



## Rapport interne

(ID Modèle = 454908)

**INERIS**

maîtriser le risque  
pour un développement durable

Ineris-200853-2703218-v1.0

27/01/2021

### EVALUATION DE LA TOXICITE, DES EFFETS DEVELOPPEMENTAUX ET DU POTENTIEL OESTROGENIQUE DE ONZE BISPHENOLS CHEZ LE POISSON ZEBRE

Entité émettrice : ESMI

Diffusion\* : MTE

\* Indiquer Restreinte si la diffusion de ce document est limitée aux destinataires identifiés ci-après.

Rédacteur : BRION Francois  
AÏT-AÏSSA Sélim  
CHRISTOPHE Armelle

Approbation : Document approuvé le  
27/01/2021 par BOUDET  
CELINE

Destinataires : LEMAITRE Cécile  
COSSON Jenifer

Copies : PORCHER Jean-Marc, BOUDET Céline,  
BISSON Michèle

PJ\* :

\* Indiquer si besoin la référence unique du(des) document(s) ou copier l'(les) hyperlien(s)

# Sommaire

<b>1. Préambule .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Contexte .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Objectifs et démarche expérimentale.....</b>	<b>3</b>
3.1. Bisphénols sélectionnés .....	4
3.2. Stratégie de tests <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> chez le poisson zèbre .....	5
3.2.1. Tests <i>in vivo</i> sur embryon de poisson zèbre .....	5
3.2.2. Tests <i>in vitro</i> .....	5
<b>4. Les substituts du BPA présentent des toxicités variables et induisent des effets développementaux variés.....</b>	<b>5</b>
<b>5. L'ensemble des substituts du BPA, à l'exception du TCBPA, sont oestrogéniques chez les embryons de poisson zèbre .....</b>	<b>6</b>
<b>6. L'activité oestrogénique des bisphénols implique une interaction directe ou indirecte avec les récepteurs des œstrogènes .....</b>	<b>7</b>
<b>7. Bilan et Perspectives .....</b>	<b>8</b>
<b>8. Références bibliographiques .....</b>	<b>9</b>

## 1. Préambule

Le présent rapport vise à synthétiser les travaux expérimentaux réalisés en 2020 au sein de l'unité *in vitro* et *in vivo* d'écotoxicologie (renommée Ecotoxicologie des Substances et des Milieux) dans le cadre de l'opération C « Dangers des perturbateurs endocriniens » du programme d'appui aux politiques publiques DRC59 « Données et profils de dangers des substances chimiques » du Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire. Elle concerne plus spécifiquement les données obtenues dans le cadre de l'opération C2 portant sur « l'évaluation des dangers perturbateurs endocriniens des substances chez le poisson ». C'est dans le cadre de cette sous-opération que nous avons évalué les propriétés œstrogène-mimétiques de substituts du bisphénol A (BPA) pour lesquels il existe un déficit d'information pour statuer sur leurs caractères potentiellement perturbateurs endocriniens.

## 2. Contexte

Le bisphénol A [BPA, 2,2-bis (4-hydroxyphénol) propane] est l'un des produits chimiques d'origine industrielle dont le volume de production est le plus élevé, en raison de sa large utilisation et de sa grande variété d'applications (Michalowicz, 2014). De nombreuses études ont démontré que le BPA est un composé perturbateur du système endocrinien, notamment en raison de sa capacité à lier et activer les récepteurs des œstrogènes (ER), et à entraîner des effets néfastes sur la santé humaine (revue de Rochester, 2013) et la faune sauvage (revue de Oehlmann *et al.*, 2009). En conséquence, l'utilisation du BPA dans les matériaux en contact avec les aliments a été restreinte ou interdite dans plusieurs pays. En 2017, l'union européenne a reconnu le BPA comme un perturbateur endocrinien pour l'homme et l'environnement limitant ainsi son importation et son utilisation sur le marché européen.

D'autres bisphénols, structurellement apparentés au BPA et destinés à le remplacer pour diverses applications industrielles, ont fait leur apparition sur le marché et sont de plus en plus utilisés et détectés chez l'Homme et dans l'environnement (Chen *et al.*, 2016). La question des effets potentiels des substituts du BPA sur le système endocrinien est d'actualité et se pose dans les études sur la santé humaine et environnementale. C'est également dans ce contexte que l'Ineris a mis en place à la demande du Ministère en charge de l'Environnement, un site internet dédié à la substitution des substances chimiques (dont les bisphénols) afin d'apporter un appui aux acteurs économiques engagés dans une démarche de substitution afin de promouvoir la diffusion et le partage d'informations (<https://substitution.ineris.fr/fr>).

Nos travaux précédents s'étaient focalisés sur quatre de ces substituts, le bisphénol S ou BPS (2,2-bis [4-hydroxyphénol]sulfone), le bisphénol F ou BPF (2,2-bis [4-hydroxyphénol]méthane), le bisphénol AF ou BPAF (4,4'-(Hexafluoroisopropylidène)diphénol) et le bisphénol C ou BPC (4,4'-Isopropylidène-di-*o*-cresol) en raison de leurs fortes utilisations dans diverses applications industrielles et de leurs occurrences environnementales. Ces travaux avaient permis de démontrer l'activité œstrogène mimétique de ces analogues structuraux du BPA dans des modèles biologiques *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre (Le Fol *et al.*, 2017 ; Pinto *et al.*, 2019).

## 3. Objectifs et démarche expérimentale

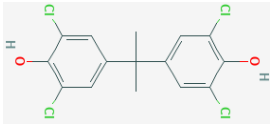

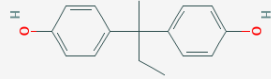
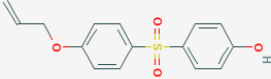
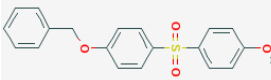
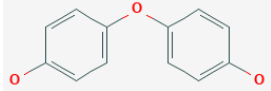
Dans la présente étude, l'objectif était de renseigner d'une part de la toxicité aiguë et développementale d'un ensemble de bisphénols et d'autre part de leurs activités œstrogéniques potentielles ainsi que de leurs modes d'action à l'échelle cellulaire et des individus.

Dans cet optique, nous avons mis en place une stratégie originale combinant deux tests *in vivo* sur embryons de poisson zèbre qui ont été validés au niveau international (test FET et test EASZY) et un test *in vitro* sur des hépatocytes de poisson zèbre exprimant stablement les récepteurs des œstrogènes de poisson zèbre (lignée ZFL-zfERs) afin d'évaluer les dangers d'un ensemble de onze bisphénols. Cette stratégie repose donc sur des tests qui visent à apporter des informations complémentaires sur les dangers des substances tout informant des mécanismes d'actions des substances à l'échelle moléculaire, cellulaire et des embryons.


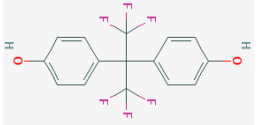
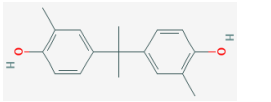
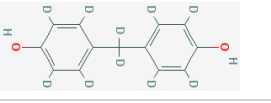
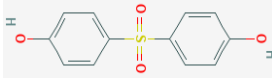
### 3.1. Bisphénols sélectionnés

Dans cette étude, les onze molécules retenues comprenaient :

- Six bisphénols pour lesquels il existait un déficit d'information relatif à leurs toxicités et leurs activités oestrogéniques :

Chemical	CAS no	MW (g/mol)	Structure	Origin	Purity (%)	Use
Tetrachlorobisphenol A	79-95-8	366.07		abcr	98	Industrial
Bisphenol C Chloride	14868-03-2	281.3		Sigma-Aldrich	98	Industrial
Bisphenol B	77-40-7	242.312		Sigma-Aldrich	98	Industrial
BPS-MAE	97042-18-7	290.33		Ark Pharm, Inc.	96	Industrial
BPS-MPE	63134-33-8	340.4		Santa Cruz Biotechnology	95	Industrial
4-4'oxydiphenol	1965-09-9	202.206		tci europe n.v.	98	Industrial

- Cinq bisphénols dont les activités oestrogéniques avaient été préalablement renseignées (Le Fol *et al.*, 2017 ; Pinto *et al.*, 2019).

Chemical	CAS no	MW (g/mol)	Structure	Origin	Purity (%)	Use
Bisphenol A	80-05-7	228.29		Sigma-Aldrich	99	Industrial
Bisphenol AF	1478-61-1	336.23		Sigma-Aldrich	99	Industrial
Bisphenol C	79-97-0	256.34		Sigma-Aldrich	97	Industrial
Bisphenol F	620-92-8	200.24		Sigma-Aldrich	98	Industrial
Bisphenol S	80-09-1	250.27		Sigma-Aldrich	98	Industrial

## 3.2. Stratégie de tests *in vivo* et *in vitro* chez le poisson zèbre

### 3.2.1. Tests *in vivo* sur embryon de poisson zèbre

#### 3.2.1.1. FET-raffiné

Dans un premier temps, chaque bisphénol a été testé en concentration-réponse dans le test FET conformément à la ligne directrice de l'OCDE (OCDE 236) afin de déterminer les concentrations induisant 50 % de mortalité (CL50). Les embryons nouvellement fertilisés ont été exposés dans des microplaques 24 puits durant 96 heures avec un renouvellement quotidien des milieux d'essais et l'analyse de critères de mortalité à 8, 24, 48, 72 et 96 heures d'exposition. Des observations complémentaires de dix critères phénotypiques (e.g., malformations cardiaques, œdèmes périvitellin, œdèmes péricardiques, mouvements spontanés, pigmentations, etc) ont été réalisées également quotidiennement afin d'évaluer les effets développementaux des bisphénols et d'identifier des molécules potentiellement tératogènes.

L'originalité du test FET réalisé dans le cadre de cette étude résidait dans l'utilisation d'embryons de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1b-GFP* (qui sont également utilisé dans le test EASZY) ce qui nous a permis de réaliser des observations complémentaires par imagerie en fluorescence et ainsi acquérir des informations préliminaires sur le potentiel oestrogénique des substances.

#### 3.2.1.2. Test EASZY

Dans un second temps, chaque molécule a été évaluée dans le test EASZY conformément à la ligne directrice (ligne directrice en cours d'adoption) en exposant des embryons de poisson zèbre transgéniques *cyp19a1b-GFP* nouvellement fertilisés durant 96 heures à des concentrations choisies sur la base des résultats du test FET, i.e. des concentrations ne provoquant ni mortalité ni altération du développement. Les milieux d'essais ont été renouvelé quotidiennement. La survie et l'éclosion des embryons ont également été analysés chaque jour. En fin d'essai, le cerveau de chaque embryon a été imagé l'aide d'un microscope à épifluorescence de manière non invasive afin de pouvoir quantifier l'intensité de fluorescence émise.

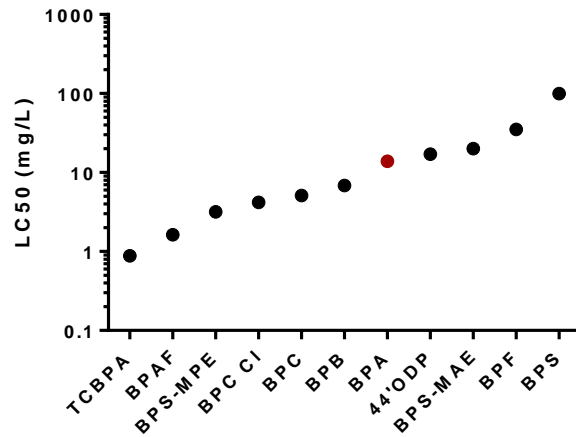
### 3.2.2. Tests *in vitro*

Enfin, les tests *in vivo* ont été complété par des tests *in vitro* sur lignée ZFL-zfERs. Il s'agit d'une lignée hépatique de poisson zèbre qui exprime de manière stable un rapporteur luciférase sous le contrôle d'éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) et les différents sous type des récepteurs des œstrogènes de poisson zèbre. Ce modèle permet d'apporter des informations mécanistiques supplémentaires sur les interactions des molécules avec les récepteurs des œstrogènes de poisson zèbre.

## 4. Les substituts du BPA présentent des toxicités variables et induisent des effets développementaux variés

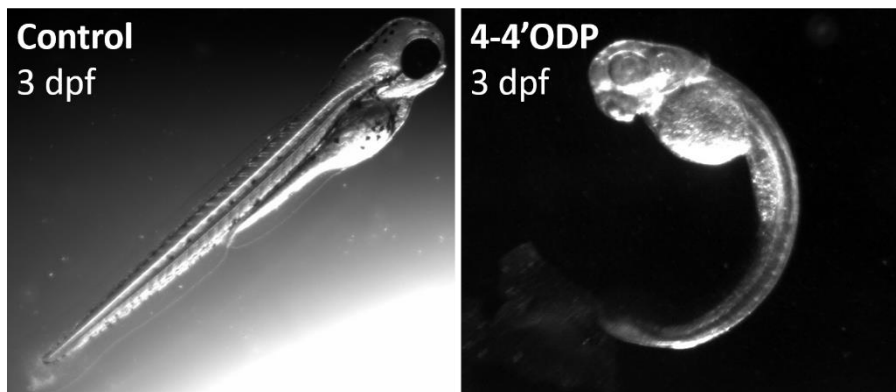
A l'issu des tests FET, les données de CL50 obtenues montraient que les bisphénols présentaient des toxicités aiguës variables depuis des substituts très toxiques (CL <1 mg/L) à des molécules non toxiques (CL50 >100 mg/L). **La figure 1** illustre la toxicité comparée des bisphénols chez les embryons de poisson zèbre.

Comparativement au BPA (CL50 = 13,8 mg/L), six substituts (TCBPA, BPAF, BPS-MPE, BPC CL, BPC, BPB) présentaient des niveaux de toxicité plus importants, deux substituts présentaient des toxicités comparables au BPA (BPS MAE, 4,4'oxydiphenol) et deux autres substituts des niveaux de toxicité faible (BPF, BPS).



**Figure 1.** Concentrations induisant 50 % de mortalité (LC50) chez les embryons de poisson zèbre *cyp19a1b-GFP* exposés aux différents bisphénols dans le test FET

En outre, les observations de critères phénotypiques associés au développement des embryons ont permis de démontrer que les bisphénols étaient capables d'induire un ensemble d'anomalies du développement dont certaines sont fréquemment observées quel que soit la molécule considérée (**Figure 2**). De manière remarquable, la majorité des substituts se caractérisaient par une altération importante de la pigmentation, qui se manifestait pour certains d'entre eux par une absence totale de pigment des embryons exposés (**Figure 2**) qui pourrait refléter une perturbation de la voie de biosynthèse de la mélanine (Cao et al., 2018; Oh et al., 2018; Mu et al., 2020).



**Figure 2.** Imagerie en lumière transmise montrant les effets d'un substitut du BPA, le 4,4' oxydiphénol (4-4'ODP), sur le développement d'un embryon de poisson zèbre qui se manifeste par des malformations de la colonne vertébrale et une altération de la pigmentation.

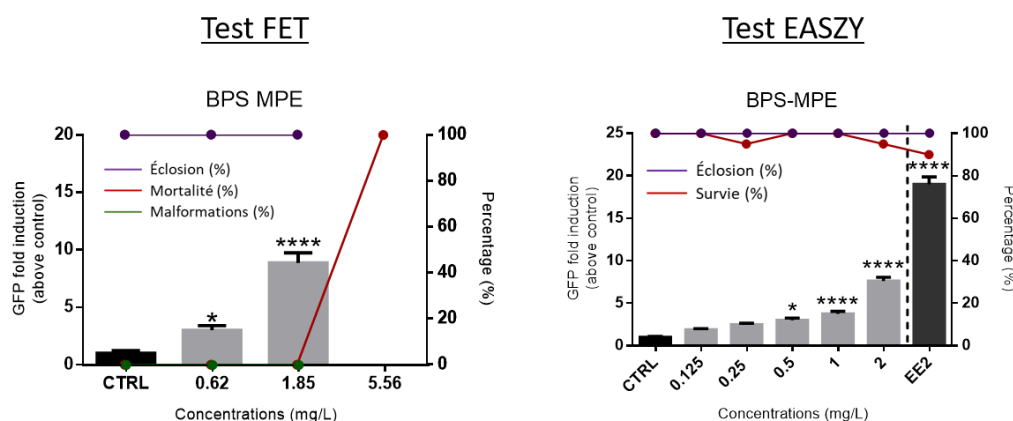
Ces effets développementaux s'opéraient à des intensités et des concentrations variables selon les substituts étudiés. Le ratio entre les CL50 et les concentrations les plus faibles induisant ces effets phénotypiques nous ont permis de dériver un indice de tératogénicité et d'identifier certains substituts du BPA comme potentiellement tératogènes (i.e. BPC Cl, 4-4'ODP, BPS-MAE, BPF).

## 5. L'ensemble des substituts du BPA, à l'exception du TCBPA, sont oestrogéniques chez les embryons de poisson zèbre

En plus de fournir de nouvelles informations pertinentes sur la toxicité des bisphénols testés, l'utilisation d'embryons transgéniques dans le test FET raffiné nous a permis d'acquérir des informations préliminaires sur leur activité oestrogénique potentielle. Ainsi, les données d'imagerie en fluorescence acquises en fin de test FET révélaient que la majorité des bisphénols, à l'exception du TCBPA, était capable d'induire la GFP sous le contrôle du promoteur du gène ER-régulé *cyp19a1b-GFP*. Cette activité oestrogénique a été ensuite investiguée plus en détail en effectuant des courbes concentration-réponses complètes dans le test EASZY.

Les expositions d'embryons de poisson zèbre au BPA et aux substituts du BPA conduisaient à des inductions concentration-dépendantes de la GFP dans le cerveau des embryons au cours du développement. La **figure 3** illustre par exemple l'effet du BPS MPE sur l'expression de la GFP chez les embryons transgéniques. Seul le TCBPA ne présentait pas d'activité oestrogénique confirmant ainsi les données préliminaires issues du test FET.

Différents profils d'induction ont été observés, certains composés induisant des réponses avec un niveau d'induction maximal similaire à celui observé chez les embryons exposés au 17 $\alpha$ -éthynylestradiol à 14,8 ng / L (utilisé comme témoin positif) tandis que d'autres induisaient la GFP à des taux d'inductions plus faibles.



**Figure 3.** Expression de la GFP (histogrammes) chez les embryons *cyp19&B-GFP* mesurée après 96 heures d'exposition au BPS-MPE dans le test FET (courbe concentration-réponse partielle) et dans le test EASZY (courbe concentration-réponse complète). Les inductions concentration-dépendantes de la GFP témoignent de l'activité oestrogénique du bisphénol. Les taux d'éclosion, de mortalité ou de survie sont indiqués par les courbes.

Sur la base des profils de réponses obtenues dans les tests EASZY, les concentrations induisant 50 % d'effet (CE50) ont été dérivées pour chaque bisphénol, permettant ainsi de les classer en fonction de leur activité oestrogénique dans le test depuis la molécule la plus active (BPC CI) à la molécule la moins active (BPS). En se basant sur les CE50, il est remarquable de constater que sept des bisphénols actifs dans le test EASZY présentaient une activité oestrogénique plus importante que le BPA.

Au bilan, les tests EASZY nous ont permis d'identifier dix molécules actives parmi les onze testées, de renseigner pour la première fois l'activité oestrogénique *in vivo* de cinq d'entre elles et enfin de démontrer que de nombreuses molécules substitutives sont plus actives que le BPA dans les modèles utilisés dans cette étude.

## 6. L'activité oestrogénique des bisphénols implique une interaction directe ou indirecte avec les récepteurs des œstrogènes

Pour aller plus loin dans la caractérisation des modes d'action des molécules, l'activité œstrogénique des onze bisphénols a été évaluée *in vitro* dans une lignée cellulaire de poisson zèbre (ZFL) exprimant de manière stable les récepteurs des œstrogènes de poisson zèbre ER $\alpha$  ou ER $\beta$ 2 et le gène de la luciférase sous dépendance des éléments de réponses aux œstrogènes (ERE-LUC).

Les résultats obtenus montraient que l'ensemble des bisphénols était capable d'induire l'activité luciférase en présence des différents sous-types des récepteurs ER de poisson zèbre à l'exception notable de trois des bisphénols testés, i.e. le TCBPA, le BPS-MAE et le BPA-MPE. Ainsi pour la majorité des bisphénols testés, leurs capacités à agir comme des ligands agonistes des récepteurs ERs de poisson zèbre étaient démontrées à l'échelle cellulaire étayant ainsi leur propriété œstrogène-mimétique et les effets observés *in vivo*. De même l'absence de transactivation des récepteurs ERs par le TCBPA confirmait l'absence d'activité oestrogénique de cette molécule.

Par contre, des différences notables ont été observées entre les réponses obtenues dans la lignée cellulaire et dans les embryons de poisson zèbre pour le BPS-MAE et le BPS-MPE (**Tableau 1**).

**Tableau 1.** Synthèse des données sur l'activité oestrogénique des bisphénols dans les tests *in vitro* de transactivation des récepteurs *zFER $\alpha$*  et *zFER $\beta$ 2* et *in vivo* chez les embryons *cyp19a1b-GFP* (test EASZY). Les cellules de couleur verte témoignent de l'absence d'activité oestrogénique dans le test considéré ; les cellules en rouge indiquent une activité oestrogénique. On notera une très bonne concordance des données *in vitro* et *in vivo* à l'exception de deux bisphénols pour lesquels les activités oestrogéniques ne sont révélées que dans le test *in vivo*.

Bisphénols	Activation du <i>zFER<math>\alpha</math></i> <i>in vitro</i>	Activation du <i>zFER<math>\beta</math>2</i> <i>in vitro</i>	Activité oestrogénique <i>in vivo</i> (EASZY)
TCBPA	-	-	-
BPAF	+	+	+
BPS-MPE	-	-	+
BPC CI	+	+	+
BPC	+	+	+
BPB	+	+	+
BPA	+	+	+
4-4'oxydiphénol	+	+	+
BPS-MAE	-	-	+
BPF	+	+	+
BPS	+	+	+

En effet, ces deux bisphénols n'induisaient aucune réponse significative dans les tests *in vitro* sur les cellules ZFL alors qu'ils induisaient l'expression de la GFP chez les embryons dans le test EASZY. De telles différences entre les réponses *in vitro* et *in vivo* ont déjà été observées dans le cadre d'autres études réalisées au laboratoire pour des molécules qualifiées de pro-oestrogéniques c'est-à-dire nécessitant d'être métabolisées avant d'induire une réponse oestrogénique. Ainsi, les réponses oestrogéniques spécifiquement obtenues dans le test EASZY pour le BPS-MAE et le BPS-MPE reflètent très probablement des différences d'activation métabolique de ces deux substances dans les modèles *in vitro* et *in vivo* soulignant la nécessité de considérer les réponses des organismes entiers pour informer de manière fiable sur l'activité endocrinienne des substances.

## 7. Bilan et Perspectives

Dans le cadre de cette étude, les effets toxiques, développementaux ainsi que les activités oestrogéniques de onze bisphénols dont le BPA ont été investiguées à l'aide d'une stratégie de tests combinant des tests *in vivo* chez les embryons de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1b-GFP* (test FET et test EASZY) et des tests *in vitro* sur la lignée hépatique ZFL-ZfERs.

Cette stratégie s'est avérée efficace pour 1) déterminer la toxicité des molécules 2) étudier leurs effets développementaux 3) renseigner de leur activité oestrogénique *in vivo* et de leur mécanisme d'action vis-à-vis de la signalisation oestrogénique dans un modèle de vertébré aquatique, le poisson zèbre.

Cette stratégie nous a permis d'apporter des informations nouvelles et pertinentes sur les dangers d'un ensemble de substituts du BPA en démontrant que parmi les substituts testés la majorité 1) sont plus toxiques que le BPA 2) induisent des effets développementaux marqués, sur la pigmentation en particulier et 3) présentent des activités oestrogéniques plus importantes que le BPA dans les tests *in vitro* et *in vivo* utilisés dans cette étude.

Bien que des données soient actuellement manquantes ou parcellaires sur les effets potentiels des substituts testés sur la fonction de reproduction (e.g., nombre d'œufs pondus par femelle), il est raisonnable de penser, sur la base des informations obtenues dans cette étude, qu'ils puissent engendrer des altérations de la fonction de la reproduction par suite de perturbations du système endocrinien et ce à des niveaux d'expositions inférieurs à ceux du BPA.

Cette étude démontrait également des effets précoces des bisphénols dans le cerveau au cours du développement embryonnaire, comme révélé par les inductions de l'expression du gène *cyp19a1b*, dont les effets toxicologiques à court et à long terme doivent être explorés plus avant via, par exemple, la mise en place de tests comportementaux chez les poissons zèbres.



## 8. Références bibliographiques

- Brion, F., Y. Le Page, B. Piccini, O. Cardoso, S. K. Tong, B. C. Chung and O. Kah (2012). "Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos." *PLoS One* 7(5): e36069.
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H.L., Zheng, Z.G., Feng, Y.L., Wu, Y., Widelka, M., (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environmental Science and Technology* **50**, 5438-5453.
- Cao, D., Gong, S., Yang, J., Li, W., Ge, Y., & Wei, Y. (2018). Melanin deposition ruled out as cause of color changes in the red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) Part B Biochemistry & molecular biology. *Comparative biochemistry and physiology*, 217, 79-85. doi: [10.1016/j.cbpb.2017.12.011](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.12.011)
- Cosnefroy, A., F. Brion, E. Maillot-Marechal, J. M. Porcher, F. Pakdel, P. Balaguer and S. Ait-Aïssa (2012). "Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line." *Toxicological Sciences* 125(2): 439-449
- Cesen, M., Lenarcic, K., Mislej, V., Levstek, M., Kovacic, A., Cimrmancic, B., Uranjek, N., Kosjek, T., Heath, D., Dolenc, M.S., Heath, E., (2018). The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. *Science of the Total Environment* **616-617**, 744-752.
- Grimaldi M, Boulahtouf A, Toporova L, Balaguer P (2019). Functional profiling of bisphenols for nuclear receptors. *Toxicology*, volume 420, 39-45
- INERIS, Bisphenols F et S (et autres) (2015). Données Technico-économiques sur les substances chimiques en France. DRC-14-136881-02238A 2015. Version Avril 2015
- INERIS, Draft report of the phase 2 Validation study of the EASZY assay. DRC-18-170858-09084A
- Le Fol V, Aït-Aïssa S, Sonavane M, Porcher JM, Balaguer P, Cravedi JP, Zalko D, Brion F (2017) In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142:150–156
- Michalowicz, J., (2014). Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 738-758.
- Mu X, Liu J, Yuan L, Huang Y, Qian L, Wang C. The pigmentation interference of bisphenol F and bisphenol A. *Environ Pollut.* 2020 Nov;266(Pt 1):115139. doi: [10.1016/j.envpol.2020.115139](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115139). Epub 2020 Jul 4. PMID: 32663677.
- NTP-NIEHS, (2008). Chemical Information Profile for Bisphenol AF.
- OCDE (2018), Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, n° 150, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J., Tyler, C.R., (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2047-2062.
- Oh, J.; Kim, J.; Jang, J.H.; Lee, S.; Park, C.M.; Kim, W.-K.; Kim, J.-S. Novel (1E,3E,5E)-1,6-bis(Substituted phenyl)hexa-1,3,5-triene Analogs Inhibit Melanogenesis in B16F10 Cells and Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 1067.
- Pinto, C., M. Grimaldi, A. Boulahtouf, F. Pakdel, **F. Brion**, S. Aït-Aïssa, V. Cavallès, W. Bourguet, J.-A. Gustafsson, M. Bondesson and P. Balaguer (2014). "Selectivity of natural, synthetic and environmental estrogens for zebrafish estrogen receptors." *Toxicology and Applied Pharmacology* **280**(1): 60-69.
- Pinto C, Hao R, Grimaldi M, Thrikawala S, Boulahtouf A, Aït-Aïssa S, Brion F, Gustafsson J-A, Balaguer P, Bondesson M (2019). Differential activity of BPA, BPAF and BPC on zebrafish estrogen receptors in vitro and in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 380, 114709.
- Pelch KE, Li Y, Perera L, Thayer KA , KorachKS (2019) Characterization of Estrogenic and Androgenic Activities for Bisphenol A-like Chemicals (BPs): In Vitro Estrogen and Androgen Receptors Transcriptional Activation, Gene Regulation, and Binding Profiles *Toxicological Sciences*, Volume 172, 23–37,

- Rochester, J.R., (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology* 42, 132-155.
- Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H., Jiang, G., (2014). Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 112, 275-281.
- Sun, Q., Wang, Y., Li, Y., Ashfaq, M., Dai, L., Xie, X., Yu, C.P., (2017). Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *Environmental Pollution* 225, 542-549.
- Yamaguchi A, Ishibashi H, Arizono K, Tominaga N (2015). In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka (*Oryzias latipes*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*;120:198-205. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.06.014.
- Yang, X, Liu Y, Chen M, Peng D, Liang Y, Song M, Zhang J, Jiang G (2014) Exposure to Bisphenol AF disrupts sex hormone levels and vitellogenin expression in zebrafish. *Environmental Toxicology*