GERI\_GEUAS.qld  
 Last Altered: Friday, November 15, 2013 10:00:55 Paris, Madrid  
 Printed: Friday, November 15, 2013 10:04:21 Paris, Madrid

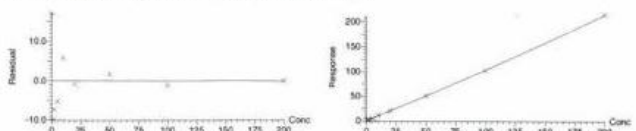
Compound name: MBzP  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998403$ , R<sup>2</sup> = 0.996809  
 Calibration curve:  $2.71041 \cdot x + 0.287894$   
 Response type: Internal Std ( Ref 21 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x<sup>2</sup>, Axis trans: None



Compound name: BP3  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.980008  
 Calibration curve:  $-0.00756355 \cdot x^2 + 13.5638 \cdot x + 4.93265$   
 Response type: Internal Std ( Ref 22 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x<sup>2</sup>, Axis trans: None



Compound name: MEHP  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.999718  
 Calibration curve:  $0.00038721 \cdot x^2 + 0.990674 \cdot x + 0.270879$   
 Response type: Internal Std ( Ref 23 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None





### 16 PARAMÈTRES DE VALIDATION

Les paramètres suivants sont présentés dans les annexes 2, 3 et 4 pour chacune des trois conditions opératoires : la justesse, la fidélité, l'incertitude de mesure, l'exactitude, la linéarité, les limites de quantification et la limite de détection.

La justesse exprime l'écart de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques. La justesse est exprimée ici en termes de biais relatif.

La fidélité exprime l'écart de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité (ou la précision) intermédiaire. La fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) est exprimée ici en termes de coefficient de variation (CV).

L'incertitude est un paramètre associé au résultat de la mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait raisonnablement être attribuée au mesurande. L'incertitude de mesure est exprimée ici en termes d'incertitude relative étendue.

L'exactitude exprime l'écart de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également "valeur conventionnellement vraie". L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude. Les limites d'acceptation ont été fixées à  $\pm 50\%$  pour les valeurs basses et à  $\pm 30\%$  pour les concentrations élevées et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique. Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part, les bornes inférieures et d'autre part, les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration. La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées *a priori*.

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

La limite inférieure de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification (ou limite de linéarité) qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau  $\beta$ , sortent des limites d'acceptation. L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure. Il existe deux façons de calculer la limite de détection, soit comme la limite inférieure de quantification divisée par 3.3, soit en utilisant la méthode de Miller et Miller.

### 16.1 Evaluation de l'effet matrice

L'effet matrice a été calculé pour chacune des molécules dosées sans standard interne et après correction en présence de standard interne. L'effet matrice a été évalué à 10.0 et 100.0 µg/L dans 10 échantillons d'urine différents. Les résultats obtenus étant similaires aux deux niveaux de concentration, seule la moyenne de l'effet matrice est présentée dans le tableau ci-dessous.

Composé	Effet matrice sans standard interne (%)	Effet matrice avec standard interne (%)
Monobenzyl phtalate	29.1	98.3
Monoéthyl phtalate	27.8	97.0
Mono-n-butyl phtalate	39.9	101.5
Mono-2-éthylhexyl phtalate	120.9	98.5
Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	31.3	99.8
Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	29.9	98.7
Mono-iso-butyl phtalate	41.7	108.3
Méthylparabène	24.7	98.7
n-butylparabène	53.6	97.9
Éthylparabène	19.9	99.4
n-propylparabène	35.9	112.5
Benzophénone-3	122.2	102.0

## 16.2 Spécificité

Composé	Temps de rétention approximatif (min)	Transition 1 (quantification) (m/z)	Transition 2 (qualification) (m/z)
Monobenzyl phtalate	± 10.2	254.8>77.0	254.8>183.0
Monoéthyl phtalate	± 4.9	192.7>77.0	192.7>121.0
Mono-n-butyl phtalate	± 9.1	220.8>77.0	220.8>177.1
Mono-2-éthylhexyl phtalate	± 13.7	276.9>134.0	276.9>77.0
Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	± 9.3	292.9>121.0	292.9>145.0
Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	± 9.6	290.9>120.9	290.9>143.0
Mono-iso-butyl phtalate	± 8.9	220.8>77.0	220.8>134.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> monobenzyl phtalate	± 10.2	258.8>79.0	258.8>186.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-n-butyl phtalate	± 9.1	224.8>79.0	224.8>180.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	± 9.6	294.9>124.0	294.9>143.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> monoéthyl phtalate	± 4.9	196.8>79.0	196.8>123.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	± 9.3	296.9>124.0	296.9>145.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> mono-2-éthylhexyl phtalate	± 13.7	281.0>137.0	281.0>79.0
Méthylparabène	± 4.2	150.7>92.0	150.7>136.0
n-butylparabène	± 10.6	192.8>92.0	192.8>137.0
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> méthylparabène	± 4.2	156.8>98.0	156.8>142.0
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> n-butylparabène	± 10.6	198.8>98.0	198.8>142.0
Éthylparabène	± 6.8	164.7>92.0	164.7>137.0
n-propylparabène	± 8.8	178.8>92.0	178.8>136.0
Benzophénone-3	± 12.9	228.9>105.0	228.9>151.0
n-propylparabène-2,3,5,6-d <sub>4</sub>	± 8.7	182.8>96.0	182.8>140.0
Éthylparabène-2,3,5,6-d <sub>4</sub>	± 6.8	168.8>96.0	168.8>140.9
2-hydroxy-4-methoxybenzophénone-2',3',4',5',6'-d <sub>5</sub>	± 12.9	234.4>110.0	234.4>151.0

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### 1. Limite de détection, de quantification et de linéarité

Analyte	Limite de détection ( $\mu\text{g/L}$ )	Limite de quantification ( $\mu\text{g/L}$ )	Limite de linéarité ( $\mu\text{g/L}$ )
Monobenzyl phtalate	0.19	0.61	200.0
Monoéthyl phtalate	0.28	0.94	200.0
Mono-n-butyl phtalate	0.30	0.99	200.0
Mono-2-éthylhexyl phtalate	0.19	0.62	200.0
Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	0.13	0.43	200.0
Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	0.16	0.53	200.0
Mono-iso-butyl phtalate	0.37	1.23	200.0
Méthylparabène	0.16	0.79	800.0
n-butylparabène	0.30	1.00	200.0
Éthylparabène	0.09	0.30	200.0
n-propylparabène	0.11	0.36	200.0
Benzophénone-3	0.20	0.67	800.0

### 2. Précision

#### Monobenzyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	40.42	40.42
0.4	16.03	17.18
0.5	4.96	7.55
0.6	22.21	26.01
0.8	6.52	7.34
1	13.46	13.46
2	7.83	8.60
10	3.32	4.72
20	4.92	4.92
100	6.11	6.82
200	3.33	7.05

**Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
β-glucuronidase d'*Helix pomatia***

Monoéthyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	120.4	172.2
0.4	10.42	44.00
0.5	11.03	16.42
0.6	33.61	33.61
0.8	14.86	20.13
1	15.24	15.24
2	8.25	8.47
10	4.69	5.95
20	2.49	7.92
100	4.05	10.22
200	3.70	11.37

Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	106.4	106.4
0.4	55.55	55.55
0.5	69.45	69.45
0.6	40.64	40.64
0.8	34.60	40.02
1	15.85	16.00
2	7.99	7.99
10	9.51	9.51
20	5.68	7.20
100	3.06	3.06
200	4.32	6.73

Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	32.77	65.92
0.4	20.33	33.76
0.5	25.88	25.88
0.6	11.44	24.12
0.8	21.47	25.99
1	-	-
2	9.37	9.49
10	6.01	6.04
20	3.35	4.91
100	3.45	3.45
200	2.72	4.11

**Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
β-glucuronidase d'*Helix pomatia***

Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	16.01	18.30
0.4	35.29	35.29
0.5	18.82	20.12
0.6	10.27	10.27
0.8	20.95	20.95
1	14.10	15.15
2	5.30	5.30
10	7.56	7.65
20	7.82	7.82
100	3.96	3.96
200	3.51	5.21

Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	11.89	29.04
0.4	20.07	20.07
0.5	11.19	23.89
0.6	17.81	17.81
0.8	9.31	9.72
1	13.32	13.32
2	6.97	7.03
10	6.33	10.24
20	4.44	6.66
100	4.31	5.80
200	7.24	7.24

Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	250.7	283.8
0.4	51.79	63.16
0.5	73.94	80.21
0.6	120.1	120.1
0.8	26.25	28.41
1	16.20	16.20
2	17.30	17.71
10	6.96	9.91
20	5.22	7.21
100	5.21	5.21
200	5.72	8.57

**Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
 $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia***

Méthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	76.33	119.5
0.4	45.35	57.92
0.6	19.56	33.20
0.8	13.10	21.63
1	12.93	18.62
2	13.90	13.90
8	6.51	11.10
40	3.74	10.30
80	3.51	5.79
400	5.68	7.93
800	1.52	8.87

n-butylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	150.4	150.4
0.4	63.64	63.64
0.5	48.72	68.14
0.6	26.99	44.56
0.8	40.79	41.71
1	28.58	28.6
2	9.01	9.01
10	2.69	6.87
20	2.61	9.47
100	4.06	9.70
200	3.59	8.82

Éthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	26.03	27.43
0.4	8.69	12.41
0.5	7.70	10.14
0.6	6.40	8.10
0.8	7.13	7.27
1	5.75	7.33
2	10.00	11.23
10	2.81	4.80
20	3.77	9.14
100	6.49	8.84
200	4.08	10.19

**Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
β-glucuronidase d'*Helix pomatia***

*n-propylparabène*

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	37.01	43.28
0.4	14.92	19.61
0.5	18.61	18.61
0.6	25.39	25.39
0.8	8.79	10.74
1	16.50	16.50
2	14.07	16.08
10	2.78	5.09
20	4.30	4.75
100	4.59	5.71
200	7.49	12.49

*Benzophénone-3*

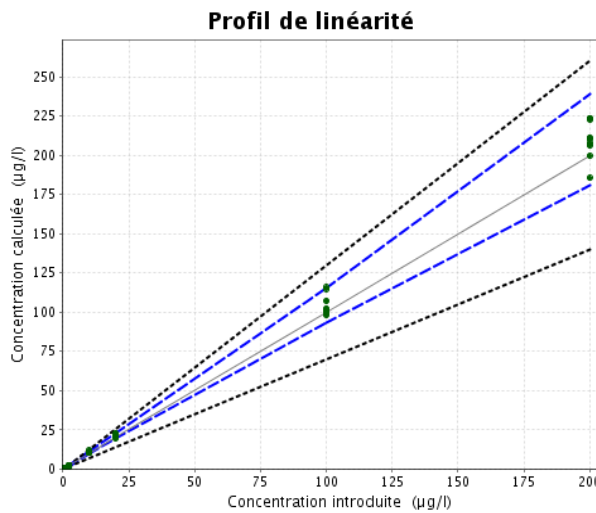
Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	140.2	140.2
0.4	41.98	43.55
0.6	31.32	31.32
0.8	14.91	17.98
1	11.00	19.33
2	7.70	7.70
8	4.63	4.99
40	2.18	4.91
80	3.62	5.65
400	5.71	9.74
800	6.99	11.92



## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### 3. Linéarité

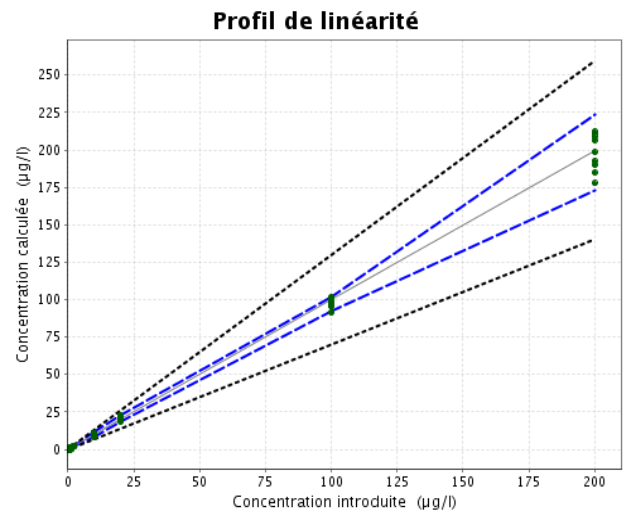
#### Monobenzyl phtalate



$$Y = -0.02525 + 1.049 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9959$

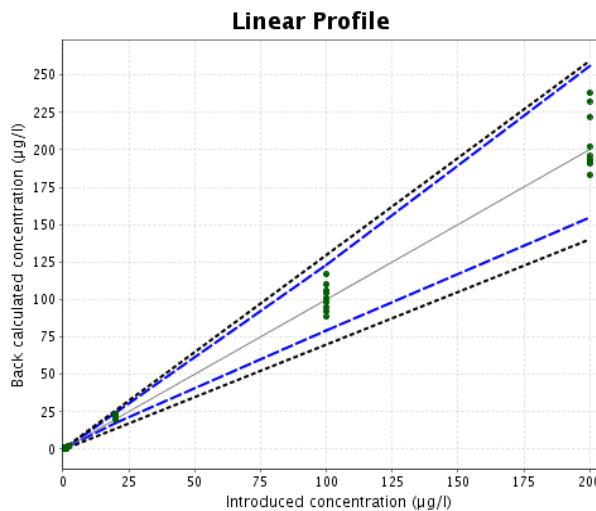
#### Mono-n-butyl phtalate



$$Y = -0.06391 + 0.9871 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9961$

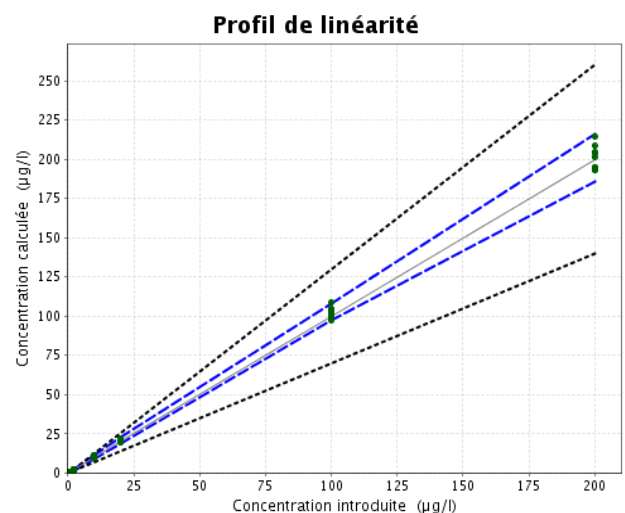
#### Monoéthyl phtalate



$$Y = -0.007109 + 1.025 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9897$

#### Mono-2-éthylhexyl phtalate



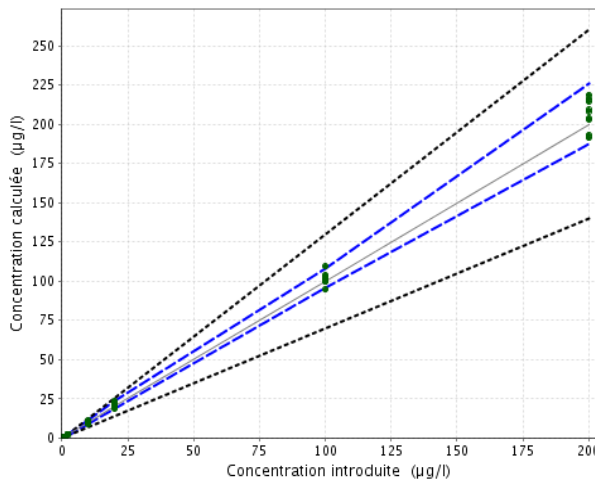
$$Y = 0.2308 + 1.008 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9983$

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

**Profil de linéarité**

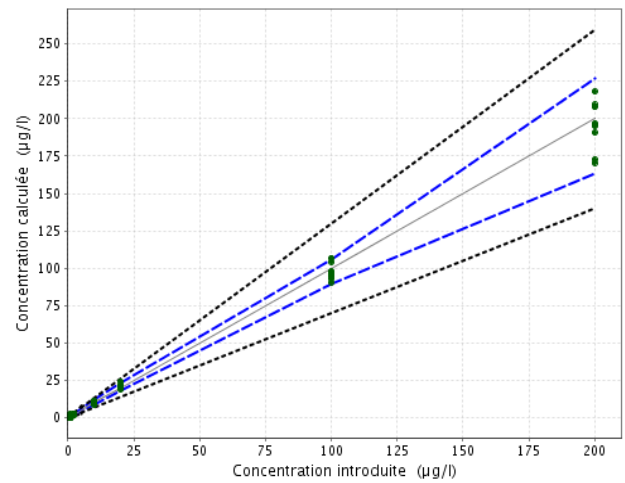


$$Y = -0.06930 + 1.030 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9976$

### Mono-iso-butyl phtalate

**Profil de linéarité**

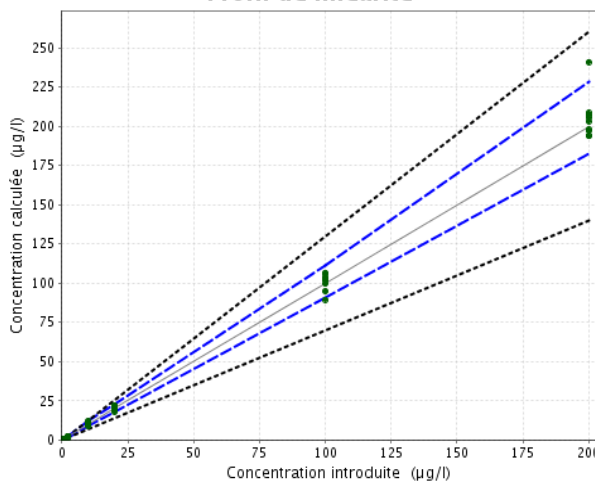


$$Y = 0.08788 + 0.9758 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9933$

### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

**Profil de linéarité**

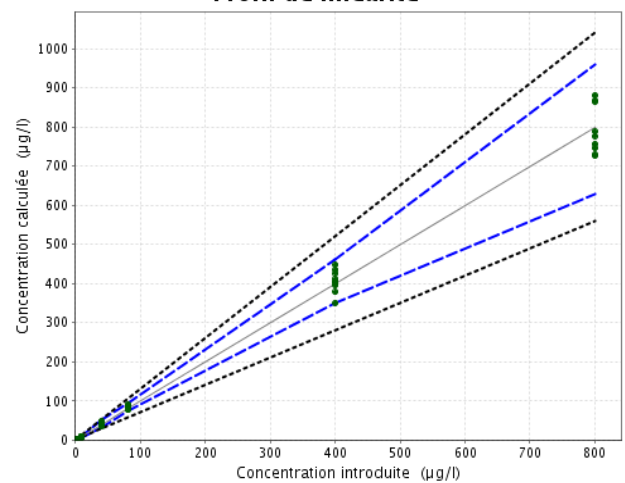


$$Y = -0.1084 + 1.024 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9949$

### Méthylparabène

**Profil de linéarité**

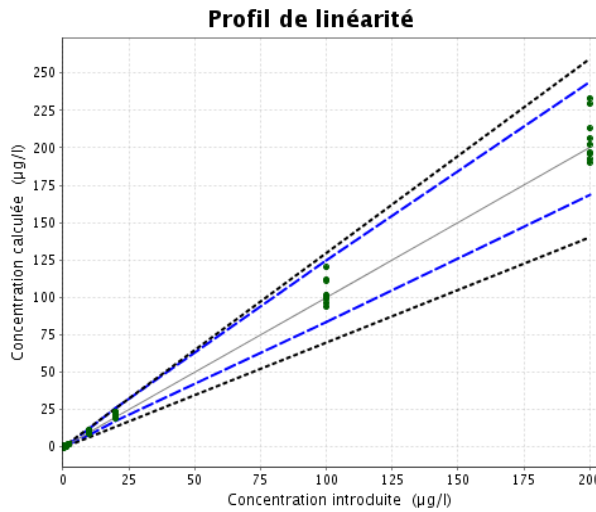


$$Y = 1.250 + 0.9940 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9933$

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

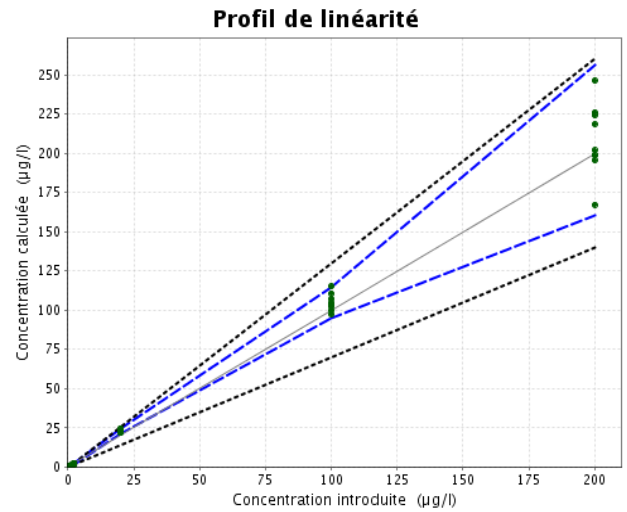
### n-butylparabène



$$Y = 0.05246 + 1.035 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9933$

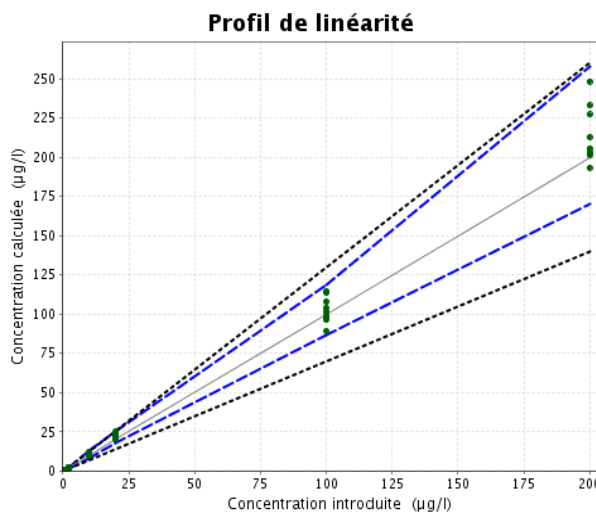
### n-propylparabène



$$Y = 0.1884 + 1.044 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9887$

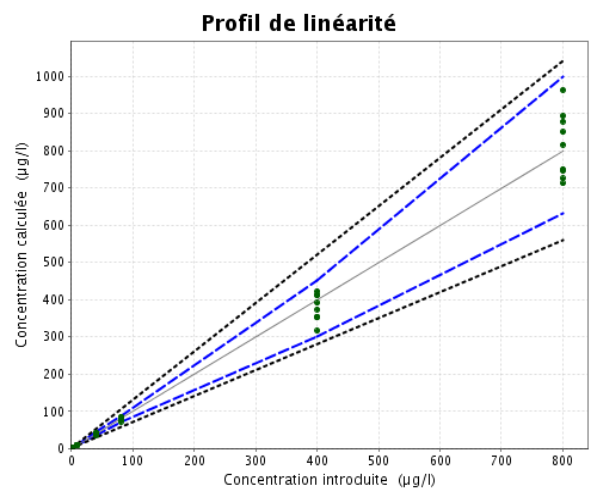
### Éthylparabène



$$Y = -0.1811 + 1.063 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9919$

### Benzophénone-3



$$Y = -1.253 + 1.005 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9869$

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### 4. Exactitude

#### Justesse :

##### Monobenzyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-3.48
0.4	-1.07
0.5	-6.81
0.6	-8.14
0.8	-14.25
1	-12.82
2	0.74
10	8.76
20	6.09
100	4.51
200	5.01

##### Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-24.79
0.4	-33.30
0.5	-1.58
0.6	-20.26
0.8	-42.21
1	-22.73
2	7.67
10	-1.11
20	3.12
100	-2.79
200	-1.01

##### Monoéthyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	87.23
0.4	2.20
0.5	9.56
0.6	-5.13
0.8	-29.78
1	-19.12
2	9.35
10	-5.20
20	6.59
100	1.33
200	2.80

##### Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	87.64
0.4	22.94
0.5	2.10
0.6	1.36
0.8	-1.32
1	-
2	3.44
10	1.48
20	4.60
100	2.48
200	0.49

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-8.54
0.4	-11.87
0.5	16.45
0.6	-19.81
0.8	-14.47
1	-16.72
2	4.30
10	3.89
20	4.79
100	1.81
200	3.22

### Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	22.26
0.4	-65.86
0.5	7.88
0.6	-28.97
0.8	-58.51
1	-29.89
2	5.20
10	1.68
20	4.89
100	-2.67
200	-2.37

### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	32.65
0.4	10.47
0.5	-3.73
0.6	-12.60
0.8	-8.95
1	-20.92
2	-2.85
10	6.13
20	1.44
100	0.86
200	2.65

### Méthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	143.6
0.4	59.51
0.6	22.46
0.8	7.04
1	2.78
2	-0.31
8	3.14
40	4.79
80	5.65
400	1.43
800	-0.92

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### n-butylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-52.76
0.4	26.87
0.5	31.73
0.6	-16.86
0.8	-17.61
1	-4.81
2	-5.87
10	-2.77
20	7.10
100	4.00
200	3.33

### n-propylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-26.11
0.4	-2.32
0.5	-0.32
0.6	-3.85
0.8	-13.85
1	-0.54
2	0.83
10	7.84
20	13.71
100	5.00
200	4.27

### Éthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	21.19
0.4	13.74
0.5	4.35
0.6	-5.59
0.8	-3.96
1	-6.09
2	8.05
10	3.17
20	8.66
100	2.71
200	7.05

### Benzophénone-3

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	246.7
0.4	72.94
0.6	15.36
0.8	-5.39
1	-2.94
2	-0.84
8	6.57
40	-0.25
80	0.71
400	-5.84
800	1.87

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### 5. Incertitude de mesure

#### Monobenzyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	85.21
0.4	36.68
0.5	16.79
0.6	56.29
0.8	15.80
1	28.37
2	18.45
10	10.45
20	10.37
100	14.67
200	15.96

#### Monoéthyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	381.2
0.4	101.1
0.5	36.46
0.6	70.85
0.8	44.33
1	32.13
2	17.94
10	12.96
20	18.13
100	23.30
200	26.02

#### Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	224.2
0.4	117.1
0.5	146.4
0.6	85.67
0.8	86.49
1	33.79
2	16.85
10	20.04
20	15.73
100	6.46
200	14.99

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	149.1
0.4	75.58
0.5	54.55
0.6	54.65
0.8	56.51
1	-
2	20.05
10	12.75
20	10.90
100	7.27
200	9.15

### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	39.47
0.4	74.41
0.5	42.94
0.6	21.65
0.8	44.16
1	32.36
2	11.17
10	16.16
20	16.48
100	8.36
200	11.56

### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	66.13
0.4	42.30
0.5	54.17
0.6	37.56
0.8	20.66
1	28.07
2	14.84
10	22.88
20	14.81
100	12.75
200	15.26



## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	611.3
0.4	137.5
0.5	171.6
0.6	253.3
0.8	60.76
1	34.99
2	37.50
10	21.92
20	15.92
100	10.98
200	19.03

### Méthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	266.5
0.4	126.8
0.6	74.43
0.8	48.40
1	41.25
2	29.30
8	24.89
40	23.52
80	12.96
400	17.51
800	20.44

### n-butylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	317.2
0.4	134.2
0.5	150.5
0.6	99.71
0.8	88.31
1	60.31
2	19.00
10	15.66
20	21.72
100	22.07
200	20.09

## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### Éthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	58.41
0.4	27.47
0.5	22.28
0.6	17.71
0.8	15.38
1	16.02
2	24.15
10	9.06
20	20.82
100	19.48
200	23.22

### n-propylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	93.67
0.4	43.05
0.5	39.23
0.6	53.52
0.8	23.37
1	34.78
2	34.69
10	11.37
20	10.19
100	12.46
200	27.96

### Benzophénone-3

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	295.6
0.4	92.46
0.6	66.02
0.8	39.08
1	43.41
2	16.23
8	10.67
40	11.16
80	12.58
400	21.85
800	26.73

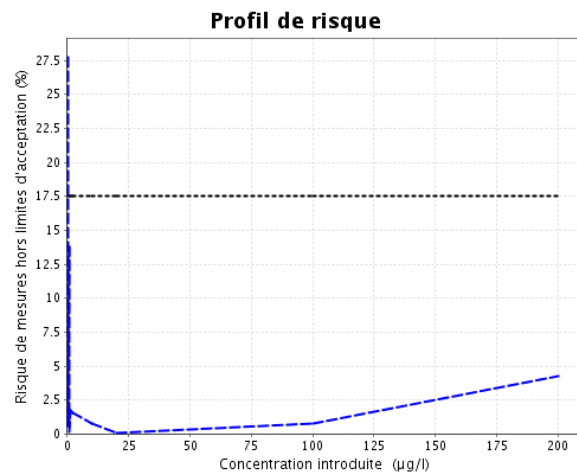
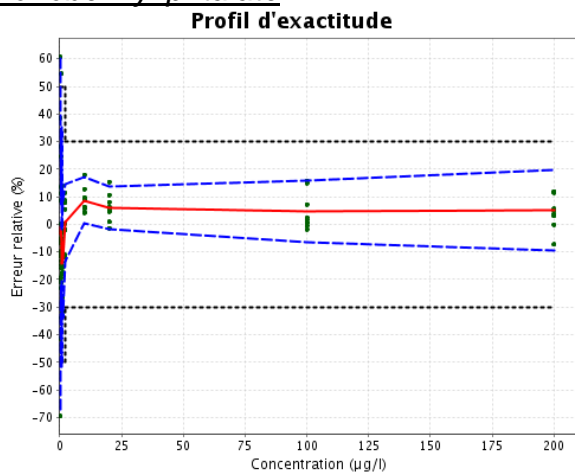
## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### Graphiques d'exactitude et de risque :

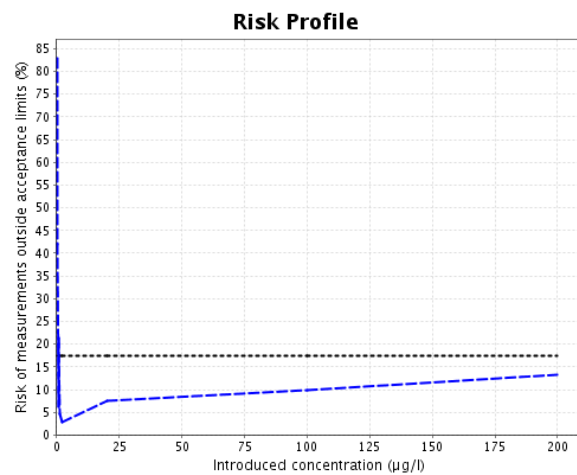
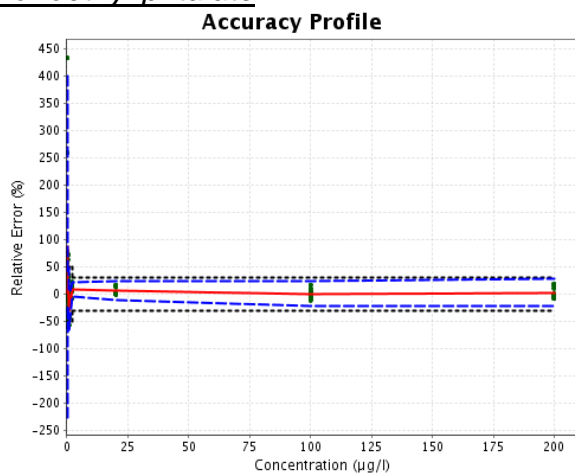
Les profils d'exactitude sont acceptables.

Les valeurs inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance sont comprises dans les limites d'acceptation (50 % jusque 2  $\mu\text{g/L}$  pour tous les composés, jusque 5  $\mu\text{g/L}$  pour le mono-iso-butyl phtalate et 30 % pour les valeurs supérieures à 2 et à 5  $\mu\text{g/L}$ ) dans le domaine de concentrations validé.

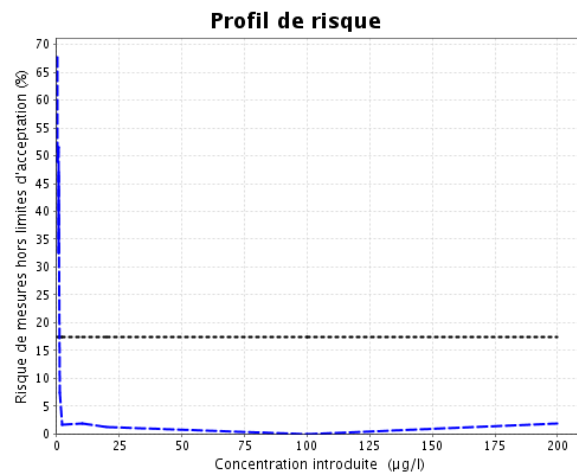
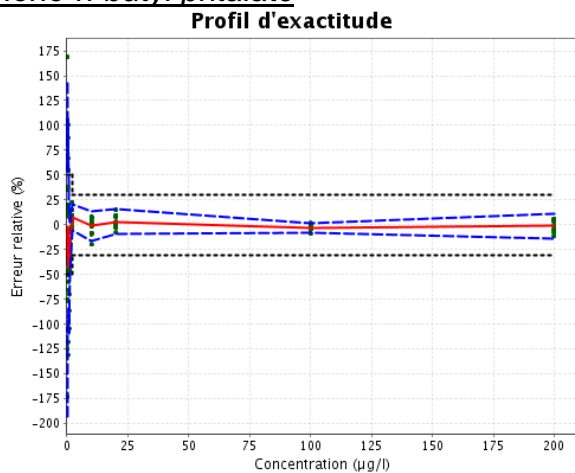
### Monobenzyl phtalate



### Monoéthyl phtalate



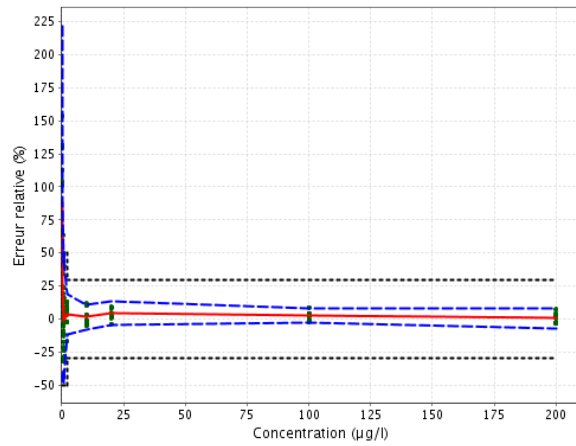
### Mono-n-butyl phtalate



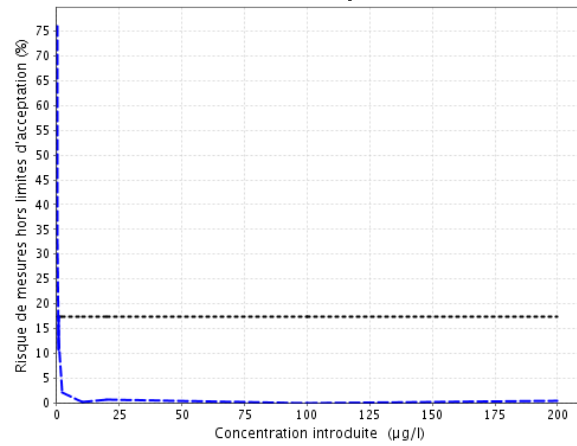
## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

### Mono-2-éthylhexyl phtalate

Profil d'exactitude

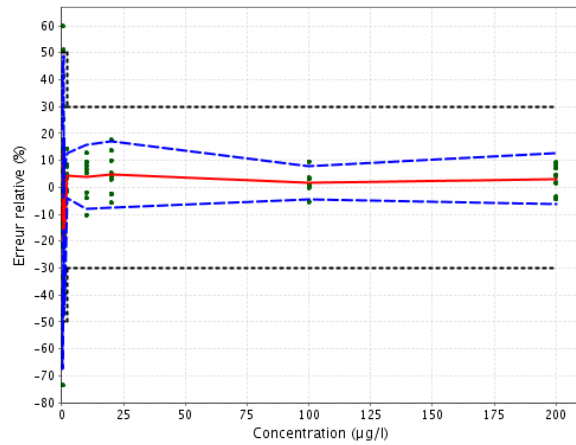


Profil de risque

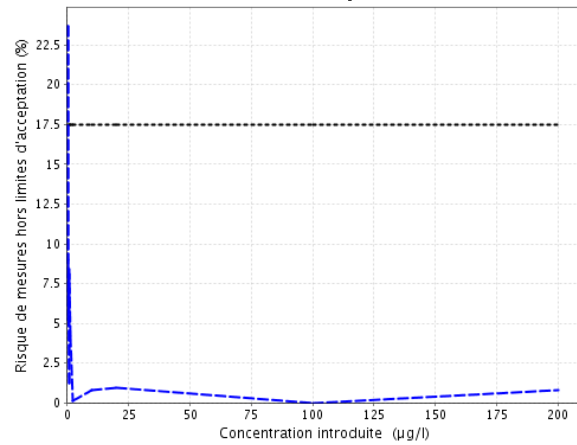


### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Profil d'exactitude

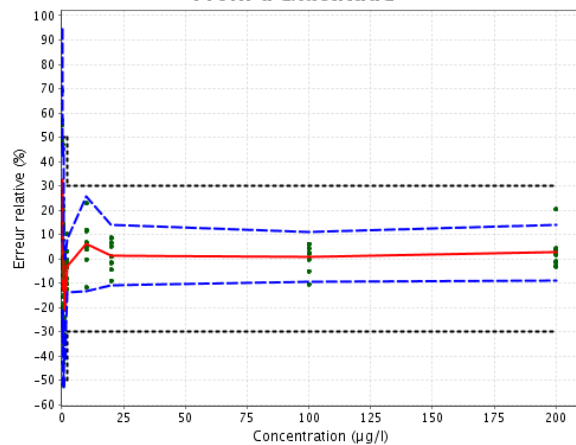


Profil de risque

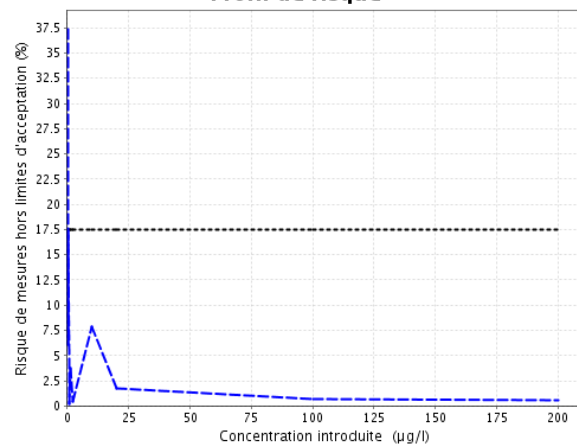


### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Profil d'exactitude

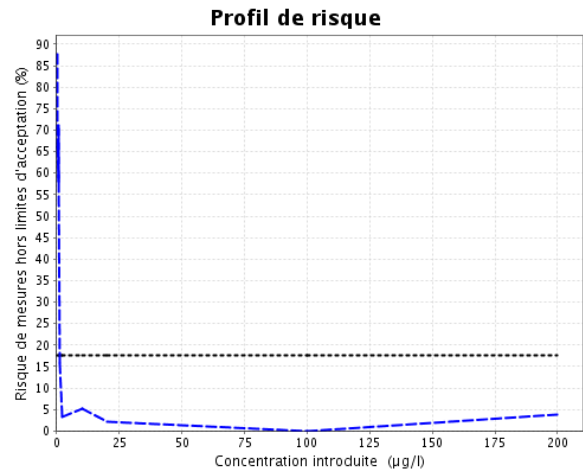
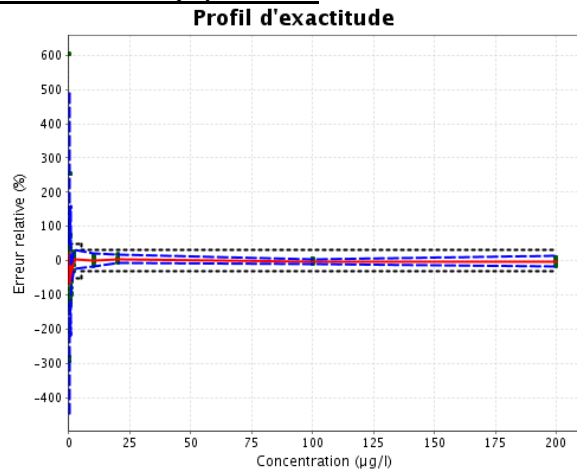


Profil de risque

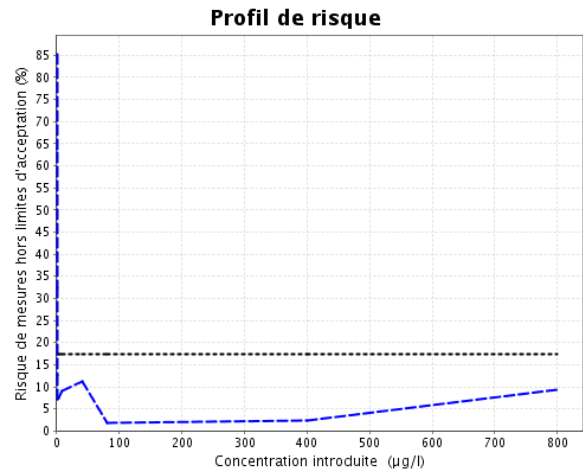
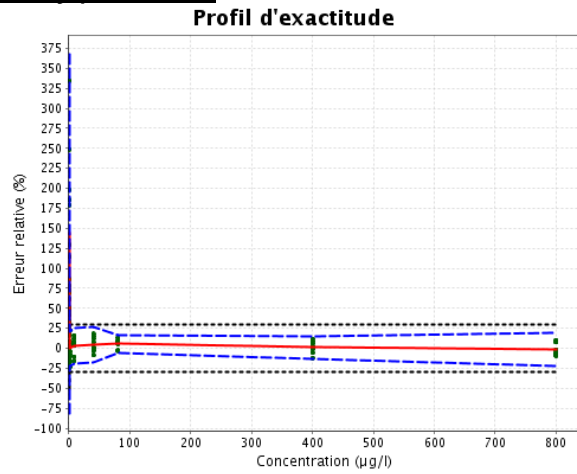


## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

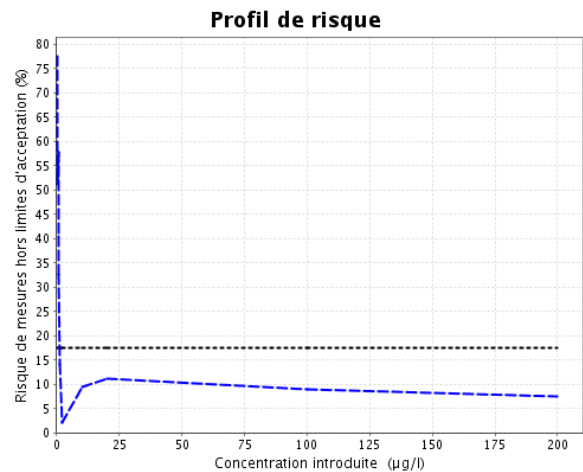
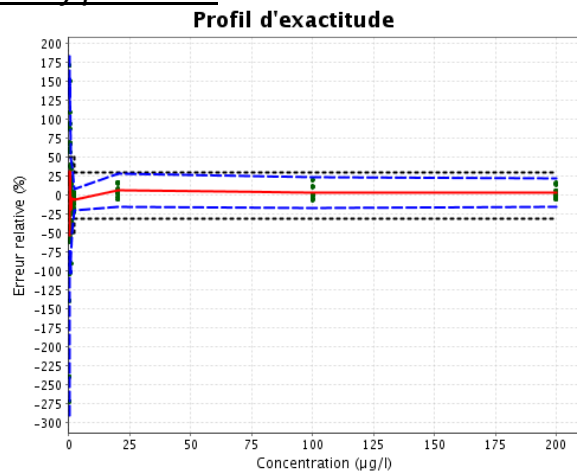
### Mono-iso-butyl phtalate



### Méthylparabène

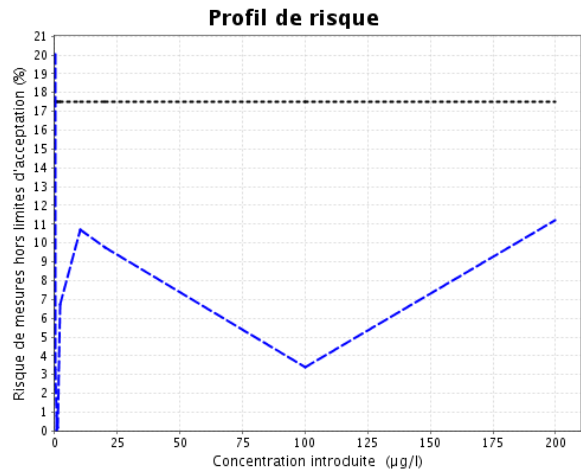
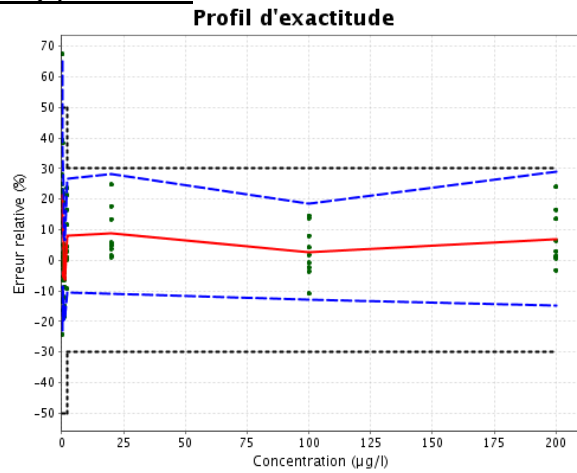


### n-butylparabène

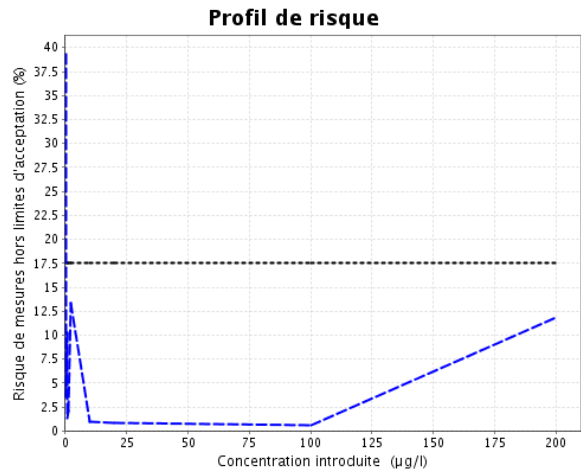
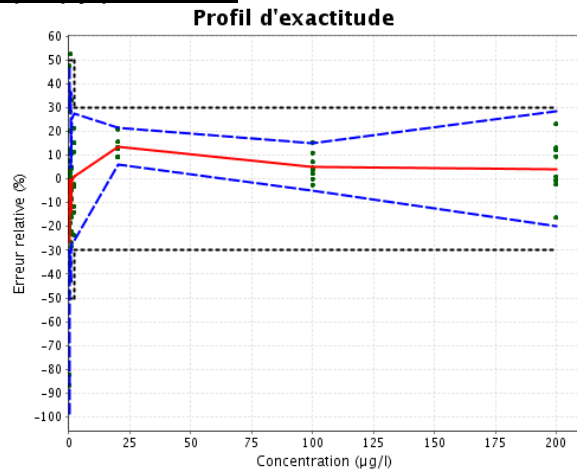


## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

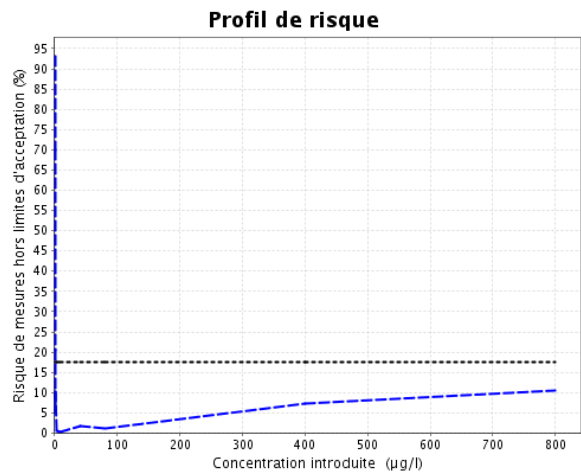
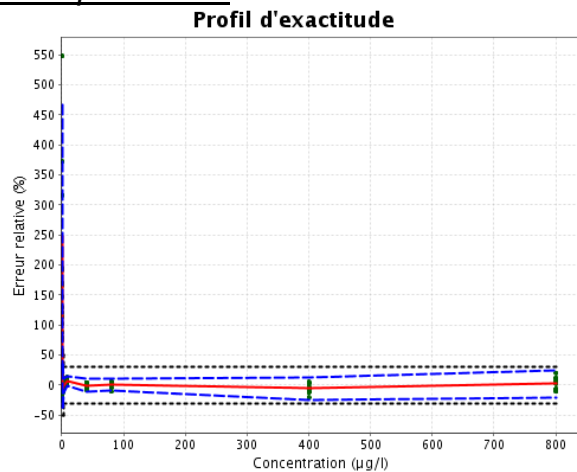
### Éthylparabène



### n-propylparabène



### Benzophénone-3



## Annexe 2 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Helix pomatia*

---

Légende :

### **Profil d'exactitude :**

La ligne rouge correspond au biais relatif (%). Les lignes bleues discontinues correspondent aux limites d'exactitude supérieures et inférieures (%). Les lignes de pointillés noirs correspondent aux limites d'acceptabilité supérieures et inférieures (%).

### **Profil de risque :**

La ligne de pointillés noirs représente le risque acceptable maximum, il est fixé à 17.5% pour répondre à nos exigences. La ligne bleue discontinue correspond au risque que la mesure sorte des limites d'acceptabilité (%).

## Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

### 1. Limite de détection, de quantification et de linéarité

Analyte	Limite de détection ( $\mu\text{g/L}$ )	Limite de quantification ( $\mu\text{g/L}$ )	Limite de linéarité ( $\mu\text{g/L}$ )
Monobenzyl phtalate	0.06	0.20	200.0
Monoéthyl phtalate	0.10	0.33	200.0
Mono-n-butyl phtalate	0.13	0.44	200.0
Mono-2-éthylhexyl phtalate	0.16	0.53	200.0
Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	0.13	0.42	200.0
Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	0.11	0.37	200.0
Mono-iso-butyl phtalate	0.14	0.47	200.0
Méthylparabène	0.15	0.99	800.0
n-butylparabène	0.29	0.97	200.0
Éthylparabène	0.11	0.37	200.0
n-propylparabène	0.10	0.34	200.0
Benzophénone-3	0.10	0.50	800.0

### 2. Précision

#### Monobenzyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	10.53	10.53
0.4	9.30	10.22
0.5	3.48	5.57
0.6	7.07	8.10
0.8	8.77	8.77
1	5.75	5.75
2	2.60	3.81
10	1.79	1.79
20	3.28	3.56
100	2.05	2.05
200	2.23	2.23



**Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
 $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli***

Monoéthyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	13.02	36.66
0.4	14.12	14.12
0.5	13.82	16.49
0.6	11.55	13.74
0.8	8.17	8.17
1	7.51	10.80
2	9.27	10.71
10	3.57	6.09
20	4.84	6.32
100	2.02	4.00
200	2.79	3.95

Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	21.86	45.34
0.4	14.78	23.33
0.5	15.57	18.24
0.6	15.86	15.86
0.8	11.20	11.20
1	8.01	11.80
2	4.32	4.42
10	3.70	4.74
20	1.95	2.86
100	0.81	1.46
200	1.56	2.16

Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	23.89	30.88
0.4	48.15	48.15
0.5	20.27	27.55
0.6	5.33	6.15
0.8	5.13	6.03
1	7.75	8.24
2	5.83	9.59
10	1.52	2.10
20	3.08	3.08
100	1.53	1.53
200	1.53	1.59

**Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
 $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli***

Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	25.22	25.22
0.4	17.85	17.85
0.5	10.55	14.72
0.6	9.33	11.20
0.8	6.78	6.79
1	6.15	8.02
2	2.95	3.55
10	1.26	2.36
20	4.02	4.36
100	1.52	2.53
200	2.73	4.91

Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	12.74	21.81
0.4	9.93	9.93
0.5	8.11	8.11
0.6	10.85	10.85
0.8	5.92	7.94
1	5.39	9.22
2	3.06	4.09
10	1.36	2.44
20	2.35	3.18
100	1.64	1.69
200	2.25	2.25

Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	53.24	105.20
0.4	36.61	59.85
0.5	16.37	16.37
0.6	18.71	18.71
0.8	9.31	11.87
1	9.30	22.98
2	12.03	18.60
10	2.19	2.19
20	2.56	2.56
100	1.63	2.23
200	1.53	1.72

**Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
 $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli***

Méthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	25.85	118.60
0.4	21.41	67.33
0.6	13.74	49.68
0.8	5.07	34.81
1	4.68	18.67
2	4.99	17.18
8	2.55	5.20
40	1.76	3.43
80	3.01	4.20
400	1.23	2.58
800	1.92	3.95

n-butylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	16.42	116.00
0.4	20.91	48.38
0.5	13.19	43.05
0.6	16.36	34.41
0.8	11.17	23.17
1	10.98	18.92
2	4.99	14.52
10	2.73	5.22
20	2.11	3.86
100	1.08	3.03
200	1.47	2.76

Éthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	8.42	26.67
0.4	10.62	12.00
0.5	5.68	5.68
0.6	5.35	10.61
0.8	2.48	6.38
1	6.09	6.09
2	2.76	3.18
10	1.52	3.97
20	2.21	5.30
100	0.99	2.96
200	2.50	4.61

**Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
β-glucuronidase d'*Escherichia coli***

*n-propylparabène*

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Répétabilité CV (%)</b>	<b>Précision intermédiaire CV (%)</b>
0.2	13.94	35.64
0.4	10.50	15.54
0.5	13.03	17.99
0.6	4.17	9.01
0.8	6.97	10.14
1	4.14	7.81
2	2.01	4.93
10	1.38	5.31
20	3.79	5.07
100	1.51	4.21
200	3.41	4.94

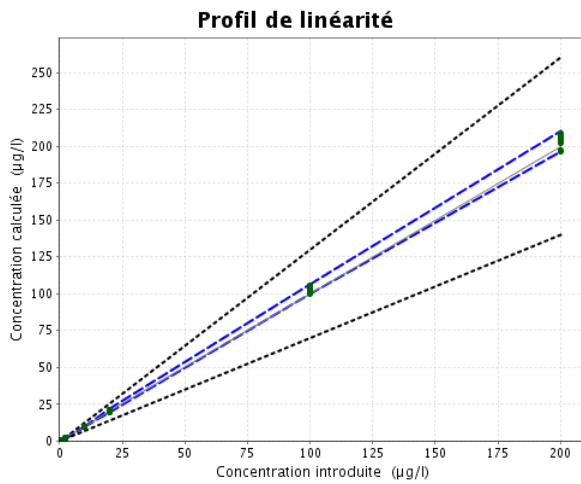
*Benzophénone-3*

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Répétabilité CV (%)</b>	<b>Précision intermédiaire CV (%)</b>
0.2	92.74	92.74
0.4	12.55	23.69
0.6	4.90	13.19
0.8	4.70	11.62
1	2.93	9.42
2	2.42	5.34
8	4.62	4.62
40	0.86	4.01
80	2.96	4.96
400	0.75	4.04
800	2.64	3.30

# Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

## 3. Linéarité

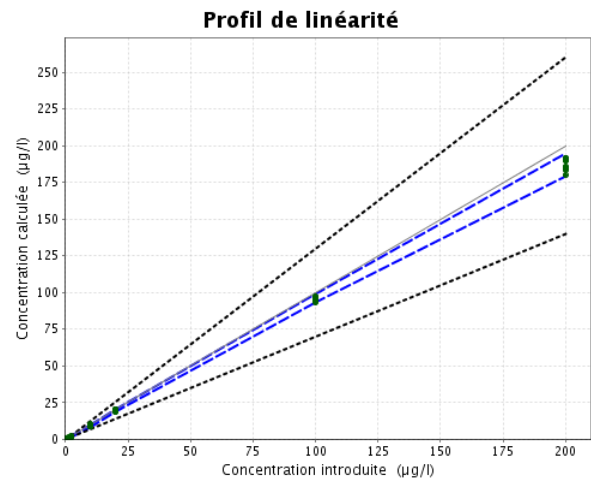
### Monobenzyl phtalate



$$Y = 0.02196 + 1.020 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9994$

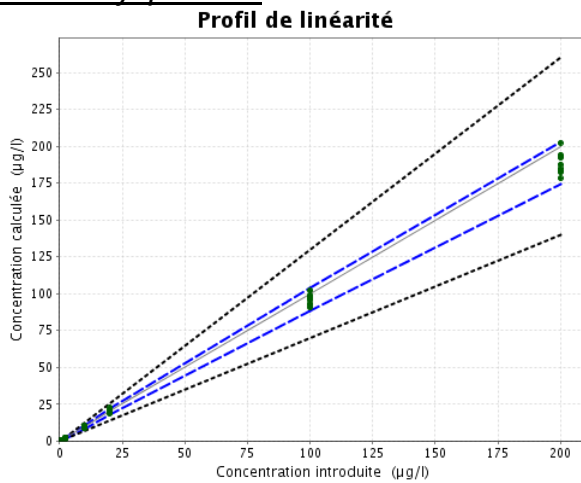
### Mono-n-butyl phtalate



$$Y = 0.1708 + 0.9379 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9994$

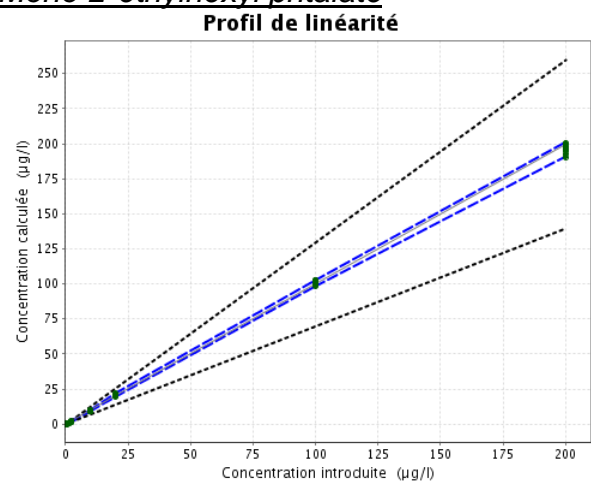
### Monoéthyl phtalate



$$0.2438 + 0.9458 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9982$

### Mono-2-éthylhexyl phtalate



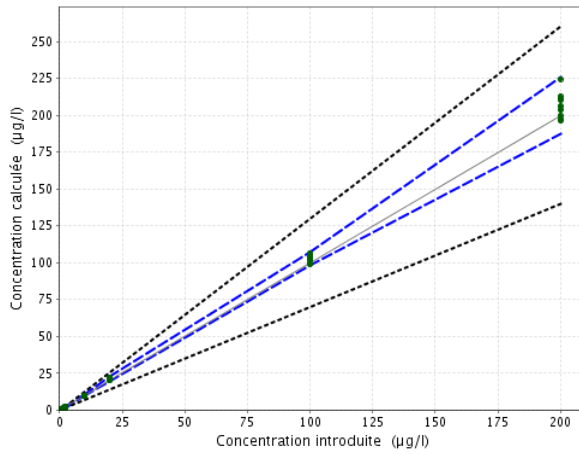
$$Y = 0.1155 + 0.9849 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9995$

## Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Profil de linéarité

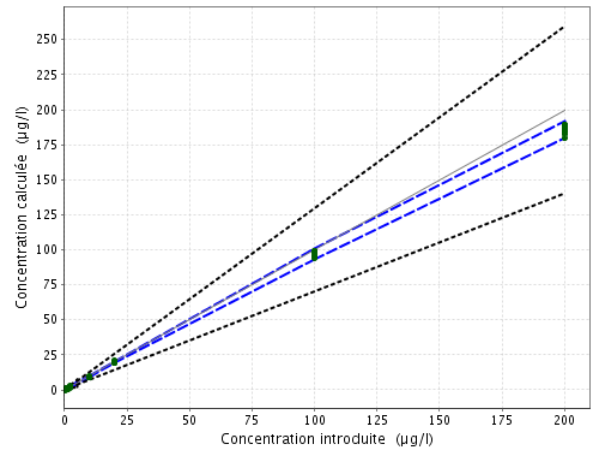


$$Y = -0.003045 + 1.033 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9982$

### Mono-iso-butyl phtalate

Profil de linéarité

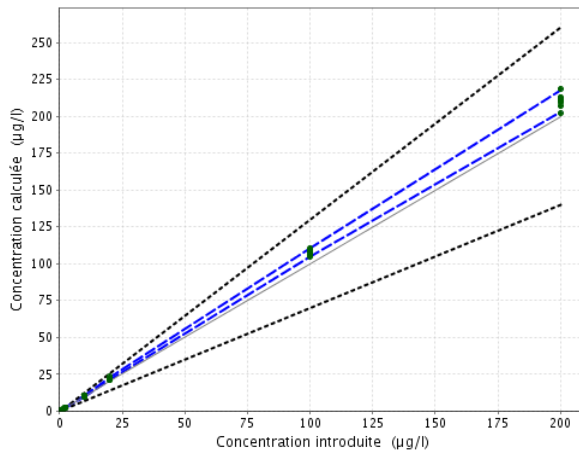


$$Y = 0.2869 + 0.9355 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9992$

### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Profil de linéarité

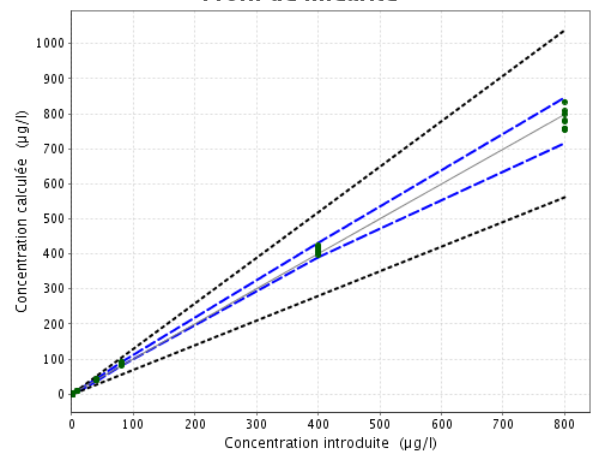


$$Y = 0.2303 + 1.055 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9994$

### Méthylparabène

Profil de linéarité

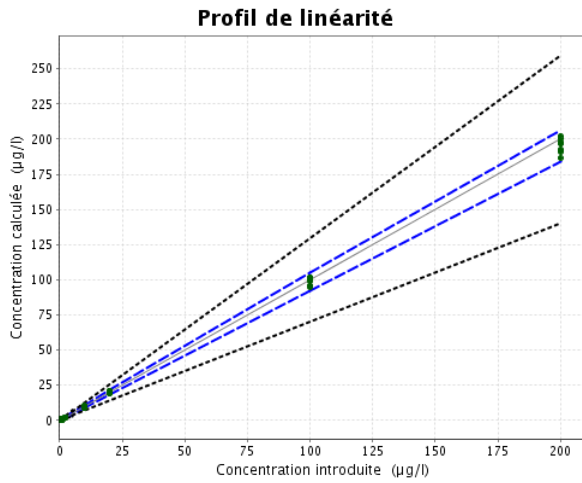


$$Y = 1.930 + 0.9832 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9981$

## Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

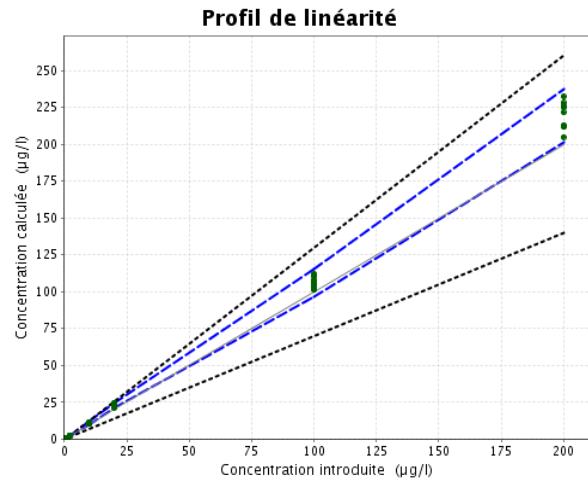
### n-butylparabène



$$Y = 0.1890 + 0.9779 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9992$

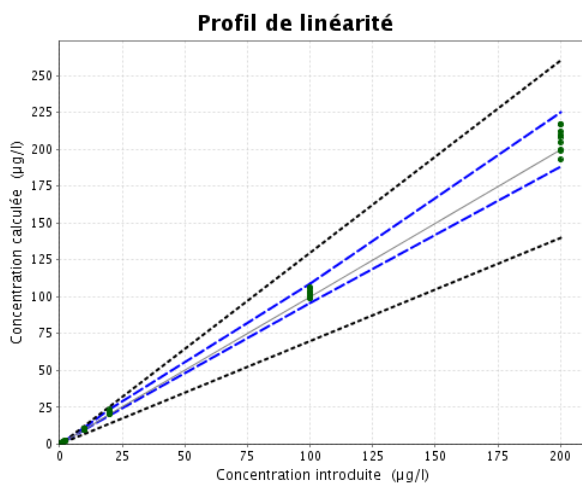
### n-propylparabène



$$Y = -0.06851 + 1.090 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9979$

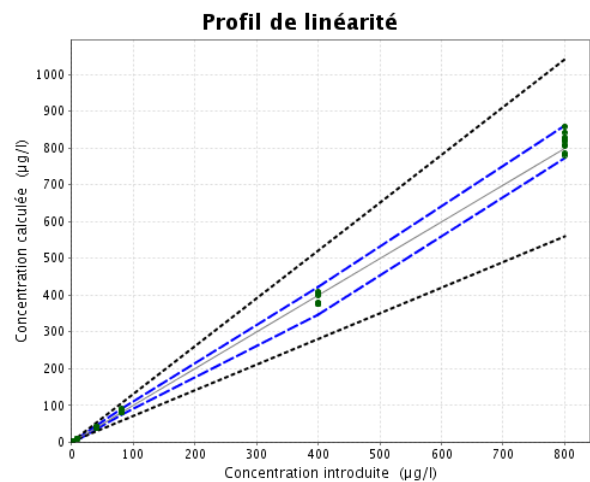
### Éthylparabène



$$Y = 0.08934 + 1.031 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9983$

### Benzophénone-3



$$Y = -0.6853 + 1.011 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9983$

## Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

### 4. Exactitude

#### Justesse :

##### Monobenzyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	1.59
0.4	-2.07
0.5	-1.57
0.6	-1.91
0.8	-3.08
1	-4.57
2	-2.86
10	-2.23
20	4.23
100	2.96
200	1.81

##### Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-0.14
0.4	-21.55
0.5	-0.10
0.6	-18.31
0.8	-7.93
1	-8.37
2	-7.34
10	-7.86
20	-1.61
100	-4.11
200	-6.63

##### Monoéthyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	17.50
0.4	4.72
0.5	14.18
0.6	3.36
0.8	0.32
1	-12.02
2	-0.51
10	-5.20
20	0.88
100	-3.84
200	-5.67

##### Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-48.48
0.4	-18.53
0.5	-10.80
0.6	-14.81
0.8	-11.14
1	-12.93
2	-7.51
10	-4.76
20	3.63
100	0.55
200	-1.97



**Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
 $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli***

Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	37.03
0.4	24.54
0.5	10.93
0.6	16.62
0.8	7.13
1	4.66
2	1.76
10	-1.51
20	5.76
100	2.67
200	3.42

Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	8.16
0.4	2.69
0.5	0.81
0.6	-14.72
0.8	2.99
1	-0.70
2	-2.72
10	-8.30
20	-1.44
100	-3.12
200	-7.09

Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	48.77
0.4	26.29
0.5	26.10
0.6	20.49
0.8	15.22
1	5.01
2	7.87
10	3.10
20	10.33
100	7.50
200	5.15

Méthylparabène

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	39.92
0.4	8.85
0.6	9.12
0.8	5.21
1	5.84
2	2.12
8	2.72
40	2.35
80	7.79
400	2.58
800	-2.46

**Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par  
 $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli***

*n*-butylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	27.34
0.4	23.79
0.5	12.63
0.6	15.88
0.8	15.80
1	10.70
2	-0.63
10	-3.31
20	1.37
100	-1.10
200	-2.37

*n*-propylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	-10.55
0.4	-4.78
0.5	10.30
0.6	2.78
0.8	6.01
1	0.35
2	10.40
10	8.43
20	15.36
100	6.02
200	9.66

Éthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	34.04
0.4	22.96
0.5	15.53
0.6	14.40
0.8	14.25
1	9.81
2	3.76
10	2.67
20	7.57
100	2.35
200	3.32

Benzophénone-3

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Biais relatif (%)
0.2	151.50
0.4	19.49
0.6	3.13
0.8	-1.80
1	-2.68
2	-1.62
8	4.15
40	1.53
80	4.08
400	-3.53
800	2.07

## Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

### 5. Incertitude de mesure

#### Monobenzyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	22.19
0.4	21.92
0.5	12.43
0.6	17.48
0.8	18.48
1	12.12
2	8.47
10	3.76
20	7.61
100	4.32
200	4.70

#### Monoéthyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	83.77
0.4	29.76
0.5	35.78
0.6	29.81
0.8	17.22
1	23.92
2	23.23
10	13.66
20	13.86
100	9.03
200	8.74

#### Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	102.70
0.4	52.03
0.5	39.47
0.6	33.43
0.8	23.61
1	26.17
2	9.40
10	10.37
20	6.35
100	3.29
200	4.78

### Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

#### Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	67.66
0.4	101.50
0.5	60.70
0.6	13.29
0.8	13.05
1	17.56
2	21.51
10	4.64
20	6.50
100	3.22
200	3.38

#### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	53.16
0.4	37.64
0.5	32.50
0.6	24.33
0.8	14.33
1	17.59
2	7.73
10	5.33
20	9.34
100	5.66
200	11.05

#### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	48.93
0.4	20.92
0.5	17.10
0.6	22.88
0.8	17.47
1	20.67
2	9.02
10	5.49
20	7.00
100	3.59
200	4.74

### Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

#### Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	237.60
0.4	133.80
0.5	34.52
0.6	39.45
0.8	25.96
1	52.35
2	41.53
10	4.63
20	5.40
100	4.93
200	3.69

#### Méthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	272.80
0.4	154.20
0.6	114.00
0.8	80.25
1	42.91
2	39.39
8	11.79
40	7.75
80	9.27
400	5.83
800	8.94

#### n-butylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	267.60
0.4	110.00
0.5	98.63
0.6	77.95
0.8	52.46
1	42.44
2	33.23
10	11.77
20	8.69
100	6.93
200	6.23

### Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

#### Éthylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	61.07
0.4	25.84
0.5	11.98
0.6	23.98
0.8	14.54
1	12.85
2	6.90
10	9.06
20	12.07
100	6.76
200	10.37

#### n-propylparabène

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	81.26
0.4	34.49
0.5	39.70
0.6	20.44
0.8	22.48
1	17.61
2	11.23
10	12.19
20	11.14
100	9.62
200	10.94

#### Benzophénone-3

Concentration cible ( $\mu\text{g/L}$ )	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	195.50
0.4	53.43
0.6	30.11
0.8	26.48
1	21.58
2	12.11
8	9.74
40	9.22
80	11.11
400	9.30
800	7.19

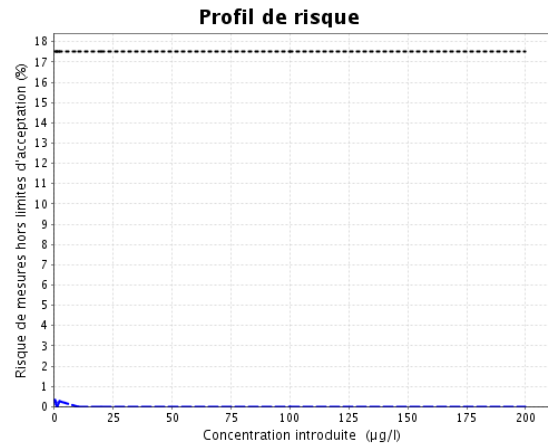
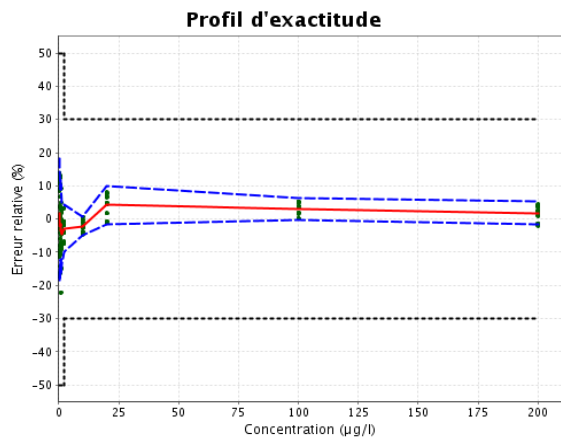
## Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

### Graphiques d'exactitude et de risque :

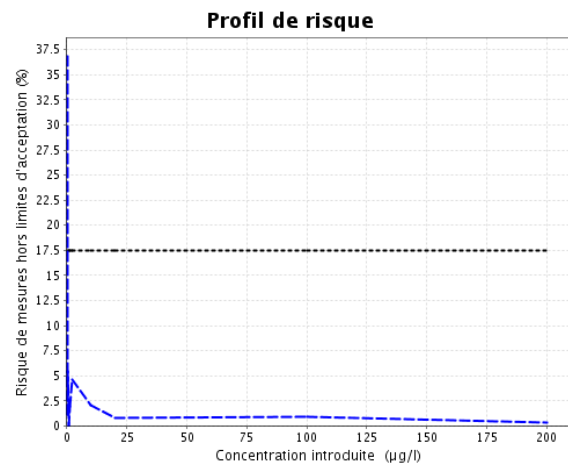
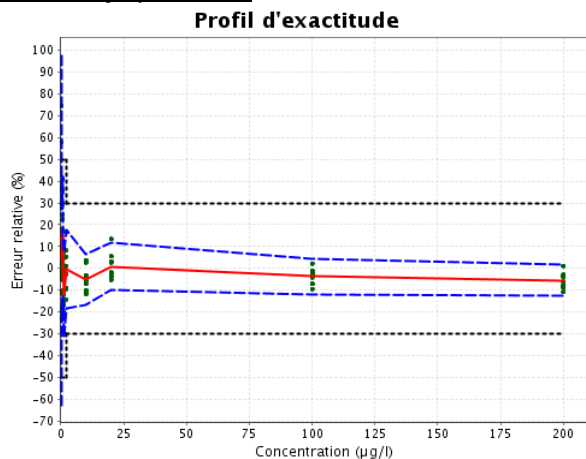
Les profils d'exactitude sont acceptables.

Les valeurs inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance sont comprises dans les limites d'acceptation (50 % jusque 2  $\mu\text{g/L}$  pour tous les composés, jusque 5  $\mu\text{g/L}$  pour le mono-iso-butyl phtalate et 30 % pour les valeurs supérieures à 2 et à 5  $\mu\text{g/L}$ ) dans le domaine de concentrations validé.

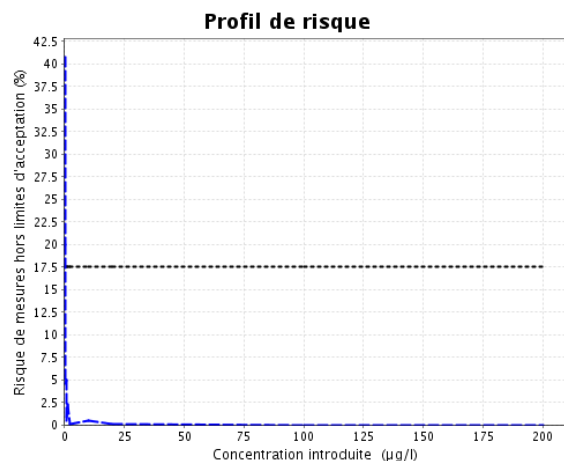
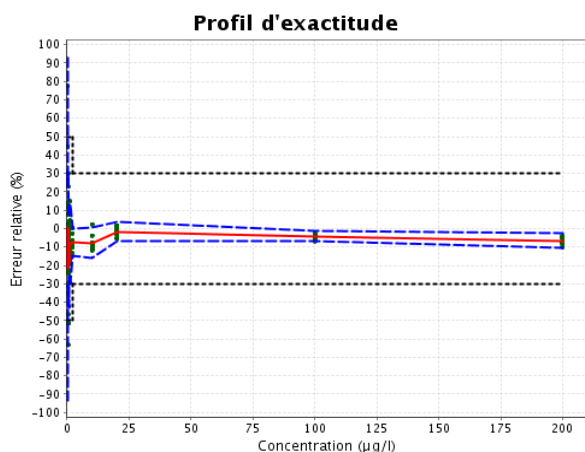
### Monobenzyl phtalate



### Monoéthyl phtalate

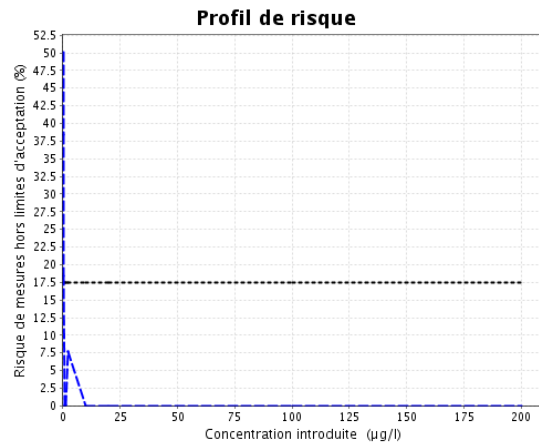
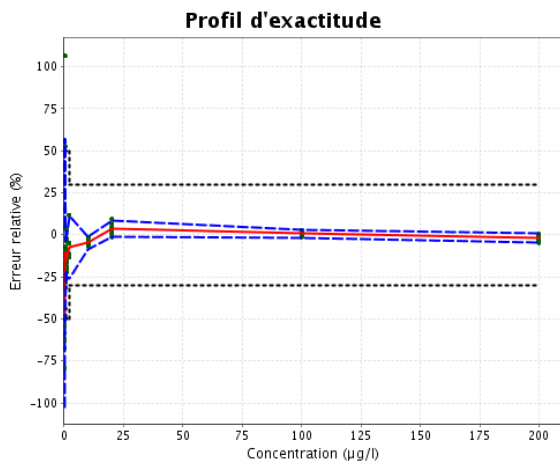


### Mono-n-butyl phtalate

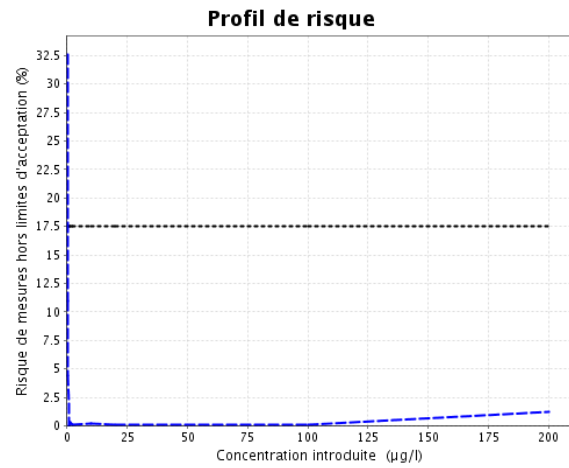
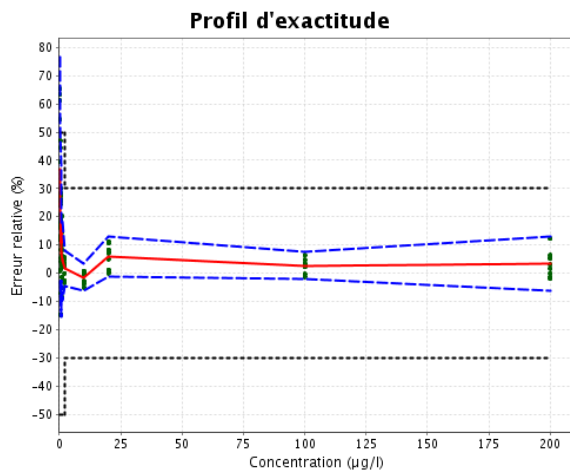


# Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

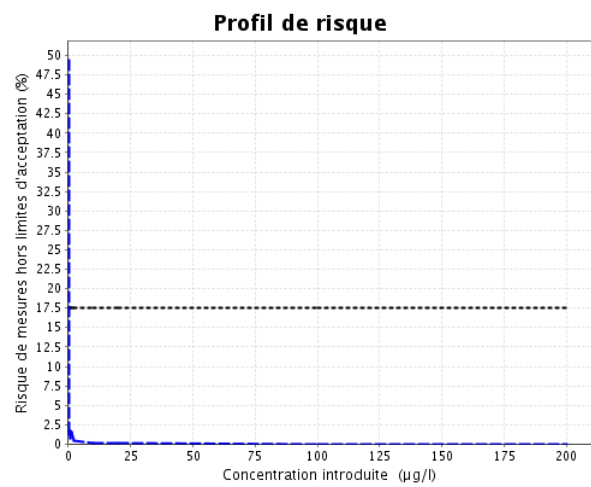
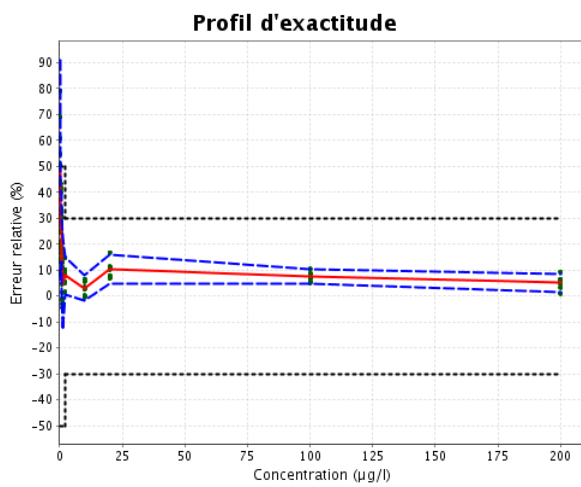
## Mono-2-éthylhexyl phtalate



## Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate



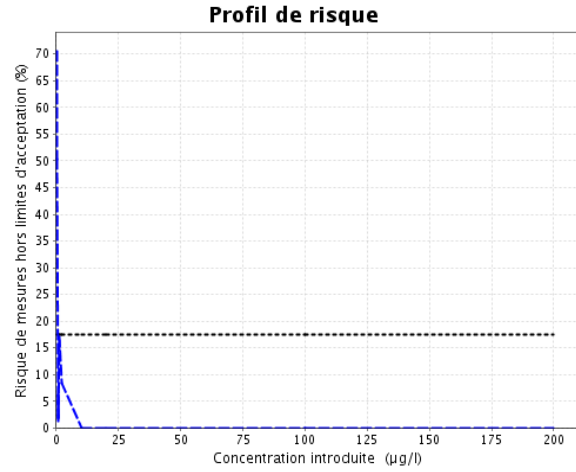
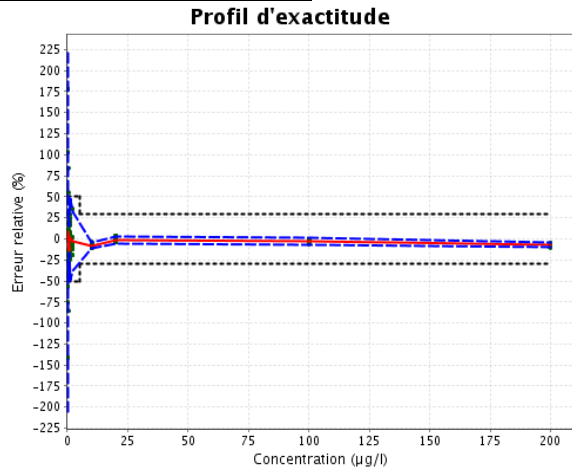
## Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate



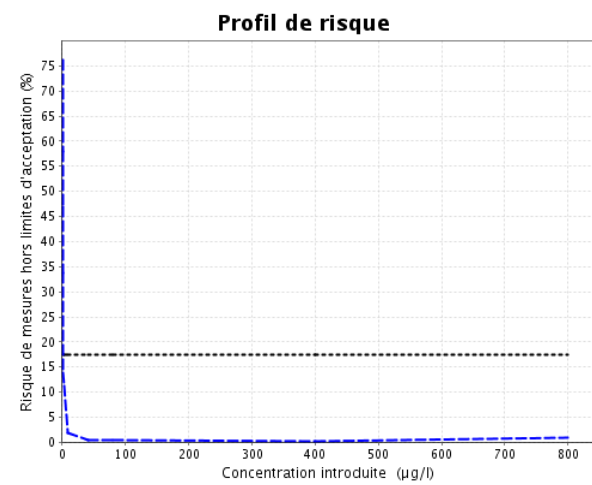
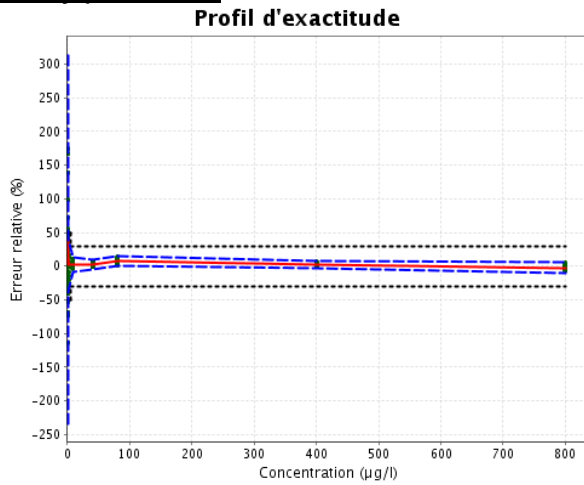


# Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

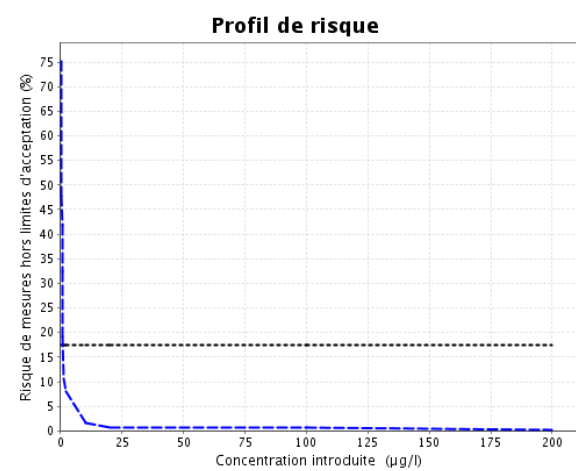
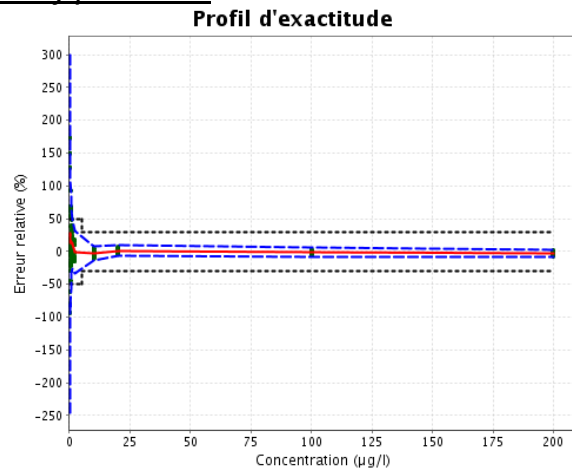
## Mono-iso-butyl phtalate



## Méthylparabène

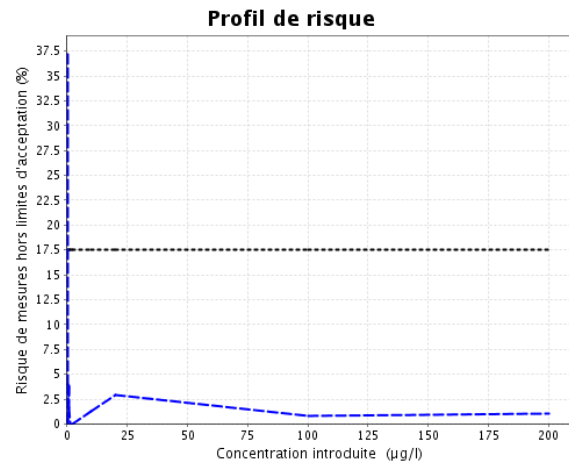
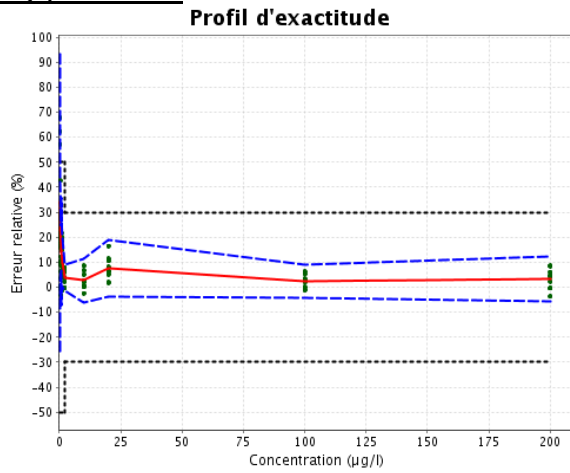


## n-butylparabène

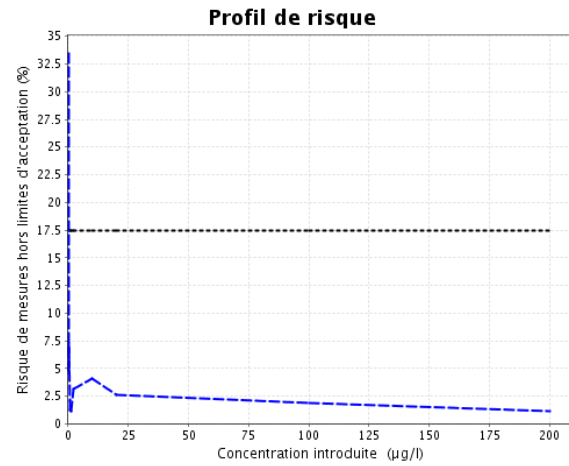
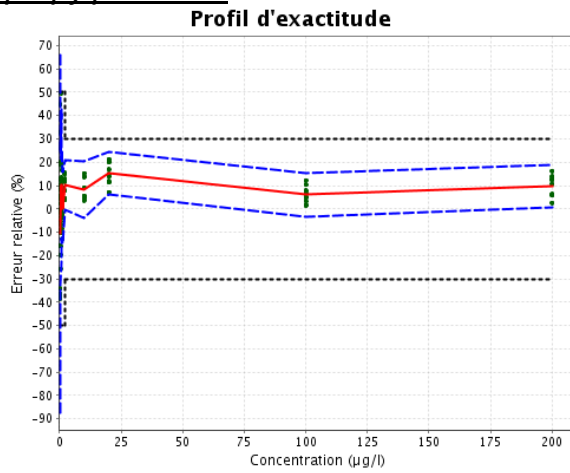


# Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*

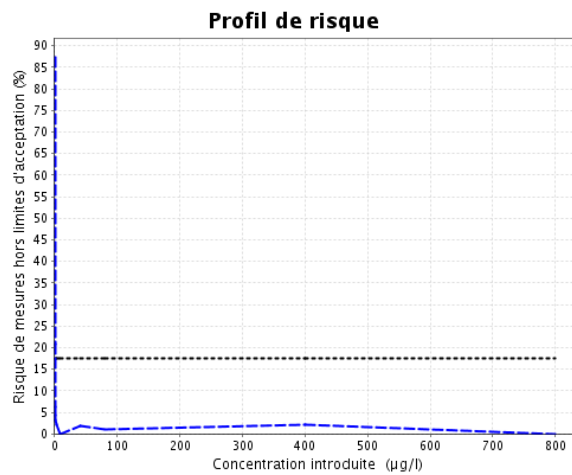
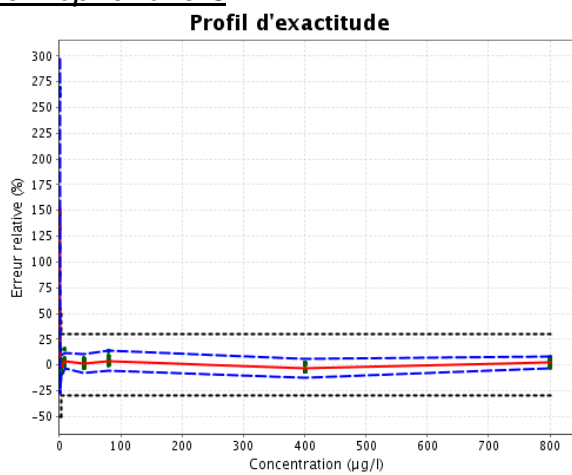
## Éthylparabène



## n-propylparabène



## Benzophénone-3



### **Annexe 3 : Paramètres de validation, traitement enzymatique par $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli***

---

#### Légende :

##### **Profil d'exactitude :**

La ligne rouge correspond au biais relatif (%). Les lignes bleues discontinues correspondent aux limites d'exactitude supérieures et inférieures (%). Les lignes de pointillés noirs correspondent aux limites d'acceptabilité supérieures et inférieures (%).

##### **Profil de risque :**

La ligne de pointillés noirs représente le risque acceptable maximum, il est fixé à 17.5% pour répondre à nos exigences. La ligne bleue discontinue correspond au risque que la mesure sorte des limites d'acceptabilité (%).

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### 1. Limite de détection, de quantification et de linéarité

Analyte	Limite de détection (µg/L)	Limite de quantification (µg/L)	Limite de linéarité (µg/L)
Monobenzyl phtalate	0.11	0.37	200.0
Monoéthyl phtalate	0.18	0.58	200.0
Mono-n-butyl phtalate	0.17	0.57	200.0
Mono-2-éthylhexyl phtalate	0.17	0.54	200.0
Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate	0.17	0.57	200.0
Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate	0.26	0.87	200.0
Mono-iso-butyl phtalate	0.26	0.86	200.0
Méthylparabène	0.13	0.97	800.0
n-butylparabène	0.37	1.23	200.0
Éthylparabène	0.06	0.20	200.0
n-propylparabène	0.06	0.20	200.0
Benzophénone-3	0.13	0.62	800.0

### 2. Précision

#### Monobenzyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	12.09	25.73
0.4	5.63	13.80
0.6	6.09	13.78
0.8	5.79	16.02
1	5.31	10.42
2	4.91	5.39
10	5.65	5.89
20	3.95	3.95
100	2.65	2.65
200	3.09	8.85

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Monoéthyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	21.58	73.40
0.4	17.74	27.58
0.6	7.67	11.43
0.8	9.39	19.75
1	5.99	16.06
2	6.38	6.38
10	5.81	5.81
20	4.81	7.14
100	3.58	3.85
200	2.65	3.56

### Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	13.85	79.23
0.4	21.94	31.34
0.6	11.74	18.23
0.8	10.10	22.73
1	4.27	7.68
2	8.99	13.32
10	5.31	8.19
20	4.30	4.30
100	3.37	3.69
200	2.51	3.84

### Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	30.32	75.70
0.4	5.53	30.97
0.6	12.41	19.77
0.8	4.03	16.79
1	4.06	10.88
2	5.14	5.60
10	5.30	6.24
20	3.13	3.15
100	1.19	1.34
200	1.28	2.15

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	28.20	40.07
0.4	6.94	22.17
0.6	7.43	14.98
0.8	4.27	11.94
1	9.92	10.75
2	5.98	6.19
10	5.61	5.61
20	3.39	3.39
100	2.43	2.43
200	2.90	3.92

### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	12.37	35.67
0.4	8.20	20.74
0.6	5.63	24.76
0.8	11.87	21.34
1	5.11	12.83
2	6.81	10.62
10	5.86	6.54
20	3.43	5.20
100	2.19	2.19
200	0.95	6.19

### Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	110.60	180.50
0.4	28.89	51.76
0.6	41.95	45.72
0.8	20.64	25.39
1	12.16	12.16
2	9.97	13.84
10	4.14	4.33
20	4.56	4.56
100	2.27	3.16
200	2.39	2.65

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Méthylparabène

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	19.18	102.40
0.4	14.50	55.19
0.6	4.51	50.74
0.8	10.34	43.78
1	5.94	7.66
8	4.84	9.01
40	4.32	8.75
80	3.93	4.40
400	3.58	3.58
800	1.22	3.27

### n-butylparabène

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	68.30	279.20
0.4	29.06	89.36
0.6	9.36	48.41
0.8	11.27	39.09
1	7.31	21.77
2	8.77	12.12
10	2.65	8.53
20	4.49	5.15
100	2.13	2.13
200	2.63	5.06

### Éthylparabène

Concentration cible (µg/L)	Répétabilité CV (%)	Précision intermédiaire CV (%)
0.2	13.07	13.07
0.4	2.67	12.12
0.6	5.64	11.67
0.8	3.36	12.32
1	4.32	9.63
2	3.83	5.25
10	4.10	5.62
20	2.14	2.39
100	0.83	1.79
200	2.24	2.24

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### *n-propylparabène*

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Répétabilité CV (%)</b>	<b>Précision intermédiaire CV (%)</b>
0.2	13.03	15.57
0.4	12.56	12.70
0.6	4.91	5.74
0.8	5.45	10.76
1	3.94	8.19
2	6.45	7.60
10	4.18	4.87
20	3.56	3.56
100	1.72	2.19
200	2.76	3.17

### *Benzophénone-3*

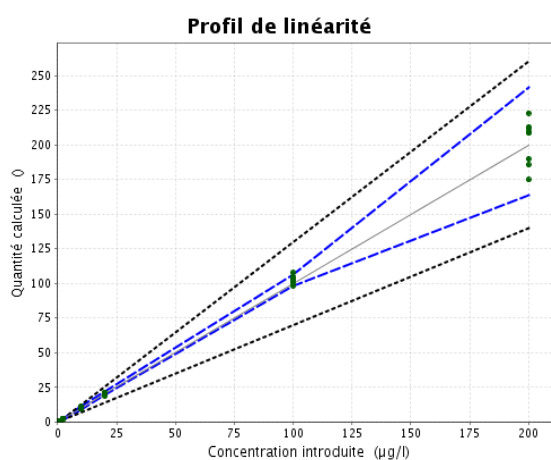
<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Répétabilité CV (%)</b>	<b>Précision intermédiaire CV (%)</b>
0.2	65.50	129.90
0.4	15.08	48.52
0.6	29.08	29.35
0.8	13.81	13.81
1	6.77	6.77
8	3.27	3.73
40	4.72	6.23
80	3.12	6.26
400	2.21	8.26
800	2.76	6.85



## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### 3. Linéarité

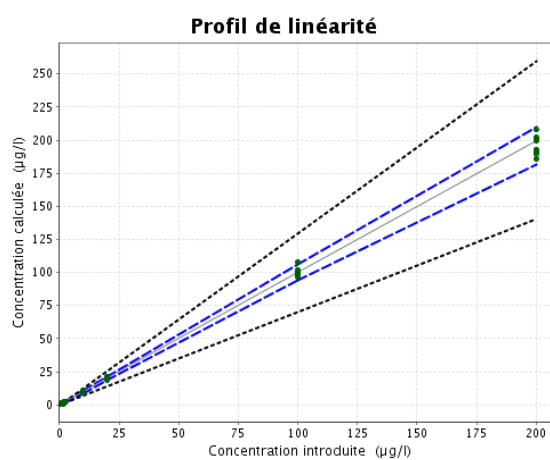
#### Monobenzyl phtalate



$$Y = 0.09378 + 1.015 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9945$

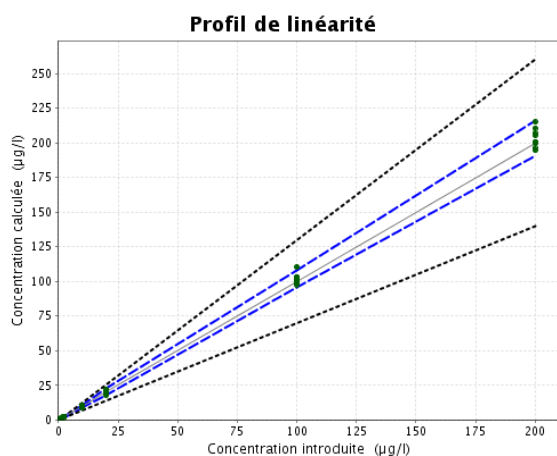
#### Mono-n-butyl phtalate



$$Y = 0.1650 + 0.9817 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9984$

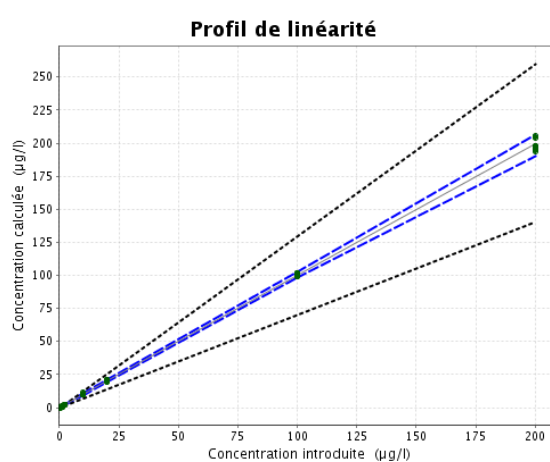
#### Monoéthyl phtalate



$$Y = 0.09093 + 1.016 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9986$

#### Mono-2-éthylhexyl phtalate

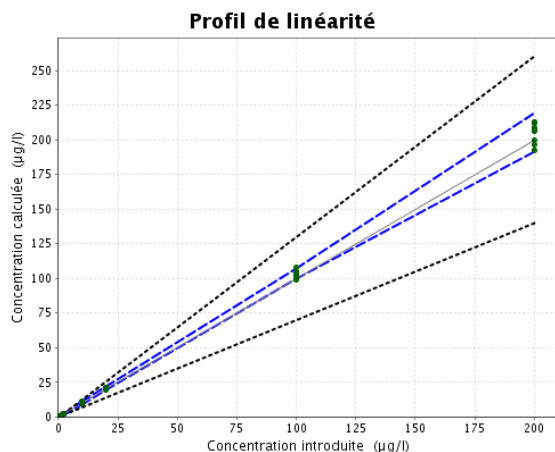


$$Y = 0.1376 + 0.9933 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9995$

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

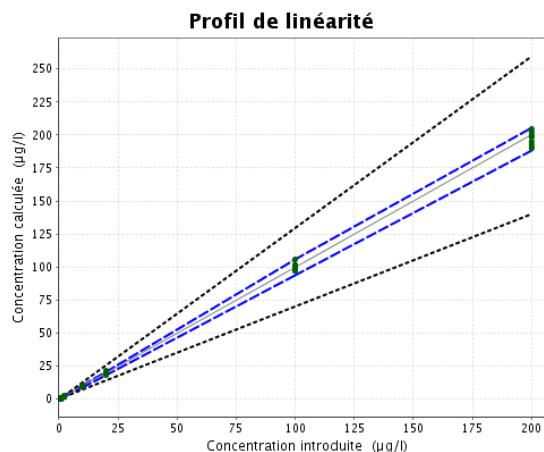
### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate



$$Y = 0.09036 + 1.027 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9987$

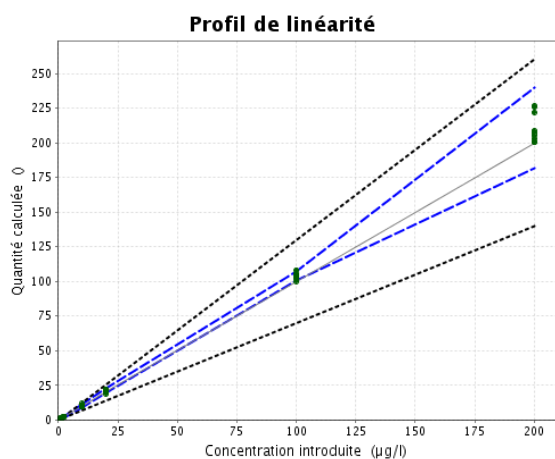
### Mono-iso-butyl phtalate



$$Y = -0.02562 + 0.9871 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.0991$

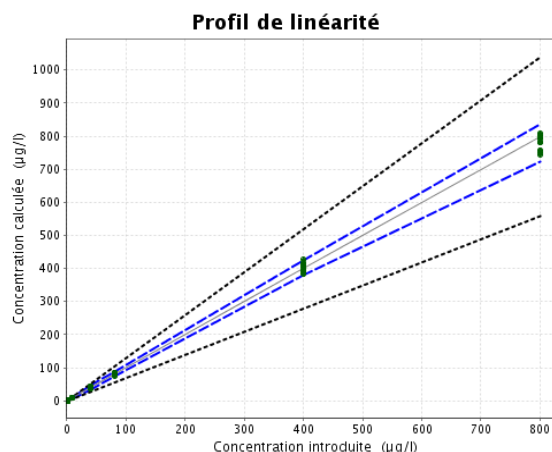
### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate



$$Y = -0.02821 + 1.052 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9975$

### Méthylparabène

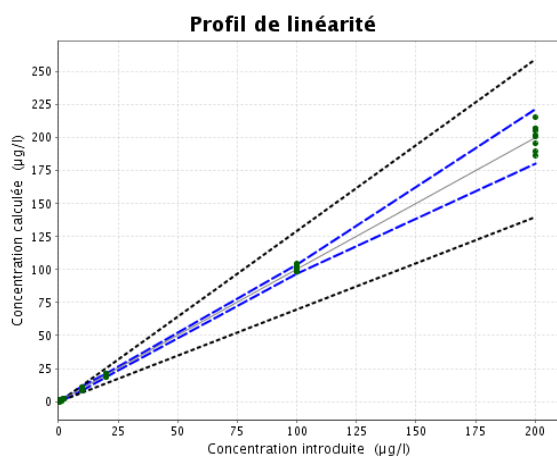


$$Y = 1.630 + 0.9792 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9986$

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

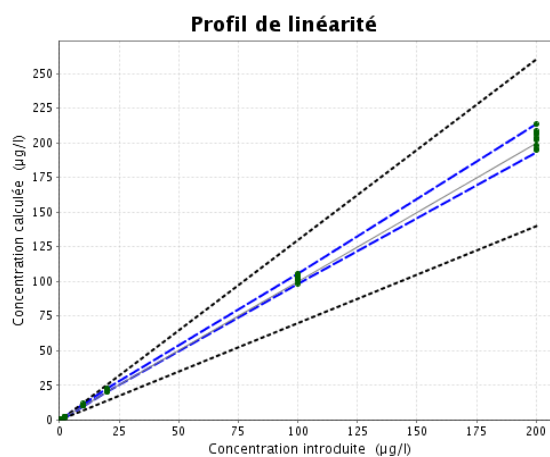
### n-butylparabène



$$Y = -0.1065 + 1.006 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9980$

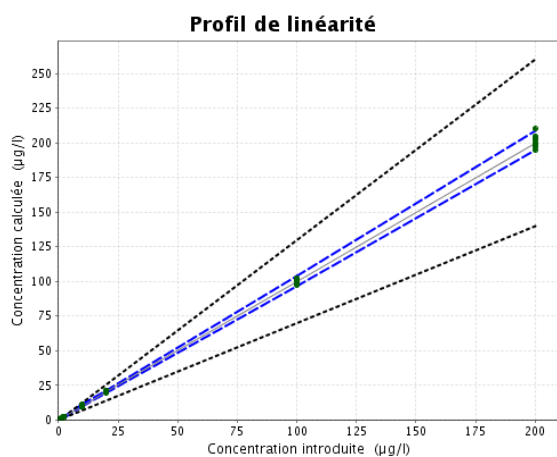
### n-propylparabène



$$Y = 0.1840 + 1.017 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9990$

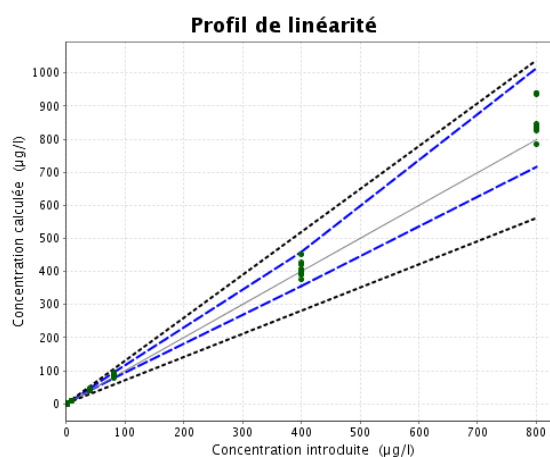
### Éthylparabène



$$Y = 0.09094 + 1.005 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9995$

### Benzophénone-3



$$Y = -1.151 + 1.070 X$$

Coefficient de détermination  $r^2 = 0.9944$

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### 4. Exactitude

#### Justesse :

##### Monobenzyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	31.57
0.4	15.58
0.6	5.94
0.8	1.38
1	-3.43
2	5.89
10	0.69
20	2.93
100	2.38
200	1.38

##### Mono-n-butyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	54.37
0.4	26.33
0.6	9.12
0.8	-1.16
1	-13.28
2	4.74
10	-3.16
20	0.47
100	-0.28
200	-2.10

##### Monoéthyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	85.69
0.4	37.66
0.6	24.47
0.8	7.93
1	13.36
2	7.61
10	-0.61
20	2.69
100	1.61
200	1.62

##### Mono-2-éthylhexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	-12.61
0.4	-9.41
0.6	-0.56
0.8	-7.84
1	-9.53
2	4.03
10	0.09
20	2.59
100	0.53
200	-0.89

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	57.54
0.4	25.07
0.6	15.14
0.8	6.23
1	2.72
2	7.79
10	1.16
20	3.69
100	3.38
200	2.63

### Mono-iso-butyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	-35.46
0.4	-20.96
0.6	-18.74
0.8	-14.83
1	-13.33
2	5.05
10	-4.04
20	-1.86
100	-0.28
200	-1.55

### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	68.59
0.4	34.14
0.6	19.36
0.8	15.35
1	9.50
2	9.87
10	3.41
20	5.65
100	3.81
200	5.51

### Méthylparabène

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	137.40
0.4	76.94
0.6	54.78
0.8	47.17
1	18.59
8	7.23
40	3.05
80	1.94
400	0.92
800	-2.54

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### n-butylparabène

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	23.23
0.4	-19.40
0.6	-14.37
0.8	-14.22
1	-12.04
2	6.48
10	-2.24
20	-0.77
100	0.36
200	0.59

### n-propylparabène

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	-0.44
0.4	-2.96
0.6	-11.44
0.8	-4.00
1	-7.64
2	7.89
10	7.24
20	6.64
100	2.11
200	1.64

### Éthylparabène

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	15.95
0.4	8.71
0.6	7.41
0.8	5.53
1	2.88
2	6.96
10	3.67
20	3.37
100	-0.15
200	0.75

### Benzophénone-3

Concentration cible (µg/L)	Biais relatif (%)
0.2	83.65
0.4	38.90
0.6	6.53
0.8	0.26
1	18.86
8	8.44
40	7.10
80	1.87
400	8.03
800	6.85

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### 5. Incertitude de mesure

#### Monobenzyl phtalate

<b>Concentration cible (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	58.31
0.4	31.42
0.6	31.30
0.8	36.60
1	23.54
2	11.56
10	12.50
20	8.32
100	5.60
200	20.23

#### Monoéthyl phtalate

<b>Concentration cible (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	168.30
0.4	61.47
0.6	25.39
0.8	44.74
1	36.65
2	13.45
10	12.25
20	15.85
100	8.23
200	7.83

#### Mono-n-butyl phtalate

<b>Concentration cible (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	182.50
0.4	69.36
0.6	40.63
0.8	51.63
1	17.26
2	29.57
10	18.24
20	9.06
100	7.90
200	8.54

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Mono-2-éthylhexyl phtalate

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	172.50
0.4	71.34
0.6	44.14
0.8	38.58
1	24.83
2	11.99
10	13.52
20	6.65
100	2.89
200	4.83

### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	88.65
0.4	50.79
0.6	33.89
0.8	27.28
1	23.00
2	13.14
10	11.82
20	7.14
100	5.12
200	8.63

### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	81.55
0.4	47.26
0.6	56.93
0.8	47.98
1	29.23
2	23.67
10	14.07
20	11.56
100	4.61
200	14.26



## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Mono-iso-butyl phtalate

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	403.70
0.4	116.40
0.6	97.90
0.8	55.30
1	25.63
2	30.55
10	9.21
20	9.62
100	6.99
200	5.69

### Méthylparabène

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	235.70
0.4	126.70
0.6	117.10
0.8	100.60
1	17.47
8	20.29
40	19.80
80	9.46
400	7.54
800	7.46

### n-butylparabène

<b>Concentration cible (µg/L)</b>	<b>Incertitude de mesure étendue (%)</b>
0.2	641.70
0.4	204.50
0.6	111.50
0.8	89.65
1	49.80
2	26.74
10	19.54
20	11.12
100	4.50
200	11.42

## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Éthylparabène

Concentration cible (µg/L)	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	27.54
0.4	27.89
0.6	26.41
0.8	28.28
1	21.86
2	11.58
10	12.40
20	5.14
100	4.06
200	4.73

### n-propylparabène

Concentration cible (µg/L)	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	33.80
0.4	26.83
0.6	12.41
0.8	24.31
1	18.55
2	16.46
10	10.54
20	7.50
100	4.80
200	6.85

### Benzophénone-3

Concentration cible (µg/L)	Incertitude de mesure étendue (%)
0.2	293.50
0.4	111.10
0.6	61.98
0.8	29.11
1	14.27
8	8.05
40	13.69
80	14.14
400	18.96
800	6.85

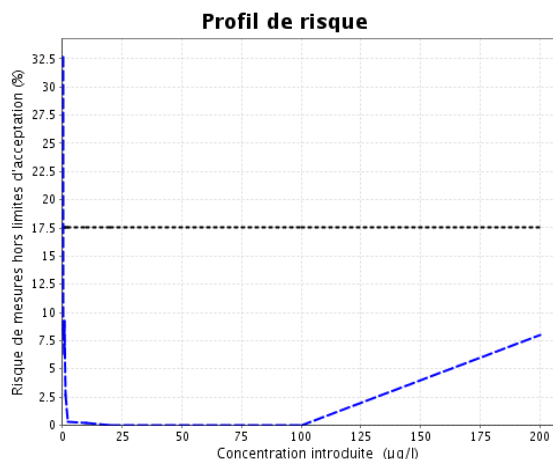
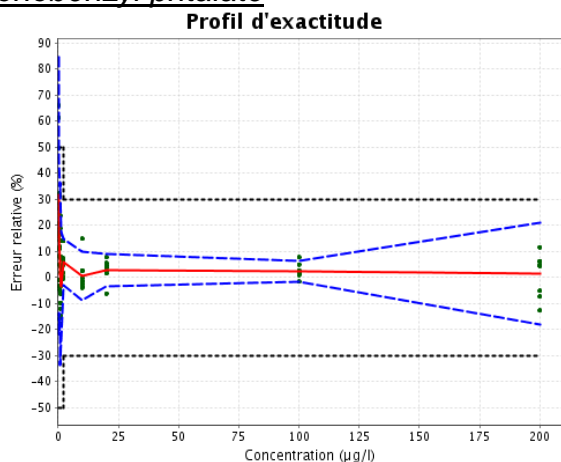
## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

### Graphiques d'exactitude et de risque :

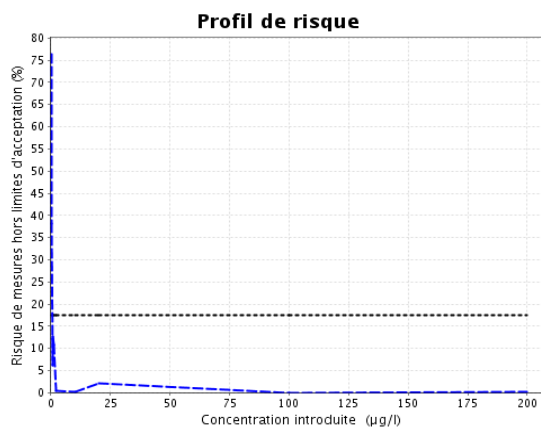
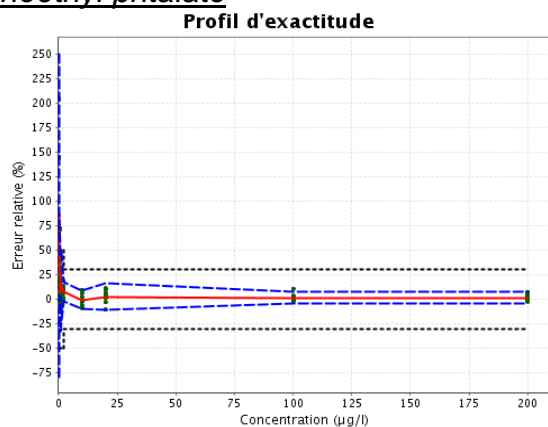
Les profils d'exactitude sont acceptables.

Les valeurs inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance sont comprises dans les limites d'acceptation (50 % jusque 2 µg/L pour tous les composés, jusque 5 µg/L pour le mono-iso-butyl phtalate et 30 % pour les valeurs supérieures à 2 et à 5 µg/L) dans le domaine de concentrations validé.

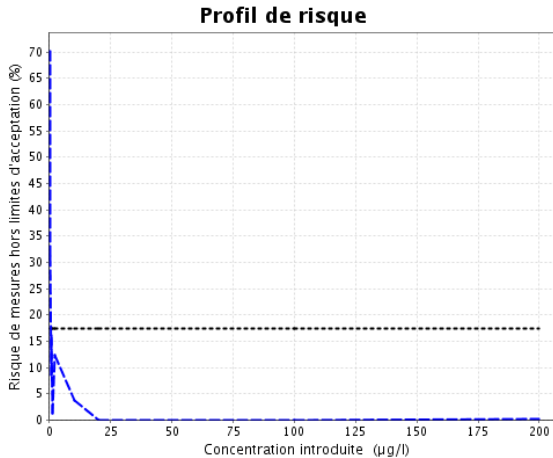
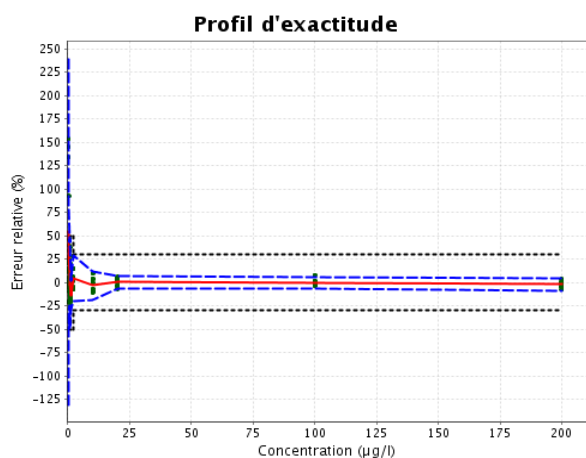
### Monobenzyl phtalate



### Monoéthyl phtalate

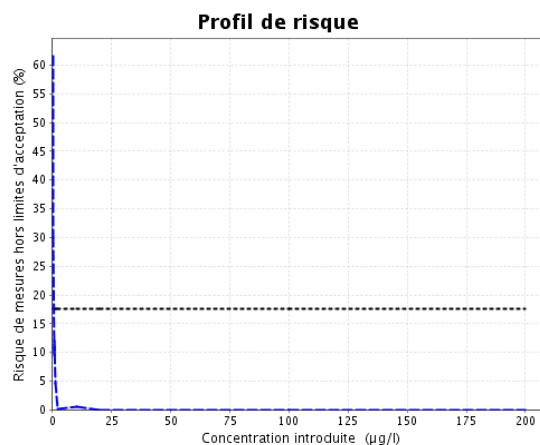
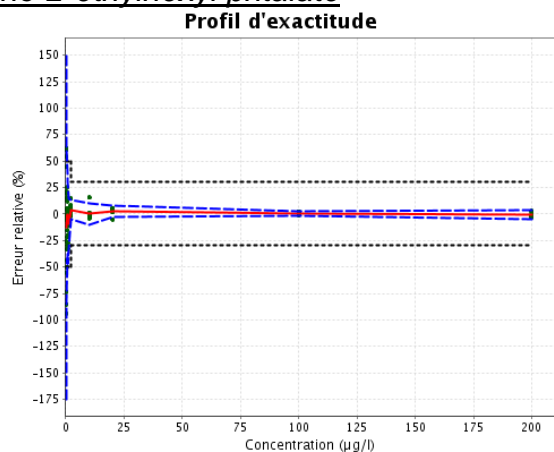


### Mono-n-butyl phtalate

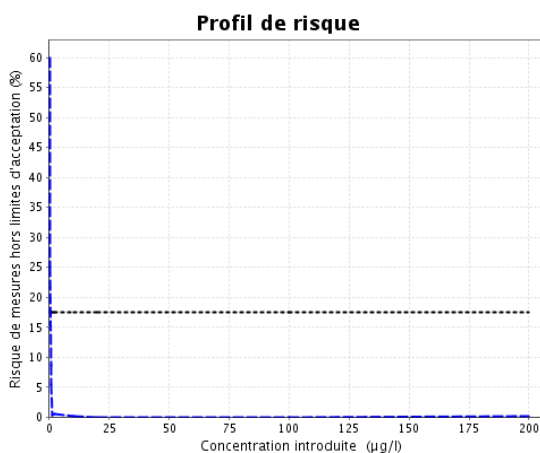
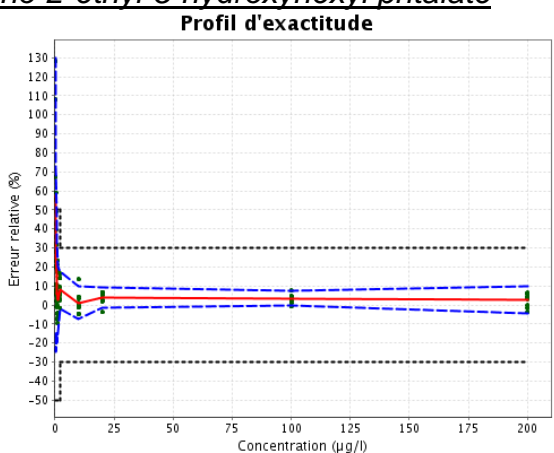


## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

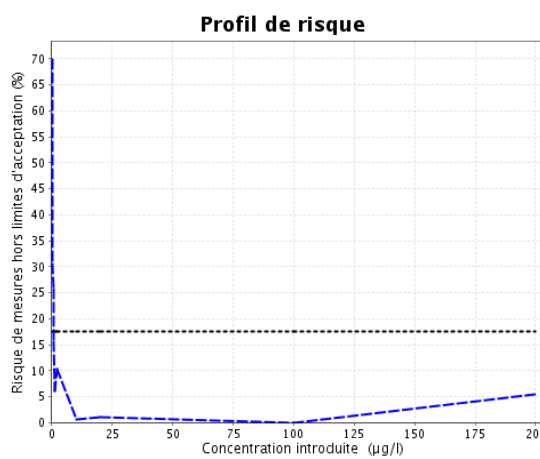
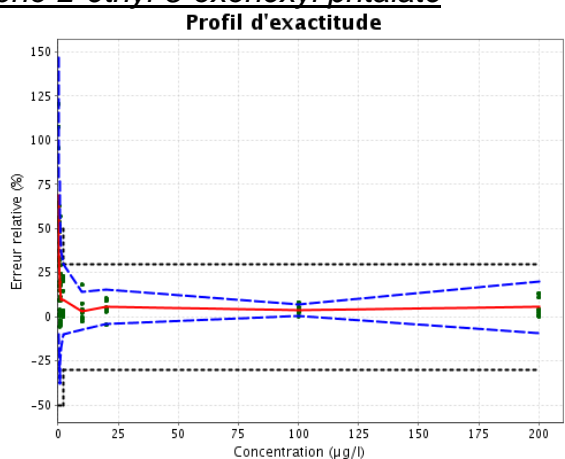
### Mono-2-éthylhexyl phtalate



### Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate

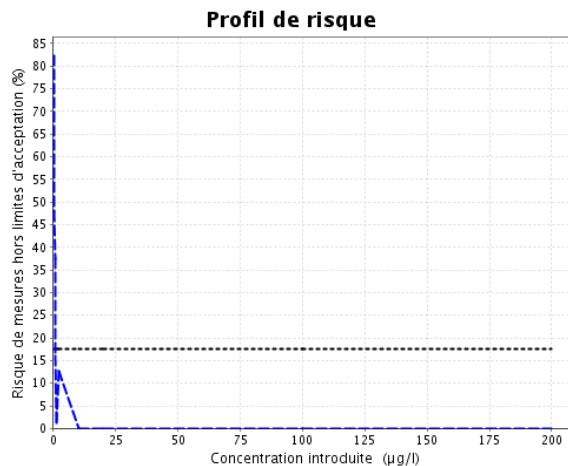
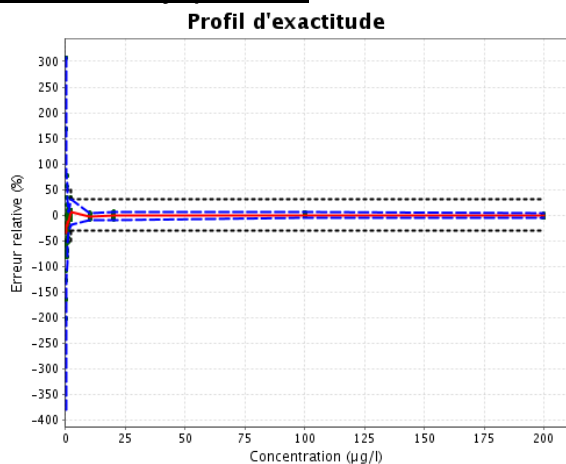


### Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate

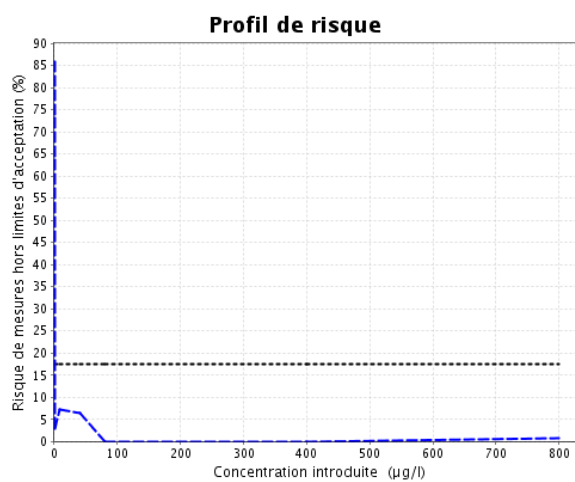
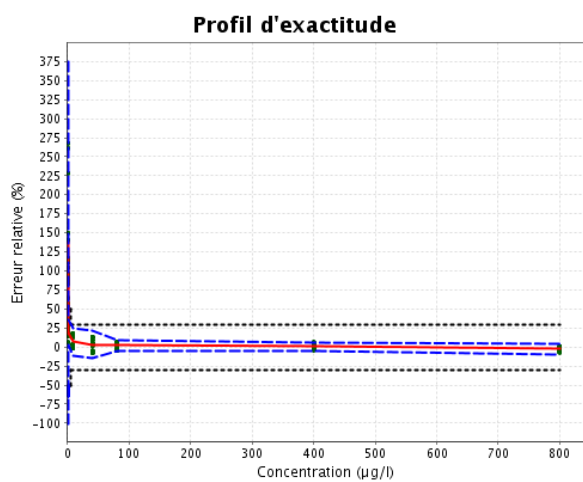


## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

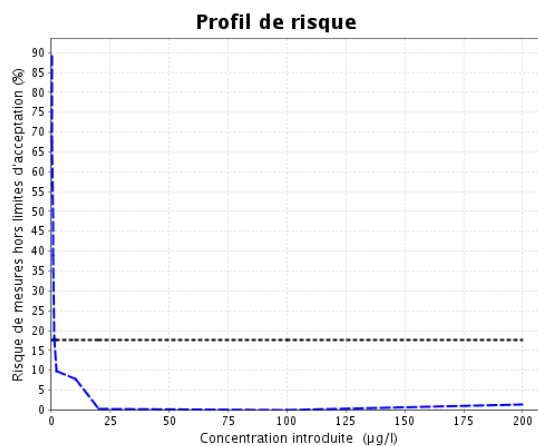
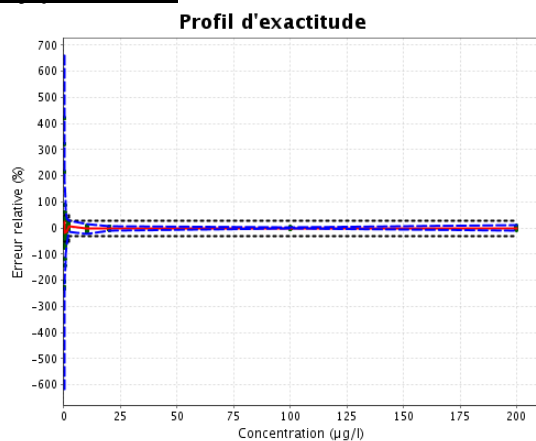
### Mono-iso-butyl phtalate



### Méthylparabène

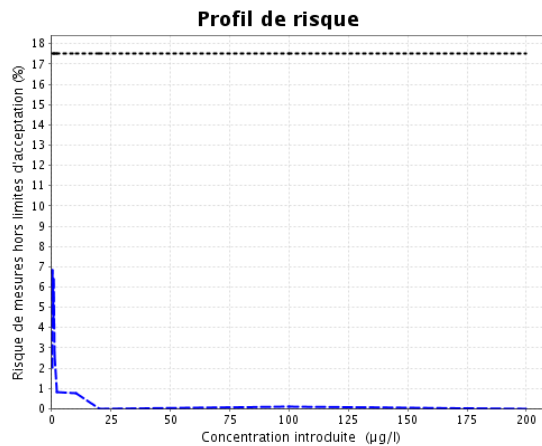
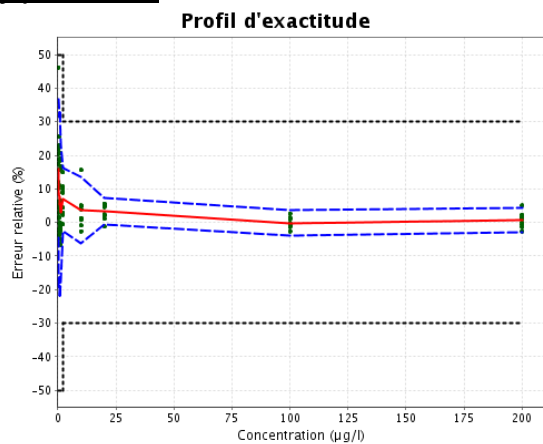


### n-butylparabène

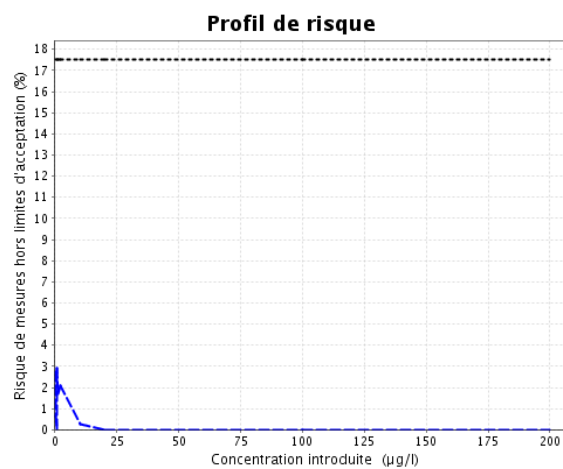
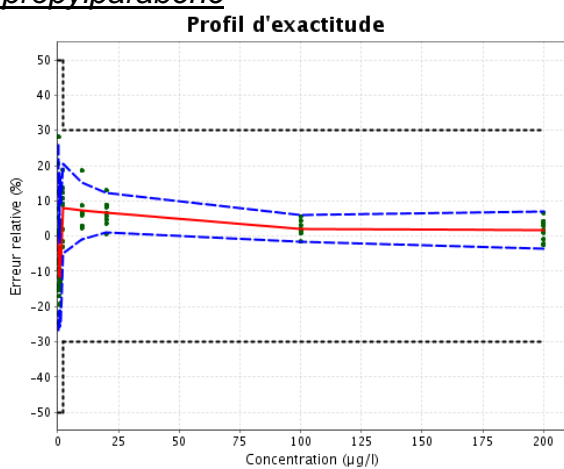


## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

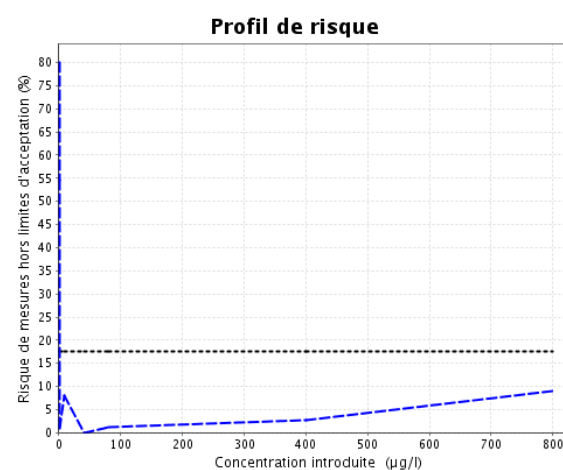
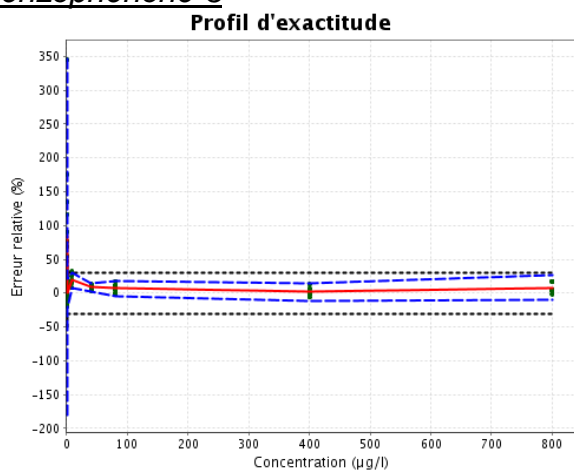
### Éthylparabène



### n-propylparabène



### Benzophénone-3



## Annexe 4 : Paramètres de validation, absence de traitement enzymatique

Légende :

### **Profil d'exactitude :**

La ligne rouge correspond au biais relatif (%). Les lignes bleues discontinues correspondent aux limites d'exactitude supérieures et inférieures (%). Les lignes de pointillés noirs correspondent aux limites d'acceptabilité supérieures et inférieures (%).

### **Profil de risque :**

La ligne de pointillés noirs représente le risque acceptable maximum, il est fixé à 17.5% pour répondre à nos exigences. La ligne bleue discontinue correspond au risque que la mesure sorte des limites d'acceptabilité (%).