

Direction générale

Maisons-Alfort, le 15 juin 2016

EXTRAIT DE L'AVIS du 17 février 2016 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé
comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer
une résine de type époxyde au contact des denrées
alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant
à leurs impuretés, produits de dégradation et oligomères du
TMBPF et du TMBPF-DGE.**

*Le présent document est un extrait de l'avis du 17 février 2016, après suppression des parties
confidentielles qui relèvent du secret industriel ou commercial, non publiables.*

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

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

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

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

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 2 juin 2015 par la Direction générale de la Concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'avis portant sur l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant à leurs impuretés, produits de dégradation et oligomères ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La demande du pétitionnaire se situe dans un contexte de substitution du diglycidyle éther de bisphénol A (BADGE) pour produire des résines époxydiques utilisables en France dans l'industrie alimentaire car ne comportant pas de bisphénol A.

La présente demande porte sur le tétraméthyl bisphénol F (TMBPF - CAS n° 5384-21-4) qui est un matériau précurseur utilisé dans la fabrication du comonomère diglycidyle éther de tétraméthyl bisphénol F (TMBPF-DGE - CAS n° 113693-69-9), qui servira lui-même à la polymérisation de résines époxydes utilisées dans les revêtements en contact avec les denrées alimentaires. Il est prévu que la résine époxyde ainsi constituée soit utilisée dans les revêtements d'emballages métalliques légers dédiés à tous types de denrées alimentaires (aqueuses, acides, alcoolisées et contenant des aliments gras).

Conformément à l'arrêté du 13 novembre 1986¹, toute demande d'emploi en France d'une nouvelle substance destinée à la fabrication de matériaux et objets destinés au contact des aliments doit être accompagnée d'un dossier conforme à l'article 2 de cet arrêté avec des renseignements généraux tels qu'une description précise de la substance, de ses conditions d'emploi, de son intérêt technologique, des autorisations d'emploi existantes, des risques pour l'environnement ainsi que des renseignements scientifiques relatifs aux données physico-chimiques et physio-toxicologiques de la substance. Au final, le contenu d'un dossier de demande d'emploi de substance est détaillé dans l'avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) du 9 décembre 1997² complété par l'instruction du 27 novembre 1986³ pour les protocoles d'expérimentation toxicologique.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée conjointement par le comité d'experts spécialisés « Evaluation des risques physico-chimiques dans l'alimentation » (ERCA) réuni le 25 novembre 2015, le groupe de travail (GT) « Perturbateurs Endocriniens » (GT PE) et le GT autonome « Évaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine » (GT ESPA) réunis respectivement le 13 novembre 2015 et le 26 novembre 2015.

La présente expertise s'est appuyée sur les documents suivants :

- Arrêté du 13 novembre 1986,
- Avis du CSHPF du 9 décembre 1997,
- Règlement CE n°1895/2005,
- Note for guidance for Food Contact Materials de l'EFSA du 30 juillet 2008.

L'expertise a consisté :

- à vérifier que le dossier du pétitionnaire comporte les données réglementaires requises par la DGCCRF en application de la réglementation de l'Union européenne et des mesures spécifiques applicables en France ;
- à examiner les données physico-chimiques et toxicologiques du dossier pour s'assurer de leur exhaustivité et de leur pertinence nécessaires à l'évaluation du risque du TMBPF et du TMBPF-DGE pour une utilisation dans la fabrication des vernis époxydiques mis au contact des aliments.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une validation finale par le CES ERCA le 18 décembre 2015 puis par le GT ESPA le 21 janvier 2016.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

¹ Arrêté du 13 novembre 1986 relatif aux dossiers de demande d'autorisation d'emploi des constituants de matériaux et objets mis ou destinés à être mis au contact des denrées, produits et boissons alimentaires.

² Avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France relatifs aux matériaux au contact des denrées alimentaires Séances du 14 octobre et du 9 décembre 1997 (Demandes d'autorisation d'emploi).

³ Instruction du 27 novembre 1986 concernant l'application de l'arrêté du 13 novembre 1986 relatif aux dossiers de demande d'autorisation d'emploi des constituants de matériaux et objets mis ou destinés à être mis au contact des denrées, produits et boissons alimentaires.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ERCA, DU GT ESPA ET DU GT PE

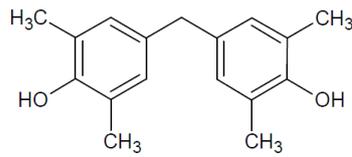
3.1. Analyse des données physico-chimiques

3.1.1. Identité et pureté des substances

TMBPF

Les principales données relatives à l'identité du TMBPF figurent dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1: Principales données relatives à l'identité du TMBPF

Dénomination	TMBPF : Tétraméthyl Bisphénol F (4,4'-méthylènebis (2,6-diméthylphénol))
Numéro CAS	5384-21-4
Formule brut	C ₁₇ H ₂₀ O ₂
Formule semi-développée	
Masse molaire	256 g/mol

Un schéma simplifié du procédé de fabrication du TMBPF est fourni dans le dossier. Il décrit les étapes du procédé et mentionne les différents intrants utilisés lors de la fabrication du TMBPF. En tant que produit fini, le TMBPF se présente sous forme d'une poudre blanche annoncée comme pure à 98,5% au minimum et dans laquelle les impuretés suivantes sont présentes :

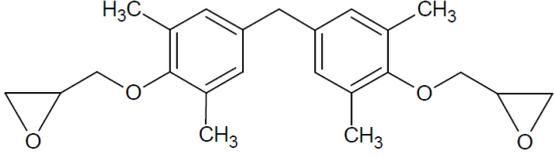
- 2,6 Xylénol (2,6-diméthyl phénol) : 0,07%_m Max
- Trimères : 0,48 %_m Max
- Eau : 0,50%_m Max

La pureté du TMBPF a été vérifiée par chromatographie en phase liquide haute performance avec détection par spectrophotométrie de type ultraviolet (CLHP-UV). Le résultat obtenu est de 98,94 % calculé à partir de l'aire du pic du TMBPF comparé au total des aires de tous les pics du chromatogramme.

TMBPF-DGE

Les principales données relatives à l'identité du TMBPF-DGE figurent dans le tableau 2.

Tableau 2: Principales données relatives à l'identité du TMBPF-DGE

Dénomination	TMBPF-DGE : Diglycidyl Ether du Tétraméthyl Bisphénol F (Phénol, 4,4_-methylenebis[2,6-diméthyle-, polymère avec 2-(chlorométhyl)oxirane))
Numéro CAS	113693-69-9
Formule brute	C ₂₃ H ₂₈ O ₄
Formule semi-développée	
Masse molaire	368 g/mol

La réaction de l'épichlorhydrine et du TMBPF à haute température en présence d'un catalyseur donne un mélange liquide dans lequel le TMBPF-DGE est le composé majoritaire (figure 1).

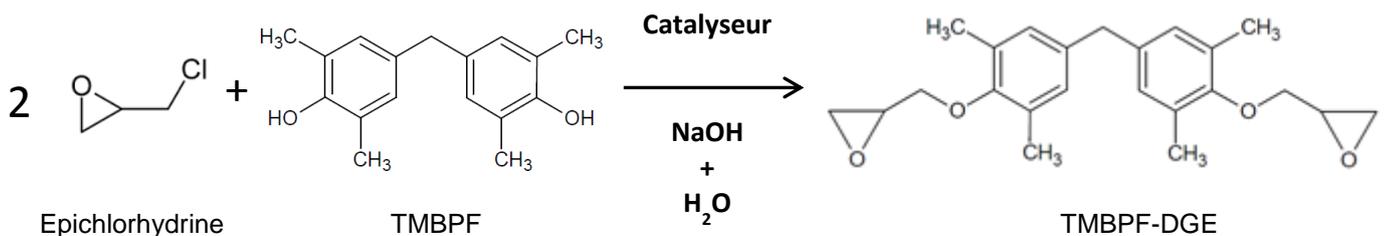


Figure 1 : Réaction de synthèse du TMBPF-DGE

Une analyse de pureté menée par CLHP-UV couplée à un spectromètre de masse à ionisation électrospray montre une teneur en TMBPF-DGE de 78% et démontre la présence de dimères (15%), de trimères (2%) et de tétramères (0,2%). Sont aussi identifiées des substances contenant au moins une unité additionnelle d'épichlorhydrine avec deux groupes époxydiques (1,88%) et des substances contenant au moins une unité additionnelle d'épichlorhydrine avec trois groupes époxydiques (0,77%). Des composés contenant un seul groupement époxydique sont enfin détectés (2%) ainsi que d'autres substances dont la structure n'a pu être établie (0,2%).

3.1.2. Propriétés physiques

A pression atmosphérique (1013 mBa), le point de fusion du TMBPF s'établit à 186°C et son point d'ébullition à 245°C. A ces niveaux de température, aucun produit de décomposition du TMBPF n'a été observé⁴. Le TMBPF a un caractère lipophile avec un Log P (coefficient de partage octanol/eau) mesuré à 25°C de 4,18 et une solubilité dans le méthanol de 3160 mg/L à 20°C. Il est peu soluble dans l'eau (3,77 mg/L à 20°C).

⁴ Source : site de l'ECHA : http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-dbbde13b-d8b6-2fbd-e044-00144f67d031/DISS-dbbde13b-d8b6-2fbd-e044-00144f67d031_DISS-dbbde13b-d8b6-2fbd-e044-00144f67d031.html

Les mesures de température effectuées sur le métal lors du durcissement des résines à base de TMBPF-DGE montrent que les valeurs maximales sont comprises entre 230°C et 250°C soit, dans le pire des cas, une valeur légèrement supérieure à la température d'ébullition du TMBPF. La température de décomposition du TMBPF-DGE et son point d'ébullition ne sont en revanche pas connus. Il conviendrait donc de fournir des données précises concernant la stabilité thermique du TMBPF-DGE (par analyse thermogravimétrique par exemple). Selon le fabricant, le TMBPF-DGE est stable sous conditions normales et à condition de l'éloigner des agents oxydants et des matériaux fortement acides afin d'éviter toute réaction exothermique. Il a un caractère lipophile avec un Log P mesuré à 25°C de 4,47 et est peu soluble dans l'eau (1,26 mg/L à 20°C).

3.1.3. Propriétés chimiques

Le TMBPF a un effet réactif attendu lors de la production de TMBPF-DGE. Il est faiblement hydrolysable et est annoncé comme stable à condition de l'éloigner des agents oxydants.

Lors de la polymérisation des résines époxydes, le TMBPF-DGE est susceptible d'engendrer des produits de réaction secondaires. Le potentiel d'hydrolyse du TMBPF-DGE n'a pas été déterminé mais le pétitionnaire précise que la présence de groupes époxy laisse présager des réactions avec l'eau pour former des composés diol et des réactions avec l'acide chlorhydrique pour former des dérivés chlorés.

Il est important de noter que la fabrication du produit fini (le vernis époxydique) est un processus en deux étapes qui met en jeu de nombreuses substances que ce soit en tant qu'intrants (substances de départ du TMBPF et du TMBPF-DGE) ou de substances présentes dans le produit fini tels que des produits de réactions secondaires (dimères, trimères et autres oligomères).

3.1.4. Utilisation prévue du TMBPF et du TMBPF-DGE

Le TMBPF est le monomère précurseur du TMBPF-DGE. Le TMBPF-DGE est un monomère utilisé pour la fabrication de résines époxydes dans lesquelles sont aussi incorporées des additifs. Les résines époxydes peuvent être copolymérisées avec des prépolymères de base acrylique, ce qui est le cas du vernis⁵ qui fait l'objet de la présente demande (appelé vernis A dans le présent avis) et dont la composition est donnée dans le dossier (informations confidentielles). Ces résines sont utilisées pour le revêtement d'emballages métalliques légers prévus pour conditionner tout type de denrées alimentaires.

Pour les deux substances, le pétitionnaire n'annonce pas d'incompatibilité d'utilisation. Les conditions d'utilisation les plus critiques au contact des denrées alimentaires des emballages métalliques revêtus de résines époxydes sont un traitement thermique à 130°C pendant 1 heure maximum suivi d'un stockage longue durée de plus de 6 mois des denrées alimentaires emballées.

Un ratio surface de matériau / masse d'aliment en contact de 6 dm² par kg d'aliment est considéré par le pétitionnaire comme le pire des cas pour les plus petits emballages métalliques revêtus de vernis époxyde à base de TMBPF-DGE.

⁵ Ce vernis époxy de base acrylique est le vernis testé dans les études de migration fournies dans le dossier.

3.1.5. Autorisations existantes du TMBPF et du TMBPF-DGE

Le TMBPF est répertorié par l'ECHA sur son site dans le cadre de la réglementation REACH avec une date limite d'enregistrement en 2013 (EC n° 226-378-9).

L'épichlorhydrine, utilisé lors de la réaction avec le TMBPF pour produire le TMBPF-DGE, est autorisée comme monomère des matières plastiques avec deux restrictions d'emploi ($Qm^6 = 1$ mg/kg de matériau fini et $LMS^7 =$ Non détecté avec Limite de détection = 0,01 mg/kg d'aliment⁸).

Le TMBPF et le TMBPF-DGE sont autorisées aux Etats-Unis pour fabriquer des revêtements polymériques pour une utilisation au contact de denrées alimentaires conformément au paragraphe 300 du Code of Federal Regulations « Resinous and polymeric coatings » (CFR21-175§300). Les autorités canadiennes ont communiqué au pétitionnaire, le 30/01/2015, une lettre de Non-Objection (LONO) pour le vernis A qui indique une utilisation possible au contact d'aliments aqueux, acides, alcoolisés jusqu'à 15% avec des traitements thermiques à température maximale de 90°C et jusqu'à des temps de stockage de longue durée à température ambiante.

3.1.6. Données concernant la teneur résiduelle en substances dans le vernis

La teneur résiduelle en TMBPF de plusieurs lots de TMBPF-DGE a été déterminée par chromatographie liquide ultra haute performance (CLUHP) avec détection par fluorescence. Sur les 4 échantillons analysés, la teneur maximale résiduelle en TMBPF est de 60 mg/kg de TMBPF-DGE. Aucun résidu de peroxyde n'a été détecté dans le vernis.

La teneur résiduelle en épichlorhydrine dans le vernis dissous dans le chlorure de méthylène a été déterminée par CPG/SM⁹ et représente 0,79 mg/kg de vernis (inférieure à la Qm de 1 mg/kg).

La teneur résiduelle en TMBPF-DGE, extrait du vernis cuit par le tétrahydrofurane, a été déterminée par CLUHP/SM. Elle est de 2870 mg/kg de vernis cuit.

Les substances suivantes ont été extraites par espace de tête et dosées par CPG/SM :

Tableau 3 : Teneur résiduelle en acide acrylique et acrylates dans le vernis

Substance	Résultat
Acide acrylique	ND (< 0,005 mg/dm ²)
Acide méthacrylique	ND (< 0,001 mg/dm ²)
Méthyl méthacrylate	ND (< 0,001 mg/dm ²)
Ethyl méthacrylate	ND (< 0,001 mg/dm ²)

ND : Non détecté

Néanmoins, l'acide acrylique et les différents acrylates sont les résidus des substances de départ du copolymère acrylique associé au polymère époxydique. Elles ne font donc pas l'objet de la demande d'avis.

⁶ Contrôle de la conformité par la teneur résiduelle par surface en contact avec les denrées alimentaires en cas de réaction avec la denrée alimentaire ou le simulant.

⁷ Limite de migration spécifique.

⁸ Règlement (UE) N° 10/2011 de la commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

⁹ Chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse.

3.1.7. Données concernant la migration du TMBPF et du TMBPF-DGE

Données de migration globale du vernis à base de TMBPF-DGE

Des plaques d'aluminium revêtues du vernis A placées dans des cellules de migration ont été mises en contact avec de l'acide acétique 3%, de l'éthanol 10% et de l'éthanol 50%. Il s'agit des simulants recommandés dans la réglementation pour les aliments aqueux, acides, alcoolisés et certains aliments contenant des matières grasses en émulsion dans l'eau¹⁰. Les conditions de contact annoncées étaient de 0,5 h à 130°C suivi de 10 jours à 40°C alors que les conditions d'utilisation du vernis telles qu'annoncées par le pétitionnaire dans le document principal sont de 1 h à 130°C suivi d'un stockage longue durée à température ambiante. Ces conditions de tests et leurs mises en perspective de la typologie du matériau soumis à évaluation, à savoir un vernis de faible épaisseur, peuvent être raisonnablement considérées comme couvrant toute condition de traitement thermique en termes de temps, pour toute température jusqu'à 130°C inclus. Il est en effet fort probable que l'équilibre de migration soit atteint après 0.5 h à 130°C + 10 jours à 60°C.

Des dosages gravimétriques des résidus secs après évaporation des simulants ont été réalisés (Méthode de la norme EN 1186-5¹¹).

Pour les simulants éthanol 10% et éthanol 50%, les résultats de migration globale sont inférieurs à 10 mg/dm² (limite autorisée pour l'alimentation des adultes) et inférieurs à 60 mg/kg (limite autorisée pour l'alimentation infantile) pour un rapport surface de matériau/masse d'aliment de 6 dm²/kg. En revanche, le résultat dans l'acide acétique 3% montre un dépassement du seuil de 10 mg/dm² lié à la présence d'une interférence (due à la corrosion du support en aluminium).

Données de migration spécifique du vernis à base de TMBPF-DGE dans les simulants réglementaires

Des plaques d'aluminium revêtues du vernis A placées dans des cellules de migration ont été mises en contact avec de l'acide acétique 3% (AA3%), de l'éthanol 10% (ETOH 10%) et de l'éthanol 50% (ETOH 50%). Les conditions de contact annoncées étaient de 0,5 h à 130°C suivi de 10 jours à 60°C. Les substances suivantes ont été dosées par CLHP dans les 3 simulants (voir tableau 4).

Tableau 4: Résultats des essais de migration dans les simulants alimentaires

Substances	Résultats de migration*		
	AA3%	ETOH 10%	ETOH 50%
Phénols	< 0,06 mg/6dm ²		0,06 mg/6dm ²
Formaldéhyde	Interférences (corrosion)		0,18 mg/6dm ²
1,4 dihydroxybenzène	< 0,03 mg/6dm ²	< 0,03 mg/6dm ²	< 0,03 mg/6dm ²
TMBPF-DGE	< 0,006 mg/6dm ²	< 0,006 mg/6dm ²	< 0,006 mg/6dm ²

*Les valeurs présentées ci-dessus ont été calculées sur la base des concentrations mesurées dans les simulants, ou le cas échéant des limites de détection déterminées par le pétitionnaire en considérant un ratio surface / volume de 6 dm² / kg d'aliment.

¹⁰ Directive n°82/711/CEE établissant les règles de base nécessaires à la vérification de la migration des constituants des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires.

¹¹ NF EN 1186-5, Janvier 2003 - Matériaux et objets en contact avec les denrées alimentaires - Matière plastique- Partie 5 : Méthodes d'essai pour la migration globale dans les liquides simulateurs aqueux en cellule.

Les conditions de mise en contact des simulants réglementaires avec le matériau ne sont pas explicitées dans le rapport du laboratoire qui a effectué les analyses de migration. En effet, les températures de mise en contact du matériau avec l'acide acétique 3% et avec les deux solutions d'éthanol sont de 130°C dans des cellules de migration. Or la norme EN 1186-5 qui est citée dans le cas des résultats de migration globale précise que les cellules normalisées ne permettent pas d'aller au-delà de 70°C. Ainsi, afin de s'assurer de la validité de ces résultats il conviendrait donc de fournir des précisions sur la résistance de la cellule de migration utilisée lors de ces tests à des températures pouvant aller jusqu'à 130°C.

Données de migration du vernis à base de TMBPF-DGE dans l'acétonitrile

Des plaques d'aluminium revêtues de vernis A ont été immergées pendant 24 heures à température ambiante avec de l'acétonitrile. Ce simulant a été choisi par le pétitionnaire comme substitut de l'huile végétale pour les aliments gras, ce qui est jugé acceptable par le GT ESPA. En effet, des études de migration effectuées sur une résine de type époxyde constituée de BADGE indiquent des niveaux de migration supérieurs dans l'acétonitrile à ceux dans l'huile végétale (Schaefer, 2004). L'essai de migration dans l'acétonitrile peut donc être considéré comme un pire cas par rapport à l'huile végétale.

Les substances suivantes ont été dosées par CLHP-SM/SM dans l'extrait à l'acétonitrile :

Tableau 5: Résultats des essais de migration dans l'acétonitrile

Substance	Résultats de migration*
TMBPF	0,8 µg/6 dm ²
TMBPF-DGE	2,3 µg/6 dm ²

*Les valeurs présentées ci-dessus ont été calculées sur la base des concentrations mesurées dans les simulants, ou le cas échéant des limites de détection déterminées par le pétitionnaire en considérant un ratio surface / volume de 6 dm² / kg d'aliment .

Sur la base de la teneur résiduelle en TMBPF dans le TMBPF-DGE, le pétitionnaire a effectué un calcul de migration maximale du TMBPF qui donne une valeur de 25,3 µg/6 dm² à comparer à la valeur de migration mesurée dans l'acétonitrile à 0,8 µg/6 dm².

A partir de l'ensemble de ces données de migration spécifique, il est possible de calculer le niveau d'exposition théorique (NET)¹² du TMBPF-DGE en considérant un ratio surface de matériau/masse d'aliment en contact de 6 dm² /kg et en prenant la limite de détection comme la valeur de migration dans le pire des cas :

$$\text{TMBPF-DGE : NET} = 0,8 \times [(6 + 6) / 2] + 0,2 \times 2,3 = 5,2 \text{ µg/personne/jour}$$

Les résultats de migration spécifique du TMBPF-DGE aboutissent à un NET compris entre 0,5 et 50 µg/personne/jour. Selon l'avis du CSHPF du 9/12/1997, au moins deux études de génotoxicité *in vitro* sur le TMBPF-DGE sont requises.

Dans le cas du TMBPF, seule la valeur de migration dans l'acétonitrile est disponible et elle est légèrement supérieure à la borne inférieure du NET requérant des études de génotoxicité (0,8 µg/personne et par jour).

¹² Calculé en considérant qu'un individu de 60 kg consomme quotidiennement au maximum 1 kg d'aliments emballés : NET (µg / personne / jour) = 0,8 x (MA + MB + MC)/3 + 0,2 x MD (avec MA, MB, MC et MD correspondant respectivement aux migrations spécifiques obtenues dans des simulants aqueux, acide, alcoolique et gras).

Identification et quantification des oligomères migrants et des produits de réaction

Des plaques d'aluminium revêtues de vernis A ont été immergées pendant 24 h à température ambiante avec de l'acétonitrile. Les oligomères et produits de réaction ont été recherchés et identifiés par LC-TOF-MS dans l'extrait à l'acétonitrile. Le GT ESPA souhaiterait que le choix de solvant soit argumenté compte tenu de la phase mobile utilisée (mélange méthanol et eau).

212 substances ont été détectées, correspondant à une quantité totale de 9,4 mg/6 dm², quantité mesurée en utilisant le bisphénol A diglycidyl ether mono hydraté (BADGE.H₂O) comme étalon externe. Par comparaison aux substances extraites d'un vernis à base de BADGE, 141 substances non liées au TMBPF-DGE ont été repérées représentant 6,7 mg/6 dm². Sur les 71 substances restantes, 23 présentaient une correspondance massique avec les espèces listées dans la base de données des oligomères du TMBPF-DGE et des produits de réaction associés préparée par le pétitionnaire. Aucune masse n'a pu être spécifiquement identifiée comme étant liée au TMBPF. Pour ces 23 substances totalisant 1,1 mg/6 dm², 0,471 mg/6 dm² présentent une ou deux fonctions oxirane¹³ (soit 0,04 mg équivalent oxirane/6 dm²). Le GT ESPA souligne que le choix de présenter ce résultat en équivalent oxirane n'est pas acceptable et que le résultat doit être exprimé en masse de molécule par surface. Ainsi, la concentration dans l'extrait d'acétonitrile de substances possédant une ou deux fonctions oxirane s'élève à 471 µg/6 dm². Il s'agit de substances potentiellement réactives et affiliées au TMBPF-DGE.

Par ailleurs, huit substances ont été identifiées comme provenant des matières premières 5 provenant du lubrifiant (0,1 mg/6 dm²) et 3 provenant du TMBPF-DGE (0,1 mg/6 dm²). Sur les 40 substances non assignées, seules 6 avaient des teneurs supérieures à 0,05 mg/6 dm². 5 ont été attribuées à des produits de réaction de l'amine quaternisante (diméthylaminoéthanol), et des structures possibles ont été proposées. Au final, une masse de 0,14 mg/6 dm² n'a pu être identifiée. Une analyse complémentaire par RMN du proton a été réalisée en utilisant le TMBPF-DGE comme substance étalon. La quantité de fonctions oxirane résiduelles dans l'extrait à l'acétonitrile a été quantifiée à 29 µg/6 dm² (exprimé en équivalent oxirane).

En conclusion, compte tenu de la présence en quantité importante dans l'extrait d'acétonitrile de substances possédant une ou deux fonctions oxirane réactives (471 µg/6 dm²) et des usages prévus du vernis, il conviendrait de déterminer les niveaux de migration de ces substances dans des simulants suivants : acide acétique 3%, éthanol 10% et huile alimentaire (ou milieux de substitution). Par ailleurs, dans la mesure où la dégradation de ces composés (notamment par hydrolyse) ne peut être exclue au cours de ces essais de migration, le GT ESPA souligne qu'il conviendrait également d'identifier et quantifier les produits de dégradation éventuels de ces composés (notamment les produits d'hydrolyse) dans les simulants alimentaires. Enfin, il est rappelé que conformément à l'avis du CSHPF du 9/12/1997, le calcul du NET permettra de déterminer les données à fournir pour évaluer la toxicité de ces substances à fonction oxirane.

Données de migration spécifique des dérivés du TMBPF-DGE

Dans les essais de migration, des substances néoformées correspondant aux produits de réaction prévisibles du TMBPF-DGE au contact de certaines catégories d'aliments ont été recherchées (voir tableaux 6 et 7).

Les résultats de migration dans les simulants représentant les aliments aqueux, acides, alcoolisés et certains aliments contenant des matières grasses en émulsion dans l'eau (lait et produits laitiers par exemple) sont les suivants :

¹³ Fonction oxirane (ou époxyde) : 

Tableau 6 : Résultats des essais de migration des dérivés du TMBPF-DGE dans les simulants alimentaires AA3%, ETOH 10% et ETOH 50%

Substance	Résultat de migration*		
	AA3%	ETOH 10%	ETOH 50%
TMBPF-DGE.H ₂ O	< 0,006 mg/6dm ²	< 0,006 mg/6dm ²	< 0,006 mg/6dm ²
TMBPF-DGE.2H ₂ O	0,03 mg/6dm ²	0,060 mg/6dm ²	0,072 mg/6dm ²
TMBPF-DGE.2HCl	< 0,006 mg/6dm ²	0,006 mg/6dm ²	0,018 mg/6dm ²
TMBPF-DGE.H ₂ O.HCl	< 0,006 mg/6dm ²	0,024 mg/6dm ²	0,042 mg/6dm ²

*Les valeurs présentées ci-dessus ont été calculées sur la base des concentrations mesurées dans les simulants, ou le cas échéant des limites de détection déterminées par le pétitionnaire en considérant un ratio surface / volume de 6 dm² / kg d'aliment.

Les résultats dans le simulant que le pétitionnaire a choisi comme substitut de l'huile végétale (acétonitrile) sont les suivants :

Tableau 7 : Résultats des essais de migration des dérivés du TMBPF-DGE dans l'acétonitrile

Substance	Résultat de migration*
TMBPF-DGE.H ₂ O	17 µg/6 dm ²
TMBPF-DGE.2H ₂ O	64 µg/6 dm ²
TMBPF-DGE.2HCl	< 1,5 µg/6 dm ²
TMBPF-DGE.HCl	2,4 µg/6 dm ²

*Les valeurs présentées ci-dessus ont été calculées sur la base des concentrations mesurées dans les simulants, ou le cas échéant des limites de détection déterminées par le pétitionnaire en considérant un ratio surface / volume de 6 dm² / kg d'aliment.

Les données de migration permettent de calculer le NET pour 3 dérivés du TMBPF-DGE en considérant un ratio surface de matériau/masse d'aliment en contact de 6 dm² /kg et en prenant la limite de détection comme la valeur de migration dans le pire des cas :

$$\text{TMBPF-DGE.H}_2\text{O} : \text{NET} = 0,8 \times [(6 + 6) / 2] + 0,2 \times 17 = 8,2 \text{ µg/personne/jour}$$

$$\text{TMBPF-DGE.2H}_2\text{O} : \text{NET} = 0,8 \times [(30 + 60) / 2] + 0,2 \times 64 = 48,8 \text{ µg/personne/jour}$$

$$\text{TMBPF-DGE.2HCl} : \text{NET} = 0,8 \times [(6 + 6) / 2] + 0,2 \times 1,5 = 5,1 \text{ µg/personne/jour}$$

En ce qui concerne les dérivés TMBPF-DGE.HCl et TMBPF-DGE.H₂O.HCl, le dossier ne contient pas tous les résultats de migration (uniquement avec l'acétonitrile pour le TMBPF-DGE.HCl et uniquement avec les simulants AA et ETOH pour le TMBPF-DGE.H₂O.HCl). En considérant ces résultats, le NET serait au minimum de 0,48 µg/personne/jour pour le TMBPF-DGE.HCl¹⁴ et de 15 µg/personne/jour pour le TMBPF-DGE.H₂O¹⁵.

Ainsi, les résultats de migration des dérivés H₂O et HCl du TMBPF-DGE donnent des valeurs de NET comprises entre 0,5 et 50 µg / personne / jour. Selon l'avis du CSHPF du 9/12/1997 et les recommandations de l'EFSA (EFSA 2011), au moins deux études de géotoxicité *in vitro* sur ces dérivés du TMBPF-DGE sont requises.

¹⁴ TMBPF-DGE.HCl : NET = 0,8 x [(0 + 0) / 2] + 0,2 x 2,4 = 0,48 µg/personne/jour

¹⁵ TMBPF-DGE.H₂O.HCl : NET = 0,8 x [(6 + 24) / 2] + 0,2 x 0 = 15 µg/personne/jour

3.1.8. Impact du TMBPF et du TMBPF-DGE sur l'environnement

Aucune information sur les conséquences du rejet dans l'environnement du TMBPF et du TMBPF-DGE ne figure dans le dossier. Il est cependant à noter que des données concernant l'impact du TMBPF sur l'environnement figurent dans le dossier d'enregistrement de cette substance sous REACH.

3.2. Analyse des données toxicologiques

Le pétitionnaire a fourni plusieurs études pour évaluer l'éventuelle génotoxicité et le caractère perturbateur endocrinien du TMBPF et du TMBPF-DGE.

3.2.1. Toxicité générale

TMBPF-DGE

Aucune étude de métabolisme ni de toxicité orale générale (aiguë, sub-chronique, chronique, toxicité développementale, toxicité sur la reproduction) n'est référencée. Néanmoins, au regard des résultats de tests de migration et conformément aux lignes directrices de l'EFSA relatives aux matériaux au contact des denrées alimentaires (MCDA), ces études ne sont pas requises pour le TMBPF-DGE (EFSA, 2008).

TMBPF

Au regard des résultats de tests de migration et conformément aux lignes directrices de l'EFSA relatives aux MCDA (EFSA, 2008), des études de toxicité générale ne sont pas requises pour le TMBPF. Néanmoins, une étude de toxicité aiguë ainsi qu'une étude de toxicité sub-chronique par voie orale sont référencées par le notifiant.

Toxicité aiguë

D'après le pétitionnaire, dans une étude de toxicité aiguë par voie orale selon la ligne directrice 423 de l'OCDE, dans laquelle les rats ont été traités par gavage à des doses uniques de 300 et 2000 mg/kg pc, aucune mortalité et aucune modification pathologique n'ont été observées.

Dans ces conditions expérimentales, la toxicité aiguë par voie orale du TMBPF est supérieure à 2000 mg/kg.

Toxicité orale subchronique

D'après le pétitionnaire, il n'y a pas de données disponibles concernant la toxicité subchronique (\geq 90 jours) à dose répétée du TMBPF. En revanche, une étude de toxicité par voie orale à dose répétée pendant 28 jours selon la ligne directrice 407 de l'OCDE est présentée. Dans cette étude, aucun effet adverse directement attribuable au TMBPF n'a été observé. La dose sans effet adverse observable (NOAEL) pour une exposition répétée de 28 jours a été estimée à 1000 mg/kg pc/j (plus forte dose testée) chez les rats Sprague-Dawley mâles et femelles.

3.2.2. Evaluation de la génotoxicité du TMBPF-DGE et du TMBPF

TMBPF-DGE

L'expertise des données du potentiel mutagène et génotoxique du TMBPF-DGE a été réalisée sur la base des rapports d'étude fournis par le notifiant. Le TMBPF-DGE a été étudié dans 3 modèles de mutagenèse *in vitro* avec et sans activation métabolique et dans 2 modèles *in vivo* chez le rat mâle. Les 3 modèles *in vitro* mis en œuvre sont le test d'Ames, un test de mutation génique et un test d'aberrations chromosomiques. Le modèle *in vivo* mis en œuvre est le test du micronoyau sur cellules de moelle osseuse de rat couplé au test des comètes vis-à-vis du foie et du duodénum. L'ensemble des tests a été effectué en suivant les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) de l'OCDE (1997).

Test d'Ames

L'étude du potentiel mutagène du produit TMBPF-DGE a été conduite avec et sans activation métabolique vis-à-vis de 4 souches de *Salmonella* Typhimurium et d'une souche d'*Escherichia coli*, en utilisant la méthode standard d'incorporation directe sur boîtes au cours des 2 essais. Cette étude a été conduite conformément à la ligne directrice 471 de l'OCDE.

Les résultats montrent que le TMBPF-DGE est considéré comme mutagène *in vitro* dans le test d'Ames pour 2 souches de *Salmonella* Typhimurium (souches TA1535 et TA100) exclusivement en présence d'activation métabolique. Sur le plan mécanistique, il est intéressant de noter que l'évènement génétique menant à de la mutagenèse correspond dans ces 2 cas à des substitutions de paires de bases (transitions GC vers AT) induites exclusivement en présence d'un système d'activation métabolique exogène ce qui signifie que ces effets sont dus à un (ou plusieurs) métabolite(s) mutagène(s). De plus, ces 2 souches de *Salmonella* Typhimurium sont connues pour être particulièrement sensibles aux agents alkylants.

Test de mutation au locus TK sur cellules de lymphome de souris

L'étude du potentiel mutagène de la substance TMBPF-DGE a été conduite avec et sans activation métabolique par la recherche de mutations géniques *in vitro* sur cellules de lymphome de souris conformément à la ligne directrice 476 de l'OCDE.

Au cours de cette étude, le TMBPF-DGE a augmenté de façon biologiquement significative aussi bien la fréquence de mutation des petites colonies que celle des grosses colonies, exclusivement en absence d'activation métabolique. Ces résultats tendent à démontrer que le TMBPF-DGE est à la fois clastogène et mutagène sur cellules de lymphome de souris.

Test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules CHO-WBL

L'étude du potentiel génotoxique de TMBPF-DGE a été conduite conformément à la ligne directrice 473 de l'OCDE, avec et sans activation métabolique par la recherche d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules CHO-WBL d'ovaire de hamster.

Les fréquences d'anomalies chromosomiques se sont révélées très élevées dans certaines conditions, jusqu'à 78,9% de cellules portant des aberrations à la concentration de 75 µg/mL après le temps long de 20 heures de traitement sans activation métabolique. De plus, des échanges complexes rarement observés expérimentalement (triradial, tétraradial, ring, dicentrique, réarrangement complexe) ont été notés dans les 3 conditions de traitement. Ces anomalies correspondent à des doubles évènements génétiques (cassure et réarrangement) et à ce titre,

elles constituent de réels marqueurs de clastogénèse. Enfin, des augmentations du nombre d'anomalies de nombre ont également été notées aussi bien après un temps long de 20 heures de traitement sans activation métabolique qu'après un traitement court de 3 heures de traitement avec activation métabolique. Ces effets représentent des alertes sur une possible activité de type aneugène.

En conclusion, l'étude démontre que le TMBPF-DGE est clastogène et possiblement aneugène sur cellules d'ovaire de hamster chinois, aussi bien en absence qu'en présence d'activation métabolique.

Test du micronoyau *in vivo* sur cellules de moelle osseuse de rat couplé au test des comètes vis-à-vis du foie et du duodénum

L'activité génotoxique *in vivo* du TMBPF-DGE a été étudiée par le test du micronucleus *in vivo* sur cellules de moelle osseuse de rat conformément à la ligne directrice 474 de l'OCDE. Cet essai a été couplé à l'étude de la fragmentation de l'ADN vis-à-vis de deux organes cible, le foie et le duodénum, conformément à la ligne directrice 489 de l'OCDE. Cette étude a été effectuée dans le respect des principes de l'OCDE des BPL (OCDE, 1997).

L'essai a été réalisé par voie orale chez le rat Sprague Dawley mâle (5 animaux/groupe). Des essais préalables de toxicité ont permis de déterminer que la dose maximale tolérée (DMT) de TMBPF-DGE par voie orale chez le rat Sprague Dawley mâle était supérieure à 2000 mg/kg/j. L'essai principal de génotoxicité a ainsi été réalisé à 2000 mg/kg/j, ce qui correspond à la dose maximale recommandée dans les lignes directrices de l'OCDE, ainsi qu'aux 2 doses inférieures de 500 et 1000 mg/kg. Les animaux ont été sacrifiés entre 3 et 4 heures après le dernier traitement.

Concernant la toxicité, aucune diminution du rapport érythrocytes polychromatiques / érythrocytes normochromatiques n'a été observée dans le test du micronoyau sur moelle osseuse. Pour le test des comètes, aucune augmentation de la proportion de cellules fortement endommagées n'a été notée aussi bien pour le foie (dans les 2 essais indépendants) que pour le duodénum.

Concernant la génotoxicité, aucune augmentation significative du nombre moyen d'érythrocytes polychromatiques micronucléés (test du micronoyau sur moelle osseuse,) et aucune augmentation significative du taux de fragmentation de l'ADN (test des comètes) n'a été notée quel que soit le groupe traité. En conclusion, cette étude démontre que le TMBPF-DGE n'induit ni augmentation significative du nombre de micronoyaux au niveau des cellules de la moelle osseuse, ni augmentation significative de la fragmentation de l'ADN au niveau du foie et du duodénum chez le rat mâle traité par voie orale.

Néanmoins, le CES ERCA regrette qu'aucune détermination des concentrations plasmatiques du produit (ou de ses métabolites) n'ait été effectuée pour s'assurer de l'exposition des organes cibles systémiques (moelle osseuse et foie). De surcroît, aucun signe de toxicité n'a été notée au niveau de la moelle osseuse, ce qui ne permet pas de s'assurer qu'une exposition systémique suffisante soit atteinte après exposition par voie orale. Il est donc impossible de garantir que ces organes aient été réellement et correctement exposés et donc de valider la pertinence de ces résultats négatifs vis-à-vis de la moelle osseuse et du foie. Il convient également de noter que dans le test des comètes, au niveau du duodénum, le taux spontané (dans le groupe témoin négatif) de cellules fortement endommagées est très élevé (46,6%) ce qui a pour conséquence de diminuer la sensibilité de ce test. Enfin, il est relevé qu'aucune identification et quantification des impuretés éventuelles du mélange TMBPF-DGE utilisé pour ces tests n'a été réalisée.

Etant donné les résultats observés *in vitro* qui tendent à démontrer un potentiel d'alkylation, un effet génotoxique direct vis-à-vis du pré-estomac et de l'estomac glandulaire qui sont les organes

primo-exposés après administration orale ne peut être exclu. De plus, aucune information sur l'éventuelle dégradabilité du TMBPF-DGE à pH acide n'est donnée. Ainsi, bien que l'on puisse penser que le duodénum ait été exposé, le choix de cet organe pour réaliser le test des comètes n'est pas argumenté et est discutable. Il aurait en effet été préférable que l'estomac glandulaire et le pré-estomac aient été choisis, puisqu'il s'agit des organes primo-exposés.

TMBPF

Les données toxicologiques disponibles dans le dossier du pétitionnaire sont majoritairement issues de prédictions liées à la similarité structure/activité. Ainsi, afin de s'assurer qu'aucune autre donnée n'existe, il est apparu pertinent dans un même temps de consulter de façon exhaustive le site de l'ECHA. Parallèlement, une recherche bibliographique sur 2 sites (Toxnet et PubMed) n'a pas permis de retrouver d'articles publiés concernant la génotoxicité du TMBPF.

Prédictions QSAR : Test d'Ames

D'après le pétitionnaire, à partir des prédictions basées sur la Relation Quantitative Structure / Activité (QSAR) émis par l'Agence pour la Protection Environnementale Danoise (Danish-EPA 2012)¹⁶, qui utilise la base de données OASIS, le TMBPF n'a révélé aucune caractéristique structurale mutagène et est considéré comme non mutagène pour les tests de mutation reverse *in vitro* sur des bactéries utilisant les souches de *Salmonella* Typhimurium.

Un résultat complémentaire de prédiction se rattachant à cette première évaluation est également disponible sur le site de l'ECHA. Celui-ci est basé sur la prédiction du résultat pour le test d'Ames exclusivement vis-à-vis de la souche *Salmonella* Typhimurium TA 100 sans activation métabolique en utilisant le logiciel de QSAR Toolbox (version 3.1). Il a été considéré que le TMBPF ne présenterait pas de potentiel d'induction de mutation génique dans cette condition. Bien que ce test soit beaucoup plus restreint dans sa portée (seule la souche TA100 a été considérée et exclusivement sans activation métabolique), il « confirme » l'évaluation QSAR réalisée par l'Agence pour la Protection Environnementale Danoise.

Néanmoins, il est reconnu que les prédictions d'un potentiel toxique à des fins réglementaires ne doivent pas être basées sur l'utilisation d'un seul outil de modélisation QSAR, la sensibilité et la spécificité étant complémentaire entre logiciels. Ainsi, un dossier toxicologique devrait contenir *a minima* les résultats de 2 logiciels QSAR différents basés sur deux modèles différents (modèle basé sur approche par la connaissance : données expérimentales et jugements d'experts ; modèle basée sur une approche statistique, modèle hybride : combinaison de l'approche basée sur la connaissance et de l'approche statistique).

De plus, cette étude ne s'intéresse qu'à la prédiction pour le test d'Ames vis-à-vis de la seule souche de *Salmonella* Typhimurium TA 100 exclusivement sans activation métabolique alors que le TMBPF-DGE est mutagène sur ce système bactérien exclusivement en présence d'activation métabolique. Cette prédiction d'absence de potentiel mutagène sur bactéries interroge car le TMBPF-DGE s'est révélé nettement mutagène dans une étude expérimentale et que ces 2 molécules sont proches.

En conclusion, en l'absence de complémentarité des logiciels de prédiction mis en jeu et de leur niveau de fiabilité modéré alors qu'une réponse clairement positive a été observée dans le test

¹⁶Danish EPA (2012) QSAR predictions by Danish Environmental Protection Agency (EPA) model powered by OASIS database <http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-dbbde13b-d8b6-2fbd-e044-00144f67d031/DISS-dbbde13b-d8b6-2fbd-e044-00144f67d031> DISS-dbbde13b-d8b6-2fbd-e044-00144f67d031.html (site visité le 02/11/2015).

d'Ames pour le TMBPF-DGE, il n'apparaît pas possible de valider ce résultat théorique négatif. De plus, en l'absence de donnée expérimentale, le potentiel mutagène du TMBPF sur bactéries ne peut être évalué.

Prédictions QSAR : Test de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères

D'après le pétitionnaire, à partir des prédictions QSAR émis par l'Agence pour la Protection Environnementale Danoise, qui utilise la base de données OASIS, le TMBPF ne montre aucune caractéristique structurale mutagène. Le pétitionnaire cite la référence correspondant à la base de données des substances enregistrées par l'ECHA.

Cette référence concernant spécifiquement l'induction de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères n'a pas été retrouvée sur le site de l'ECHA. Il semble qu'il y ait eu extrapolation des résultats prédictifs sur bactéries vers des cellules de mammifères. A l'instar des résultats prédictifs du test d'Ames, cette prédiction d'absence de potentiel mutagène sur cellules interroge car le TMBPF-DGE s'est révélé clairement mutagène dans une étude expérimentale.

En conclusion, étant donnée la réponse clairement positive observée au cours du test MLA/TK pour le TMBPF-DGE, il n'apparaît pas possible de valider ce résultat théorique négatif. En absence de donnée expérimentale, le potentiel mutagène du TMBPF sur cellules de mammifère ne peut être évalué.

Test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules de mammifères

D'après le pétitionnaire qui cite la base de données ECHA des substances enregistrées, le TMBPF n'a induit aucune augmentation significative de la fréquence de mutations chromosomiques et/ou géniques dans les cellules CHL/IU utilisées pour l'analyse simultanée des mutations géniques et des anomalies chromosomiques, avec et sans activation métabolique.

D'après le dossier, cette étude expérimentale, n'a pas été réalisée avec du TMBPF mais avec 6,6'-di-tert-butyl-2,2'-methylènedi-p-cresol dont la structure chimique est proche de celle du TMBPF (schéma 2).

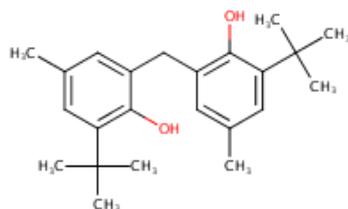


Figure 2 : Structure chimique du 6,6'-di-tert-butyl-2,2'-methylènedi-p-cresol

En conclusion, cette étude expérimentale a été réalisée sur une substance proche et non pas sur le TMBPF. De plus, de nombreuses faiblesses scientifiques et méthodologiques sont notées :

- Utilisation d'un modèle cellulaire transgénique non recommandé dans les lignes directrices correspondantes,
- Absence de contrôles permettant d'apprécier la sensibilité et l'efficacité du modèle,
- Impossibilité d'évaluer la significativité biologique (les niveaux spontanés de mutation et de micronoyaux ne peuvent pas être appréciés en absence de référence).

Ainsi, il n'est pas possible de valider ce résultat théorique négatif et en absence de donnée expérimentale, le potentiel génotoxique du TMBPF sur cellules de mammifère ne peut être évalué.

3.2.3. Evaluation du potentiel perturbateur endocrinien (PE) du TMBPF et du TMBPF-DGE

À l'égard du TMBPF, plusieurs tests ont été réalisés à savoir :

- Le test utéro-trophique *in vivo*,
- Plusieurs essais *in vitro* dont un essai d'expression de gènes rapporteurs œstrogène/androgène induits sur levure recombinante, des essais *in vitro* sur la redistribution des gènes rapporteurs des cellules USO2 ER α et USO2 AR et un essai de gène rapporteur AR, ER et DR CALUX (Dioxin Responsive Chemical Activated Luciferase gene eXpression),
- Deux tests d'activité endocrinienne LUMICELL : l'un d'activité agoniste des œstrogènes et l'autre d'activité antagoniste des œstrogènes,
- Un essai d'inhibition enzymatique de l'aromatase.

À l'égard du TMBPF-DGE, les tests réalisés concernent seulement des essais *in vitro* d'expression de gènes rapporteurs AR, ER et DR CALUX.

TMBPF-DGE

Test d'activité endocrinienne : essai de gène rapporteur ER et AR CALUX

Le test CALUX (Chemical Activated LUciferase gene eXpression) permet d'identifier et de quantifier par rapport à une substance de référence (l'estradiol-17 β (E2) pour l'ER CALUX et la dihydrotestostérone (DHT) pour l'AR CALUX) la capacité d'une substance à reconnaître, fixer et activer le récepteur aux estrogènes/androgènes et donc de mesurer son potentiel estrogénique/androgénique. Il s'agit d'un test *in vitro* réalisé sur une lignée cellulaire humaine U2OS provenant d'un ostéosarcome. Les cellules ont été transfectées de façon stable pour exprimer le récepteur humain des estrogènes (ER α) ou des androgènes (U2OS-ER/AR) associé à un gène rapporteur exprimant la luciférase. La technique consiste à déterminer le taux d'expression du gène rapporteur sous le contrôle du récepteur nucléaire. Les mesures de luminescence ont été réalisées après 24h d'exposition des cellules U2OS (ER ou AR) aux substances à tester dans des boîtes 96 puits. Les dilutions en série du TMBF-DGE ont été réalisées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (1%).

Dans ces conditions, le TMBPF-DGE testé aux concentrations allant de 3,14 x 10⁻⁵ M à 3,14 x 10⁻⁸ M (7 concentrations différentes) ne montre aucune activité estrogénique ou androgénique. Il est à noter, par ailleurs, que les activités anti-estrogéniques et anti-androgéniques n'ont pas été mesurées.

Essai de gène rapporteur DR CALUX

Le test DR CALUX permet d'identifier et de quantifier par rapport à la 2,3,7,8-TCDD qui est la dioxine de référence la capacité d'une substance à reconnaître et fixer le récepteur Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) et à induire la transcription de gènes cibles. Brièvement, la liaison au récepteur AhR d'une substance active entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle

d'un gène rapporteur se traduisant par une production de luciférase proportionnelle à la quantité de liaison.

Dans ces conditions, le TMBPF-DGE testé aux concentrations allant de $7,55 \times 10^{-4}$ M à $2,52 \times 10^{-8}$ M (8 concentrations différentes) ne montre aucune activité de type dioxine. En conclusion, dans les conditions décrites de réalisation du test DR-CALUX, le TMBF-DGE ne montre pas de potentiel dioxin-like. Néanmoins, ce test est considéré comme peu sensible pour les molécules à faible potentiel de liaison à AhR.

Conclusion sur le caractère perturbateur endocrinien du TMBPF-DGE

Sur la base des tests réalisés, limités aux activités agonistes du TMBPF-DGE vis-à-vis des récepteurs Er α et AR, il n'y a pas d'effet perturbateur endocrinien (PE) du TMBPF-DGE.

TMBPF

Test d'activité endocrinienne : essai de gène rapporteur ER et AR CALUX

Un test ER et AR CALUX a été réalisé pour le TMBPF selon le même mode opératoire que pour le TMBPF-DGE. Le TMBPF testé aux concentrations allant de $3,81 \times 10^{-6}$ M à $3,81 \times 10^{-8}$ M (5 concentrations différentes) ne montre pas d'activité estrogénique ou androgénique. Aux concentrations de $1,14 \times 10^{-5}$ M et $3,81 \times 10^{-5}$ M, aucune activité androgénique n'est observée mais une activité E2 voisine de 30% est observée. Les 3 autres concentrations plus élevées ($1,14 \times 10^{-3}$ M, $3,81 \times 10^{-4}$ M et $1,14 \times 10^{-4}$ M) provoquant une cytotoxicité n'ont pas été analysées. Il est à noter que les activités anti-estrogéniques ou anti-androgéniques n'ont pas été mesurées et que la signalisation *via* le récepteur ER β n'a pas été recherchée ni les médiations non génomiques. Enfin, à titre de comparaison, l'effet estrogénique du bisphénol F (BPF) a été mis en évidence à partir de divers systèmes *in vitro* (Perez et al. 1998, Stroheker et al. 2004, Cabaton et al. 2009) et a été confirmé *in vivo* (Stroheker et al. 2003). Il est à noter qu'à ce jour, de tels effets n'ont pas été mis en évidence pour le Bisphénol F (BPF) par l'intermédiaire du test CALUX.

Essai de gène rapporteur DR CALUX

Un test DR CALUX a été réalisé pour le TMBPF selon le même mode opératoire que pour le TMBPF-DGE (voir ci-dessus). Le TMBPF testé aux concentrations allant de $9,14 \times 10^{-5}$ M à $3,05 \times 10^{-8}$ M (8 concentrations différentes) ne montre aucune activité de type dioxine. Deux autres concentrations plus fortes ($3,05 \times 10^{-4}$ M et $9,14 \times 10^{-4}$ M) provoquant une cytotoxicité n'ont pas été analysées.

En conclusion, dans les conditions décrites de réalisation du test DR-CALUX, le TMBF ne montre pas de potentiel dioxine-like. Cependant ce test est considéré comme peu sensible pour les molécules à faible potentiel de liaison à AhR.

Essai utérotrrophique in vivo

L'étude a été réalisée sur 5 groupes de 6 rates immatures Sprague Dawley à qui, pendant 3 jours consécutifs ont été administrés par gavage dans de l'huile de maïs les traitements suivants :

TMBPF aux doses de 0, 100, 300, 1000 mg/kg/j et 17 α -éthinyloestradiol à la dose de 0,2 mg/kg/j (témoin positif).

Le poids frais de l'utérus a été relevé après dissection immédiatement après le sacrifice des animaux et un examen histologique de l'utérus, du vagin et de la glande mammaire (uniquement pour la dose la plus élevée) a été réalisé. Aucun effet du traitement au TMBPF, quelle que soit la dose, n'a été observé sur le poids de l'utérus alors que l'administration d'éthinyloestradiol a entraîné une augmentation significative du poids de l'utérus. Enfin, aucun changement histologique (hyperplasie ou pathologie) n'a été observé chez les groupes traités au TMBPF comparativement au témoin.

Dans les conditions de l'étude, le TMBPF n'a pas produit d'effet estrogénique *in vivo*. Cette étude a été menée selon les lignes directrices de l'OCDE (440) et conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL).

Essai *in vitro* œstrogène/androgène sur levure recombinante β -galactosidase

Un test *in vitro* basé sur des levures *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes capable d'identifier les composés interagissant avec les récepteurs humains aux estrogènes et aux androgènes a été utilisé dans cette étude. Dans ce modèle, les séquences génomiques des récepteurs estrogéniques hER α , ou celle des récepteurs androgéniques hAR, ont été insérées dans le chromosome des levures associé à un plasmide d'expression portant le gène rapporteur LacZ codant l'enzyme β -galactosidase (Routledge and Sumpter 1996). Lorsque les levures sont exposées à une substance capable d'activer l'un ou l'autre des récepteurs, la β -galactosidase est sécrétée dans le milieu et son activité est mesurée par colorimétrie.

Les concentrations de TMBPF testées étaient comprises entre 50 μ g/L et 100 mg/L. Outre le TMBPF, des concentrations de 17 β -estradiol (de 5 ng/L à 10 μ g/L) et de dihydrotestostérone (de 10 ng/L à 20 μ g/L) ont été testées comme témoins positifs sur des levures exprimant respectivement ER et AR. Les mesures ont été effectuées en plaques de 96 puits, après des durées d'incubation de 3 jours à 30°C. En cas de résultat négatif à 3 jours pour les tests d'estrogénicité, une période supplémentaire d'incubation de 4 jours a été appliquée.

Dans les conditions expérimentales décrites, aucune activité estrogéno-mimétique ou androgéno-mimétique n'a été observée avec le TMBPF. Il est intéressant de remarquer qu'au cours de la même étude d'autres substances proches du TMBPF, en particulier le tétraméthyl bisphénol A (TMBPA) ont été testées. Contrairement au TMBPF, le TMBPA a produit une nette activité estrogénique, proche de celle du BPA.

Essai *in vitro* sur la redistribution des gènes rapporteurs des cellules USO2 Era et USO2 AR

Le système biologique utilisé dans ces deux tests repose sur des cellules recombinantes U2OS exprimant de manière stable le récepteur humain Era et AR fusionné à la GFP (protéine verte fluorescente). Ces tests ont consisté à mesurer l'accumulation de la protéine de fusion GFP-Era et GFP-AR sous forme de foyers dans les noyaux des cellules, suite à l'action des estrogènes et des androgènes. La translocation de GFP-Era et de GFP-AR a été suivie par imagerie de fluorescence. Les concentrations testées ont varié de 0.39 à 200 μ M et la durée d'incubation était de 22 h dans le test sur cellules USO2 Era et de 4 h dans l'essai sur USO2 AR. Le 17 β -estradiol a été utilisé comme témoin positif dans l'essai sur cellules USO2 Era et la DHT a été utilisée comme témoin positif dans l'essai sur cellules USO2 AR.

Dans ces conditions expérimentales, le TMBPF n'a provoqué aucune activation des récepteurs Era et AREule l'activité agoniste vis-à-vis des récepteurs Era et AR a été prise en compte dans ces deux études.

Test d'activité endocrinienne LUMICELL : activité agoniste des estrogènes

Le test LUMICELL évalue le potentiel de transactivation médié par le récepteur α ou β des estrogènes de l'Homme. Il a plusieurs applications et notamment l'estimation de l'activité agoniste des estrogènes. Il s'agit d'un test *in vitro* dont le principe repose sur l'utilisation d'une lignée cellulaire BG-1 (carcinome ovarien humain) transfectée de manière stable avec un plasmide contenant 4 éléments de réponse de type ERE en amont du gène de la luciférase. La lignée cellulaire résultante (BG1Luc4E2) répond aux estrogènes ou composés estrogéniques de façon dépendante du temps, de la dose et de la molécule à tester par l'induction du gène de la luciférase. Il permet également d'évaluer les réponses initiées à la fois par la liaison au récepteur α ou β des estrogènes puisque la lignée exprime les 2 types de récepteurs.

Le test a été réalisé selon la ligne directrice 455 de l'OCDE et a été conduit selon les bonnes pratiques de laboratoire. Dans les conditions décrites, le TMBF s'est révélé toxique aux concentrations de 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le TMBF aux doses allant de 10^{-4} à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ n'a révélé aucune activité estrogénique dans le test LUMICELL.

Test d'activité endocrinienne LUMICELL : activité antagoniste des œstrogènes

L'activité antagoniste des estrogènes du TMBF a été testée *in vitro* en utilisant le test LUMICELL conformément aux lignes directrices TG457 de l'OCDE. Le protocole est identique au protocole LUMICELL de détection de l'activité agoniste exception faite de la substance référente qui est une combinaison d'E2 pour induire une activité estrogénique et le Raloxifène (RAL) qui est un antagoniste puissant de l'activité estrogénique. Trois concentrations de RAL ($3,06 \times 10^{-9}$ M, $7,67 \times 10^{-10}$ M et $1,92 \times 10^{-10}$ M) combinées à une concentration fixe d'E2 ($9,8 \times 10^{-11}$ M) ont été utilisées comme contrôle de l'activité antagoniste.

Dans les conditions décrites, le TMBF s'est révélé toxique aux concentrations de 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et sans activité antagoniste aux estrogènes aux doses allant de 10^{-4} à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Essai d'inhibition enzymatique

Certains PE agissent en inhibant l'activité aromatasase dont la fonction est d'aromatiser les androgènes et ainsi produire des œstrogènes. Une étude a donc été produite pour évaluer la capacité du TMBPF à inhiber l'aromatase humaine recombinante. La mesure de l'activité aromatasase a été effectuée conformément à la ligne directrice de l'US-EPA¹⁷ à partir de l'androstènedione tritiée dont la transformation en estrone donne de l'eau tritiée qui peut être isolée par extraction liquide-liquide à partir d'un mélange dichlorométhane/eau. Les essais ont été réalisés avec l'hydroxy-androstènedione comme témoin positif.

Une très faible inhibition, jugée insuffisante pour être considérée comme positive, a été observée aux plus fortes concentrations testées. Dans ces conditions il peut être conclu que le TMBPF n'a pas d'activité inhibitrice vis-à-vis de l'aromatase.

¹⁷ EDSP Test guideline OCSPP 890.1200. Aromatasase [Human recombinant]

3.3. Conclusions du CES ERCA, du GT ESPA et du GT PE

3.3.1. Concernant les données physico-chimiques

Les données concernant le référentiel réglementaire et les données physico-chimiques communiquées par le pétitionnaire dans son dossier de demande d'autorisation du TMBPF et du TMPBF-DGE sont présentées selon la trame des lignes directrices de l'EFSA (EFSA 2008). Les substances concernées par la demande sont bien identifiées et caractérisées, hormis la stabilité thermique du TMBPF-DGE qui n'a pas été déterminée. Il conviendrait donc de fournir des données précises concernant la stabilité thermique du TMBPF-DGE (par analyse thermogravimétrique par exemple). Par ailleurs, il est à noter qu'aucune information concernant l'impact du TMBPF-DGE sur l'environnement n'a été fourni bien que cette information soit un requis de l'avis du CSHPF du 9 décembre 1997.

Des résultats d'analyse de migration spécifique du TMBPF, du TMBPF-DGE et des dérivés obtenus sur le vernis au contact de simulants couvrent les aliments aqueux, acide, alcoolisés et certains aliments contenant des matières grasses en émulsion dans des phases aqueuses. En complément, des résultats d'analyses de migration du TMBPF, du TMBPF-DGE et des dérivés effectuées avec de l'acétonitrile pendant 24 heures à température ambiante ont été communiqués pour inclure le contact avec les aliments gras. Les conditions des analyses de migration permettent d'envisager toute condition de traitement thermique en termes de temps, pour toute température jusqu'à 130°C inclus suivi d'une conservation de longue durée des aliments dans les emballages métalliques.

Les conditions de mise en contact des simulants réglementaires avec le matériau ne sont pas explicitées dans le rapport du laboratoire qui a effectué les analyses de migration. En effet, les températures de mise en contact du matériau avec l'acide acétique 3% et avec les deux solutions d'éthanol sont de 130°C dans des cellules de migration. Or, la norme EN 1186-5 qui est citée dans le cas des résultats de migration globale précise que les cellules normalisées ne permettent pas d'atteindre des températures supérieures à 70°C. Afin de s'assurer de la validité des résultats de migration, il conviendrait donc de fournir des précisions sur la résistance de la cellule de migration utilisée à de tels niveaux de température.

Les résultats d'analyses de migration spécifique du TMBPF, du TMBPF-DGE et de dérivés hydrolysés et chlorés prévisibles ont permis de calculer des NET compris entre 0,5 et 50 µg/personne/jour. Au regard de l'avis du CSHPF du 9 décembre 1997 et des lignes directrices de l'EFSA (2008), ces résultats de migration spécifique justifient l'évaluation de la génotoxicité de ces composés.

Le pétitionnaire a identifié et quantifié dans un extrait acétonitrile du vernis, des oligomères issus du TMBPF-DGE à hauteur de 471 µg/6 dm². Au regard des résultats obtenus dans l'acétonitrile et des usages prévus du vernis, il conviendrait de déterminer les niveaux de migration de ces substances dans les simulants alimentaires réglementaires suivants : acide acétique 3%, éthanol 10% et huile alimentaire (ou milieux de substitution). Par ailleurs, dans la mesure où la dégradation de ces composés (notamment par hydrolyse) ne peut être exclue au cours de ces essais de migration, il conviendrait également d'identifier et quantifier les produits de dégradation éventuels de ces composés (notamment les produits d'hydrolyse) dans les simulants alimentaires testés. Enfin, il est rappelé que conformément à l'avis du CSHPF du 9/12/1997, le calcul du NET

permettra de déterminer les données à fournir pour évaluer la toxicité de ces substances à fonction oxirane.

3.3.2. Concernant l'évaluation du potentiel génotoxique du TMBPF et du TMBPF-DGE

Le dossier comporte des données permettant d'évaluer le potentiel génotoxique du TMBPF-DGE et le TMBPF uniquement. Aucune information n'est fournie concernant les dérivés hydrolysés, chlorés et les oligomères du TMBPF-DGE.

Le TMBPF-DGE présente une activité génotoxique et mutagène dans les 3 modèles expérimentaux *in vitro* qui permettent de mettre en évidence divers événements génétiques susceptibles de mener à de la mutagenèse et/ou de la génotoxicité (mutations géniques, aberrations chromosomiques structurelles et numériques) sur des organismes différents (bactéries et cellules de mammifère). En effet, le TMBPF-DGE est clairement mutagène dans le test d'Ames (exclusivement en présence d'activation métabolique) et dans le test MLA/TK (exclusivement en absence d'activation métabolique). Les divergences de réponse sont liées aux différents systèmes d'essai mis en œuvre mais aussi probablement à la différence des systèmes exogènes d'activation métabolique utilisés dans ces 2 tests qui ne sont pas identiques (S9 de foies de rats induits par l'Arochlor 1254 ou par le mélange [Phénobarbital + β -naphtoflavone]). Le TMBPF-DGE est également génotoxique dans le test d'aberrations chromosomiques *in vitro* réalisé sur cellules CHO-WBL, aussi bien en absence qu'en présence d'activation métabolique.

Une expérimentation *in vivo* a été mise en œuvre chez le rat afin d'évaluer l'induction de micronoyaux au niveau de la moelle osseuse (ligne directrice OCDE 474) et de fragmentation de l'ADN par le test des comètes au niveau du foie et du duodénum (ligne directrice OCDE 489). Au cours de cette étude couplée, le TMBPF-DGE n'a induit aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux au niveau des cellules de la moelle osseuse, ni d'augmentation significative de la fragmentation de l'ADN vis-à-vis du foie et du duodénum chez le rat mâle traité par voie orale. Néanmoins, aucune preuve d'exposition systémique n'a été recherchée ce qui ne permet pas de valider la pertinence des résultats négatifs vis-à-vis de la moelle osseuse et du foie. De plus, le choix du duodénum pour réaliser ce test est discutable. En effet, étant donné les résultats observés *in vitro* qui tendent à démontrer un potentiel d'alkylation, un effet génotoxique direct vis-à-vis du pré-estomac et de l'estomac glandulaire qui sont les organes primo-exposés après administration orale ne peut être exclu.

Il apparaît donc nécessaire de réaliser un nouveau test des comètes (ligne directrice OCDE 489) mais sur l'estomac glandulaire et le pré-estomac après administration orale. De plus, afin de valider les résultats négatifs obtenus sur la moelle osseuse et le foie au cours de l'expérimentation *in vivo* décrite ci-dessus, il conviendrait lors de ce nouveau test d'apporter des preuves d'exposition systémique par voie orale de ces organes, par la réalisation d'un dosage plasmatique du TMBPF-DGE et/ou de ses métabolites. Une détermination des impuretés du TMBPF-DGE utilisé lors de ce test devrait également être réalisée.

Concernant le TMBPF, les données toxicologiques disponibles dans le dossier du pétitionnaire apparaissent très parcellaires, incomplètes et majoritairement issues de prédiction liée à la similarité structure/activité. Aucune donnée complémentaire concernant la (géo)toxicité du TMBPF n'a été retrouvée lors de la recherche bibliographique sur 2 sites dédiés (Toxnet et PubMed). Il n'est donc pas possible de conclure quant au potentiel mutagène et génotoxique du TMBPF aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ainsi, il apparaît indispensable que le TMBPF soit testé sur le plan expérimental au travers de 2 études *in vitro* de génotoxicité au minimum : un test de mutation génique sur bactéries, et un test du micronoyau *in vitro* (EFSA 2011). En cas de réponses positives dans ces tests, des résultats d'études complémentaires devront être fournis.

3.3.3. Concernant l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien du TMBPF et du TMBPF-DGE

Les conclusions concernant le potentiel perturbateur endocrinien du TMBPF et du TMBPF-DGE sont basées sur une série de tests réalisés par le notifiant de cette saisine. L'évaluation et l'interprétation du caractère perturbateur endocrinien ne sont réalisées que sur la base de ces résultats, aucune autre donnée de la littérature n'étant disponible. Des experts du GT PE ont analysé les résultats et la qualité de ces études qui ont été jugées de bonne qualité et conformes aux standards internationaux.

En ce qui concerne l'activation des récepteurs ER, AR, AhR, les tests réalisés ne mettent pas en évidence d'effet perturbateur endocrinien du TMBPF et le TMBPF-DGE. Sur la base du test utéro-trophique sur rongeurs (Ligne Directrice OCDE 440), le TMBPF n'a pas montré d'effet estrogénique in vivo. En ce qui concerne les tests d'inhibition enzymatique, le TMBPF ne présente pas d'activité inhibitrice de l'enzyme aromatasase. Néanmoins, le GT PE tient à préciser qu'un PE peut aussi agir par activation/inhibition impliquant d'autres types d'enzymes et de récepteurs que ceux évalués dans le présent dossier et selon des modes d'action différents.

Dans l'état actuel des connaissances et au regard des lignes directrices de l'OCDE (OCDE, 2012) pour l'évaluation des PE, le groupe de travail « PE » considère que sur la base des données fournies, il n'existe pas d'argument soutenant que le TMBPF et le TMBPF-DGE soient des PE.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES ERCA, du GT ESPA et du GT PE.

En l'absence des données expérimentales suivantes, l'Agence n'est pas en mesure de se prononcer sur l'innocuité du TMBPF (utilisé comme précurseur), du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires) et de ses produits de dégradation et oligomères :

- Il convient de fournir des données précises concernant la stabilité thermique du TMBPF-DGE (par analyse thermogravimétrique par exemple).
- Afin de s'assurer de la validité des résultats de migration, il convient de fournir des précisions sur la résistance de la cellule de migration utilisée à de tels niveaux de température.
- Concernant le TMBPF-DGE, la réalisation d'un nouveau test des comètes (ligne directrice OCDE 489) sur l'estomac glandulaire et le pré-estomac après administration orale apparaît nécessaire. Afin de valider les résultats négatifs obtenus sur la moelle osseuse et le foie au cours de l'expérimentation *in vivo* décrite, il convient lors de ce nouveau test d'apporter des preuves d'exposition systémique par voie orale de ces organes, par la réalisation d'un dosage plasmatique du TMBPF-DGE et/ou de ses métabolites. Une détermination des impuretés du TMBPF-DGE utilisé lors de ce test doit également être réalisée.
- Au regard des résultats de migration du TMBPF et des dérivés hydrolysés et chlorés prévisibles du TMBPF-DGE, la génotoxicité de ces composés doit être évaluée sur le plan expérimental.
- Au regard des résultats obtenus au cours de l'étude d'identification et quantification des oligomères migrants dans l'acétonitrile et des usages prévus du vernis, il convient de déterminer les niveaux de migration de ces composés dans les simulants alimentaires réglementaires suivants : acide acétique 3%, éthanol 10% et huile alimentaire (ou milieux de substitution).

Un nouvel avis sera produit ultérieurement sur la base des données complémentaires fournies par le notifiant suite à la rédaction du présent avis.

MOTS-CLES

MCDA, TMBPF, TMBPF-DGE, Epoxy, Vernis.

BIBLIOGRAPHIE

Arrêté du 13 novembre 1986 relatif aux dossiers de demande d'autorisation d'emploi des constituants de matériaux et objets mis ou destinés à être mis au contact des denrées, produits et boissons alimentaires.

Avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France relatifs aux matériaux au contact des denrées alimentaires Séances du 14 octobre et du 9 décembre 1997 (Demandes d'autorisation d'emploi).

Cabaton, N., C. Dumont, I. Severin, E. Perdu, D. Zalko, M. Cherkaoui-Malki and M. C. Chagnon (2009). "Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line." Toxicology **255**(1-2): 15-24.

Perez, P., R. Pulgar, F. Olea-Serrano, M. Villalobos, A. Rivas, M. Metzler, V. Pedraza and N. Olea (1998). "The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups." Environ Health Perspect **106**(3): 167-174.

Routledge, E. J. and J. P. Sumpter (1996). "Estrogen activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen." Environmental toxicology and chemistry **15**(3): 241-248.

Schaefer, A. (2004) Identification and Quantification of Migrants from Can Coatings. An Approach to Elucidate the Total Migrate below 1000 Da. Dissertation. University of Hamburg.

Stroheker, T., M. Chagnon, M. Pinnert, R. Berges and M. Canivenc-Lavier (2003). "Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study." Reprod Toxicol. **17**(4): 431-432.

Stroheker, T., K. Picard, J. C. Lhuguenot, M. C. Canivenc-Lavier and M. C. Chagnon (2004). "Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines." Food Chem Toxicol **42**(6): 887-897.