

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Elaboration de VTR chronique par voie orale pour l'acide perfluorobutanoïque (PFBA)

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Juin 2017

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Elaboration de VTR chronique par voie orale pour l'acide perfluorobutanoïque (PFBA)

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Juin 2017

Édition scientifique

Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 23 juin 2017

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à «l'élaboration de valeurs de référence chroniques par voie orale pour 4 composés perfluorés : l'acide perfluorohexanoïque (PFHxA), l'acide perfluorohexane sulfonique (PFHxS), l'acide perfluorobutanoïque (PFBA), et l'acide perfluorobutane sulfonique (PFBS)»

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses s'est auto-saisie le 9 juin 2015 pour la réalisation des expertises suivantes : élaboration de valeurs de référence chroniques par voie orale pour les composés perfluorés suivants : l'acide perfluorohexanoïque (PFHxA, CAS n° 307-24-4), l'acide perfluorohexane sulfonique (PFHxS, CAS n°355-46-4), l'acide perfluorobutanoïque (PFBA, CAS n°375-22-4), et l'acide perfluorobutane sulfonique (PFBS, CAS n°375-73-5).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le présent avis d'expertise fait suite aux travaux de l'Agence sur les composés perfluorés ayant donné lieu à un rapport publié en 2015 (Anses, 2015b), réalisé dans le cadre de la saisine de la Direction générale de la santé de juin 2009 relative aux substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes (PE) (Saisine «n° 2009-SA-0331»).

Ce rapport a mis en évidence 4 perfluorés prioritaires : l'acide perfluorobutanoïque (PFBA), l'acide perfluorobutane sulfonique (PFBS), l'acide perfluorohexanoïque (PFHxA) et l'acide perfluorohexane sulfonique (PFHxS). Cette sélection a été faite selon plusieurs critères dont le statut réglementaire (REACH et réglementation sectorielle), le corpus de données disponibles pour chacun des composés, l'utilisation et l'évolution de l'utilisation des composés, les valeurs de référence déjà disponibles etc... Ces quatre composés perfluorés ont donc fait l'objet de travaux distincts dans l'objectif de leur attribuer des valeurs toxicologiques de référence (VTR).

Une VTR est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes

d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2015a).

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

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

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

Une valeur toxicologique indicative (VTi) est un repère toxicologique pouvant être utilisé pour l'évaluation d'un risque. Il s'agit d'une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible.

Une VTi pourra être proposée lorsque les conditions nécessaires à l'élaboration d'une VTR ne sont pas remplies et qu'une évaluation quantitative des risques (EQRS) est nécessaire dans un contexte d'exposition donné :

1. en cas d'**insuffisance des données** disponibles sur la substance pour caractériser le danger de la substance ou de **doute sur le caractère néfaste de l'effet**. Dans ce cas, une veille bibliographique sera menée par l'Anses sur ces substances en vue de remplacer les VTi par des VTR si de nouvelles données le permettent ;
2. en cas de **contraintes de temps et/ou de ressources**. Dans ce cas, la VTi serait élaborée au mieux dans le temps imparti afin de répondre aux impératifs d'action des décideurs, puis un travail complémentaire sera le cas échéant réalisé afin de proposer une VTR.

Sur la base de l'approche OMS/IPCS proposant une démarche par étapes pour l'évaluation des risques sanitaires dont la première étape consiste en une évaluation préliminaire (*screening*), la VTi pourra être utilisée pour écarter un risque dans une approche d'évaluation de risque de premier niveau, conservatrice (OMS-IPCS, 2010).

A la différence d'une VTR, une VTi ne devrait être utilisée que pour répondre à la situation et au contexte spécifiques qui ont justifié sa construction. Les conditions d'application devront donc être clairement explicitées pour chacune des VTi proposées. Comme pour les VTR, l'utilisation et l'interprétation des VTi devront obligatoirement tenir compte de la voie d'exposition, de la durée d'exposition, de la période d'exposition, du type d'effet auquel elle est associée et de la population cible pour laquelle elle est destinée. Le mode de construction des VTi dépend des données disponibles sur les mécanismes d'action biologique des substances et d'hypothèses communément admises. On distingue ainsi des VTi à seuil de dose et des VTi sans seuil de dose. Une VTi est élaborée en suivant les mêmes étapes de construction qu'une VTR.

Les VTi ne seront pas publiées sur le site internet de l'Anses indépendamment des évaluations du risque simplifiée qui auront justifié leur élaboration.

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 relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » (appelé ci-après CES « Substances »). Les travaux ont été présentés au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre juin 2015 et février 2017. Ils ont été adoptés par le CES « Substances » réuni le 23 février 2017.

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).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

■ Acide perfluorobutanoïque (PFBA) - CAS n°375-22-4

- Toxicocinétique

Au regard des T_{max}^1 et des biodisponibilités calculées dans des expérimentations par voie orale chez le rat et la souris, l'absorption du PFBA semble à la fois rapide et relativement complète.

Suite à une exposition par voie orale, les faibles valeurs des volumes de distribution indiquent que le PFBA est très peu distribué dans les tissus. L'ensemble des données converge vers une élimination rapide du PFBA. Chez toutes les espèces étudiées (rat, souris, singe), l'urine est la voie d'excrétion principale. L'élimination *via* les fèces est quant à elle négligeable.

- Toxicité

A ce jour, trois études animales de toxicité par exposition répétée (28 jours, 90 jours, et toxicité sur le développement) sont disponibles pour évaluer ce composé. Elles ont notamment mis en évidence des effets sur la thyroïde, sur le développement, et sur le foie.

Concernant les effets sur la thyroïde, dans les études 28 jours et 90 jours de Butenhoff *et al.* (2012), est observée, en plus d'une augmentation du poids absolu de la thyroïde, une diminution des taux sériques de T4 totale et de T4 libre (sans modification des taux de TSH²).

Concernant les effets sur le développement, un retard d'ouverture des yeux statistiquement significatif mais modéré est observé, avec une relation dose réponse peu robuste.

Concernant les effets hépatiques, une augmentation du poids absolu (+ 45% dans l'étude 28 jours, et + 23% dans l'étude 90 jours, aux plus fortes doses) et relatif du foie est observée dans les deux études de Butenhoff *et al.* (2012), associée à des hypertrophies hépatocellulaires (uniquement minimales dans l'étude 28 jours, minimales à légères dans l'étude 90 jours). Dans l'étude 28 jours et l'étude sur le développement, une diminution statistiquement significative du cholestérol est

¹ Tmax : temps d'atteinte de la concentration maximale

² TSH : Thyroïdostimuline

également observée. À l'exception de cette diminution du cholestérol, toutes les valeurs des paramètres biochimiques mesurés sont dans la gamme de la normalité, c'est-à-dire usuellement observées chez les rats Sprague-Dawley. Elles ne présentent donc pas de pertinence toxicologique. Dans les deux études de toxicité répétée, les auteurs ont également mesuré les niveaux hépatiques de transcrits d'ARNm d'intérêt. Un certain nombre de ces transcrits (Acox, CYP4A1...), marqueurs d'une activation de PPAR α ³, augmente. Est également observée une augmentation des niveaux du CYP2B2, marqueur de l'activation de CAR⁴. Enfin, une diminution du niveau hépatique du CYP1A1 est également observée, suggérant une diminution de l'activité de l'AhR⁵.

- Construction
 - Choix de l'effet critique

- **Effets thyroïdiens**

Le CES ne considère pas pertinent de construire une VTR basée sur les modifications de concentrations hormonales mentionnées plus haut, les auteurs eux-mêmes émettant un doute sur la fiabilité des résultats obtenus (problème dans la réalisation des mesures).

- **Effets sur le développement**

Les auteurs n'ont pas détaillé leur méthodologie pour évaluer le retard d'ouverture des yeux. De plus, celui-ci n'est pas corroboré par d'autres critères de retards de développement (comme par exemple un retard de sortie des incisives). Le CES ne considère pas pertinent de construire une VTR basée sur ces modifications.

- **Effets hépatiques**

Compte tenu des différences de mécanisme d'action et des conséquences de l'activation des PPAR α entre l'Homme et les rongeurs, établis sur la base de souris au PPAR α humanisé, cet effet n'est pas jugé transposable à l'Homme (Hall *et al.*, 2012). En conséquence, les modifications des transcrits relevant d'une activation des PPAR α ne peuvent donc pas soutenir l'élaboration d'une valeur de référence sur des effets hépatiques (Hall *et al.*, 2012). De même que pour PPAR α , il semble exister de fortes différences entre le CAR murin et humain, que ce soit au niveau de ses ligands ou des réponses médiées par ce récepteur, la société européenne de pathologie toxicologique (ESTP) considérant même leur activation comme un effet non-néfaste (Hall *et al.*, 2012). En particulier, la réponse concernant la lipogenèse semble différente entre l'Homme et les rongeurs. L'extrapolation à l'Homme de ces observations faites sur un modèle rongeur semble donc discutable dans l'objectif de les retenir comme effet critique (Lynch *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2013 ; Hall *et al.*, 2012).

Selon les documents de l'Agence américaine de protection de l'environnement (U.S. EPA) (2002) et de l'ESTP (Hall *et al.*, 2012), lors d'une hypertrophie hépatocytaire, en l'absence de modifications histologiques, des preuves de dommages hépatocytaires caractérisés par une modification dose dépendante, biologiquement significative et cohérente d'au moins deux paramètres hépatiques sont nécessaires pour caractériser un effet néfaste pour le foie. Ces

³ PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

⁴ CAR : Constitutive Androstane Receptor. Récepteur constitutif des androstanes

⁵ AhR : Aryl Hydrocarbon Receptor. Récepteur aux hydrocarbures aromatiques

conditions ne sont donc pas remplies dans le cas présent. Selon ces critères, les effets hépatiques ne devraient donc pas être considérés comme néfastes.

Néanmoins, bien que pris indépendamment les uns des autres, aucun ne soit suffisant pour construire une VTR (ampleur de la réponse) ou soit totalement transposable à l'Homme, de nombreux effets (hypertrophie et signes fonctionnels) liés aux métabolismes hépatique et lipidique sont observés suite à une exposition au PFBA. Par ailleurs, même s'il s'agit d'une étude mécanistique, des nécroses hépatiques minimales à légères ont été observées, en plus d'hypertrophies, chez les souris mâles de type sauvage exposées 28 jours au PFBA dans l'étude de Foreman *et al.* (2009). Enfin, il apparaît également nécessaire de prendre en compte dans cette analyse les connaissances existantes sur l'ensemble de la famille des perfluorés, et notamment les deux composés les plus étudiés de cette famille, à savoir le PFOS et le PFOA. Une toxicité hépatique clairement établie pour ces deux composés, allant jusqu'à l'apparition d'adénomes hépatocytaires chez l'animal, ne peut pas être exclue chez l'Homme (EFSA, 2008 ; U.S. EPA, 2016a, 2016b).

Au regard de tous ces éléments, le CES a décidé de retenir les effets hépatiques comme effet critique. Considérant les doutes existant sur le choix de l'effet critique et son caractère néfaste, le choix a été fait de construire une VTi pour le PFBA.

- Choix de l'étude clé

L'étude subchronique (90 jours), ayant la modalité d'exposition la plus longue parmi les études disponibles sur ce composé, a été retenue pour le choix du point de départ (Butenhoff *et al.* 2012).

- Choix de la dose critique

Au regard de l'ensemble des effets apparaissant à 30 mg/kg/j dans cette étude (augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif du foie, hypertrophie hépatocellulaire, diminution du transcrit d'ARNm marqueur de l'Ahr, ...), cette dose a été considérée comme le LOAEL⁶. Le NOAEL⁷, dose directement inférieure dans l'étude de 6 mg/kg/j est retenue comme dose critique.

- Ajustements

Dans le but de réduire le degré d'incertitude due à la variabilité inter-espèce lors de la détermination d'une dose équivalente humaine (HED), un ajustement allométrique a été réalisé, selon l'équation suivante :

$$\text{Dose équivalente humaine} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids Homme}} \right)^{1/4}$$

$$\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 6,0 \text{ mg / kg / j} \times \left(\frac{0,523 \text{ kg}}{70 \text{ kg}} \right)^{1/4} = 1,764 \text{ mg / kg / j}$$

- Choix des facteurs d'incertitude

⁶ LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level (Dose minimale entraînant un effet néfaste observé)

⁷ NOAEL : No Observed Adverse Effect Level (Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)

Le calcul de la VTi à partir du NOAEL_{HED} a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015a) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 3

Il s'agit d'une étude subchronique, les animaux ayant été exposés 90 jours. Pour prendre en compte d'éventuels effets survenant à des doses plus faibles après des expositions plus longues, il a été considéré pertinent d'appliquer un UF_S de 3.

- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL ou d'un NOAEL (UF_{B/L}) : 1

La construction de la VTi est basée ici sur un NOAEL, ce facteur ne s'applique pas.

- Insuffisance des données (UF_D) : 1

Les trois études animales de toxicité par exposition répétée (28 jours, 90 jours, et toxicité sur le développement) disponibles sur le PFBA sont suffisantes pour évaluer la toxicité du composé.

Un facteur d'incertitude global de 75 est donc utilisé pour la construction de la VTi du PFBA.

- Proposition de VTi chronique par ingestion

$$VTi = \frac{1,764 \text{ mg/kg/j}}{75} = 0,0235 \cong 0,024 \text{ mg/kg/j}$$

■ Acide perfluorohexane sulfonique (PFHxS) - CAS n°355-46-4

- Toxicocinétique

Aucune donnée sur la toxicocinétique du PFHxS n'est disponible.

- Toxicité

De nombreuses études chez l'Homme sont disponibles pour évaluer la toxicité du PFHxS, mais ne permettent pas de dériver de VTR. De plus, à ce jour seule une étude de toxicité par doses répétées combinée avec un test de toxicité sur la reproduction et le développement (OCDE 422) permet d'évaluer ce composé (Butenhoff *et al.*, 2009). Elle a notamment mis en évidence des effets sur la thyroïde et le foie.

Concernant les effets sur la thyroïde, une augmentation des hypertrophies/hyperplasies thyroïdiennes est observée.

Concernant les effets hépatiques, une augmentation du poids absolu et relatif du foie aux deux plus fortes doses (+ 20% et 56% pour le poids absolu, pas de données pour les poids relatifs) associée à des hypertrophies hépatocellulaires (9/10 rats, 8 minimales, 1 légère à 3 mg/kg/j et 10/10 rats, 4 minimales, 5 légères et 1 moyenne à 10 mg/kg/j) est observée. Une augmentation statistiquement significative de la phosphatase alcaline (ALP) (+ 37%) est observée à 10 mg/kg/j.

Une augmentation statistiquement significative de l'albumine (5%) et du ratio albumine/globuline (19%), ainsi qu'une diminution du cholestérol (- 42%) et des triglycérides (- 68%) sont également observées à la plus forte dose, bien que la signification toxicologique de ces modifications soit discutable.

- Construction
 - Choix de l'effet critique

- **Effets thyroïdiens**

Selon les auteurs, l'augmentation des hypertrophies/hyperplasies serait la conséquence de l'hypertrophie hépatique. L'absence de test statistique et de dosages hormonaux ne permet pas d'étayer cet argument mécanistique. Sans confirmation du mécanisme d'action, l'hypertrophie thyroïdienne apparaît trop peu robuste pour pouvoir construire une valeur de référence.

- **Effets hépatiques**

Selon les documents de l'U.S. EPA (2002) et de l'ESTP (Hall *et al.* 2012), lors d'une hypertrophie hépatocytaire, en l'absence de modifications histologiques, des preuves de dommages hépatocytaires caractérisés par une modification dose dépendante, biologiquement significative et cohérente d'au moins deux paramètres hépatiques sont nécessaires pour caractériser un effet néfaste sur le foie. Ces conditions ne sont donc pas remplies dans le cas présent. Selon ces critères, les effets hépatiques ne devraient donc pas être considérés comme néfastes.

Néanmoins, bien que pris indépendamment les uns des autres, aucun ne soit suffisant pour construire une VTR (ampleur de la réponse) ou soit totalement transposable à l'Homme, de nombreux effets (hypertrophie et signes fonctionnels) liés aux métabolismes hépatique et lipidique sont observés suite à une exposition au PFHxS. Par ailleurs, il apparaît également nécessaire de prendre en compte dans cette analyse les connaissances existantes sur l'ensemble de la famille des perfluorés, et notamment les deux composés les plus étudiés de cette famille, à savoir le PFOS et le PFOA. Une toxicité hépatique clairement établie pour ces deux composés, allant jusqu'à l'apparition d'adénomes hépatocytaires chez l'animal, ne peut pas être exclue chez l'Homme (EFSA, 2008 ; U.S. EPA, 2016a, 2016b).

Au regard de tous ces éléments, le CES a décidé de retenir les effets hépatiques comme effet critique. Considérant les doutes existant sur le choix de l'effet critique et son caractère néfaste, le choix a été fait de construire une VTi pour le PFHxS.

- Choix de l'étude clé

Une seule étude expérimentale est disponible pour la construction d'une VTi (Butenhoff *et al.*, 2009). Elle suit les lignes directrices OCDE 422 (Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement), et a donc été retenue comme étude clé.

- Choix de la dose critique

Au regard de l'ensemble des effets apparaissant à 3 mg/kg/j dans cette étude (augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif du foie, hypertrophie hépatocellulaire chez 9 rats sur 10), cette dose a été considérée comme le LOAEL.

Le NOAEL, dose directement inférieure dans l'étude de 1 mg/kg/j est donc retenue comme dose critique.

○ Ajustements

Dans le but de réduire la valeur de l'incertitude due à la variabilité inter-espèce lors de la détermination d'une dose équivalente humaine, un ajustement allométrique a été réalisé, selon l'équation suivante :

$$\text{Dose équivalente humaine} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids Homme}} \right)^{1/4}$$

$$\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 1,0 \text{ mg / kg / j} \times \left(\frac{0,490 \text{ kg}}{70 \text{ kg}} \right)^{1/4} = 0,289 \text{ mg / kg / j}$$

○ Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTi à partir du NOAEL_{HED} a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015a) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 3

Dans l'étude de Butenhoff *et al.* (2009), les rats mâles ont été exposés au minimum 42 jours. En conséquence, il a été considéré pertinent d'appliquer un UF_S de 3.

- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL ou d'un NOAEL (UF_{B/L}) : 1

La construction de la VTi est basée ici sur un NOAEL, donc un UF_{B/L} spécifique n'est pas nécessaire.

- Insuffisance des données (UF_D) : 1

Une seule étude expérimentale est disponible pour évaluer la toxicité du PFHxS, mais elle combine la toxicité par doses répétées et la reproduction/toxicité développementale. De plus, de nombreuses études chez l'Homme sont disponibles sur ce composé. En conséquence, le CES a considéré qu'un UF_D n'était pas nécessaire.

Un facteur d'incertitude global de 75 est donc utilisé pour la construction de la VTi du PFHxS.

○ Proposition de VTi chronique par ingestion

$$VTi = \frac{0,289 \text{ mg/kg/j}}{75} = 0,0038 \cong 0,004 \text{ mg/kg/j}$$

■ **Acide perfluorobutane sulfonique (PFBS) - CAS n°375-73-5**

- Toxicocinétique

Par voie orale, les valeurs de T_{max} suggèrent une absorption rapide du PFBS.

Le calcul des biodisponibilités chez les mâles et les femelles à partir des données disponibles ne permettent cependant pas de conclure quant à l'importance de l'absorption du PFBS par voie orale chez les rats.

Que ce soit chez les singes ou les rats, les demi-vies d'élimination sériques rapportées dans les études disponibles indiquent que le métabolisme du PFBS chez les mâles semble plus faible que chez les femelles.

L'urine est la voie majeure d'élimination du composé, que ce soit par voie orale ou par voie intraveineuse. De plus, cette élimination est rapide.

- Toxicité

A ce jour, deux études animales de toxicité par exposition répétée (90 jours et 2-génération) permettent d'évaluer ce composé. Elles ont notamment mis en évidence des effets rénaux et hépatiques. Les effets rénaux sont les plus reproductibles dans les études disponibles : une hyperplasie tubulaire est en effet observée dans l'étude 90 jours disponible et dans l'étude deux générations, à la fois chez les parents et chez les petits de la génération F1 (Lieder *et al.*, 2009a, 2009b).

- Construction

- Choix de l'effet critique

Le CES a donc retenu les effets sur le rein comme effet critique. Le CES souligne que ce choix protégera des effets potentiels observés au niveau hépatique.

- Choix de l'étude clé

Bien que l'hyperplasie tubulaire soit également observée dans l'étude par exposition subchronique (Lieder *et al.*, 2009a), l'étude clé retenue est l'étude deux générations (pour les effets observés chez la génération F0) (Lieder *et al.*, 2009b). Les effets rénaux sont plus détaillés par les auteurs dans cette dernière.

- Choix de la dose critique

Les données expérimentales établies sur l'hyperplasie tubulaire ont pu être modélisées à l'aide du logiciel Proast afin d'établir une Benchmark dose (BMD). Il est à noter que seuls les résultats aux deux plus fortes doses étaient fournis par les auteurs de la publication, et ont donc pu être utilisés pour la modélisation.

L'objectif de la démarche est d'estimer la concentration correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin, appelé Benchmark Response (BMR). Ce BMR correspond à un excès de risque de 10%, recommandé par l'Anses et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) pour les données quantales (EFSA, 2017).

Dans le cas du PFBS, les données chez les femelles ont été choisies, celles-ci apparaissant plus sensibles pour cet effet.

Les valeurs retenues sont les suivantes :

$$\text{BMD}_{10\%} : 40,6 \text{ mg/kg/j}$$

$$\text{BMD}_{10\%L_{95\%}} : 24 \text{ mg/kg/j}$$

- Ajustements

Dans le but de réduire la valeur de l'incertitude due à la variabilité inter-espèce lors de la détermination d'une dose équivalente humaine, un ajustement allométrique a été réalisé, selon l'équation suivante :

$$\text{Dose équivalente humaine} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids Homme}} \right)^{1/4}$$

$$\text{BMD}_{10\%L_{95\%}} \text{ HED} = 24 \text{ mg/kg/j} \times \left(\frac{0,285 \text{ kg}}{70 \text{ kg}} \right)^{1/4} = 6,06 \text{ mg/kg/j}$$

- Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de la $\text{BMD}_{10\%L_{95\%}} \text{ HED}$ a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015a) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 3

L'étude clé retenue étant une étude 2-génération où les animaux ont été exposés 70 jours, et aucune étude par exposition chronique n'étant disponible, il a été décidé d'appliquer un UF_S de 3.

- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL ou d'un NOAEL ($\text{UF}_{B/L}$) : 1

La construction de la VTR est basée ici sur une BMDL, ce facteur ne s'applique pas.

- Insuffisance des données (UF_D) : 1

Les données toxicologiques disponibles sur le PFBS sont jugées suffisantes pour évaluer la toxicité du composé.

Un facteur d'incertitude global de 75 est donc utilisé pour la construction de la VTR du PFBS.

- Proposition de VTR chronique par ingestion

$$\text{VTR} = \frac{6,06 \text{ mg/kg/j}}{75} = 0,081 \cong \mathbf{0,08 \text{ mg/kg/j}}$$

- Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à cette VTR chronique par voie orale en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données :

Moyen : les données toxicologiques sont globalement suffisantes pour évaluer ce composé. Cependant, la plupart des études disponibles, bien que de bonne qualité, ont été produites par le groupe de Butenhoff et collaborateurs (Bijland *et al.*, 2011, Lieder *et al.*, 2009a & b, Olsen *et al.*, 2009).

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action :

Moyen : l'hyperplasie tubulaire est un effet observé dans toutes les études ayant évalué la toxicité générale de ce composé. Néanmoins, cet effet est généralement peu discuté par les auteurs.

- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé :

Fort : il s'agit d'une étude bien détaillée qui suit les lignes directrice OCDE et les bonnes pratiques de laboratoire.

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique :

Moyen : une BMD a pu être construite, mais uniquement sur deux doses. Les résultats aux deux plus faibles doses n'ont en effet pas été présentés par les auteurs.

Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc **moyen**.

■ Acide perfluorohexanoïque (PFHxA) - CAS n° 307-24-4

- Toxicocinétique

Suite à une exposition par voie orale, l'absorption du PFHxA semble rapide, avec un T_{max} d'environ 1 heure.

Concernant la distribution systémique du PFHxA, une étude par voie intraveineuse semble montrer des différences entre mâles et femelles, avec une demi-vie sérique plus importante chez les mâles. L'étude par voie orale, cependant, ne rapporte pas une telle différence entre mâles et femelles.

Que ce soit après administration par voie orale ou par voie intraveineuse, le PFHxA est excrété rapidement, et majoritairement dans l'urine.

- Toxicité

Les études disponibles sur le PFHxA ont mis en évidence différents effets, notamment aux niveaux hépatique et rénal.

Au niveau hépatique, une augmentation du poids absolu et relatif du foie associée à une hypertrophie hépatocellulaire et une augmentation statistiquement significative des aspartate aminotransférases (ASAT) et alanine aminotransférases (ALAT) sont observées dans les deux études par exposition subchronique disponibles.

Concernant les effets sur le rein, l'étude par exposition chronique montre une nécrose papillaire et une dégénérescence tubulaire chez les femelles à 200 mg/kg/j (Klaunig *et al.*, 2015). Ces lésions sont associées à une augmentation statistiquement significative du volume urinaire et une diminution statistiquement significative de la gravité spécifique à la même dose chez les femelles à 26 semaines de traitement.

- Construction

- Choix de l'effet critique

- **Effets hépatiques**

Selon l'U.S. EPA (2002), les ALAT et les ASAT doivent être augmentées au minimum d'un facteur 2 ou 3 pour être considérées pertinentes, ce qui n'est pas le cas dans ces deux études. De plus, l'étude par exposition chronique ne montre pas d'augmentation de ces deux paramètres.

- **Effets rénaux**

Au regard de la sévérité des lésions observées au niveau rénal (nécrose papillaire et dégénérescence tubulaire), le CES a décidé de les retenir comme effet critique. Le CES souligne que ce choix protégera des potentiels effets observés au niveau hépatique.

- Choix de l'étude clé

L'étude clé retenue est l'étude de Klaunig *et al.* (2015), la seule étude disponible pour une exposition chronique (2 ans). Il s'agit d'une étude d'assez bonne qualité, mais qui ne suit pas les lignes directrices de l'OCDE. Il est important de noter qu'un nombre important d'animaux sont également morts avant la fin de l'étude, indépendamment des effets toxiques de la substance.

- Choix de la dose critique

Du fait de l'absence de relation dose-réponse (effet apparaissant à la plus forte dose), une BMD n'a pas pu être construite. En conséquence, le NOAEL est la dose directement inférieure au LOAEL identifié, à savoir 200 mg/kg/j. Le NOAEL est donc de 30 mg/kg/j.

- Ajustements

Dans le but de réduire la valeur de l'incertitude due à la variabilité inter-espèce lors de la détermination d'une dose équivalente humaine, un ajustement allométrique a été réalisé, selon l'équation suivante :

$$\text{Dose équivalente humaine} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids Homme}} \right)^{1/4}$$

$$\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 30 \text{ mg/kg/j} \times \left(\frac{0,338 \text{ kg}}{70 \text{ kg}} \right)^{1/4} = 7,91 \text{ mg/kg/j}$$

- Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir du NOAEL_{HED} a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015a) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 1

L'étude clé retenue étant une étude chronique, un UF_S n'est pas nécessaire.

- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL ou d'un NOAEL (UF_{B/L}) : 1

La construction de la VTR est basée ici sur un NOAEL, ce facteur ne s'applique pas.

- Insuffisance des données (UF_D) : 1

Les données toxicologiques disponibles sur le PFHxA sont suffisantes pour évaluer la toxicité du composé. Un UF_D n'est donc pas nécessaire.

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR du PFHxA.

- Proposition de VTR chronique par ingestion

$$VTR = \frac{7,91 \text{ mg/kg/j}}{25} = 0,316 \cong 0,32 \text{ mg/kg/j}$$

- Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à cette VTR chronique par voie orale en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données :

Fort : les données toxicologiques sont suffisantes pour évaluer ce composé. Les études disponibles sont de bonne qualité.

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action :

Moyen : c'est un effet suffisamment robuste pour construire une VTR. Il n'est cependant retrouvé que chez les femelles, à la plus forte dose, sans relation dose réponse identifiable.

- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé :

Moyen : il s'agit d'une étude bien détaillée mais qui ne suit pas les lignes directrice et ne précise pas le respect des bonnes pratiques de laboratoire. Le nombre d'animaux par dose est important. Les écarts entre les doses de l'essai sont cependant assez élevés, et un nombre important d'animaux sont morts au cours de l'étude.

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique :

Moyen : aucune relation dose réponse n'est identifiable. Une BMD n'a pas pu être construite, mais un NOAEL a pu être identifié.

Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc **moyen**.

Les rapports ont été validés à l'unanimité par les experts présents (16 experts présents).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » qui portent sur l'élaboration de valeurs référence par voie orale pour les 4 perfluorés évalués.

Concernant le PFBA et le PFHxS, considérant les doutes existant sur le choix de l'effet critique et son caractère néfaste, le choix a été fait de construire une Valeur Toxicologique Indicative (VTi). Une VTi est construite par l'Anses lorsque toutes les conditions nécessaires à la construction d'une VTR ne sont pas réunies (insuffisance des données, doute sur le caractère néfaste de l'effet et/ou contraintes de temps et/ou de ressources). Cette approche pragmatique vise à répondre de façon transitoire à l'objectif de l'évaluation des risques sanitaires dans l'attente de données

qualitatives et/ou quantitatives suffisantes, et peut donc contribuer à répondre aux attentes des gestionnaires de risque en présence de situations d'exposition documentées. Cette VTi ne peut être utilisée que pour répondre à une situation et un contexte spécifiques qui ont justifié sa construction.

PFBA :

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	Valeur de référence
Effets hépatiques Butenhoff <i>et al.</i> , 2012	NOAEL = 6 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> NOAEL _{HED} = 1,764 mg/kg/j	75 UF _A : 2,5 UF _D : 1 UF _H : 10 UF _L : 1 UF _S : 3	VTi = 0,024 mg/kg/j

PFHxS :

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	Valeur de référence
Effets hépatiques Butenhoff <i>et al.</i> , 2009	NOAEL = 1 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> NOAEL _{HED} = 0,289 mg/kg/j	75 UF _A : 2,5 UF _D : 1 UF _H : 10 UF _L : 1 UF _S : 3	VTi = 0,004 mg/kg/j

Pour le PFBS et le PFHxA, des VTR ont été construites :

PFBS :

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	Valeur de référence
Effets rénaux (Hyperplasie tubulaire) Lieder <i>et al.</i> , 2009b	BMD _{10%} L _{95%} = 24 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique :</u> BMD _{10%} L _{95%} HED = 6,06 mg/kg/j	75 UF _A : 2,5 UF _D : 1 UF _H : 10 UF _L : 1 UF _S : 3	VTR = 0,08 mg/kg/j
			Niveau de confiance Moyen

PFHxA :

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	Valeur de référence
Effets rénaux (Nécrose papillaire et dégénérescence tubulaire) Klaunig <i>et al.</i> , 2015	NOAEL = 30 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique :</u> NOAEL _{HED} = 7,91 mg/kg/j	25 UF _A : 2,5 UF _D : 1 UF _H : 10 UF _L : 1 UF _S : 1	VTR = 0,32 mg/kg/j
			Niveau de confiance Moyen

Dr Roger GENET

MOTS-CLÉS

Valeur toxicologique de référence, VTR, Voie orale, chronique, Valeur Toxicologique Indicative, VTi, Acide perfluorobutanoïque, PFBA, Acide perfluorobutane sulfonique, PFBS, Acide perfluorohexanoïque, PFHxA, Acide perfluorohexane sulfonique, PFHxS
Toxicological reference value, TRV, Perfluorobutyrate, Perfluorobutane sulfonate, Perfluorohexanoic acid, Perfluorohexane sulfonate, oral route, chronic

BIBLIOGRAPHIE

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), (2015a) Valeurs toxicologiques de référence (VTR), Guide d'élaboration de VTR.

Anses, (2015b). RAPPORT de l'Anses sur les perfluorés. TOME 1: Connaissances relatives à la réglementation, à l'identification, aux propriétés chimiques, à la production et aux usages des composés de la famille des perfluorés ; TOME 2: Connaissances relatives aux données de contamination et aux expositions par des composés de la famille des perfluorés ; TOME 3: Connaissances relatives aux données de toxicité sur les composés de la famille des perfluorés.

Butenhoff J.L., Chang S.-C., Ehresman D. J., York R.G., (2009) Evaluation of potential reproductive and developmental toxicity of potassium perfluorohexanesulfonate in Sprague Dawley rats. *Reproductive Toxicology* 27 pp 331–341

Butenhoff J L., Bjorkb J A., Chang S-C, Ehresman D J., Parker G A., Das K, Lau C, Lieder P H., van Otterdijke F M., Wallace K B. (2012) Toxicological evaluation of ammonium perfluorobutyrate in rats: Twenty-eight-day and ninety-day oral gavage studies. *Reproductive Toxicology* 33, 513–530

Chengelis C. P., Kirkpatrick J. B., Radovsky A., Shinohar M. (2009) A 90-day repeated dose oral (gavage) toxicity study of perfluorohexanoic acid (PFHxA) in rats (with functional observational battery and motor activity determinations). *Reproductive Toxicology* 27 342–351.

European Food Safety Authority (EFSA) (2008) Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2004-163). *The EFSA Journal* 653, 1-131

EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen KH, More S, Mortensen A, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rychen G, Silano V, Solecki R, Turck D, Aerts M, Bodin L, Davis A, Edler L, Gundert-Remy U, Sand S, Slob W, Bottex B, Abrahantes JC, Marques DC, Kass G and Schlatter JR, 2017. Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal* 2017;15(1):4658, 41 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4658

Foreman J E., Chang S-C, Ehresman D J., Butenhoff J L., Anderson C R., Palkar P S., Kang B-H, Gonzalez F J., Peters J M. (2009). Differential Hepatic Effects of Perfluorobutyrate Mediated by Mouse and Human PPAR- α . *Toxicological Sciences* 110(1), 204–211

Hall AP., Elcombe CR., Foster JR., Harada T., Kaufmann W., Knippel A., Kuttler K., Malarkey DE., Maronpot RR., Nishikawa A., Nolte T., Schulte A., Strauss V., York MJ. (2012) Liver Hypertrophy:

A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes - Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*, 40: 971-994.

Klaunig J. E., Shinohara M., Iwai H., Chengelis C. P., Kirkpatrick J. B., Wang Z. And Bruner R. H. (2015). Evaluation of the Chronic Toxicity and Carcinogenicity of Perfluorohexanoic Acid (PFHxA) in Sprague-Dawley Rats. *Toxicologic Pathology*, 43: 209-220.

Lieder P.H., Chang S-C., York R.G., Butenhoff J.L. (2009a) Toxicological evaluation of potassium perfluorobutanesulfonate in a 90-day oral gavage study with Sprague–Dawley rats. *Toxicology* 255; pp 45–52

Lieder P.H., York R.G., Hakes D.C., Chang S-C., Butenhoff J.L. (2009b) A two-generation oral gavage reproduction study with potassium perfluorobutanesulfonate (K+PFBS) in Sprague Dawley rats. *Toxicology* 259; pp 33–45

Lynch C., Pan Y., Li L., Heyward S., Moeller T., Swaan PW., Wang H. (2014) Activation of the Constitutive Androstane Receptor Inhibits Gluconeogenesis without Affecting Lipogenesis or Fatty Acid Synthesis in Human Hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* ; 279(1): 33–42

Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2010) WHO Human Health Risk Assessment Toolkit: Chemical Hazards. IPCS harmonization project document no. 8. (OMS, Genève) 87p.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2002) Hepatocellular hypertrophy. HED guidance document #G2002.01. Technical Report.

U.S. EPA (2016a) Health Effects Support Document for Perfluorooctanoic Acid (PFOA). EPA Document Number: 822-R-16-003

U.S. EPA (2016b) Health Effects Support Document for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS). EPA Document Number: 822-R-16-002

Yang H., Wang H. (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell*, 5(2):113–123

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Elaboration de VTR chronique par voie orale pour l'acide perfluorobutanoïque
(PFBA)
(CAS n°375-22-4)

Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »

Saisine « 2015-SA-0129 »
Saisine liée « 2009-SA-0331 »

RAPPORT

d'expertise collective

Comité d'experts spécialisé
« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de
référence »

Février 2017

Mots clés

Valeur Toxicologique de Référence, VTR, Valeur Toxicologique Indicative, VTi, Acide perfluorobutanoïque, PFBA, voie orale, chronique,

Toxicological Reference Value, TRV, Indicative Toxicological Value, iTV, Perfluorobutyrate, oral route, chronic

Présentation des intervenants

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

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » – 11 juin 2015, 14 janvier, 10 mars, 12 mai, 15 septembre, 20 octobre, 9 décembre 2016 et 23 février 2017

Président

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue

Vice-président

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue chez Nexter Group – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

Membres

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal – Chimiste toxicologue, VLEP

M. Sylvain BILLET – Enseignant chercheur / maître de conférence en toxicologie à l'Université du Littoral Côte d'Opale – Toxicologie respiratoire, nanomatériaux

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Pharmacien toxicologue, toxicologie générale - VTR

Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire

M. François CLINARD – Epidémiologiste à l'Institut de Veille Sanitaire – Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

Mme Fatiha EL-GHISSASSi – Scientifique, Section des Monographies de IARC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à l'Institut de Veille sanitaire – Docteur es science en biochimie, toxicologie, VLEP

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Guillaume GARCON – Professeur de toxicologie à l'Université de Lille 2 – Toxicologie générale, cancérologie, modèles expérimentaux, toxicologie respiratoire, pollution atmosphérique

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants - Anses – Laboratoire de Fougères- Toxicologie, génotoxicité, nanomatériaux

Mme Véronique MALARD – Ingénieur chercheur en toxicologie au CEA, Centre de Cadarache. Docteur es science – Toxicologie « in vitro », biologie cellulaire, nanotoxicologie, protéomique.

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19

M. Jean-Paul PAYAN – Chef du laboratoire Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme à l'INRS, Nancy – Pharmacien toxicologue, toxicocinétique

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine - Pharmacien biologiste - Neurotoxicité, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Alain SIMONNARD – Pharmacien toxicologue, ERT, retraité de l'INRS

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève – Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

Mme Lydie SPARFEL – Professeur à l'Université de Rennes 1 / IRSET 'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail' UMR INSERM 1085– Pharmacien Toxicologue, immunotoxicologie, toxicogénomique, cancérologie, biologie cellulaire et moléculaire

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

RAPPORTEURS

M. François CLINARD – Epidémiologiste à l'Institut de Veille Sanitaire – Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Aurélie MATHIEU-HUART – Chef de projets scientifiques – Anses

Mme Pauline GUILLOU – Chargée de projets scientifiques – Anses

Contribution scientifique

Mme Pauline GUILLOU – Chargée de projets scientifiques – Anses

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX-PETRE – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	8
Liste des tableaux.....	9
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	10
1.1 Contexte.....	10
1.2 Objet de la saisine.....	11
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	11
1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt	12
2 Informations générales.....	13
2.1 Identification de la substance	13
2.2 Propriétés physico-chimiques	13
3 Synthèse des données toxicologiques.....	15
3.1 Toxicocinétique.....	15
3.1.1 Absorption	15
3.1.2 Distribution	15
3.1.3 Métabolisme.....	15
3.1.4 Excrétion	16
3.2 Toxicité aiguë	16
3.3 Irritation	16
3.4 Sensibilisation.....	17
3.5 Toxicité subchronique et chronique	17
3.5.1 Données chez l'Homme.....	17
3.5.2 Données chez l'animal.....	17
3.5.2.1 Effets hépatiques.....	17
3.5.2.2 Effets thyroïdiens.....	18
3.6 Effets sur la reproduction et le développement.....	20
3.6.1 Données chez l'Homme.....	20
3.6.2 Données chez l'animal.....	20
3.7 Génotoxicité	21
3.8 Cancérogénicité	21

3.9 Mécanismes d'action	21
3.10 Populations sensibles	22
4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence	23
5 Proposition de VTR chronique par voie orale.....	24
5.1 Choix de l'effet critique.....	24
5.2 Choix de l'étude clé.....	25
5.3 Choix de la dose critique	25
5.4 Ajustements.....	25
5.5 Choix des facteurs d'incertitude	26
5.6 Proposition de VTi chronique par ingestion	26
6 Conclusions du CES.....	27
7 Bibliographie.....	28

Sigles et abréviations

AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
APO	Apolipoprotéine
ARNm	ARN messenger
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CES	Comité d'Experts Spécialisés
CYP	Cytochrome P
EFSA	European Food Safety Authority
ESTP	European Society of Toxicologic Pathology
fT4	Thyroxine libre
IPCS	International Programme on Chemical Safety
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (= Dose minimale entraînant un effet néfaste observé)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (= Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PND	Postnatal Day
PFBA	Acide perfluorobutanoïque
PFBS	Acide perfluorobutane sulfonique
PFHxA	Acide perfluorohexanoïque
PFHxS	Acide perfluorohexane sulfonique
PFOA	Acide perfluorooctanoïque
PFOS	Sulfonate de perfluorooctane
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
RfC	Reference Concentration
t _{1/2}	Temps de demi-vie
T4	Thyroxine
TSH	Thyréostimuline
TT4	Thyroxine totale
UF	Uncertainty Factor (= Facteur d'incertitude)
UF _A	Facteur d'incertitude inter-espèces
UF _D	Facteur d'incertitude au manque de données
UF _H	Facteur d'incertitude interindividuel
UF _{H-TK}	Composante toxicocinétique du facteur d'incertitude interindividuel
UF _{H-TD}	Composante toxicodynamique du facteur d'incertitude interindividuel
UF _L	Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
UF _S	Facteur d'incertitude lié à la transposition subchronique à chronique

U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency (États-Unis)
VTi	Valeur Toxicologique Indicative
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification de la substance	13
Tableau 2 : Propriétés physicochimiques	13
Tableau 3 : niveaux sériques de thyrostimuline, thyroxine totale et thyroxine libre chez les mâles exposés 28 jours	19
Tableau 4 : observations histopathologiques chez les mâles exposés 28 jours	19
Tableau 5 : niveaux sériques de thyrostimuline, thyroxine totale et thyroxine libre chez les mâles exposés 90 jours	19
Tableau 6 : observations histopathologiques chez les mâles exposés 90 jours	20
Tableau 7 : Nombre de résorptions	20
Tableau 8 : Marqueurs de développement chez les petits exposés au PFBA <i>in utero</i>	21
Tableau 9 : VTi chronique par voie orale pour le PFBA	27

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2015a).

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

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

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

Une valeur toxicologique indicative (VTi) est un repère toxicologique pouvant être utilisé pour l'évaluation d'un risque.

Une VTi pourra être proposée lorsque les conditions nécessaires à l'élaboration d'une VTR ne sont pas remplies et qu'une évaluation quantitative de risque sanitaire (EQRS) est nécessaire dans un contexte d'exposition donné :

1. en cas d'**insuffisance des données** disponibles sur la substance pour caractériser le danger de la substance ou de **doute sur l'adversité de l'effet**. Dans ce cas, une veille bibliographique sera menée par l'Anses sur ces substances en vue de remplacer les valeurs toxicologiques indicatives par des VTR si de nouvelles données le permettent ;
2. en cas de **contraintes de temps et/ou de ressources**. Dans ce cas, la valeur toxicologique indicative serait élaborée au mieux dans le temps imparti, puis un travail complémentaire sera le cas échéant réalisé afin de proposer une VTR.

Il s'agit d'une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible.

Sur la base de l'approche OMS/IPCS proposant une démarche par étapes pour l'évaluation des risques sanitaires dont la première étape consiste en une évaluation préliminaire (screening), la VTi pourra être utilisée pour écarter un risque dans une approche d'évaluation de risque de premier niveau (conservatrice) (OMS-IPCS, 2010).

A la différence d'une VTR, une VTi ne devrait être utilisée que dans le contexte qui l'a vu naître. Les conditions d'application devront donc être clairement explicitées pour chacune des VTi proposées. Comme pour les VTR, l'utilisation et l'interprétation des VTi devront obligatoirement tenir compte de la voie d'exposition, de la durée d'exposition, de la période d'exposition, du type d'effet auquel elle est associée et de la population destinée à être protégée.

Une VTi est élaborée en suivant les mêmes étapes qu'une VTR.

Les VTi ne seront pas publiées sur le site de l'Anses indépendamment des évaluations du risque simplifiées qui auront justifié leur élaboration.

1.2 Objet de la saisine

Ce travail fait suite aux travaux de l'Agence sur les perfluorés ayant donné lieu à un rapport publié en 2015 (Anses, 2015b), réalisé dans le cadre de la saisine de la Direction générale de la santé de juin 2009 relative aux substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes (PE) (Saisine «n° 2009-SA-0331»).

Parmi l'ensemble de ces molécules, ce rapport a permis de mettre en évidence 4 perfluorés prioritaires : l'acide perfluorobutanoïque (PFBA), l'acide perfluorobutane sulfonique (PFBS), l'acide perfluorohexanoïque (PFHxA) et le sulfonate de perfluorohexane (PFHxS). Cette sélection s'est faite selon plusieurs critères dont le statut réglementaire (REACH et réglementation sectorielle), le corpus de données disponibles pour chacun des composés, l'utilisation et l'évolution de l'utilisation des composés, les valeurs de référence déjà disponibles etc... Ces 4 perfluorés ont donc fait l'objet de travaux distincts dans l'objectif de leur attribuer des VTR.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisés (CES) « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise des rapporteurs ont été soumis régulièrement au CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques). Le rapport produit par les rapporteurs tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

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

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

1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt

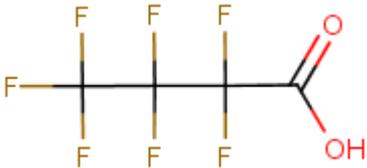
L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

2 Informations générales

2.1 Identification de la substance

Tableau 1 : Identification de la substance

Nom	Acide perfluorobutanoïque
Numéro CAS	375-22-4
Numéro EINECS	206-786-3
Synonymes	PFBA
Formule	$C_4HF_7O_2$ 

2.2 Propriétés physico-chimiques

Tableau 2 : Propriétés physicochimiques

Forme physique	Liquide
Masse molaire*	214
T° fusion*	-17,5°C
T° ébullition*	121°C
Point d'éclair**	Non applicable
Solubilité**	Soluble dans l'éthanol et le toluène; Insoluble dans l'éther de pétrole
Coefficient de partage $\log K_{o/w}$ *	Non applicable
Densité**	1,651 g.cm ⁻³ à 20°C
Pression de vapeur (Pa)**	44 mm Hg à 56°C
Densité de la phase vapeur (par	

rapport à l'air) *	
Facteur de conversion**	1 ppm = 8,90 mg.m ⁻³ 1 mg.m ⁻³ = 0,11 ppm

* TOXNET, ** ATSDR (Lide, 2005)

3 Synthèse des données toxicologiques

3.1 Toxicocinétique

Toutes les données de toxicocinétique du PFBA décrites ci-dessous sont issues de l'étude de Chang *et al.* (2008). Dans cette étude, les auteurs ont effectué une analyse comparative de la pharmacocinétique du PFBA chez des rats (voies intraveineuse et orale), des souris (voie orale) des singes (voie intraveineuse), et des volontaires exposés professionnellement.

3.1.1 Absorption

Dans l'étude de Chang *et al.*, 2008, trois expériences ont été menées sur des rats et des souris.

Expérience 1 : Trois rats Sprague-Dawley par sexe ont été exposés à 30 mg/kg/j par gavage afin d'étudier l'absorption orale et l'élimination. Les T_{max} observés sont respectivement de 1,25 et 0,63h chez les mâles et les femelles. Ceci suggère que l'absorption du PFBA par voie orale chez les rats est rapide. A partir des données de l'étude, le calcul des biodisponibilités corrigées par la clairance chez les mâles et les femelles (respectivement 101% et 95%) indiquent également que l'absorption du PFBA par voie orale chez les rats semble relativement complète (Chang *et al.*, 2008).

Expérience 2 : Trois : souris CD-1 par sexe et par dose ont également été exposées à 10, 30 ou 100 mg/kg/j. Des résultats comparables au rat ont été observés, avec des T_{max} compris entre 0,56 et 2,35h, sauf chez les femelles suite à l'exposition de 100 mg/kg/j (4,14h) (Chang *et al.*, 2008).

Expérience 3 : Trois rats Sprague-Dawley par sexe ont également été exposés à 30 mg/kg/j par voie intraveineuse afin d'étudier la biodisponibilité de la substance.

3.1.2 Distribution

Chez les rats et les souris, quel que soit le sexe, les volumes de distributions semblent comparables, s'étalant entre 0,1 et 0,29 L.kg⁻¹. Ces valeurs faibles indiquent que le PFBA est très peu distribué dans les tissus.

Cela est confirmé par les faibles concentrations hépatiques de PFBA retrouvées chez le rat et la souris. Elles correspondent à 22-28% des concentrations sériques chez les mâles, et sont même plus faibles chez les souris femelles, environ 17%, indiquant une accumulation hépatique limitée.

Il est à noter que les volumes de distribution suite à une exposition par voie intraveineuse chez le singe sont légèrement plus élevés que chez les rongeurs, avec des valeurs de 0,53 et 0,44 L.kg⁻¹ chez les mâles et les femelles respectivement (Chang *et al.*, 2008).

3.1.3 Métabolisme

Aucune donnée n'est disponible concernant le métabolisme du PFBA.

3.1.4 Excrétion

Chez l'Homme, une analyse a été réalisée sur 12 volontaires exposés professionnellement, afin de déterminer le temps de demi-vie sérique du PFBA. Pour cela, les volontaires ont été retirés de leur lieu de travail ou sont partis en vacances, afin de les soustraire à toute source d'exposition. Le $t_{1/2}$ calculé dans cette étude varie entre 28,6 et 152 h (Chang *et al.*, 2008).

Chez les rats, après administration de 30 mg/kg/j par voie orale (expérience 1), le $t_{1/2}$ du PFBA est respectivement de 9,22 et 1,76 h chez les mâles et les femelles. Après l'exposition intraveineuse de la même dose (expérience 3), les valeurs calculées sont légèrement plus faibles (6,38 et 1,03 h) (Chang *et al.*, 2008).

Dans l'étude chez les souris (expérience 2), il est à noter que quelle que soit la dose, comme chez les rats, le $t_{1/2}$ est toujours plus faible chez les femelles. A 30 mg/kg/j, il est de 16,25 et 3,08 h respectivement chez le mâle et la femelle. A noter également que ces $t_{1/2}$ diminuent à 100 mg/kg/j (5,22 et 2,79 h). Les auteurs ont suggéré, en se basant sur les connaissances de la toxicocinétique du PFOA, qu'il pourrait y avoir un mécanisme de saturation de la réabsorption tubulaire de la substance (Chang *et al.*, 2008).

Chez le singe, après une administration unique par voie intraveineuse de 10 mg/kg/j, le $t_{1/2}$ sérique du PFBA est de 1,61 h et 2,28 h en phase α et 40 h et 41 h en phase β chez les mâles et les femelles respectivement (Chang *et al.*, 2008).

Chez toutes les espèces étudiées (i.e. souris, rats et singe), l'urine est la voie d'excrétion principale. Il est à noter que chez les rongeurs, à 24h, les pourcentages de doses administrées retrouvés dans les urines sont plus élevés chez les femelles que chez les mâles (environ 50-60% contre 100% chez les rats, et 35% contre 65-67% chez les souris). Chez les singes cependant, cette différence entre les mâles et les femelles n'est pas observée : 41 et 36% chez les mâles et les femelles respectivement. Ces pourcentages sont corrélés avec les taux d'élimination calculés (demi-vie) (Chang *et al.*, 2008).

L'élimination *via* les fèces est négligeable. Elle est cependant légèrement plus élevée chez les souris que chez les rats (entre 0,10 et 2,99% chez le rat et entre 4,10 et 10,92 chez la souris). Les auteurs expliquent cette observation par une absorption incomplète et une excrétion biliaire chez les souris (Chang *et al.*, 2008).

L'ensemble des données convergent vers une élimination rapide du PFBA (Chang *et al.*, 2008).

3.2 Toxicité aiguë

Aucune donnée n'est disponible concernant la toxicité aiguë du PFBA.

3.3 Irritation

Aucune donnée n'est disponible concernant les effets irritants du PFBA.

3.4 Sensibilisation

Aucune donnée n'est disponible concernant les effets sensibilisants du PFBA.

3.5 Toxicité subchronique et chronique

3.5.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme concernant les toxicités subchronique et chronique n'est disponible pour le PFBA.

3.5.2 Données chez l'animal

3.5.2.1 Effets hépatiques

Il est à noter que les effets décrits dans cette section sont observés exclusivement chez les rats mâles.

Dans une étude de 28 jours sur des rats Sprague Dawley, 20 animaux par sexe ont été exposés au PFBA à des doses de 0, 6, 30, et 150 mg/kg/j par voie orale (gavage) (Butenhoff *et al.*, 2012). Dix animaux ont été euthanasiés le lendemain de la dernière administration, et 10 ont été utilisés pour tester la réversibilité des effets suite à une période de récupération de 3 semaines.

Une augmentation des poids absolu et relatif du foie, statistiquement significative à 30 mg/kg/j (+27%) et 150 mg/kg/j (+45%) a été observée sans qu'aucune modification de poids corporel, de gain de poids corporel, ou de prise alimentaire ne soit notée. Six rats mâles sur dix présentaient des hypertrophies hépatocellulaires minimales à la plus forte dose (150 mg/kg/j).

Associée à cette augmentation du poids du foie, une diminution dose dépendante statistiquement significative du cholestérol total est notée à 30 mg/kg/j (-20,4%) et 150 mg/kg/j (-27%).

Tous ces paramètres se normalisent après récupération.

Les auteurs ont également analysé les niveaux hépatiques de transcrits d'ARNm spécifiques. Les augmentations les plus fortes le sont pour l'acyl CoA oxydase et l'acide arachidonique mono oxygénase, statistiquement significative à 30 et 150 mg/kg/j. Ces deux transcrits suggèrent une activation des PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha). Deux transcrits voient leur niveau statistiquement diminuer suite à l'exposition au PFBA : CYP1A1, suggérant une diminution de l'activité du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR), et l'apolipoprotéine A1 (ApoA1), composant majeur de l'HDL. Après 3 semaines de récupération, aucun transcrit n'est significativement différent des contrôles, excepté l'ApoA1 qui est statistiquement augmenté.

Dans la même publication, une étude sur 90 jours a été réalisée (Butenhoff *et al.*, 2012). Dix rats Sprague Dawley par sexe ont été exposés au PFBA à des doses de 0 ; 1,2 ; 6 ; et 30 mg/kg/j par gavage. Un groupe satellite supplémentaire de 10 rats par sexe a été ajouté pour le groupe contrôle et la plus forte dose pour tester la réversibilité des effets suite à une période de récupération de 3 semaines.

Les résultats de l'étude 90 jours sont comparables à ceux de l'étude 28 jours. Sont observées une augmentation des poids absolu et relatif du foie statistiquement significative à 30 mg/kg/j (+23%), ainsi qu'une augmentation du nombre de rats présentant des hypertrophies hépatocellulaires à cette même dose (9 rats sur 10, 5 minimales, 4 légères).

Le cholestérol total est diminué de 15% par rapport au groupe témoin (non significatif).

Tous ces paramètres se normalisent après récupération.

Plusieurs autres modifications biochimiques sont observées après exposition mais ces valeurs restent dans les normes physiologiques pour les rats Sprague Dawley.

Les résultats des analyses des ARNm hépatiques dans l'étude 90 jours sont également comparables à ceux de l'étude 28 jours. Les transcrits Acox et CYP4A1 sont significativement augmentés à la plus forte dose, et CYP1A1 et ApoA1 sont significativement diminués. De plus, l'enzyme malique, répondant à l'activation de PPAR α , et le CYP2B2, un marqueur de l'activation du récepteur constitutif aux androstanes (CAR) sont également significativement augmentés à la plus forte dose. A part CYP1A1, tous les transcrits sont retrouvés à des concentrations similaires aux témoins après la période de récupération.

Dans une étude sur le développement sur la souris décrite dans la partie concernée (cf. 3.6), il est de plus observé une augmentation du poids du foie absolu et relatif chez les mères, statistiquement significative aux 2 plus fortes doses (175 et 350 mg/kg/j) (Das *et al.*, 2008).

3.5.2.2 Effets thyroïdiens

Comme pour les effets hépatiques, les effets décrits ci-dessous, sauf mention explicite, concernent exclusivement les mâles.

Dans l'étude 28 jours décrite précédemment (Butenhoff *et al.*, 2012, cf. 3.5.2.1), des effets thyroïdiens sont également observés.

Le poids absolu de la thyroïde est augmenté significativement à 6 (+109%) et 30 mg/kg/j (+118%), mais pas à 150 mg/kg/j (+55%).

Les effets suivants sont également observés :

- Une diminution dose dépendante du taux sérique de T4 totale et de T4 libre. Uniquement présente à 150 mg/kg/j après récupération :

Tableau 3 : niveaux sériques de thyroïdostimuline, thyroxine totale et thyroxine libre chez les mâles exposés 28 jours

	TSH (ng/dL)	TT4 (µg/dL)	fT4 (ng/dL)
0 mg/kg/j	4,88 +/- 3,30	3,09 +/- 0,82	1,83 +/- 0,53
6 mg/kg/j	3,08 +/- 0,82	1,26 +/- 0,26*	0,98 +/- 0,34*
30 mg/kg/j	4,20 +/- 1,46	1,04 +/- 0,37*	0,91 +/- 0,31*
150 mg/kg/j	4,04 +/- 1,13	0,66 +/- 0,33*	0,63 +/- 0,19*

*Statistiquement significatif (p<0,05)

- Une augmentation réversible de l'incidence et de la gravité des hyperplasies/hypertrophies folliculaires :

Tableau 4 : observations histopathologiques chez les mâles exposés 28 jours

Hypertrophies/hyperplasies folliculaires	0 mg/kg/j	6 mg/kg/j	30 mg/kg/j	150 mg/kg/j
Observations totales : nombre d'animaux (%)	3 (30)	3 (30)	9 (90)	7 (70)
Grade minimal : nombre d'animaux (%)	3 (30)	3 (30)	9 (90)	4 (40)
Grade léger : nombre d'animaux (%)	-	-	-	3 (30)
Grade modéré : nombre d'animaux (%)	-	-	-	-

Dans l'étude 90 jours décrite précédemment (Butenhoff *et al.*, 2012, cf. 3.5.2.1), excepté l'augmentation du poids de la thyroïde, des effets similaires sont observés :

- Diminution du taux sérique de TT4 et fT4 à 30 mg/kg/j. Uniquement présente pour le TT4 après récupération :

Tableau 5 : niveaux sériques de thyroïdostimuline, thyroxine totale et thyroxine libre chez les mâles exposés 90 jours

	TSH (ng/dL)	TT4 (µg/dL)	fT4 (ng/dL)
0 mg/kg/j	2,14 +/- 1,18	5,27 +/- 0,71	-
1,2 mg/kg/j	2,62 +/- 1,96	5,97 +/- 1,08	1,38 +/- 0,27
6 mg/kg/j	2,87 +/- 2,14	4,46 +/- 0,88	1,25 +/- 0,24
30 mg/kg/j	1,63 +/- 1,42	3,23 +/- 0,55*	0,97 +/- 0,11 [†]

*Statistiquement significatif (p<0,05)

[†]Statistiquement significatif par rapport à la dose de 1,2 mg/kg/j (p<0,05)

- Augmentation réversible de l'incidence et de la gravité des hyperplasies/hypertrophies folliculaires à 30 mg/kg/j :

Tableau 6 : observations histopathologiques chez les mâles exposés 90 jours

Hypertrophies/hyperplasies folliculaires	0 mg/kg/j	6 mg/kg/j	30 mg/kg/j	150 mg/kg/j
Observations totales : nombre d'animaux (%)	4 (40)	6 (60)	4 (40)	9 (90)
Grade minimal : nombre d'animaux (%)	4	6	4 (40)	4 (40)
Grade léger : nombre d'animaux (%)	-	-	-	5 (50)

Il est à noter que les auteurs estiment néanmoins qu'au vu de l'absence de relation dose réponse et des difficultés à mesurer le poids de la thyroïde, ces variations n'ont pas de significativité toxicologique. Par ailleurs, il est également spécifié par les auteurs eux-mêmes que les mesures d'hormones thyroïdiennes sont soumises à caution suite à un problème technique lors de la mesure et que leur interprétation est donc non réalisable.

3.6 Effets sur la reproduction et le développement

3.6.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme concernant les effets sur la reproduction et le développement n'est disponible pour le PFBA.

3.6.2 Données chez l'animal

L'effet d'une exposition au PFBA durant la grossesse a été étudié chez la souris CD-1 (Das *et al.*, 2008). Les animaux (10 femelles par dose) ont été exposés à 0, 35, 175 et 350 mg PFBA/kg/j du premier au 17^{ème} jour de gestation. Certaines souris ont été sacrifiées au 18^{ème} jour de gestation et examinées, d'autres ont reçu un ultime traitement le 18^{ème} jour de gestation et le développement des petits a été suivi.

Concernant les effets sur la reproduction, il est observé à 175 et 350 mg/kg/j une augmentation du poids absolu et relatif du foie chez les petits des deux sexes à PND1 (postnatal day), mais qui n'est plus identifiable à PND10.

Il est également noté une augmentation des résorptions complètes de portées à la plus forte dose :

Tableau 7 : Nombre de résorptions

	0 mg/kg/j	35 mg/kg/j	175 mg/kg/j	350 mg/kg/j
Résorptions complètes (nb)	2	1	3	8
Résorptions complètes (%)	6,8	3,4	11,1	29,6*

Des retards de développement sur l'ouverture des yeux, l'ouverture vaginale et la séparation préputiale sont également observés :

Tableau 8 : Marqueurs de développement chez les petits exposés au PFBA *in utero*

	Ouverture des yeux (j)	Ouverture vaginale (j)	Séparation préputiale (j)
0 mg/kg/j	16,3 +/- 0,3	30,6 +/- 0,6	29,3 +/- 0,3
35 mg/kg/j	17,4 +/- 0,2*	32,6 +/- 0,5	29,6 +/- 0,5
175 mg/kg/j	17,7 +/- 0,2*	32,9 +/- 0,7*	30,2 +/- 0,5
350 mg/kg/j	17,8 +/- 0,2*	33,8 +/- 0,5*	31,5 +/- 0,4*

3.7 Génotoxicité

Aucune donnée n'est disponible concernant la génotoxicité du PFBA.

3.8 Cancérogénicité

Aucune étude spécifique concernant la cancérogénicité du PFBA n'est disponible. Cependant, aucun effet cancérogène n'est suggéré dans les études disponibles ayant étudié la toxicité générale du PFBA (Butenhoff *et al.*, 2012 ; Das *et al.*, 2008).

3.9 Mécanismes d'action

Foreman *et al.* (2009) ont étudié l'activation de PPAR α par le PFBA.

Trois lignées de souris mâles ont été utilisées pour cette étude : des souris de type sauvage, des souris génétiquement modifiées sans PPAR α , et des souris exprimant un PPAR α humanisé. Dix animaux par génotype ont été répartis en 5 groupes de traitement différents : contrôle (eau), 35, 175 et 350 mg PFBA/kg/j et 50 mg Wy-14,643/kg/j (contrôle positif) et exposés par gavage 28 jours (Foreman *et al.*, 2009).

En comparant les animaux de type sauvage et sans PPAR α exposés au PFBA, cette étude démontre que les augmentations de poids du foie, l'apparition des hypertrophies hépatocellulaires (également observés dans l'étude par expositions répétées de Butenhoff *et al.* (2012)) et les nécroses hépatiques sont dépendantes de ces PPAR α . Ces effets sont en effet observés chez les animaux de type sauvage, mais pas chez les animaux knock-out.

Il est observé dans cette étude que l'augmentation du poids du foie et l'hypertrophie hépatocellulaire sont également observés chez des souris humanisées. Au contraire, l'incidence et la sévérité moindres de la nécrose focale chez ces souris humanisées par rapport aux souris de type sauvage suggèrent que les PPAR α humains n'induisent pas la même réponse hépatique que les PPAR α de la souris et que des différences interespèces existent.

3.10 Populations sensibles

Aucune donnée existante à ce jour concernant d'éventuelles populations sensibles au PFBA.

4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence

Aucune VTR n'a été construite à ce jour pour le PFBA.

5 Proposition de VTR chronique par voie orale

5.1 Choix de l'effet critique

Peu de données sont disponibles concernant la toxicité du PFBA. En effet, à ce jour seules trois études animales de toxicité par exposition répétée (28 jours, 90 jours, et sur le développement) permettent d'évaluer ce composé. Elles ont mis en évidence les effets suivants :

- **Effets thyroïdiens** : Dans les études 28 jours et 90 jours de Butenhoff *et al.* (2012), il est observé, en plus d'une augmentation du poids absolu de la thyroïde, une diminution des taux sériques de T4 totale et de T4 libre (sans modification des taux de TSH). Cependant, le CES ne considère pas pertinent de construire une VTR basée sur ces modifications de concentrations hormonales, les auteurs eux-mêmes émettant un doute sur la fiabilité des résultats obtenus (problème dans la réalisation des mesures).
- **Effets sur le développement** : un retard d'ouverture des yeux statistiquement significatif mais modéré est observé, avec une relation dose réponse peu consistante. De plus, les auteurs n'ont pas détaillé leur méthodologie pour évaluer ce paramètre. Enfin, il n'est pas corroboré par d'autres critères de retards de développement (comme par exemple un retard de sortie des incisives). Le CES ne considère pas pertinent de construire une VTR basée sur ces modifications.
- **Effets hépatiques** : Il est observé dans les deux études de Butenhoff *et al.* (2012), une augmentation des poids absolu (+ 45% dans l'étude 28 jours, et + 23% dans l'étude 90 jours, aux plus fortes doses) et relatif du foie, associée à des hypertrophies hépatocellulaires (uniquement minimales dans l'étude 28 jours, minimales à légères dans l'étude 90 jours). Dans l'étude 28 jours et l'étude sur le développement, une diminution statistiquement significative du cholestérol est également observée. À l'exception de cette diminution du cholestérol, toutes les valeurs des paramètres biochimiques mesurés sont dans la gamme de la normalité, c'est-à-dire usuellement observées chez les rats Sprague-Dawley. Elles ne présentent donc pas de pertinence toxicologique. Dans les deux études de toxicité répétée, les auteurs ont également mesuré les niveaux hépatiques de transcrits d'ARNm d'intérêt. Un certain nombre de ces transcrits (Acox, CYP4A1...), marqueurs d'une activation de PPAR α , augmentent. Compte tenu des différences de mécanisme d'action et des conséquences de l'activation des PPAR α entre l'Homme et les rongeurs, établis sur la base de souris au PPAR α humanisé, cet effet n'est pas jugé transposable à l'Homme (Hall *et al.*, 2012). Les modifications des transcrits relevant d'une activation des PPAR α ne peuvent donc pas soutenir l'élaboration d'une valeur de référence sur des effets hépatiques (Hall *et al.*, 2012). Il est également observé une augmentation des niveaux du CYP2B2, marqueur de l'activation de CAR. De même que pour PPAR α , il semble exister de fortes différences entre le CAR murin et humain, que ce soit au niveau de ses ligands ou des réponses médiées par ce récepteur, la société européenne de pathologie toxicologique (ESTP) considérant même leur activation comme un effet non-adverse (Hall *et al.*, 2012). En particulier, la réponse concernant la lipogenèse semble différente entre l'Homme et les rongeurs. L'extrapolation à l'Homme de ces observations faites sur un modèle rongeur semble donc discutable dans l'objectif de les retenir comme effet critique (Lynch *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2013 ; Hall *et al.*, 2012). Enfin, il est également observé une diminution du niveau hépatique du CYP1A1, suggérant une diminution de l'activité de l'Ahr . Selon les documents de l'U.S. EPA (2002) et de l'ESTP (Hall *et al.*, 2012), lors d'une hypertrophie hépatocytaire, en l'absence de modifications histologiques, des preuves de dommages hépatocytaires caractérisés par une modification dose dépendante, biologiquement significative et cohérente d'au moins 2 paramètres hépatiques sont

nécessaires pour caractériser un effet néfaste sur le foie. Ces conditions ne sont donc pas remplies dans le cas présent. Selon ces critères, les effets hépatiques ne devraient donc pas être considérés comme néfastes.

Néanmoins, bien que pris indépendamment les uns des autres, aucun ne soit suffisant pour construire une VTR (ampleur de la réponse) ou soit totalement transposable à l'Homme, de nombreux effets (hypertrophie et signes fonctionnels) liés aux métabolismes hépatique et lipidique sont observés suite à une exposition au PFBA. Par ailleurs, même s'il s'agit d'une étude mécanistique, des nécroses hépatiques minimales à légères ont été observées, en plus d'hypertrophies, chez les souris mâles de type sauvage exposées 28 jours au PFBA dans l'étude de Foreman *et al.* (2009). Enfin, il apparaît également nécessaire de prendre en compte dans cette analyse les connaissances existantes sur l'ensemble de la famille des perfluorés, et notamment les deux composés les plus étudiés de cette famille, à savoir le PFOS et le PFOA. Une toxicité hépatique clairement établie pour ces deux composés, allant jusqu'à l'apparition d'adénomes hépatocytaires chez l'animal, ne peut pas être exclue chez l'Homme (EFSA, 2008 ; U.S. EPA, 2016a, 2016b).

Au regard de tous ces éléments, le CES a décidé de retenir les effets hépatiques comme effet critique. Considérant les doutes existant sur le choix de l'effet critique et son adversité, il a été fait le choix de construire une VTi pour le PFBA.

5.2 Choix de l'étude clé

L'étude subchronique (90 jours), ayant la modalité d'exposition la plus longue des études disponibles sur ce composé, a été retenue pour le choix du point de départ (Butenhoff *et al.* 2012).

5.3 Choix de la dose critique

Au regard de l'ensemble des effets apparaissant à 30 mg/kg/j dans cette étude (augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif du foie, hypertrophie hépatocellulaire, diminution du transcrit d'ARNm marqueur de l'Ahr,...), cette dose a été considérée comme le LOAEL. Le NOAEL, dose directement inférieure dans l'étude, est donc 6 mg/kg/j.

5.4 Ajustements

Dans le but de réduire le degré d'incertitude due à la variabilité inter-espèce lors de la détermination d'une dose équivalente humaine (HED), un ajustement allométrique a été réalisé, selon l'équation suivante :

$$\text{Dose équivalente humaine} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids Homme}} \right)^{1/4}$$

$$\text{NOAEL}_{\text{Dose équivalente humaine}} = 6,0 \text{ mg / kg / j} \times \left(\frac{0,523 \text{ kg}}{70 \text{ kg}} \right)^{1/4} = 1,764 \text{ mg / kg / j}$$

5.5 Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VT_i à partir du NOAEL_{HED} a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015a) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 3

Il s'agit d'une étude subchronique, les animaux ayant été exposés 90 jours. Pour prendre en compte d'éventuels effets survenant à des doses plus faibles après des expositions plus longues, il a été considéré pertinent d'appliquer un UF_S de 3.

- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL ou d'un NOAEL (UF_{B/L}) : 1

La construction de la VT_i est basée ici sur un NOAEL, ce facteur ne s'applique pas.

- Insuffisance des données (UF_D) : 1

Les trois études animales de toxicité par exposition répétée (28 jours, 90 jours, et toxicité sur le développement) disponibles sur le PFBA sont suffisantes pour évaluer la toxicité du composé.

Un facteur d'incertitude global de **75** est donc utilisé pour la construction de la VT_i du PFBA.

5.6 Proposition de VT_i chronique par ingestion

$$VT_i = \frac{1,764 \text{ mg/kg/j}}{75} = 0,0235 \cong 0,024 \text{ mg/kg/j}$$

6 Conclusions du CES

Une VTi chronique par voie orale est proposée pour le PFBA (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Tableau 9 : VTi chronique par voie orale pour le PFBA

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	Valeur de référence
Effets hépatiques Butenhoff <i>et al.</i> , 2012	NOAEL = 6 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> NOAEL _{HED} = 1,764 mg/kg/j	75 UF _A : 2,5 UF _D : 1 UF _H : 10 UF _L : 1 UF _S : 3	VTi = 0,024 mg/kg/j

Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisé : le 23/02/2017.

Signature :

Maisons-Alfort, le ,

Au nom des experts du CES

« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »,

M Guerbet

Président du CES

7 Bibliographie

Agence française de normalisation (AFNOR), Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. Norme française NF X 50-110, Mai 2003.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), (2015a) Valeurs toxicologiques de référence (VTR), Guide d'élaboration de VTR.

Anses, (2015b). RAPPORT de l'Anses sur les perfluorés. TOME 1: Connaissances relatives à la réglementation, à l'identification, aux propriétés chimiques, à la production et aux usages des composés de la famille des perfluorés ; TOME 2: Connaissances relatives aux données de contamination et aux expositions par des composés de la famille des perfluorés ; TOME 3: Connaissances relatives aux données de toxicité sur les composés de la famille des perfluorés.

Butenhoff J L., Bjorkb J A., Chang S-C, Ehresman D J., Parker G A., Das K, Lau C, Lieder P H., van Otterdijke F M., Wallace K B. (2012) Toxicological evaluation of ammonium perfluorobutyrate in rats: Twenty-eight-day and ninety-day oral gavage studies. *Reproductive Toxicology* 33, 513–530

Chang SC, Das K, Ehresman D J., Ellefson M E., Gorman G S., Hart J A., Noker P E., Tan Yu-Mei, Lieder P H., Lau C, Olsen G W., Butenhoff J L. (2008) Comparative Pharmacokinetics of Perfluorobutyrate in Rats, Mice, Monkeys, and Humans and Relevance to Human Exposure via Drinking Water. *Toxicological Sciences* 104(1), 40–53

Das K P., Grey B E., Zehr R D., Wood C R., Butenhoff J L., Chang S-C, Ehresman D J., Tan Y-M, Lau C (2008) Effects of Perfluorobutyrate Exposure during Pregnancy in the Mouse. *Toxicological Sciences* 105(1), 173–181.

European Food Safety Authority (EFSA) (2008) Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2004-163). *The EFSA Journal* 653, 1-131

Foreman J E., Chang S-C, Ehresman D J., Butenhoff J L., Anderson C R., Palkar P S., Kang B-H, Gonzalez F J., Peters J M. (2009). Differential Hepatic Effects of Perfluorobutyrate Mediated by Mouse and Human PPAR- α . *Toxicological Sciences* 110(1), 204–211

Hall AP., Elcombe CR., Foster JR., Harada T., Kaufmann W., Knippel A., Kuttler K., Malarkey DE., Maronpot RR., Nishikawa A., Nolte T., Schulte A., Strauss V., York MJ. (2012) Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes - Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*, 40: 971-994.

Lynch C., Pan Y., Li L., Heyward S., Moeller T., Swaan PW., Wang H. (2014) Activation of the Constitutive Androstane Receptor Inhibits Gluconeogenesis without Affecting Lipogenesis or Fatty Acid Synthesis in Human Hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* ; 279(1): 33–42

Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2010) WHO Human Health Risk Assessment Toolkit: Chemical Hazards. IPCS harmonization project document no. 8. (OMS, Genève) 87p.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2002) Hepatocellular hypertrophy. HED guidance document #G2002.01. Technical Report.

U.S. EPA (2016a) Health Effects Support Document for Perfluorooctanoic Acid (PFOA). EPA Document Number: 822-R-16-003

U.S. EPA (2016b) Health Effects Support Document for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS). EPA Document Number: 822-R-16-002

Yang H., Wang H. (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). Protein Cell, 5(2):113–123

Notes



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