



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/
Eprints ID : 15880](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 15880)

To cite this version :

Puthon, Morgane. *Caractérisation de l'élimination du bisphénol A et de ses formes conjuguées par la fœtus ovin*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 82 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

CARACTERISATION DE L'ELIMINATION DU BISPHENOL A ET DE SES FORMES CONJUGUEES PAR LE FŒTUS OVIN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

PUTHON Morgane

Née, le 30 décembre 1990 à Cluses (74)

Directeur de thèse : Mme Véronique GAYRARD

JURY

PRESIDENT :
M. Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Véronique GAYRARD
Mme Nicole HAGEN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. Alain MILON

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1^o
CLASSE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2^o
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

**PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**N. MAITRES DE CONFERENCES
HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

**M. MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS
CONTRACTUELS**

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*
M. **HERRY Vincent**, *Pathologie des ruminants*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*

Remerciements

Aux membres du jury de thèse :

A Monsieur Jean PARINAUD

De l'Université Paul Sabatier,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.
Hommage respectueux.

A Madame Véronique Gayrard-Troy

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Qui m'a guidée tout au long de l'élaboration de ce travail.
Pour sa disponibilité, sa patience et ses précieux conseils.
Sincères remerciements.

A Madame Nicole Hagen-Picard

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Qui a aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.
Pour sa disponibilité et ses précieux conseils.
Sincère reconnaissance.

Et également :

A Monsieur Adrien Levasseur

Diplômé d'un master en sciences de la vie et de la santé
Qui a largement participé à l'élaboration de ce travail.
Sincère reconnaissance.

Table des matières

Introduction	17
I. Etude bibliographique	19
<i>I.1. Le Bisphénol A : pourquoi et comment est-il utilisé ?</i>	20
I.1.1. Diverses utilisations	20
I.1.2. Réglementations relatives à l'utilisation du Bisphénol A	22
I.1.3. L'utilisation du Bisphénol A est-elle dangereuse pour l'Homme ?	26
<i>I.2. Devenir du Bisphénol A dans l'organisme</i>	28
I.2.1. Métabolisme du Bisphénol A	28
I.2.2. Liaison aux protéines plasmatiques	30
I.2.3. Elimination du Bisphénol A	31
<i>I.3. Contamination et exposition humaine au Bisphénol A</i>	32
I.3.1. Comment se fait la contamination ?	32
I.3.2. Quelle est l'exposition actuelle de la population humaine ?	34
I.3.3. Y-a-t'il une augmentation de l'exposition au Bisphénol A au cours de la gestation ? ...	38
<i>I.4. Devenir du Bisphénol A dans l'organisme : cas particulier de la gestation</i>	39
I.4.1. Métabolisme du Bisphénol A dans l'organisme maternel en gestation	39
I.4.2. Métabolisme du Bisphénol A par le fœtus	40
I.4.3. Transfert placentaire et élimination fœtale du Bisphénol A et de ses métabolites	41
<i>I.5. Contexte de notre étude</i>	43
I.5.1. Choix du modèle ovin	43
I.5.2. Objectifs de l'étude	44

II.	Matériel et méthodes.....	46
	<i>II.1. Animaux et chirurgie.....</i>	<i>46</i>
	<i>II.2. Préparation des solutions et traitement des animaux</i>	<i>48</i>
	<i>II.3. Plan expérimental</i>	<i>49</i>
	II.3.1. Etude pilote	50
	II.3.2. Etude expérimentale.....	51
	<i>II.4. Prélèvements et traitement des échantillons</i>	<i>51</i>
	II.4.1. Traitements des échantillons sanguins collectés.....	51
	II.4.2. Traitements des échantillons urinaires collectés.....	52
	II.4.3. Traitements des échantillons tissulaires et des fluides fœtaux collectés.....	52
	<i>II.5. Dosage du BPA et de ses métabolites</i>	<i>53</i>
	<i>II.6. Analyses des données</i>	<i>54</i>
	II.6.1. Analyses des données fœtales.....	54
	II.6.2. Analyses des données maternelles.....	55
III.	Résultats	56
	<i>III.1. Impact des traitements sur les paramètres physiologiques du fœtus</i>	<i>56</i>
	<i>III.2. Evaluation des doses de BPA et de BPA-G perfusées aux fœtus.....</i>	<i>56</i>
	<i>III.3. Exposition fœtale au Bisphénol A et à ses métabolites</i>	<i>56</i>
	<i>III.4. Analyse des données plasmatiques maternelles.....</i>	<i>59</i>
	<i>III.5. Clairances plasmatiques fœtales.....</i>	<i>61</i>
	<i>III.6. Analyse des données urinaires maternelles</i>	<i>63</i>
	<i>III.7. Biodistribution du BPA et de ses métabolites</i>	<i>66</i>
IV.	Discussion.....	70
	Conclusion.....	74
	Bibliographie	77

Liste des illustrations

- *Liste des figures*

<u>Figure 1</u> : Domaines d'utilisation des polycarbonates (Source : Fédération de la plasturgie, 2011).....	1
9	
<u>Figure 2</u> : Domaines d'application des résines époxydes (Source : Plastics Europe, 2007).....	20
<u>Figure 3</u> : Evolution des réglementations européenne et française autour du BPA au cours des dix dernières années.....	23
<u>Figure 4</u> : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (la forme conjuguée retrouvée majoritairement chez l'Homme est le BPA-G).....	24
<u>Figure 5</u> : Les différents cas de figure à l'origine de l'exposition interne humaine au BPA (évaluation de l'Anses en 2013, relative aux risques liés au BPA pour la santé humaine).....	32
<u>Figure 6</u> : Concentrations urinaires en BPA total rapportées dans la littérature pour des études publiées entre 2001 et 2012 (Anses, 2013).....	34
<u>Figure 7</u> : Contribution de différentes voies d'exposition à la dose interne totale en BPA pour les femmes enceintes (compartiment aérien, poussières et alimentation) d'après le rapport de l'Anses (2013).....	37
<u>Figure 8</u> : Représentation schématique du protocole expérimental mis en place au cours des études pilote et expérimentale.....	48
<u>Figure 9</u> : Brebis munie du dispositif de perfusion relié au cathéter fœtal.....	49
<u>Figure 10</u> : Evolution des concentrations plasmatiques maternelles de BPA, BPA-G et BPA-S au cours de la perfusion IV fœtale de BPA à la dose de 31.3mg/(kg.j) (une brebis).....	58
<u>Figure 11</u> : Evolution des concentrations plasmatiques maternelles en BPA-G au cours de la perfusion IV fœtale de BPA à des doses comprises entre 3.6 et 6.2mg/(kg.j) (4 brebis).....	59
<u>Figure 12</u> : Evolution des quantités de BPA-G recueillies dans les urines maternelles des brebis dont le fœtus a reçu une perfusion de BPA-G aux doses de 1, 8 et 10mg/(kg.j) ou de BPA aux doses de 0.9, 6 et 31mg/(kg.j).....	62

- *Liste des tableaux*

<u>Tableau 1</u> : Caractéristiques du BPA et conséquences physiologiques.....	18
<u>Tableau 2</u> : Notions et valeurs définies par les autorités sanitaires européennes nécessaires à la compréhension de la réglementation concernant l'utilisation et l'exposition du BPA.....	21
<u>Tableau 3</u> : Effets avérés et suspectés du BPA sur la santé respectivement animale et humaine (Anses, 2013)	26
<u>Tableau 4</u> : Clairances plasmatiques du BPA chez la souris, l'humain et la brebis.....	30
<u>Tableau 5</u> : Ordres de grandeur des niveaux d'exposition des adultes, enfants et nourrissons au BPA selon le rapport préliminaire sur les effets du BPA sur la santé (Inserm, 2010).....	36
<u>Tableau 6</u> : Pourcentage des clairances placentaires et non placentaires du BPA par rapport aux clairances maternelles et fœtales.....	41
<u>Tableau 7</u> : Concentrations moyennes en ng/mL de BPA, BPA-G et BPA-S dans le plasma fœtal obtenues au cours de la perfusion IV fœtale de BPA ou de BPA-G pendant 72h à différentes doses.....	56
<u>Tableau 8</u> : Aires sous la courbe des concentrations plasmatiques maternelles (AUC_{0-72h}) en BPA-G obtenues au cours des perfusions IV fœtales de BPA, quantités totales de BPA perfusées aux fœtus (dose tot) et quantités correspondantes de BPA éliminées dans les urines maternelles (Xu).....	59
<u>Tableau 9</u> : Clairance plasmatique fœtale du BPA (Cl-BPA) et du BPA-G (Cl-BPA-G), obtenues au cours de la perfusion IV de BPA ou de BPA-G.....	60
<u>Tableau 10</u> : Quantités de BPA-G, BPA-S et BPA total (BPA _{tot}) éliminées dans les urines maternelles au cours de la perfusion fœtale de BPA ou de BPA-G	63
<u>Tableau 11</u> : Concentrations de BPA, BPA-G et BPA-S dans les tissus des fœtus de l'étude pilote.....	65
<u>Tableau 12</u> : Moyennes des ratios des concentrations tissulaires en BPA ou BPA-G en nmol/g de tissu sur la dose de BPA ou de BPA-G reçue en nmol/kg de poids corporel (n = nombre d'individus pris en compte pour le calcul de la moyenne / $[BPA] = \text{concentration tissulaire en BPA} / [BPA-G] = \text{concentration tissulaire en BPA-G}$).....	67

Liste des acronymes et abréviations

Anses : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments, de l'Environnement et du Travail

AUC : Area Under Curve = Aire sous la courbe

BPA : Bisphénol A

BPA-G : Bisphénol A-Glucuronide

BPA-S : Bisphénol A-Sulfate

CEE : Communauté Economique Européenne

DJA : Dose Journalière Admissible

EFSA : European Food Safety Authority – Agence européenne de sécurité des aliments

IM : Intra Musculaire

Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IV : Intra Veineuse

LMS : Limite de Migration Spécifique

LOQ : Limit Of Quantification - Limite de quantification

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level

p.c. : Poids Corporel

REACH : enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques

SC : Sous Cutané

SHBG : Sex Hormone-Binding Globulin

UGT : Uridine diphosphate-Glucuronyl-Transférase

VO : Voie Orale

Introduction

Parmi les sujets qui préoccupent les consommateurs quant à leur santé, le Bisphénol A (BPA) en est un qui anime les polémiques. Il est à ce sujet possible d'entendre dire que « de nombreuses études prouvent que le BPA est dangereux mais elles sont ignorées », que « les études financées par l'industrie ne sont pas objectives et ne devraient pas être à la base de décisions réglementaires », que « le BPA rend les hommes stériles »... Parmi ces déclarations, que faut-il croire ? Lesquelles tiennent de la réalité ou de l'idée reçue ? Que connaissons-nous de cette substance ? Comment les autorités sanitaires gèrent-elles l'utilisation de ce produit ? Pour le comprendre, il est nécessaire de définir ce qu'est le BPA, comment il interagit avec l'organisme et ses dangers.

Le BPA est un composé largement utilisé dans l'industrie du plastique. Son utilisation était réglementée au niveau européen en tant que reprotoxique de catégorie 3, c'est-à-dire jugée « *préoccupante pour la fertilité de l'espèce humaine* » en raison « *d'effets toxiques possibles* » mais non démontrés sur la reproduction. Il se distinguait alors des substances de catégories 1 et 2 dont les effets néfastes sur la santé humaine sont avérés (directive européenne 67/548/CEE relative à la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances dangereuses). Or, depuis 2014, l'agence européenne des substances chimiques a délivré un avis favorable à la proposition de l'Anses concernant le classement du BPA en tant que substance toxique pour la reproduction de catégorie 1 (www.anses.fr).

Le BPA est un produit chimique d'origine industrielle libéré dans notre environnement qui présente une activité hormonale potentielle ou qui peut induire une perturbation hormonale dans un organisme intact ; il est, à ce titre, qualifié de « perturbateur endocrinien » (Vandenberg et al., 2012). Ces derniers, en interférant avec le fonctionnement normal du système endocrinien peuvent exercer une toxicité même à de très faibles doses par le biais, notamment, de l'interaction entre le xénobiotique et le récepteur hormonal (Triendl et al., 2001). L'hypothèse émise par plusieurs groupes de chercheurs est, que l'exposition à un perturbateur endocrinien pendant la période critique du développement embryonnaire et fœtale ou des premiers jours de vie postnataux, peut être à l'origine d'altérations fonctionnelles et morphologiques à l'âge adulte. Ces dernières peuvent conduire à des altérations de la croissance, de la reproduction et du développement.

L'exposition aux perturbateurs endocriniens tels que le Bisphénol A est suspectée d'être à l'origine de l'augmentation de l'incidence de troubles pathologiques et d'altération de la fertilité.

Les effets suspectés du BPA reposent principalement sur des observations expérimentales utilisant des rongeurs, qui mettent en évidence des effets néfastes du BPA à des doses inférieures à la dose journalière admissible (EFSA, 2006) chez des animaux exposés *in utero* au BPA. Ces résultats sont à l'origine de la controverse actuelle autour de ce xénoestrogène et de ses éventuels effets sur la santé humaine. Les agences mondiales sont confrontées à d'importantes difficultés pour donner un avis univoque sur le risque pour la santé humaine lié à l'exposition au Bisphénol A, ce qui rend difficile la prise de décision réglementaire par les autorités. En outre, l'exposition fœtale humaine pour des expositions maternelles environnementales au BPA est peu connue, ce qui limite considérablement l'évaluation du risque pour le fœtus.

Pour répondre à cette problématique, il a été développé par l'équipe gestation Perturbateurs endocriniens de Toxalim un modèle intégratif fondé sur des considérations physiologiques : le modèle *in vivo* du fœtus ovin instrumenté qui autorise la réalisation de perfusions et de prélèvements sanguins du côté fœtal et du côté maternel. Ce modèle a permis de montrer que, suite à une administration maternelle de BPA, le ratio des concentrations plasmatiques en BPA entre les circulations fœtales et maternelles est de l'ordre de 0.5 alors que les activités métaboliques de l'unité foeto-placentaire conduisent à la formation de composés glucurono*- (BPA-G) et sulfo-conjugués (BPA-S) qui s'accumulent dans les fluides fœtaux en raison d'un défaut de passage transplacentaire, conduisant à un ratio des concentrations plasmatiques en BPA-G entre les circulations fœtales et maternelles de l'ordre de 10 (Corbel et al., 2013). Ce résultat soulève la question des mécanismes d'élimination du BPA-G à partir de l'unité foeto-placentaire et de l'implication de l'hydrolyse potentielle du BPA-G dans ce processus d'élimination. En effet, une étude *ex vivo* récemment réalisée au laboratoire a mis en évidence une hydrolyse du BPA-G au niveau des tissus fœtaux et du placenta (Corbel et al., 2015).

L'étude à laquelle j'ai participé visait à caractériser l'exposition des organismes maternels et fœtaux au BPA et à ses métabolites ainsi que les modalités de leur élimination. L'objectif ultime était de tester l'hypothèse de la réactivation *in vivo* des métabolites inactifs du BPA au niveau des tissus fœtaux et d'évaluer son impact sur l'exposition fœtale au BPA.

Dans une première partie, les connaissances actuelles concernant le BPA seront présentées, notamment, sa large utilisation, ainsi que la réglementation qui s'y rattache. Ensuite, seront traités l'exposition humaine et le métabolisme du BPA, en détaillant tout particulièrement la période de la gestation. Dans un second temps, seront détaillées les études expérimentales concernant les modalités des expositions fœtale et maternelle au BPA et à ses métabolites à la suite de perfusions fœtales en BPA et BPA-G. Les résultats obtenus seront alors interprétés, et la possibilité de réactivation des métabolites en BPA actif dans l'organisme fœtal sera discutée.

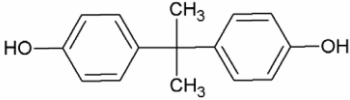
I. Etude bibliographique

Le Bisphénol A (BPA) ou 4-4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane a été synthétisé pour la première fois il y a plus de cent ans par un chimiste russe, nommé A. Dianin, dans le cadre de la recherche d'œstrogènes de synthèse à visée thérapeutique (Dodds et al. 1936). Ses propriétés œstrogène-mimétiques ont été mises en évidence dès la fin du XIXe siècle, mais il n'a jamais été utilisé en tant que tel.

Depuis plus de 50 ans, le BPA est synthétisé par catalyse acide de deux phénols avec une cétone et polymérisé pour la fabrication de matières plastiques de type polycarbonate et de résines époxydes principalement. Ce n'est pas un additif du plastique, mais un composant essentiel de ce dernier. D'après le groupe Plastics Europe (Association des Industries Plastiques en Europe, www.bisphenol-a-europe.org), 99% du BPA est transformé en polymères, le reste étant utilisé sous forme non polymérisée en tant qu'antioxydants ou agents actifs.

Le BPA se présente sous la forme d'une molécule de petite taille, lipophile et non ionisée dans l'intervalle des pH physiologiques comme le confirment ses caractéristiques physicochimiques (Tableau 1). Ces dernières confèrent au BPA la capacité de traverser les membranes plasmiques des cellules d'un organisme, et de se distribuer ainsi aux différents organes.

Tableau 1 : Caractéristiques du BPA et conséquences physiologiques.

Propriétés	Données concernant le BPA	Conséquences
Structure chimique		} Molécule de petite taille
Formule chimique brute	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	
Masse molaire	228.28 g/mol	
Coefficient de partage octanol/eau (log K _{ow})	3.4 (2.20-4.16)	} Molécule hydrophobe et relativement lipophile
Solubilité dans l'eau	120-300 mg/L à pH 7	
Constante d'ionisation (pK _a)	9.73 (9.6-10.2)	→ Molécule non ionisée à pH physiologique
Coefficient de répartition (sang/plasma)	0.67-1.1	→ Molécule partiellement liée aux protéines plasmatiques

1.1. Le Bisphénol A : pourquoi et comment est-il utilisé ?

1.1.1. Diverses utilisations

Le Bisphénol A est présent dans de très nombreux produits utilisés au quotidien par l'Homme. Selon les données fournies par l'industriel Plastics Europe, la production mondiale est supérieure à 3 millions de tonnes par année et d'après les données de 2005 et 2006, 1.15 millions de tonnes de BPA sont utilisées par an au sein de l'Union Européenne.

Sa très forte production et utilisation vient du fait qu'il peut être utilisé sous différentes formes (Figures 1 et 2), telles que :

- **les polycarbonates**

Ils représentent plus de deux tiers de l'utilisation totale du BPA. Ils constituent un plastique très polyvalent, durable, transparent, qui résiste à la chaleur et au choc. C'est un matériau de choix pour une large gamme de produits aussi divers que les DVD, les ordinateurs, l'électroménager, les lunettes et lentilles, les bombonnes d'eau réutilisables et le matériel médical (site www.bisphenol-a-europe.org).

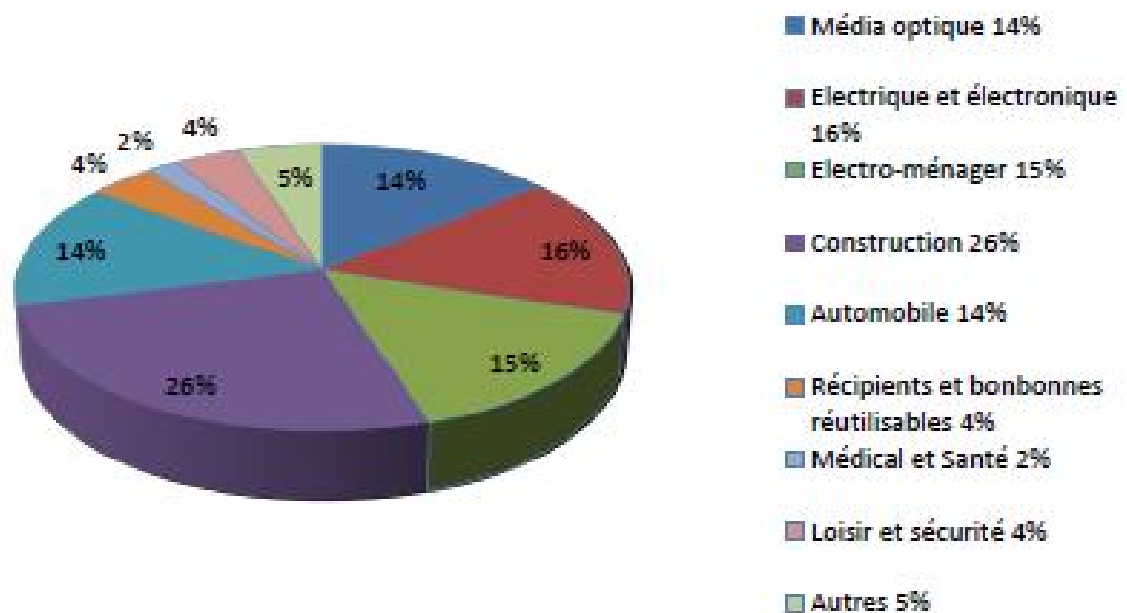


Figure 1: Domaines d'utilisation des polycarbonates (Source : Fédération de la plasturgie, 2011).

- **les résines époxy-phénoliques**

Elles représentent 30 % de l'utilisation du BPA environ. Elles sont utilisées principalement en tant que revêtement pour des applications industrielles et de consommation, telles que la nourriture, les boissons en canettes et les revêtements de protection pour des utilisations électroniques et marines (site www.bisphenol-a-europe.org).

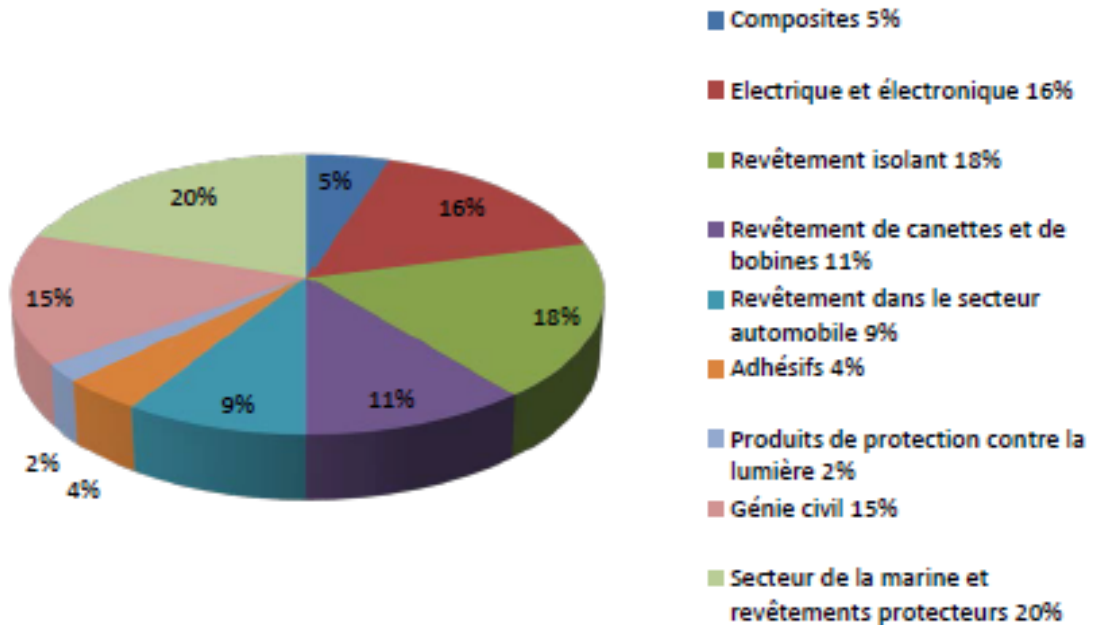


Figure 2: Domaines d'application des résines époxydes (Source : Plastics Europe, 2007).

- **les autres dérivés contenant du BPA**

Les autres utilisations du BPA représentent moins de 5% de son utilisation totale. Ce dernier est ainsi utilisé dans les papiers thermiques comme révélateur acide du leuco-colorant de l'encre contenue dans les papiers. Ce type de papier est largement utilisé dans l'impression des tickets de caisse et des factures bancaires. Le BPA est également utilisé en dentisterie sous forme de composites dentaires (www.bisphenol-a-europe.org).

La large utilisation du BPA, sa présence ubiquitaire mise en évidence dans les études de biosurveillance humaine ainsi que son potentiel toxique, notamment chez le fœtus, a fait du Bisphénol A l'objet de nombreuses polémiques, qui ont opposé les scientifiques aux agences réglementaires.

I.1.2. Réglementations relatives à l'utilisation du Bisphénol A

Une réglementation concernant l'utilisation du BPA a été mise en place et a pour but de protéger la population humaine en limitant son exposition au BPA.

Différentes notions sont à définir pour mieux comprendre la réglementation en vigueur (Tableau 2).

Tableau 2 : Notions et valeurs définies par les autorités sanitaires européennes nécessaires à la compréhension de la réglementation concernant l'utilisation et l'exposition du BPA.

Notions	Définitions	Valeurs	Origines
DJA	<p>= Dose Journalière Admissible</p> <p>➤ Estimation de la quantité de BPA qui peut être ingérée chaque jour durant toute la vie, sans effet néfaste appréciable sur la santé (valable pour toutes sources d'exposition confondues)</p>	<p>50 µg/kg/j</p> <p>= DJA recommandée jusqu'en 01/2014</p> <p>4µg/kg/j</p> <p>= DJA temporaire recommandée depuis 01/2014</p>	<p>Définie par l'EFSA au niveau européen</p> <p>DJA=NOAEL/100</p>
NOAEL	<p>= No Observed Adverse Effect Level</p> <p>➤ Dose la plus élevée sans effet délétère observable</p>	<p>5 mg/kg/j</p> <p><i>D'après Tyl et al. 2002 ; 2008</i></p>	<p>Etablie dans un modèle rongeur dans des études toxicologiques réglementaires</p>
LMS	<p>= Limite de Migration Spécifique</p> <p>➤ Quantité maximale de migration de BPA à partir d'un matériau dans le milieu avec lequel il est en contact</p>	<p>0.6 mg/kg d'aliments</p>	<p>Dépend de la Directive 2004/19/CE</p>

La DJA a été définie en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose la plus élevée sans effet délétère observable (NOAEL). Ce facteur de sécurité de 100 prend en compte :

- un facteur de 10 pour l'extrapolation des données de l'animal de laboratoire à l'Homme (différences interspécifiques),
- un facteur de 10 pour la prise en compte des différences interindividuelles.

La NOAEL a été établie à partir des études toxicologiques réglementaires réalisées selon les lignes directrices élaborées par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) et selon les bonnes pratiques de laboratoire (Tyl et al. 2002 ; 2008) au cours desquelles, il a été mis en évidence des effets de toxicité systémique du BPA (diminution du poids corporel, diminution du poids des organes, toxicité hépatique) pour des doses supérieures à la dose de 5 mg/kg/j, ainsi identifiée comme valeur de référence pour l'EFSA.

La LMS permet de contrôler la concentration des aliments en BPA. D'après la loi n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du Bisphénol A, il est prévu une « *suspension, à compter du 1er janvier 2015, de la commercialisation de tout conditionnement alimentaire comportant du Bisphénol A et suspension à compter du 1er janvier 2013 pour les conditionnements destinés à recevoir des produits alimentaires pour les nourrissons et les enfants en bas âge* » selon le site legifrance.

La Figure 3 présente l'évolution des réglementations européenne et française concernant le BPA depuis 2006. Il est à noter que malgré les données expérimentales, l'EFSA n'a pas jugé nécessaire de réévaluer la DJA en 2010. En décembre 2004, VomSaal et al. ont référencé sur PubMed 115 études évaluant les effets du BPA à de faibles doses : 94 rapportent des effets significatifs pour des doses inférieures à la NOAEL, dont 31 montrant un effet significatif du BPA à des doses inférieures à la DJA (VomSaal et al, 2005). Cependant, en janvier 2014, l'EFSA a rendu public un avis provisoire sur le bisphénol A dans lequel l'agence européenne dit s'être penchée sur « *plus de 450 études portant sur les dangers potentiels pour la santé associés au BPA* » et a identifié « *des effets indésirables probables sur le foie et les reins, ainsi que des effets sur la glande mammaire, liés à l'exposition à cette substance chimique* ». L'EFSA a ainsi recommandé en 2014 de réduire la DJA, celle-ci devant passer de 50µg/j/kg à 4µg/j/kg. « *Cette DJA est temporaire jusqu'à ce que les résultats des recherches en cours réalisées par l'US National Toxicology Program puissent être incorporés à l'évaluation* » (www.efsa.europa.eu). Pour le calcul de cette nouvelle DJA, l'EFSA a utilisé une méthode plus précise pour calculer la dose la

plus faible à laquelle le BPA provoque un effet négatif léger dans les reins des souris. L'EFSA a établi que cet effet se produit à la dose de 8 960 µg/kg pc/jour. Les experts de cette agence ont pu convertir la dose qui engendre un effet négatif sur les reins des souris en une dose orale équivalente pour l'homme de 609 µg/kg pc/jour. Il reste alors un facteur de 25 à appliquer pour tenir compte des différences interspécifique et interindividuelle (non égal à 100 car les différences inter-espèces toxicocinétiques du BPA sont déjà prises en compte lors du calcul de la dose équivalente humaine). Enfin, un facteur supplémentaire de 6 a été inclus pour tenir compte des incertitudes relatives aux effets sur la glande mammaire, sur les systèmes reproductif, neurocomportemental, immunitaire et métabolique. Ainsi, un facteur d'incertitude global de 150 (= 25 × 6) a été appliqué à la dose équivalente humaine permettant d'obtenir la nouvelle DJA temporaire de 4 µg/kg pc/jour (www.efsa.europa.eu).

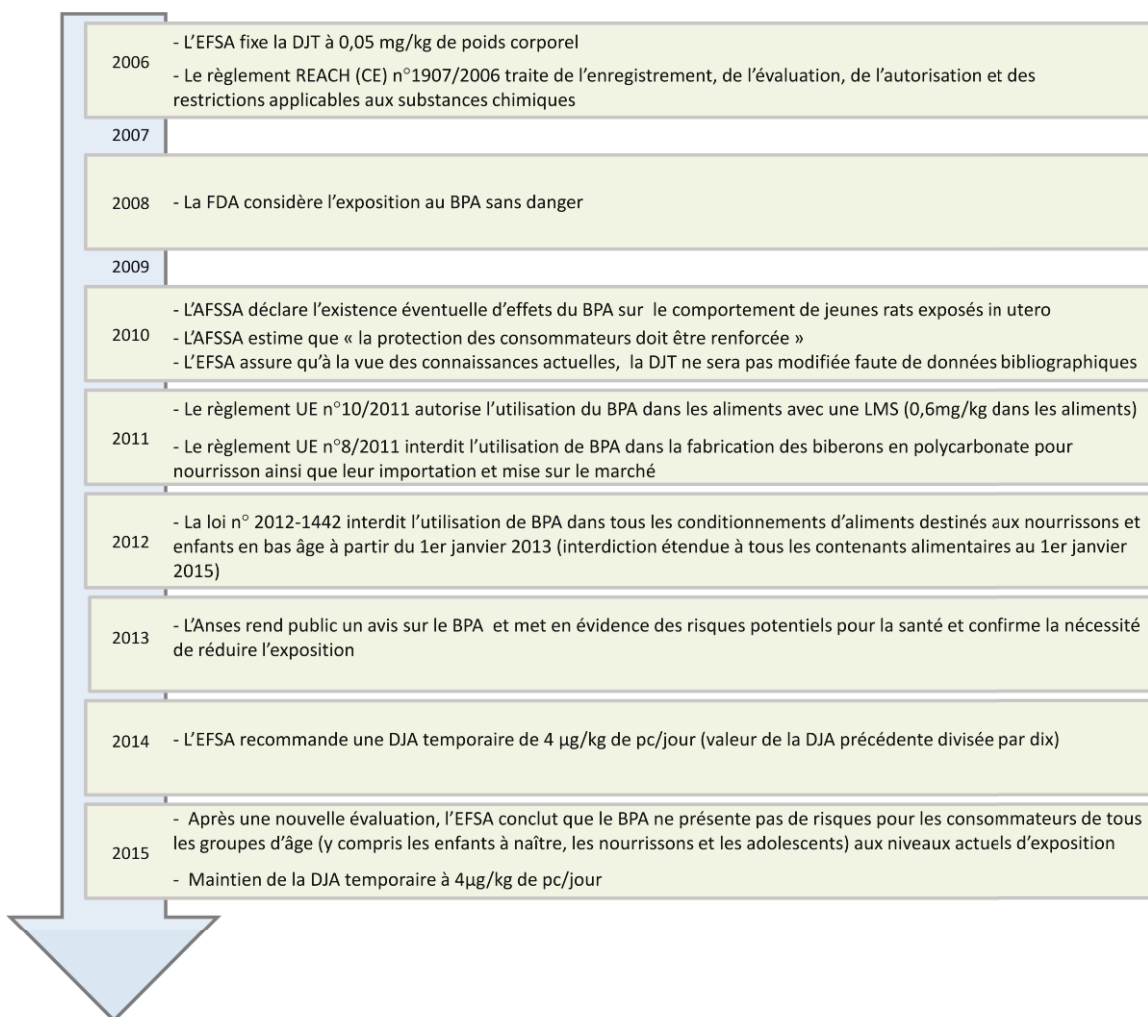


Figure 3: Evolution des réglementations européenne et française autour du BPA au cours des dix dernières années.

Au-delà des mesures réglementaires d'ores et déjà prises en France, l'Anses émet dans son rapport de 2013 différentes recommandations qui visent notamment à réduire les risques liés à l'exposition au BPA pendant la grossesse. Ces recommandations concernent la réduction des risques liés à l'exposition au BPA (par voie alimentaire ainsi que par contact avec les papiers thermiques). Il est à noter que les avis de l'Anses sont essentiels dans la gestion de l'exposition humaine au BPA car ils sont pris en compte pour le vote des textes réglementaires comme ce fut le cas après l'avis scientifique de 2011 qui a mené au vote par l'Assemblée Nationale de la proposition de loi visant à interdire l'utilisation du BPA dans les contenants alimentaires.

1.1.3. L'utilisation du Bisphénol A est-elle dangereuse pour l'Homme ?

Les recherches scientifiques ont montré que de très petites doses de BPA altèrent le développement des organes reproducteurs chez la souris (Howdeshell et al. 1999 ; Kubo et al. 2001; Markey et al. 2001; Schonfelder et al. 2002a ; vom Saal et al. 1998 ; Welshons et al. 1999). Ceci a été l'un des éléments déclencheurs de l'inquiétude des consommateurs autour de cette substance. En effet, l'exposition prénatale de rongeurs à des doses de BPA inférieures à la NOAEL a été associée à des effets délétères révélés en période postnatale : réduction de la production spermatique quotidienne chez les mâles (vom Saal et al., 1998), augmentation du poids de la prostate (Welshons et al., 1999), altération du développement de la glande mammaire et de l'organisation tissulaire de cette dernière (Markey et al., 2001), perturbation de la différenciation cérébrale (Kubo et al. 2001), effets délétères à long terme sur le vagin (Schonfelder et al., 2002a) et accélération de la croissance et de la survenue de la puberté chez les femelles (Howdeshell et al., 1999). Ces effets n'ont toutefois pas été retrouvés dans d'autres études, telles que celles menées par Ashby et al. (1999) et Cagen et al. (1999).

Ces différentes conclusions ont mené à une controverse toujours d'actualité sur l'éventuel effet délétère du BPA sur la santé. Selon les agences réglementaires, les résultats d'études expérimentales sur des modèles rongeurs ne peuvent être extrapolés à l'Homme car les effets observés pour de faibles doses d'exposition n'ont pas pu être reproduits et les techniques utilisées dans les études précédemment citées ne sont pas communément employées dans les études toxicologiques réglementaires. En outre, il existe des différences toxicocinétiques entre l'Homme et les rongeurs vis-à-vis du BPA et de ses métabolites, qui pourraient empêcher l'extrapolation des données des modèles rongeurs à l'espèce humaine.

Au sein du rapport de l'Anses paru en 2013, l'Agence a présenté la liste des effets retenus pour l'évaluation des risques du BPA sur la santé humaine (Tableau 3). A l'issue de cette analyse, les experts retiennent en première intention, les effets jugés « avérés » chez l'animal et « suspectés » chez l'Homme. A noter qu'il n'y a, à ce jour, aucun effet dit « avéré » identifié chez l'Homme.

Tableau 3 : Effets avérés et suspectés du BPA sur la santé respectivement animale et humaine (Anses, 2013).

<p><i>Effets du BPA avérés chez l'animal</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la survenue de kystes ovariens lors d'expositions pré et postnatales - Modifications hyperplasiques de l'endomètre lors d'expositions pré et postnatales - Avancement de l'âge de la puberté lors d'expositions pré et post-natales - Altération de la production spermatique lors d'expositions à l'âge adulte - Modifications histologiques sur la neurogenèse lors d'expositions pré ou périnatale - Effets sur la lipogenèse suite à une exposition prénatale, périnatale ou à l'âge adulte - Effets sur la glande mammaire : accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire à l'âge adulte et développement de lésions hyperplasiques intra-canalaires en lien avec une exposition pré ou périnatale au BPA
<p><i>Effets du BPA suspectés chez l'Homme</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Effets sur la maturation ovocytaire chez la femme dans un contexte de procréation médicalement assistée - Effets sur les pathologies cardiovasculaires (maladies coronariennes) et le diabète

Par ailleurs, pour évaluer le risque lié à l'exposition humaine au BPA, il est nécessaire de connaître ses propriétés toxicocinétiques.

I.2. Devenir du Bisphénol A dans l'organisme

I.2.1. Métabolisme du Bisphénol A

Après une administration *per os*, le BPA est absorbé par la muqueuse digestive de façon identique chez les rongeurs ou les primates. Le BPA subit alors une réaction de métabolisation de phase II au niveau hépatique (Inoue et al., 2001) et intestinal (Inoue et al., 2003) sous l'action d'enzymes de biotransformation responsables de la conjugaison des xénobiotiques. La principale réaction de conjugaison est la glucuronidation qui correspond à la formation d'un composé β -glucuronoconjugué : le BPA-glucuronide (BPA-G) (Matthews et al., 2001) mais du BPA sulfoconjugué (BPA-S) est également produit en moindre quantité (Pottenger et al., 2000) ainsi que du BPA-3,4-quinone (Pottenger et al., 2000 ; Zalko et al. 2003). Il est important de noter que le BPA-G, tout comme les autres métabolites du BPA, est biologiquement inactif car sa conformation tridimensionnelle ne permet pas sa liaison aux récepteurs aux œstrogènes (Matthews et al. 2001). Le métabolisme de biotransformation du BPA en BPA-G est ainsi considéré comme un mécanisme de détoxification de l'organisme.

La conversion rapide et intense du BPA absorbé contribue à la très faible biodisponibilité du BPA par voie orale (inférieure à 1% selon Doerge et al., 2010). Elle est due à la présence de nombreuses isoformes de l'UGT (uridinediphosphate-glucuronosyltransferase), exprimées essentiellement aux niveaux hépatique et intestinal qui glucurono-conjuguent le BPA (Yokota et al. 1999 ; Hanioka et al. 2008). Il en résulte de très faibles concentrations de la forme active du BPA dans le plasma, mesurées chez les rats adultes (Doerge et al., 2010a), les souris adultes (Taylor et al., 2011) et l'Homme adulte (Volkel et al., 2002) suite à une administration orale de BPA.

Une étude récente a mis en évidence une biodisponibilité du BPA par voie orale de 70 à 90% (Gayrard et al., 2013). Ces valeurs, qui diffèrent fortement de celles obtenues jusque-là, ont été obtenues chez des chiens ayant reçu du BPA par voie sublinguale. Ce résultat suggère que l'exposition interne au BPA, administré par voie orale, est sous-estimée, si le BPA est administré par gavage.

L'effet de premier passage hépatique limite l'exposition interne à la forme active du BPA, particulièrement chez l'adulte dont l'activité des UGT est plus importante comparativement à celle du nouveau-né et encore plus par rapport au fœtus (Domoradzki et al., 2003 et 2004). De plus, ces enzymes du métabolisme sont soumises à un polymorphisme génétique (Inserm, 2010), ainsi la détoxification du BPA par l'organisme dépend du stade physiologique ainsi que de facteurs génétiques, qui pourraient expliquer la variabilité individuelle quant au potentiel de détoxification du BPA.

La Figure 4 illustre les principales voies métaboliques du BPA.

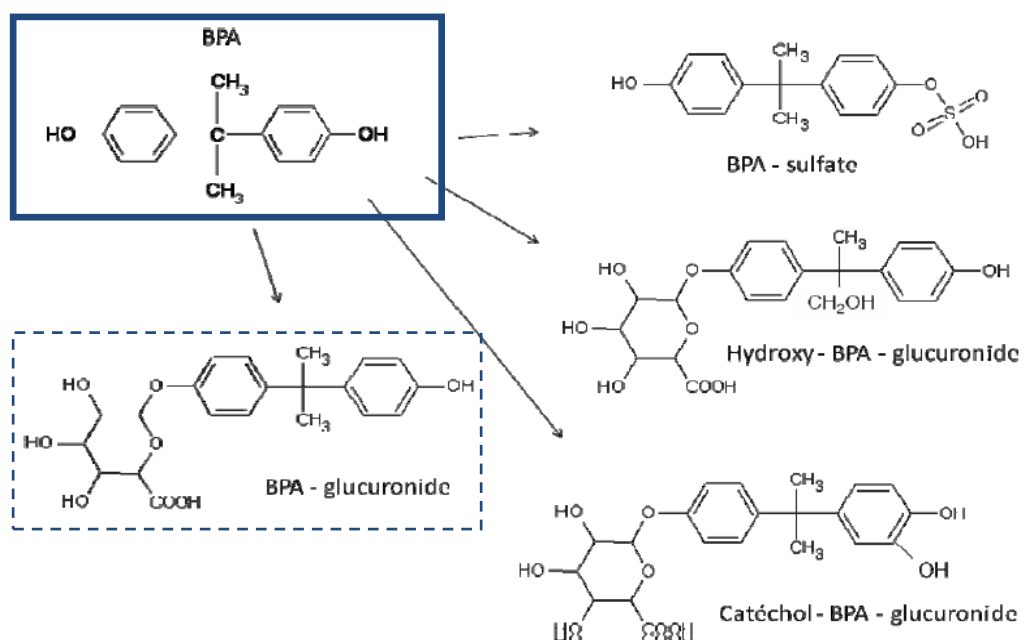


Figure 4 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (la forme conjuguée retrouvée majoritairement chez l'Homme est le BPA-G).

I.2.2. Liaison aux protéines plasmatiques

Une fois dans le sang, le BPA est transporté par des protéines plasmatiques, principalement l'albumine et la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin). La fraction libre de BPA dans le plasma humain est de 5% (Csanady et al., 2002). Pour l'espèce humaine, l'affinité du BPA pour la SHBG est très nettement inférieure à celle de l'œstradiol pour cette même protéine (9000 fois plus faible d'après Déchaud et al, 1999). Cette liaison aux protéines plasmatiques est capable de moduler l'accessibilité du BPA aux tissus cibles (cerveau, utérus, etc.).

Il a été mis en évidence de plus faibles concentrations plasmatiques en albumine chez le fœtus au 125^e jour de gestation par rapport à l'adulte dans l'espèce ovine (respectivement 21 mg/mL et 39 mg/mL d'après Dziegielewska et al, 1980). Ainsi, une concentration plasmatique en albumine moins importante chez le fœtus pourrait conduire à une fraction en BPA libre plus importante par rapport à l'adulte, comme cela a été montré par Corbel et al. (2013) qui met en évidence une fraction de BPA libre supérieure dans le sang du fœtus ovin (10.0 %) par rapport au sang de la brebis adulte (6.2 %). Cette étude a également montré que chez la brebis adulte, la fraction libre du BPA n'est pas significativement différente selon l'état gestationnel (Corbel et al., 2013).

I.2.3. Elimination du Bisphénol A

Chez les rongeurs, un cycle entérohépatique du BPA a été mis en évidence. En effet, suite à l'administration de BPA, le xénobiotique est partiellement conjugué dans le foie puis une partie du BPA-G formé est éliminée dans le canal cholédoque avec la bile et rejoint le tube digestif (Inoue et al., 2001). Certains éléments de la flore digestive sont capables de déconjuguer le BPA-G, d'où une libération de BPA dans les portions terminales du tube digestif (Hawksworth et al., 1971). Une partie de ce BPA est alors réabsorbée, expliquant ainsi les observations faites par Doerge et al. (2010) qui avait constaté plusieurs rebonds des concentrations plasmatiques en BPA, après une administration de BPA par voie orale chez le rat. Ce phénomène prolonge l'exposition interne en BPA sous sa forme active. L'autre partie du BPA-G éliminée par voie biliaire est donc retrouvée dans les selles (Pottenger et al., 2000). En parallèle, une partie du BPA-G formé lors du premier passage hépatique est éliminée dans les urines, mais cette modalité d'élimination n'est pas prépondérante (Snyder et al., 2000).

Chez l'Homme, le BPA est rapidement et complètement excrété dans les urines (Kurebayashi et al., 2002 et Volkel et al., 2002). D'après les données de l'Inserm (2010), le BPA est éliminé sous forme de BPA-G principalement (à raison de 90% environ), mais également sous forme de BPA-S. L'étude de Volkel et al. (2002) menée sur des Hommes de 54 à 90 kg met en évidence une clairance plasmatique du BPA-G de 0,13 L/min après ingestion de 5mg de BPA, ce qui correspond approximativement à la clairance en créatinine d'un adulte sain (0,12 L/min d'après Koch et al., 2986) suggérant une élimination du BPA-G par filtration rénale.

Le Tableau 4 présente les clairances plasmatiques du BPA en mL/(kg.min) chez la souris, l'Homme et la brebis.

Espèces	Valeurs de clairance en BPA	Sources
Souris	208 mL/(kg.min)	Cho et al., 2002
Homme	30 mL/(kg.min)	Volkel et al., 2002
Brebis	54.1±24.7 mL/(kg.min)	Collet et al., 2010

Tableau 4 : Clairances plasmatiques du BPA chez la souris, l'Homme et la brebis.

Du fait de la présence d'un cycle entérohépatique dans l'élimination du BPA chez les rongeurs, la demi-vie d'élimination plasmatique du BPA est plus importante pour ces espèces : de l'ordre de 24 à 48h pour le rat par exemple (Kurebayashi et al. 2003) alors qu'elle est inférieure à 1h pour l'Homme (Cho et al., 2002).

I.3. Contamination et exposition humaine au Bisphénol A

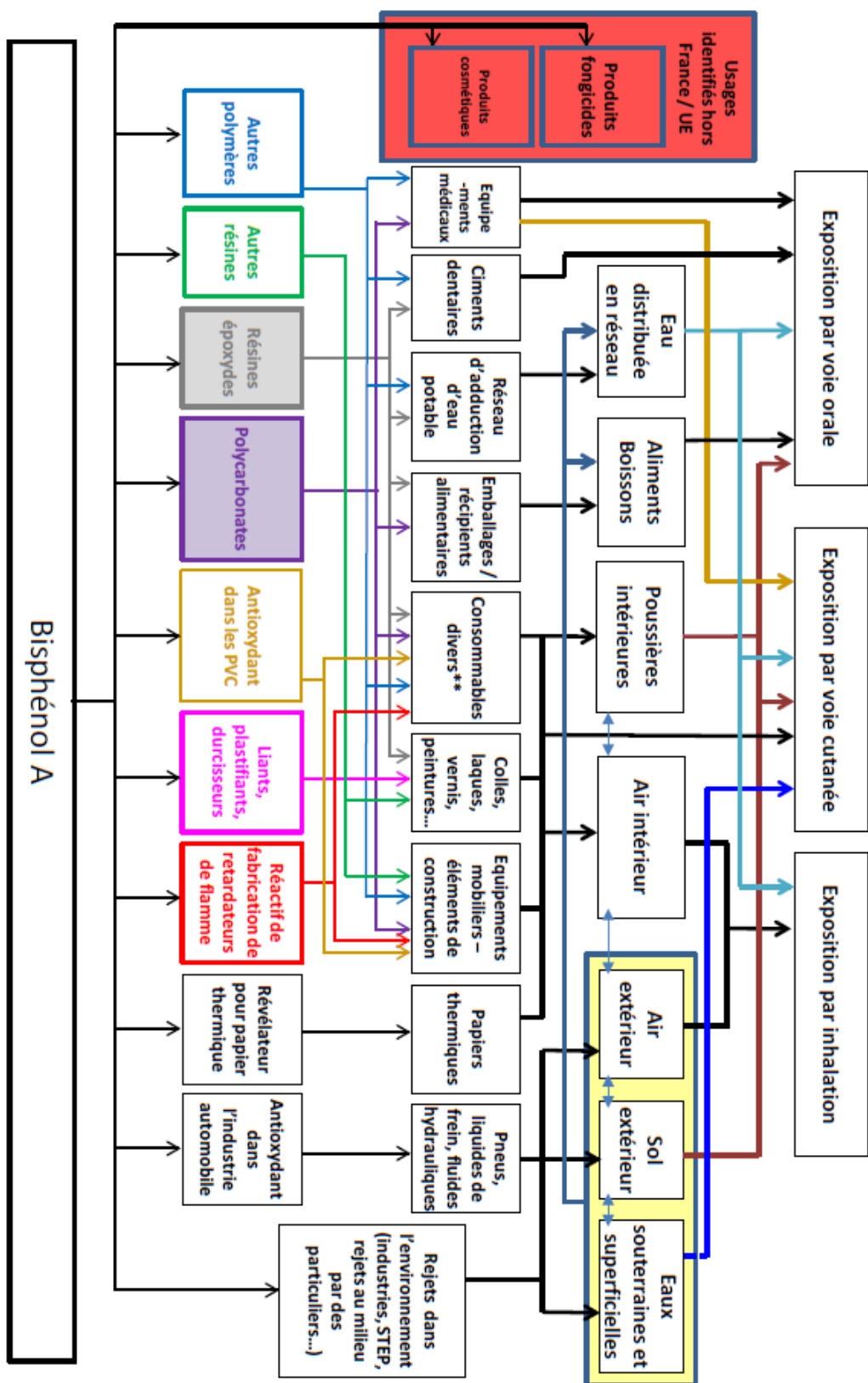
I.3.1. Comment se fait la contamination ?

L'exposition au BPA se fait par trois voies : l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané.

L'EFSA dans son rapport d'étude de 2013 conclut à une contamination prépondérante par voie alimentaire. En effet, l'exposition humaine au BPA vient de façon majoritaire du BPA issu de polymères plastiques emballant ou contenant des denrées alimentaires. Il existe deux voies principales par lesquelles l'aliment se contamine : soit des monomères résiduels sont présents dans ces matériaux et migrent ensuite vers l'aliment, soit un procédé tel que le chauffage ou un changement de pH provoque l'hydrolyse du polymère (évaluation Inserm 2010) ; c'est le cas notamment lors du chauffage du lait dans les biberons en polycarbonates.

Une étude commanditée par l'Anses a permis de caractériser les teneurs en BPA dans l'ensemble des aliments du régime alimentaire des populations cibles (aliments collectés sur le territoire français entre 2007 et 2009 (Figure5). Près de 85% des échantillons composites (c'est-à-dire composés chacun d'une quinzaine d'échantillons) présentent une contamination de faible niveau qui serait due au caractère ubiquitaire du BPA. Certains échantillons, essentiellement des produits en conserve (légumes, plats cuisinés, à base de produits de la mer et de viandes) et de produits de la mer et de viandes non conditionnés en conserves, présentent des niveaux de contamination plus importants ($> 5\mu\text{g}/\text{kg}$).

La manipulation de produits d'usage courant qui contiennent du BPA peut eux aussi être à l'origine d'une contamination de l'Homme. C'est le cas des tickets thermiques manipulés par les agents de caisse ou le consommateur (exposition cutanée) ou encore de la présence directe dans l'environnement du BPA (exposition par inhalation d'air, ingestion de poussières).



** : CD, DVD, ordinateurs, écrans, éléments électriques, appareils électroménagers, téléphones portables, équipements optiques, articles de sport...

Figure 5 : Les différents cas de figure à l'origine de l'exposition interne humaine au BPA (évaluation de l'Anses en 2013, relative aux risques liés au BPA pour la santé humaine).

I.3.2. Quelle est l'exposition actuelle de la population humaine ?

Du fait de l'élimination majoritaire du BPA par voie urinaire, les matrices les plus utilisées pour évaluer l'exposition interne humaine sont les urines et le sang (plasma ou sérum). Concernant les urines, les données sont exprimées en quantités de BPA total (BPA non conjugué + BPA conjugué).

- **Concentrations urinaires en BPA et estimation de la dose journalière de BPA absorbée**

Dans un avis scientifique de l'Anses rendu publique en 2013, les concentrations urinaires moyennes en BPA total, chez des individus de zones géographiques différentes atteignent 1 à 5 ng/mL. Cependant, au sein de chaque population étudiée, les résultats sont parfois très variables, allant de valeurs inférieures à la limite de détection des dosages (c'est-à-dire inférieur à 0.4 voire 0.1ng/mL) jusqu'à des valeurs très élevées de plus de 100 ng/mL (Becker et al., 2009 ; Braun et al., 2011 ; Brock et al., 2001 ; Calafat et al., 2005 ; Garcia-Prieto et al., 2008 ; He et al., 2009 ; Kasper-Sonnenberg et al., 2012 ; Mahalingaiah et al., 2008 ; Mao et al., 2004 ; Moors et al. 2007 ; Nepomnaschy et al., 2009 ; Teegarden et al. 2011 ; Teitelbaum et al. 2008 ; Vandertorren et al. 2011 ; Volkel et al., 2008 ; Wolff et al. 2008 ; Yang et al., 2009 ; Ye et al. 2008b et 2009 ; Zhang et al., 2011).

Les résultats de ces études ont été synthétisés dans le rapport Anses 2013 (Figure 6).

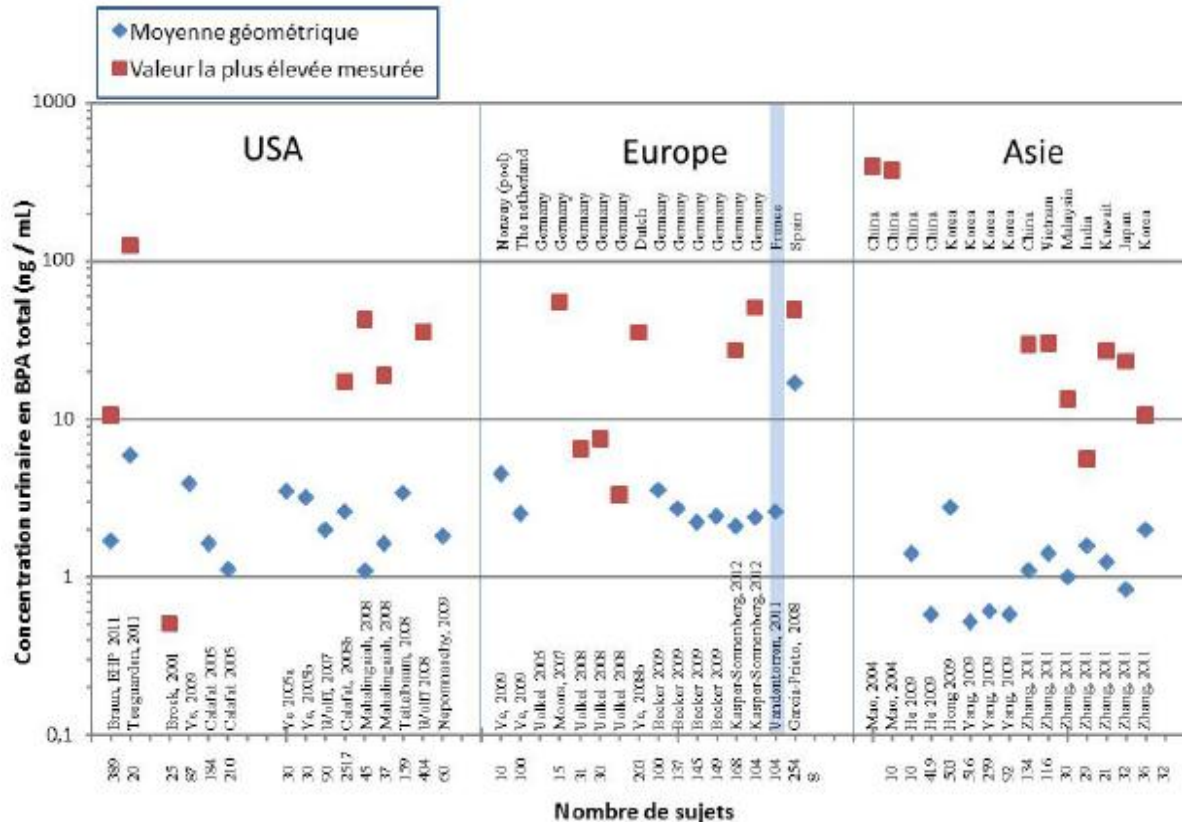


Figure 6: Concentrations urinaires en BPA total rapportées dans la littérature pour des études publiées entre 2001 et 2012 (Anses 2013). Les citations multiples correspondent à des valeurs fournies pour différentes catégories au sein de la même étude : Calafat et al., 2005 (184 hommes, 210 femmes), Mahalingaiah et al., 2008 (45 femmes, 37 hommes), Volkel et al., 2008 (31 femmes, 30 enfants 5-6 ans, 21 adultes), Becker et al., 2009 (137 enfants 3-5 ans, 145 enfants 6-8 ans, 149 enfants 9-11 ans, 168 enfants 12-14 ans), Kasper-Sonnenberg et al., 2012 (104 mères, 104 enfants), Mao et al., 2004 (10 hommes, 10 femmes), He et al., 2009 (419 hommes, 503 femmes), Yang et al., 2009 (259 hommes, 92 femmes pré-ménopause, 134 femmes post-ménopause), Zhang et al., 2011 (différents pays).

A partir des concentrations urinaires mesurées, certains chercheurs ont estimé la dose journalière interne en multipliant la concentration en BPA d'un échantillon urinaire par le volume d'urine produite sur 24h.

Le BPA est rapidement éliminé par l'organisme du fait d'une demi-vie courte (Volkel et al. 2002 et 2005). De ce fait, l'estimation de l'exposition au BPA par la mesure d'une concentration urinaire unique ne sera révélatrice que de l'exposition récente de l'individu au BPA et non pas de l'exposition chronique dont l'évaluation nécessite de répéter les prélèvements urinaires. Teeguarden et al. (2011) ont ainsi montré que le pic de concentration sérique qui est atteint environ 1 et 2h après l'ingestion d'un repas précède le pic de concentration urinaire d'une heure approximativement.

Certains auteurs ont estimé l'exposition à partir d'un prélèvement urinaire unique (Geens et al. 2011) alors que d'autres ont choisi de faire des prélèvements répétés dans le but d'évaluer la variabilité des concentrations urinaires en BPA au cours de la journée. Il semblerait que la méthode la plus précise consiste à collecter la totalité des urines sur 24h (Becker et al. 2009). Les valeurs moyennes d'exposition interne journalière au BPA mesurées se révèlent finalement être assez proches : entre 10 et 100 ng/kg pour la plupart des individus.

- **Concentrations sanguines en BPA**

Les concentrations plasmatiques en BPA permettent d'extrapoler des données de l'animal à l'Homme car cette exposition interne permet de s'affranchir des différences interspécifiques de pharmacocinétique et des différences liées à la voie d'entrée du BPA.

Un grand nombre d'études de biosurveillance humaine décrivent des concentrations sériques en BPA chez des adultes sains de l'ordre du ng/mL, variant de 0.2 à 20ng/mL (Inoue et al., 2000 et 2001 ; Ikezuki et al., 2002 ; Schonfelder et al., 2002b ; Takeuchi et Tsutsumi, 2002, Yamada et al., 2002).

Ces concentrations plasmatiques en BPA chez l'adulte, de l'ordre du ng/mL, semblent surestimées. En effet, en calculant la concentration à l'équilibre en BPA ($C_{SS\ BPA}$) selon l'équation ci-dessous, les concentrations prédites sont très inférieures à 1 ng/mL (de l'ordre du picogramme par mL).

$$C_{SS} = (\text{dose} * \text{biodisponibilité}) / \text{clairance},$$

Avec :

- Dose de BPA ingérée quotidiennement = 0.1µg/kg/j selon l'OMS (2010),
- Clairance du BPA = 25ml/kg/min selon Collet et al. 2013,
- Biodisponibilité du BPA par voie orale < 1% selon Doerge et al. 2010,

Certains auteurs (Teeguarden et al. 2011) estiment que les concentrations élevées en BPA pourraient être liées à des contaminations des échantillons par le BPA présent dans l'environnement.

- **Concentrations de BPA dans le lait et le colostrum**

Concernant le lait maternel, il est à noter que plus de 60% des échantillons étudiés contenaient du BPA sous sa forme active (Otaka et al., 2003 ; Sun et al., 2004 ; Yeet al., 2006 ; Yeet al., 2008a), avec des concentrations moyennes allant de 0.61 à 1.3 ng/mL mais pouvant aller jusqu'à 6.3 ng/mL selon l'étude de Yeet al.(2006).

D'autres études menées sur les colostrums des trois premiers jours après la naissance ont mis en évidence des concentrations colostrales en BPA du même ordre de grandeur que celles mesurées dans le lait (Kuruto-Niwa et al., 2007; Cariot et al., 2012).

A partir de ces données, l'Anses a estimé l'exposition du nourrisson à 171 ng/kg pour un lait contenant 1 ng/mL de BPA et à 1200 ng/kg pour un lait contenant 7 ng/mL de BPA (calculs réalisés sur la base d'un volume de lait maternel consommé de 600 mL et pour un nourrisson de 3.5 kg).

- **Exposition de l'unité fœto-placentaire au BPA**

Des concentrations de BPA non conjugué, de l'ordre du ng/mL ont été mises en évidence dans le sang du cordon ombilical de 152 nouveau-nés (Fénichelet al., 2012). Dans le liquide amniotique, la présence de la forme non conjugué du BPA par rapport à la forme conjuguée, pourrait être expliquée par la présence de β -glucuronidases placentaires capables de déconjuguer le BPA et/ou par la faible expression des UGT hépatiques fœtales (Eldow et al., 2012).

L'analyse des concentrations en BPA des liquides biologiques (urine et lait) a permis aux agences sanitaires d'estimer l'exposition journalière au BPA. Après l'analyse des études scientifiques disponibles, l'Inserm (2010) a fait un bilan des niveaux d'exposition humaine au BPA (Tableau 5).

Tableau 5 : Ordres de grandeur des niveaux d'exposition des adultes, enfants et nourrissons au BPA selon le rapport préliminaire sur les effets du BPA sur la santé (Inserm, 2010).

Population	Adultes	Enfants de 6 à 11 ans	Nourrissons nourris au biberon
Ordres de grandeur des niveaux d'exposition en BPA	0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (Estimation à partir des concentrations urinaires en BPA)	0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (Estimation à partir des concentrations urinaires en BPA)	0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (Estimation à partir des concentrations du lait en BPA)

I.3.3. Y-a-t'il une augmentation de l'exposition au Bisphénol A au cours de la gestation ?

Comme le présente la Figure 7, les voies de contamination de la femme enceinte par le BPA sont : l'alimentation pour près de 75%, l'air à raison de 12% et enfin les poussières dans une moindre mesure (Anses, 2013).

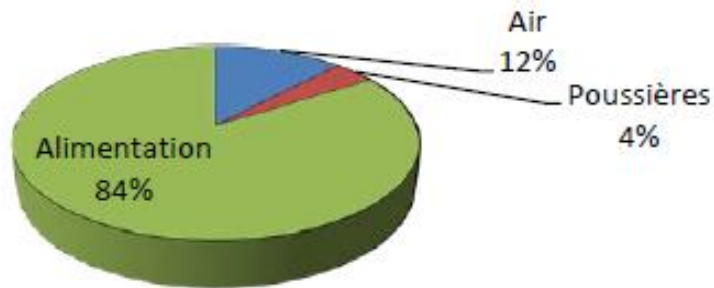


Figure 7 : Contribution de différentes voies d'exposition à la dose interne totale en BPA pour les femmes enceintes (compartiment aérien, poussières et alimentation) d'après l'Anses (2013)

Les données épidémiologiques suggèrent que les concentrations circulantes en BPA chez les femmes enceintes sont plus importantes que celles des femmes non enceintes. En effet, les concentrations en BPA sont particulièrement élevées dans le sang maternel au moment de l'accouchement : entre 0.3 et 18.9 ng/mL selon Schönfelder et al. (2002).

Plusieurs pays industrialisés tels que l'Allemagne (Ikezuki et al., 2002), le Japon (Yamada et al., 2002) ou encore les Etats Unis ont cherché à évaluer précisément l'exposition interne en BPA de la femme enceinte au cours de la gestation. L'étude réalisée par Padmanabhan et al. (2008) aux Etats Unis a montré que les taux de BPA plasmatiques chez les femmes enceintes étaient compris entre 0.5 et 22.3ng/mL. Ces données sont relativement proches de celles mesurées par Schönfelder et al. (2002).

I.4. Devenir du Bisphénol A dans l'organisme : cas particulier de la gestation

I.4.1. Métabolisme du Bisphénol A dans l'organisme maternel en gestation

L'exposition élevée au BPA de la femme enceinte pourrait s'expliquer par une différence de toxicocinétique au cours de la gestation (Vandenberg et al., 2010). En effet, il a été mis en évidence des modifications de l'activité des enzymes glucuronotransférase, sulfotransférase et glucuronidase (Domoradzki et al., 2003) au cours de la gestation ainsi qu'une baisse de l'activité de l'UGT chez la rate gravide par rapport à celle non gravide (Domoradzki et al., 2003 ; Matsumoto et al, 2002).

Les mécanismes de l'exposition de l'unité materno-foeto-placentaire au BPA a pu être étudiée grâce au modèle physiologique de la brebis gravide (Corbel et al., 2013). Ainsi, dans une première étude longitudinale, du BPA a été perfusé à des brebis à raison de 2 mg/(kg.j) par voie intraveineuse, pendant 24h, à quatre périodes différentes : avant la mise à la reproduction, en début de gestation, en fin de gestation et après la mise bas. Dans un second temps, du BPA ou BPA-G a été perfusé par voie intraveineuse chez des brebis vides et gravides ou chez des fœtus à 4 mois de gestation. Le BPA et ses métabolites ont été mesurés dans les plasmas fœtaux et maternels et dans le liquide amniotique à la fois en fin de perfusion et après l'arrêt de la perfusion. Les résultats indiquent que l'état gravide ne modifie pas de façon significative les paramètres toxicocinétiques du BPA et du BPA-G (Corbel et al., 2013).

I.4.2. Métabolisme du Bisphénol A par le fœtus

Le BPA pourrait exercer des effets plus importants pendant les premiers stades de développement fœtal, du fait des capacités de conjugaison limitées (chez l'Homme, d'après Nunez et al., 2001).

L'existence d'UGT a été mise en évidence au niveau hépatique chez le fœtus du rat et de l'Homme, mais en moins grande quantité que chez l'adulte (Coughrie et al., 1988 et 2006). Cela n'est en revanche valable que pour certaines isoformes : l'UGT A1A, par exemple, semblerait absente au niveau hépatique chez le fœtus alors qu'elle est présente dans l'organisme adulte. Strassburg et al. (2002) suggèrent que les UGT fœtales chez l'Homme ne sont exprimées qu'à partir de la 20^{ème} semaine de gestation.

Au cours des expériences sur la brebis instrumentée utilisée par Corbel et al. (2013), il n'a pas été mis en évidence de passage de BPA-G du sang maternel au sang fœtal. Les fortes concentrations en BPA-G mesurées dans la circulation fœtale s'expliquent par la capacité de l'unité fœto-placentaire ovine à glucuronoconjuguer le BPA à la fin de la gestation. Or, l'étude de Pretheeban et al. (étude réalisée sur 3 fœtus ovins), met en évidence une expression limitée des gènes codant pour l'UGT hépatique chez le fœtus ovin à 120 mois d'âge conceptionnel par rapport au nouveau-né et à l'adulte (Pretheeban et al, 2011). De ce fait, il semblerait que ce soit l'UGT placentaire, qui, exprimée de façon importante, implique la glucuronoconjugaison du BPA dans l'unité fœto-placentaire.

I.4.3. Transfert placentaire et élimination fœtale du Bisphénol A et de ses métabolites

- **Transfert du Bisphénol A au travers du placenta**

Chez la brebis gravide, il a été montré que 4.5% de la dose de BPA administrée à la mère par voie intraveineuse étaient transférés au fœtus à travers le placenta (Corbel et al., 2013).

Schönfelder et al. (2002) ont évalué les concentrations en BPA au sein de l'unité fœto-materno-placentaire humaine. Ils ont mis en évidence les concentrations en BPA suivantes :

- sang maternel (entre 31 et 41 semaines de gestation) : 0.3 à 18.9 ng/mL,
- sang fœtal (dans le cordon ombilical à la naissance) : 0.2 à 9.2 ng/mL,
- tissu placentaire (à la naissance) : 1.0 à 104.9 ng/g.

Ces données montrent que le placenta ne constitue pas une barrière pour le BPA, la forme non conjuguée passe bien de la mère au fœtus (en accord avec les résultats d'Ikezuki et al., 2002 ; Balakrishnan et al., 2010 ; Corbel et al., 2014).

- **Transfert du Bisphénol A-Glucuronide à travers le placenta**

Le BPA-G est une molécule hydrophile qui peut difficilement traverser la barrière placentaire. Dans le modèle du fœtus ovin instrumenté, après une perfusion de BPA-G à la mère, les concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G se sont révélées inférieures à la LOQ. Ces données montrent que ce métabolite inactif ne passe pas ou très faiblement la barrière placentaire (Corbel et al., 2013). Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus *ex vivo* à l'aide du modèle de placenta humain perfusé (Corbel et al., 2014) et avec l'étude de Nishikawa et al. (2010), qui montre que seulement 0.13% de la dose de BPA-glucuronide administrée à la ratte gravide étaient transférés au fœtus après une perfusion utérine de BPA-G.

- **Hydrolyse du Bisphénol A-Glucuronide en Bisphénol A**

Dans le modèle ovin instrumenté, suite à l'administration maternelle de BPA, les concentrations en BPA-G étaient environ 3 fois plus élevées et celles en BPA environ 12 fois plus faibles chez le fœtus que chez la mère (Corbel et al., 2013). Le trappage du BPA-G dans l'unité fœto-placentaire soulève la question de la réactivation possible du BPA à partir des formes conjuguées. Ainsi, il existe des β -glucuronidases au niveau des membranes lysosomiales et dans le

réticulum endoplasmique de certains tissus tels que les reins, le foie (Sperker et al., 1997) ou le placenta (Ginsberg et Rice, 2009). Ces résultats, en accord avec ceux de Collier et al. (2002), ont été confirmés par ceux d'une étude *ex vivo* réalisée au laboratoire, qui montre que le BPA-G peut être déconjugué en BPA au niveau du placenta et des gonades fœtales (Corbel et al., 2015).

- **Clairances du Bisphénol A par les organismes maternel et fœtal**

Sur le modèle de fœtus ovin instrumenté, il a été montré que la clairance placentaire fœto-maternelle du BPA est 11 fois plus élevée que la clairance materno-fœtale (Corbel et al. 2013).

Les clairances maternelles et fœtales totales ont été respectivement estimées à 50mL/kg/min et 200mL/kg/min. Par rapport à ces données, les clairances placentaires et non placentaires ont été exprimées en pourcentage de ces valeurs de clairances (Tableau 6).

Tableau 6 : Pourcentage des clairances placentaires et non placentaires par rapport aux clairances maternelles et fœtales du BPA sur le modèle de la brebis gravide instrumentée (Corbel et al., 2013).

Clairances du BPA	Valeurs en pourcentage des clairances maternelles ou fœtales
- Non placentaire maternelle	98% de la clairance maternelle totale
- Placentaire materno-fœtale	2% de la clairance maternelle totale
- Placentaire fœto-maternelle	91% de la clairance fœtale totale
- Non placentaire fœtale	9% de la clairance fœtale totale

I.5. Contexte de notre étude

Les effets suspectés du BPA reposent essentiellement sur des observations expérimentales chez les rongeurs qui montrent le potentiel perturbateur du BPA chez les jeunes exposés *in utero* (Rubin et al., 2011 ; vom Saal et al., 2005) à des doses inférieures à 50µg/kg/j (dose journalière admissible valable en 2006 selon l'EFSA). Une partie de la controverse actuelle concernant l'évaluation réglementaire du BPA est liée à la difficulté d'extrapoler les données expérimentales à l'Homme en raison des données limitées concernant l'exposition fœtale au BPA associée à l'exposition maternelle. En effet, pour pouvoir extrapoler des données de l'animal à l'Homme, il est nécessaire de connaître tous les facteurs déterminant l'exposition fœtale au BPA, tout particulièrement le métabolisme du BPA et du BPA-G par l'unité foeto-placentaire ainsi que la recirculation possible du BPA et du BPA-G entre le liquide amniotique et la circulation fœtale.

Cette étude s'inscrit donc dans la nécessité de mieux comprendre et de préciser les mécanismes qui contrôlent l'exposition fœtale au BPA et à ses formes conjuguées.

I.5.1. Choix du modèle ovin

Pour répondre à cette problématique, un modèle intégratif fondé sur des considérations physiologiques a été mis en place au laboratoire : le modèle *in vivo* du fœtus ovin instrumenté qui autorise la réalisation de perfusions et de prélèvements sanguins du côté fœtal et du côté maternel grâce à des cathéters mis à demeure dans la circulation foetale. De cette façon, la pharmacocinétique du BPA et de ces métabolites peut être évaluée (Corbel et al., 2013). Des travaux réalisés dans le laboratoire montrent que le modèle ovin instrumenté est pertinent vis-à-vis de l'Homme en termes de toxicocinétique du BPA (Collet et al., 2010). De plus, la brebis gravide est considérée comme un modèle pour l'étude de la gestation chez l'Homme car il existe des similitudes physiologiques entre les deux espèces, qui ont déjà permis l'étude de la physiologie de l'unité materno-placento-foetale (Barry et al., 2008).

Le modèle du fœtus ovin est très pertinent car il permet l'administration directe de xénobiotiques au fœtus. Il a permis d'étudier le passage du BPA ou de ses métabolites dans le sens fœto-maternel et l'étude des paramètres pharmacocinétiques fœtaux du BPA et de ses métabolites.

I.5.2. Objectifs de l'étude

Au cours des expériences précédemment menées au laboratoire (Corbel et al., 2013), il a été montré que les activités métaboliques de l'unité foeto-placentaire conduisent à la formation de composés glucurono (BPA-G) et sulfoconjugués (BPA-S) qui s'accumulent dans les liquides fœtaux en raison d'un défaut de passage transplacentaire, conduisant à un ratio des concentrations plasmatiques en BPA-G entre les circulations foetales et maternelles de l'ordre de 10. Ce résultat soulève la question de la possible réactivation du BPA-G par les enzymes de déconjugaison au niveau des tissus cibles selon un mécanisme déjà décrit pour différentes substances (Meffin et al., 1983). Les résultats préliminaires obtenus *ex vivo* au laboratoire suggèrent que le BPA-G pourrait être fortement hydrolysé en BPA au niveau du placenta et de certains tissus sensibles aux oestrogènes (dont les gonades fœtales) selon un mécanisme comparable à celui responsable de l'hydrolyse des oestrogènes conjugués par les tissus fœtaux ovins (Jenkin et Heap, 1976).

Ces observations ne peuvent cependant pas être directement extrapolées aux conditions qui prédominent *in vivo* dans lesquelles le BPA non conjugué, libéré par les activités enzymatiques tissulaires et/ou placentaires, va diffuser dans la circulation fœtale et pourra franchir la barrière placentaire pour être éliminé *in fine* via l'organisme maternel et/ou être à nouveau conjugué et recirculer entre le liquide amniotique et la circulation foetale.

Les objectifs de ce travail visent à mieux comprendre les modalités de l'élimination du BPA-G produit par l'unité foeto-placentaire et à évaluer la contribution du processus d'hydrolyse à l'exposition interne du fœtus au BPA. Pour cela, nous avons réalisé des perfusions fœtales intraveineuses de BPA et de BPA-G à différents niveaux de dose pendant 72h et évalué la cinétique d'élimination du BPA et du BPA-G depuis le compartiment fœtal vers le compartiment maternel à travers la mesure (1) des concentrations plasmatiques fœtales à l'équilibre de BPA et de BPA-G au bout de 72h de perfusion (2) de l'évolution au cours de la perfusion des concentrations plasmatiques maternelles de BPA et de BPA-G ainsi que des quantités de BPA total éliminées dans les urines maternelles.

Cette approche a été complétée par la mesure à l'équilibre des concentrations tissulaires en BPA libre et conjugué dans les tissus fœtaux cibles des oestrogènes (système nerveux central, appareil génital, foie et tissu adipeux). Cette méthode nous a permis d'analyser l'hypothèse selon laquelle la déconjugaison tissulaire des métabolites du BPA pourrait être à l'origine d'un découplage entre les concentrations tissulaires et plasmatiques de BPA.

Les objectifs de l'étude sont donc :

- d'évaluer le taux d'hydrolyse du BPA-G au niveau de l'unité fœto-placentaire,
- de caractériser les expositions tissulaire et plasmatique fœtales au BPA et à ses métabolites après des perfusions fœtales de BPA et de BPA-G à différents niveaux de dose,
- de contribuer à l'identification des mécanismes d'élimination du BPA-G fœtal.

II. Matériel et méthodes

Deux études ont été réalisées :

- une étude pilote réalisée avec 5 brebis gravides afin d'établir le schéma d'exposition au BPA et au BPA-G et de préciser le protocole de prélèvement,
- une étude expérimentale réalisée avec 11 brebis au cours de laquelle différentes doses de BPA et de BPA-G ont été utilisées.

II.1. Animaux et chirurgie

L'étude préliminaire a été menée sur 5 brebis adultes (poids moyen 75.4 ± 10.5 kg) et la deuxième sur 11 brebis adultes (poids moyen 70.6 ± 6.6 kg), gravides de race Lacaune viande. Les brebis ont été mises à la reproduction par l'éleveur et le stade de gestation a été estimé par échographie à partir de la mesure du diamètre bipariétal. Les fœtus ovins au stade 110-120 jours de gestation (terme à 147j) ont été instrumentés en suivant la même procédure que Corbel et al. (2013) avec deux cathéters mis en place dans l'artère carotidienne et la veine jugulaire pour permettre, respectivement, la réalisation des prélèvements de sang et les administrations. Cette procédure a débuté par la mise à la diète des animaux pendant 48h avant la chirurgie. Les brebis ont reçu de l'acide propionique (Rumigastryl®, ¼ sachet dilué dans 100 mL d'eau, VO) la veille, le soir et le lendemain du jour de la chirurgie. Une antibiothérapie à base d'amoxicilline (Clamoxyl®LA, 20mg/kg IM) a été instaurée la veille de l'opération. Une prémédication à base d'acépromazine (Calmivet®, 0.1 mg/kg IM) et d'acide tolfénamique (Tolfine®, 2 mg/kg IV) a été effectuée 30 minutes avant le début de la chirurgie. L'anesthésie générale a été induite avec du thiopental sodique (Nesdonal®, 15 mg/kg IV) et relayée avec de l'isoflurane entre 2 et 3 % après intubation. Pendant la phase chirurgicale, l'animal a reçu une perfusion IV de Ringer Lactate au débit de 10 mL/kg/h et différents éléments ont été monitorés : la capnométrie, la saturation périphérique de l'hémoglobine en O₂, la fréquence cardiaque et le pourcentage d'isoflurane.

La brebis a été placée en décubitus latéral droit. La zone opératoire a été lavée et désinfectée. Une anesthésie locale traçante (plans musculaires et sous-cutanés) à l'aide de lidocaïne (Lurocaïne 2%®, 10 injections de 1mL) a été réalisée sur le flanc gauche. La peau a été incisée sur 20 cm dans le flanc gauche en direction crânio-ventrale, à partir du pli du grasset. Les parois musculaires et le péritoine ont été incisés plan par plan.

Une partie de la corne utérine a été extériorisée au niveau de la tête du fœtus. L'hystérotomie a été réalisée au niveau de la grande courbure de l'utérus et des pinces en cœur ont été disposées, au fur et à mesure, sur toute l'ouverture pour maintenir la paroi de l'utérus avec les enveloppes chorio-amniotiques, de façon à éviter les pertes de liquide amniotique. La tête du fœtus a

été extériorisée. La peau du cou du fœtus a été incisée au niveau du sillon jugulaire sur 1 à 2 cm. La veine jugulaire et l'artère carotide ont ensuite été disséquées. Des ligatures en soie ont été passées autour de ces vaisseaux pour les maintenir et éviter les saignements lors de la cathérisation. Le vaisseau a été ponctionné avec une aiguille rose 18G recourbée, qui sert aussi de guide pour insérer l'extrémité du cathéter. Les cathéters ont ensuite été introduits jusqu'au tronc brachiocéphalique pour le cathéter carotidien (cathéter polyvinyl ; diamètre interne 0.81mm ; diamètre externe 1,69mm) et jusqu'à la veine cave crâniale dans le cas du cathéter jugulaire (cathéter Tygon S-54-HL ; diamètre interne 1.02mm ; diamètre externe 1,78mm). Leur fonctionnement a été contrôlé par aspiration de sang. Les cathéters ont été fixés par deux ligatures (soie 3-0 ; 2.5 Ph-Eur ; Ethicon Rome, Italie) situées en amont et en aval du point d'ouverture du vaisseau. Leur fonctionnement a été à nouveau contrôlé. La peau du fœtus a ensuite été suturée (tresse polyester (Mersuture n°2-0, 3 Ph-Eur) et les cathéters ont été fixés à la peau par un ou deux points simples. La tête du fœtus a été remplacée délicatement dans l'utérus. L'utérus a été refermé, en incluant les enveloppes fœtales, par un surjet simple et un surjet enfouissant (fils sertis: Vicryl n°1, 4 Ph-Eur). Les cathéters ont été extériorisés au niveau de la plaie utérine. Les plans musculaires et le plan cutané ont ensuite été suturés, les cathéters ont été tunnélisés dans le plan sous-cutané sur 10 cm dorsalement à l'incision et ont été extériorisés dans le flanc au niveau d'une petite incision cutanée de 0.5 cm. Les incisions cutanées ont ensuite été recouvertes d'Aluspray®.

Les cathéters ont été externalisés un à un et fixés par des points simples à leur sortie. Chaque cathéter a été obturé par un bioconnecteur « auto-flush » (Vygon®, Ecouen, France). Les embouts des cathéters ont été entourés d'une compresse stérile imbibée de Vétédine® solution et maintenus dans une poche plastique.

Le retour en boxe et la reprise de l'appétit avait lieu le jour même. Après la chirurgie, le fonctionnement des cathéters a été vérifié chaque jour. Ils ont été rincés quotidiennement avec du sérum physiologique hépariné (100 UI/mL). Afin d'éviter toute infection, la préparation des solutions destinées à ces injections et le remplissage des seringues (BD Discardit II, 2mL, Le Pont-de-Claix, France) ont été réalisés sous la hotte dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Le lendemain de la chirurgie, la couverture antibiotique a été poursuivie avec de l'amoxicilline (Clamoxyl®LA, 15 mg/kg IM).

Les expérimentations ont débuté au minimum 3 jours après la chirurgie sur des fœtus au stade de gestation 107-132j (moyenne 120j) en début d'expérimentation. Le pH et les valeurs des pressions partielles exercées par l'O₂ et le CO₂ dissouts dans le sang artériel fœtal ont été évalués à la fin des mesures afin de vérifier l'innocuité des manipulations expérimentales.

II.2. Préparation des solutions et traitement des animaux

Les doses administrées (en mg/(kg.j)) ont été déterminées en considérant un poids du fœtus de 2.5kg (Bazer et al., 2012). Ces doses théoriques ont ensuite été corrigées par le poids du fœtus, déterminé après l'extraction du fœtus réalisée à la fin des mesures. Les solutions à administrer ont été perfusées par voie intraveineuse durant 72h à l'aide d'un injecteur portatif MS32 Sims Graseby® équipé de seringues Luer Lock® de 20ml, à un débit de 0.3ml/h, soit un pulse d'un volume de 5µl toutes les minutes.

Les fœtus ont été perfusés avec une solution de BPA (pureté $\geq 99\%$, Sigma Aldrich) à la concentration de 0.35, 1.7 et 8.7 mg/ml, correspondant aux doses nominales respectives de 1, 5 ou 25mg/(kg.j) ou avec une solution de BPA-G (pureté $\approx 80\%$; purifié au laboratoire, Lacroix et al., 2011) à la concentration de 0.07, 0.52, 1.2 et 3.5 mg/mL correspondant aux doses nominales de 0.2, 1.5, 3.5 ou 10mg/kg.j dans un mélange éthanol/propylène glycol (v:v 1:49). Les doses de BPA-G ont été choisies de façon à obtenir des concentrations molaires à l'équilibre de BPA-G équivalentes à celles de BPA.

Les fœtus contrôles ont reçu une perfusion de solvant (contrôle négatif) durant la même durée de perfusion. Toutes les solutions ont été préparées la veille des administrations et ont été filtrées à l'aide d'un filtre 0.2µm.

II.3. Plan expérimental

La Figure 8 illustre la chronologie des expérimentations.

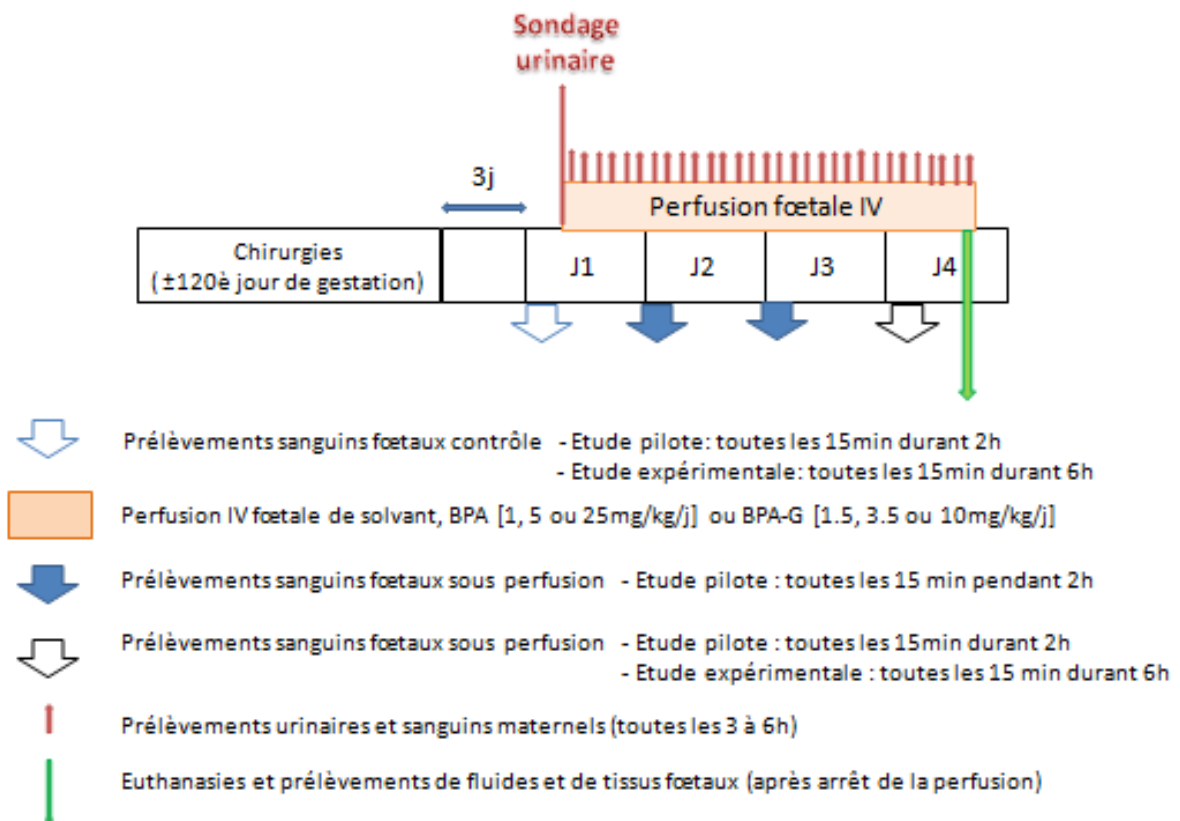


Figure 8 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en place au cours des études pilote et expérimentale.

Ce protocole expérimental a également été utilisé pour l'étude de biomarqueurs d'effet du BPA. En effet, l'équipe Perturbateurs endocriniens de Toxalim a évalué chez le fœtus, les hormones régulées par le rétrocontrôle des oestrogènes afin d'étudier l'effet oestrogénomimétique du BPA. Ainsi, des prélèvements sanguins foetaux ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant des périodes de 2h (étude pilote) et de 6h (étude expérimentale) à 4 reprises avant et au cours de la perfusion. Ces prélèvements n'ont pas été utilisés pour les études toxicocinétiques faisant l'objet de ce rapport.

II.3.1. Etude pilote

L'étude pilote a été réalisée avec 5 fœtus (poids théorique : 2.5kg) qui ont reçu une perfusion :

- de BPA à la dose nominale de 5 mg/(kg.j) (12.5mg/j, 38nmoles/min, n=2)
- de BPA-G à la dose nominale de 3.5mg/(kg.j) (8.75mg/j, 14.6nmoles/min, n=2)
- de solvant (n=1).

Les brebis de cette étude étaient numérotées de 1 à 5.

Les perfusions ont été réalisées en continu grâce à un injecteur portatif (MS32, Sims Graseby®). La solution à perfuser était contenue dans une seringue (BD Plastipak, embout LuerLock) de 20 mL, placée dans cet injecteur. Ce dispositif, placé dans une boîte en aluminium, a été fixé sur le dos de la brebis à l'aide d'un harnais (cf. Figure 9). Un trou placé dans cette boîte permet le passage d'un prolongateur (Vygon®, Ecouen, France) reliant l'injecteur au cathéter fœtal.

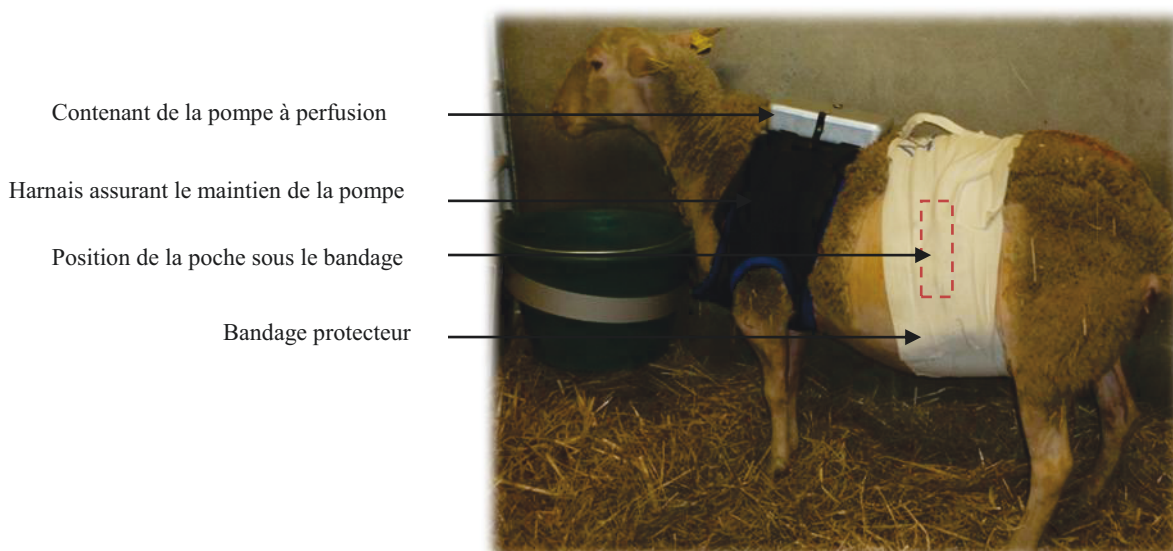


Figure 9 : Brebis munie du dispositif de perfusion relié au cathéter fœtal.

Des prélèvements de sang fœtal artériel de 0,5mL ont été effectués avant le début des perfusions (J1) puis après 22h, 46h et 70h de perfusion (respectivement J2, J3 et J4) durant la même période du nyctémère afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de LH (résultats non présentés). Dans notre étude, afin d'évaluer les concentrations plasmatiques en BPA et de ses métabolites dans le sang fœtal, un volume de 1ml de sang artériel a été prélevé à la fin de chaque période après avoir retiré l'obturateur présentant une valve en polycarbonate permettant les prélèvements répétés (pour éviter les contaminations du sang en BPA).

Afin d'examiner le devenir du BPA et du BPA-G administré au fœtus, des prélèvements sanguins et urinaires ont également été effectués sur les brebis dont le fœtus a été perfusé avec du BPA ou du BPA-G, avant le début de la perfusion ainsi que toutes les 3 à 6h au cours des 72h de perfusion.

A la fin des 72h de perfusion, les brebis ont d'abord été anesthésiées par l'administration de pentobarbital à la dose de 15mg/kg (3.6mg/20ml Doléthal®) puis césariées afin d'extraire le fœtus avant d'être euthanasiées à l'aide d'une deuxième administration de pentobarbital à la même dose. Après leur extraction, les fœtus ont été euthanasiés, pesés et les prélèvements de liquides biologiques (contenu stomacal, liquide amniotique, sang, urine) et de tissus fœtaux ont été rapidement réalisés. Les informations concernant la taille de la portée et le sexe de chaque fœtus ont été enregistrées.

II.3.2. Etude expérimentale

Cette étude a été réalisée sur 11 fœtus (poids moyen 2.9 ± 0.6 kg) qui ont reçu une perfusion de BPA à la dose nominale de 1 (n=2), 5 (n=2) ou 25 (n=1) mg/(kg.j), de BPA-G à la dose de 1.5 (n=2) ou 10 (n=2) mg/(kg.j) ou de solvant (n=2). Les brebis de cette étude sont numérotées de 6 à 16.

Des prélèvements de sang fœtaux de 0.3ml ont été réalisés toutes les 15min durant 6h pendant la période contrôle précédant la perfusion (J1) et après 66h de perfusion (J4) afin d'évaluer les concentrations plasmatiques en LH (résultats non présentés). Pour notre étude, durant chaque série de prélèvements, un prélèvement de sang artériel de 1mL a été réalisé toutes les 2h (3 prélèvements par fœtus) afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de BPA, BPA-G et BPA-S.

Les prélèvements maternels de sang et d'urines ont été réalisés dans les mêmes conditions que lors de l'étude pilote.

II.4. Prélèvements et traitement des échantillons

Tout le matériel utilisé pour la préparation des solutions, les prélèvements, l'échantillonnage et l'analyse était en verre ou en polypropylène (PP).

II.4.1. Traitements des échantillons sanguins collectés

Les échantillons sanguins ont été placés dans de la glace avant d'être centrifugés pendant 30 minutes (sang fœtal) ou 10 minutes (sang maternel) à 3000g à 4°C dans un délai n'excédant pas

1h après la collecte. Après centrifugation, le sérum a été conservé dans des tubes en polypropylène de 1.5ml à -20°C.

Les prélèvements artériels fœtaux sériés destinés au dosage de BPA, BPA-G, BPA-S, ont été recueillis dans des tubes héparinés en polypropylène de 4ml (Aerotube, héparine de lithium). 100µL du plasma ont été conservés à -20°C jusqu'au dosage du BPA. Le plasma correspondant a été réparti en fractions aliquotes.

Les prélèvements de sang maternel (2 à 4ml) ont été effectués par ponction directe de la veine jugulaire droite avec des aiguilles à usage unique de 0.6mm de diamètre (Terumo®) dans des tubes héparinés en polypropylène de 4ml pour le dosage du BPA et des métabolites. Deux fractions aliquotes de plasma maternel (100 µL et 1ml) ont été conservées à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dosages.

II.4.2. Traitements des échantillons urinaires collectés

Une sonde urinaire de Foley RÜSCH® a été mise en place afin de vider le contenu vésical avant le début des perfusions de BPA ou de BPA-G et de collecter les urines tout au long de la perfusion. La totalité du contenu de la vessie a été collectée à chaque prélèvement à l'aide d'une seringue de 50ml (Terumo®) et le volume total d'urines a été enregistré. Pour chaque prélèvement, un volume d'urine d'environ 30ml a été conservé dans un tube Falcon® de 50ml puis traité de la même façon que les échantillons de sang maternel.

II.4.3. Traitements des échantillons tissulaires et des fluides fœtaux collectés

Pour chaque fœtus perfusé avec le BPA, le BPA-G ou le solvant, des prélèvements de fluides fœtaux (liquide amniotique, urine, contenu stomacal) et de placenta (deux cotylédons à proximité du cordon ombilical) ont été réalisés afin d'évaluer l'exposition du conceptus au BPA et au BPA-G. Les fluides fœtaux placés dans de la glace ont été rapidement centrifugés et répartis dans plusieurs fractions aliquotes conservées à -80°C.

Les organes fœtaux prélevés ont été les organes émonctoires (rein, foie) ainsi que les organes potentiellement cibles des œstrogènes (gonades, utérus, glande mammaire, système nerveux central, hypophyse).

Lors de l'étude pilote, un échantillon de chaque tissu a été placé dans un tube de verre de 5ml maintenu dans de la glace jusqu'au moment de préparation des homogénats tissulaires réalisée au cours des 2h suivant les prélèvements. Pour cela, une portion de chaque tissu de l'ordre de 1g a été pesée et placée dans un tube de verre de 5mL. Les homogénats aqueux ont été réalisés en ajoutant un volume d'eau ultra-pure équivalent à la quantité de tissu (50% w/w). Pendant toute la durée de préparation des homogénats, les tubes ont été maintenus sur de la glace.

L'homogénéisation des tissus a été réalisée à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra-Turrax®) et deux fractions d'homogénat ont été conservées à -80°C jusqu'à la réalisation des dosages de BPA et de ses métabolites.

Lors de l'étude expérimentale, selon les organes, 1 à 4 fractions de tissu de 1g environ ont été isolées, immédiatement placées dans un cryotube et plongées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C jusqu'au moment de la réalisation des homogénats tissulaires. Pour cela, une portion de chaque tissu de l'ordre de 1g a été pesée et placée dans un tube de verre de 5mL. Les homogénats ont été réalisés en ajoutant un volume de méthanol équivalent à la quantité de tissu (50% w/w). Pendant toute la durée de préparation des homogénats, les tubes ont été maintenus sur de la glace. L'homogénéisation des tissus a été réalisée à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra-Turrax®), une fraction d'homogénat de 100µl et le reste de l'homogénat ont été conservés à -80°. Du BPAGd6 a été ajouté à chaque tissu avant la préparation de l'homogénat, à la concentration finale de 400ng/ml, afin de vérifier de l'absence d'hydrolyse du BPA-G dans les conditions de préparation des homogénats.

II.5. Dosage du BPA et de ses métabolites

Le BPA, BPA-G et le BPA-S ont été dosés dans le plasma maternel et fœtal et dans les urines maternelle et les extraits tissulaires après extraction à l'acétonitrile par la méthode mise en place au laboratoire qui utilise la chromatographie liquide de haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) (24). La concentration en BPA et BPA-G des solutions administrées aux fœtus a également été déterminée.

La gamme d'étalonnage était de 10 à 10000ng/ml pour le BPA et de 50 à 50000ng/ml pour le BPA-G et le BPA-S dans les urines. Pour les dosages dans le plasma et dans les tissus, la gamme d'étalonnage était de 1 à 1000 ng/mL et de 5 à 5000ng/ml pour le BPA et BPA-G (BPA-S) respectivement. La LOQ du dosage dans le sang et les tissus pour le BPA et le BPA-G (BPA-S) était de 1 et 5ng/ml respectivement et de 10 et 50ng/ml dans les urines.

II.6. Analyses des données

II.6.1. Analyses des données fœtales

Au cours de la perfusion de BPA (BPA-G), les concentrations à l'équilibre (C_{ss}) de BPA (BPA-G) ont été calculées en faisant la moyenne des concentrations obtenues au cours de la perfusion.

A partir des C_{ss} et de la dose de BPA ou de BPA-G perfusée, les clairances fœtales du BPA et du BPA-G ont été calculées selon les Équation 1 et Équation 2, respectivement.

Équation 1 :
$$Cl f_{BPA} = \frac{\tau_{BPA}}{C_{SS_{BPA}}}$$

Équation 2 :
$$Cl f_{BPAG} = \frac{\tau_{BPAG}}{C_{SS_{BPAG}}}$$

Avec :

$Cl f_{BPA}$: Clairance fœtale du BPA lors d'une perfusion de BPA (en ml/(kg.min))

$Cl f_{BPA-G}$: Clairance fœtale du BPA-G lors d'une perfusion de BPA-G (en ml/(kg.min))

τ_{BPA} : Taux de perfusion fœtale du BPA (en μ moles/(kg.min))

τ_{BPA-G} : Taux de perfusion fœtale du BPA-G (en μ moles/(kg.min))

$C_{SS_{BPA}}$: Concentration à l'équilibre de BPA obtenue lors d'une perfusion de BPA (en μ M)

$C_{SS_{BPA-G}}$: Concentration à l'équilibre de BPA-G obtenue lors d'une perfusion de BPA-G (en μ M)

II.6.2. Analyses des données maternelles

En raison du caractère stable des concentrations plasmatiques maternelles en BPA, BPA-G et BPA-S, la concentration à l'équilibre du BPA, BPA-G et BPA-S a été calculée en faisant la moyenne des concentrations obtenues durant toute la durée de la perfusion.

Pour chaque prélèvement, les quantités de BPA, BPA-G et BPA-S éliminées dans les urines maternelles ont été calculées en multipliant les concentrations urinaires en BPA, BPA-G et BPA-S par le volume urinaire. Ces quantités ont été converties en moles et la quantité de BPA total éliminé dans les urines au cours de la perfusion a été calculée en faisant la somme des quantités molaires de BPA, BPA-G et BPA-S urinaires recueillies. Cette quantité a été exprimée en pourcentage de la dose de BPA ou de BPA-G (exprimées en moles) administrée au fœtus pendant la même période.

La quantité totale de BPA-G retrouvée dans les urines maternelles a été comparée à la valeur de cette quantité qui peut être estimée à partir de l'équation 3.

Equation 3 : $X_u = Cl_r \times AUC(0-48h)^*$

*Où X_u est la quantité de BPA-G excrétée dans les urines maternelles et $AUC(0-48h)$, l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA-G évaluée au cours de la perfusion de BPA-G au fœtus en utilisant la méthode des trapèzes linéaires ; Cl_r est la clairance rénale du BPA-G qui a précédemment été évaluée chez la brebis gravide à 3.35ml/kg.min.

III. Résultats

III.1. Impact des traitements sur les paramètres physiologiques du fœtus

Les valeurs moyennes des paramètres physiologiques sanguins fœtaux ont été les suivantes : $\text{pH} = 7.37 \pm 0.03$; $\text{pO}_2 = 26.2 \pm 5.8$ mmHg ; $\text{pCO}_2 = 51.4 \pm 4.8$ mmHg. Ces valeurs n'ont pas différé significativement par rapport aux valeurs physiologiques définies par Dawes (1969) : $\text{pH} = 7.33$; $\text{pO}_2 = 24$ mmHg ; $\text{pCO}_2 = 45$ mmHg.

Ces données confirment l'innocuité des manipulations expérimentales (perfusion, prélèvements de sang) réalisées sur les fœtus.

III.2. Evaluation des doses de BPA et de BPA-G perfusées aux fœtus

Les doses nominales de BPA et de BPA-G ont été déterminées sur la base d'une estimation du poids du fœtus à 2.5kg. Les doses n'ont pas été corrigées en prenant en compte la concentration évaluée de la solution administrée en raison de la similarité des valeurs calculées par rapport aux valeurs attendues de concentrations, à l'exception des doses de BPA-G de l'essai pilote (fœtus B3 et B4). Ces fœtus ont reçu une perfusion d'une solution de BPA-G à une concentration évaluée à 0.71 mg/mL et 0.61mg/mL au lieu de 1.2mg/mL. La différence entre la concentration nominale et la concentration évaluée a été cohérente avec le résultat du test de pureté des fractions réalisé après l'étude pilote et qui a estimé la pureté de la fraction de BPA-G utilisée lors de cet essai à 50% au lieu de 88%. Pour ces deux fœtus, la dose réelle perfusée a donc été corrigée à la fois par le poids du fœtus et la concentration en BPA-G de la solution administrée.

III.3. Exposition fœtale au Bisphénol A et à ses métabolites

Les concentrations plasmatiques fœtales moyennes en BPA, BPA-G et BPA-S au cours de la perfusion ont été calculées (Tableau 7).

Tableau 7 : Concentrations moyennes en ng/mL de BPA, BPA-G et BPA-S dans le plasma fœtal obtenues au cours de la perfusion IV fœtale de différentes doses de BPA ou de BPA-G pendant 72h.

Pour les fœtus de l'étude pilote (B1, B2, B3 et B4), les 3 prélèvements de sang pour le dosage de BPA ont été obtenus au bout de 24, 48 et 72h.

Pour les fœtus de l'étude expérimentale (B6 à B12, B14, B15), les 3 prélèvements de sang pour le dosage de BPA ont été obtenus au bout de 66, 69 et 72h de perfusion.

* le BPA a été administré dans la cavité amniotique (B8).

Fœtus	Perfusion fœtale	Poids (kg)	Dose (mg/(kg.j))	Dose (nmol/(kg.min))	BPA (ng/mL)	BPA-G (ng/mL)	BPA-S (ng/mL)	BPA/BPA-G (%)
B9	BPA	2.7	0.9	2.8	<LOQ	123	20	-
B14	BPA	2.9	0.9	2.6	<LOQ	384	-	-
B15	BPA	3.5	3.6	11	18	6152	81	0.3
B10	BPA	2.2	5.7	17	20	5922	69	0.3
B2	BPA	2.2	5.7	17	14	6127	81	0.2
B1	BPA	2.0	6.2	19	31	5254	140	0.6
B11	BPA	2.0	31.2	95	122	22879	514	0.5
B12	BPA-G	3.7	1.0	1.7	<LOQ	5802	108	<0.02
B4	BPA-G	4.0	1.1	1.2	<LOQ	5165	64	<0.02
B6	BPA-G	2.1	1.8	3.1	<LOQ	10486	120	<0.1
B3	BPA-G	2.2	2.3	4.5	<LOQ	12243	110	<0.1
B7	BPA-G	3.1	8.1	14	<LOQ	19875	175	<0.05
B8*	BPA-G	2.5	10	17	23.2	13174	316	0.2

- **Perfusion IV fœtale de BPA**

Le BPA n'a pas été détecté dans le plasma fœtal lors de la perfusion de BPA à la dose de 0.9 mg/kg. Lorsque le BPA a été perfusé au fœtus à une dose comprise entre 3.6 et 6.2 mg/kg par jour, la concentration moyenne à l'équilibre en BPA du plasma fœtal a varié entre 14 et 31 ng/ml (moyenne de 21 ng/ml). Les concentrations moyennes correspondantes de BPA-G et de BPA-S ont été d'environ 6 µg/mL et de 100 ng/ml, respectivement. Pour la plus forte dose de BPA (31 mg/kg par jour), les concentrations moyennes de BPA, BPA-G et BPA-S ont été de 122 ng/ml, 23 µg/ml et 514 ng/ml, respectivement, ce qui suggère que les concentrations de BPA et de ses métabolites varient de façon relativement proportionnelle à la dose de BPA pour une gamme de dose comprise entre 4 et 30 mg/kg.

Lorsque le BPA a été perfusé à la plus faible dose (0.9mg/kg/j), les concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G ont été 20 fois inférieures à celles observées pour une dose de BPA seulement 4 fois supérieure (4mg/kg), ce qui suggère que les mécanismes de formation ou d'élimination fœtale du BPA-G sont dépendants de la dose de BPA.

Pour les 2 fœtus de l'étude pilote qui ont reçu une perfusion de BPA à la dose de 6.2 et 5.7 mg/(kg.j), les concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G observées au bout de 72h de perfusion ont peu différencié de celles observées au bout de 24h (valeur moyenne : 6120 ng/ml vs 5261 ng/mL), ce qui suggère que les concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G atteignent un état d'équilibre dès 24h de perfusion de BPA.

- **Perfusion IV fœtale de BPA-G**

La concentration moyenne de BPA-G a été proportionnelle à la dose de BPA-G perfusée pour les doses comprises entre 1 et 2 mg/kg par jour tandis que pour des doses 4 à 5 fois plus fortes (8-10 mg/kg par jour), la concentration moyenne de BPA-G a présenté des valeurs respectivement 2 et 4 fois inférieures à celles prédites par une relation de proportionnalité avec la dose.

Pour les 2 fœtus de l'étude pilote qui ont reçu une perfusion de BPA-G, les concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G observées au bout de 72h de perfusion ont été du même ordre de grandeur que celles observées au bout de 24h (valeur moyenne : 9277 vs 8803 ng/ml), ce qui suggère que les concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G ont atteint un état d'équilibre au bout de 24h de perfusion de BPA-G.

Le BPA a été détecté uniquement dans le plasma du fœtus qui a reçu une perfusion de BPA-G dans la cavité amniotique à la forte dose de 10 mg/kg par jour (17 nmoles/(kg.min)). La concentration moyenne de BPA de ce fœtus (23 ng/ml) a été du même ordre de grandeur que celle d'un fœtus perfusé avec du BPA à une dose molaire équivalente (6 mg/kg par jour, 17 nmoles/(kg.min)).

III.4. Analyse des données plasmatiques maternelles

- **Administration fœtale de BPA**

Le BPA et le BPA-S ont été détectés seulement dans le plasma de la brebis dont le fœtus a reçu une perfusion intraveineuse de la plus forte dose de BPA (31 mg/kg par jour).

La Figure 10 représente l'évolution de ces concentrations plasmatiques au cours de la perfusion de BPA. Le BPA et ses métabolites ont été détectés dans le sang collecté lors du premier prélèvement qui a suivi la mise en place de la perfusion (3h après le début de la perfusion) et les concentrations de BPA et de ses métabolites ont peu fluctué au cours de la perfusion. Cette observation indique que l'équilibre entre les circulations maternelles et fœtales est rapidement atteint.

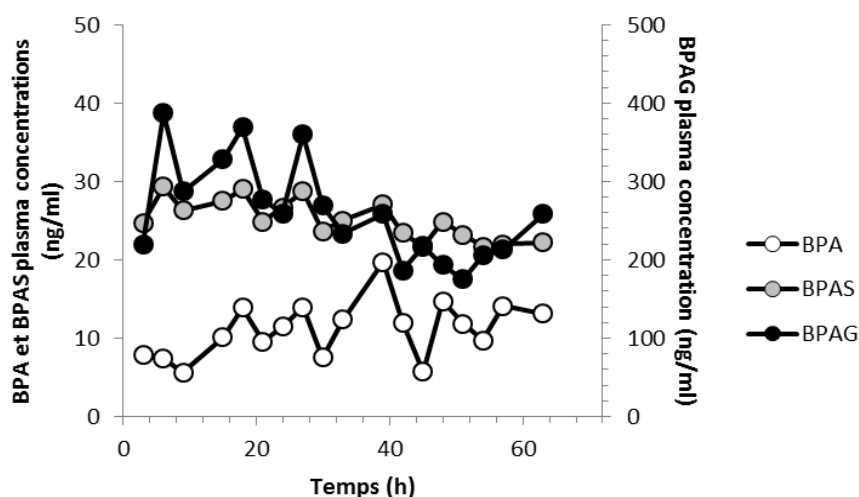


Figure 10 : Evolution des concentrations plasmatiques maternelles de BPA, BPA-G et BPA-S à partir de la 3^e heure de perfusion IV fœtale de BPA et jusqu'à la 72^e heure, à la dose de 31.3 mg/kg par jour (une brebis).

Le BPA-G a été détecté dans le plasma des 5 brebis dont le fœtus a reçu une perfusion intraveineuse de BPA à une dose comprise entre 3.6 et 31 mg/kg par jour. La Figure 11 illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en BPA-G de 4 brebis au cours de la perfusion intraveineuse fœtale de BPA à des doses comprises entre 3.6 et 6.2 mg/kg par jour. Le BPA-G a été détecté dans le plasma maternel dès le premier prélèvement qui a suivi la mise en place de la perfusion chez 3 brebis sur 4 (3h après le début de la perfusion). Les niveaux des concentrations plasmatiques maternelles en BPA-G ont peu différenciés (à l'exception d'une brebis qui a présenté des niveaux plus faibles) et ont fluctué sans qu'aucune tendance générale de leur évolution temporelle n'ait pu être mise en évidence : en particulier, nous n'avons pas observé d'augmentation de ces concentrations au cours du temps.

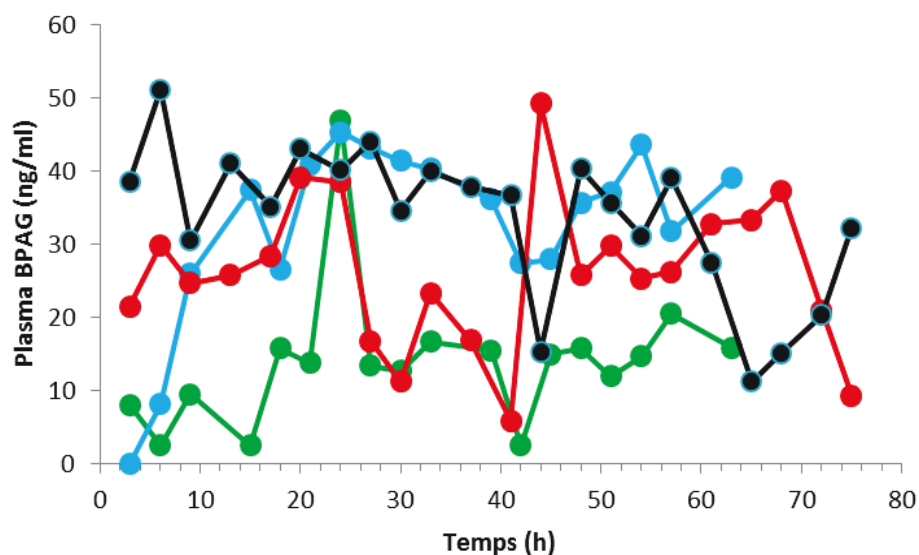


Figure 11 : Evolution des concentrations plasmatiques maternelles en BPA-G au cours des 72h de perfusion IV fœtale de BPA à des doses comprises entre 3.6 et 6.2 mg/kg par jour (4 brebis).

Le Tableau 8 présente les valeurs des aires sous la courbe des concentrations plasmatiques maternelles (AUC_{0-72h}) en BPA-G obtenues au cours des perfusions IV fœtales de BPA et des quantités correspondantes de BPA éliminées dans les urines maternelles sous la forme de BPA-G estimées par le produit de l' AUC_{0-72h} par la clairance rénale du BPA-G de la brebis gravide (3.35 ml/(kg.min), 9L/h).

Tableau 8 : Aires sous la courbe des concentrations plasmatiques maternelles (AUC_{0-72h}) en BPA-G obtenues au cours des perfusions IV fœtales de BPA, quantités totales de BPA perfusées aux fœtus ($dose_{tot}$) et quantités correspondantes de BPA éliminées dans les urines maternelles (X_u). * peu de valeurs détectées.

Fœtus	Perfusion fœtale	Dose (nmoles/ (kg.min))	Dose _{tot} (μmoles)	AUC_{0-72h} (nmoles.h/L)	X_u (μmoles)	X_u (% dose)
B9	BPA	2.8	32	-	-	-
B14	BPA	2.6	34	591*	5*	16*
B15	BPA	11	172	6031	54	32
B10	BPA	17	170	2393	22	13
B2	BPA	17	186	6233	56.	29
B1	BPA	19	163	4831	44	27
B11	BPA	95	890	40595	365	41

La fraction estimée de la dose de BPA administrée au fœtus éliminée dans les urines maternelles sous la forme de BPA-G a varié entre 13 et 41% ($26 \pm 10\%$).

- **Administration fœtale de BPA-G**

Dans le cas d'une administration fœtale de BPA-G, un prélèvement de sang maternel sur cinq a été dosé (1 prélèvement / 15h). Seule la brebis dont le fœtus a reçu la plus forte dose de BPA-G (10 mg/kg correspondant à un total de 345 μ moles) a présenté des valeurs quantifiables de BPA-G (2 sur 4, de 9 et 19 ng/ml). A partir de ces données, la quantité de BPA-G éliminée dans les urines maternelles a été estimée à 9 μ moles, soit 2.5% de la dose administrée au fœtus.

III.5. Clairances plasmatiques fœtales

Le Tableau 9 donne les valeurs des clairances fœtales de BPA et BPA-G obtenues lors d'une perfusion de BPA et de BPA-G.

Tableau 9 : Clairances plasmatiques fœtales de BPA (Cl_{BPA}) et de BPA-G (Cl_{BPA-G}), obtenues au cours de la perfusion IV de BPA ou BPA-G.

Fœtus	Perfusion fœtale	Dose (mg/(kg.j))	Dose (nmoles/(kg.min))	BPA (nM)	BPA-G (nM)	Cl_{BPA} (ml/(kg.min))
B9	BPA	0.9	2.8	<LOQ	303	-
B14	BPA	0.9	2.6	<LOQ	949	-
B15	BPA	3.6	11	79	15223	137
B10	BPA	5.7	17	87	14653	199
B2	BPA	5.7	17	62	26860	280
B1	BPA	6.2	19	134	23032	142
B11	BPA	31.2	95	534	56610	178
Fœtus	Perfusion fœtale	Dose (mg/(kg.j))	Dose (nmoles/(kg.min))	BPA (nM)	BPA-G (nM)	Cl_{BPA-G} (ml/(kg.min))
B12	BPA-G	1.0	1.7	<LOQ	14357	0.12
B4	BPA-G	1.1	1.2	<LOQ	22641	0.053
B7	BPA-G	1.8	3.1	<LOQ	25946	0.12
B3	BPA-G	2.3	4.5	<LOQ	53669	0.083
B7	BPA-G	8.1	14	<LOQ	49178	0.28
B8*	BPA-G	10	17	101.5	32597	0.53

La clairance moyenne du BPA a été de 187 ml/(kg.min) pour des doses de BPA comprises entre 3.6 et 31.2 mg/kg par jour.

La clairance moyenne du BPA-G a été de 0.09 ml/(kg.min) pour des doses de BPA-G comprises entre 1 et 2 mg/kg par jour.

Pour les doses élevées de BPA-G (8 et 10 mg/kg par jour), la clairance du BPA-G a été estimée à une valeur environ 4-5 fois supérieure (0.3 à 0.5 ml/(kg.min)).

- **Clairance fœto-maternelle placentaire du BPA**

A partir des seules données de la brebis dont le fœtus a reçu la plus forte dose de BPA, la clairance placentaire fœto-maternelle (Cl_{FM}) du BPA a été estimée à 159 ml/min (soit 80 ml/(kg.min)) à partir de l'équation de Szeto (1982) ci-dessous.

$$Cl_{FM} = Cl_M \times \frac{C_M}{C_F}$$

Avec Cl_M : clairance maternelle du BPA (25 ml/kg.min, soit 1750 ml/min pour une brebis de 70kg), C_M et C_F , les concentrations plasmatiques maternelles (11 ng/ml) et fœtales (121 ng/ml) à l'équilibre en BPA obtenues lors de la perfusion fœtale de BPA.

Lorsque l'on applique cette équation aux données des concentrations plasmatiques maternelles (14 ng/ml) et fœtales (13174 ng/ml) en BPA-G obtenues à partir de la perfusion de la plus forte dose de BPA-G (10 mg/kg) et en utilisant une valeur de clairance du BPA-G de 3.5 ml/(kg.min) (245 ml/min), la clairance placentaire fœto-maternelle (Cl_{FM}) du BPA-G est estimée à 0.26 ml/min, soit environ 0.10 ml/(kg.min). Cette valeur, du même ordre de grandeur que la clairance fœtale du BPA-G évaluée pour des doses de BPA-G comprises entre 1 et 2 mg/(kg.j), correspond à 20% de la clairance fœtale du BPA-G estimée pour ce niveau de dose de BPA-G (0.5 ml/(kg.min)).

Pour les doses plus faibles de BPA-G (1-8 mg/(kg.j)), les concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G ont varié de 5165 à 19875 ng/ml. Les concentrations plasmatiques maternelles en BPA-G ont été inférieures à la LOQ (5ng/ml). A partir d'une valeur arbitraire de ces dernières fixée à 1 ng/ml et de la concentration plasmatique fœtale en BPA-G la plus élevée (19875 ng/ml), il est possible de prédire une valeur de la clairance placentaire fœto-maternelle de BPA-G inférieure à 0.01-0.05 ml/min (0.004-0.02 ml/(kg.min)), ce qui correspond à environ 2-20% de la clairance fœtale du BPA-G.

III.6. Analyse des données urinaires maternelles

Le BPA n'a pas été détecté dans les urines maternelles suite à la perfusion fœtale de BPA ou de BPA-G. Du BPA-G a été retrouvé dans les urines de toutes les brebis à l'exception de celle dont le fœtus a reçu la plus faible dose de BPA-G (0.2 mg/kg par jour). Le BPA-S n'a pas été détecté dans les urines de cette brebis ainsi que dans les urines des deux brebis qui ont reçu du BPA aux doses respectives de 0.9 et 3.6 mg/kg par jour.

La Figure 12 représente l'évolution des quantités molaires de BPA-G dans les urines de 4 brebis dont le fœtus a été perfusé avec du BPA-G ou du BPA à différents niveaux de dose.

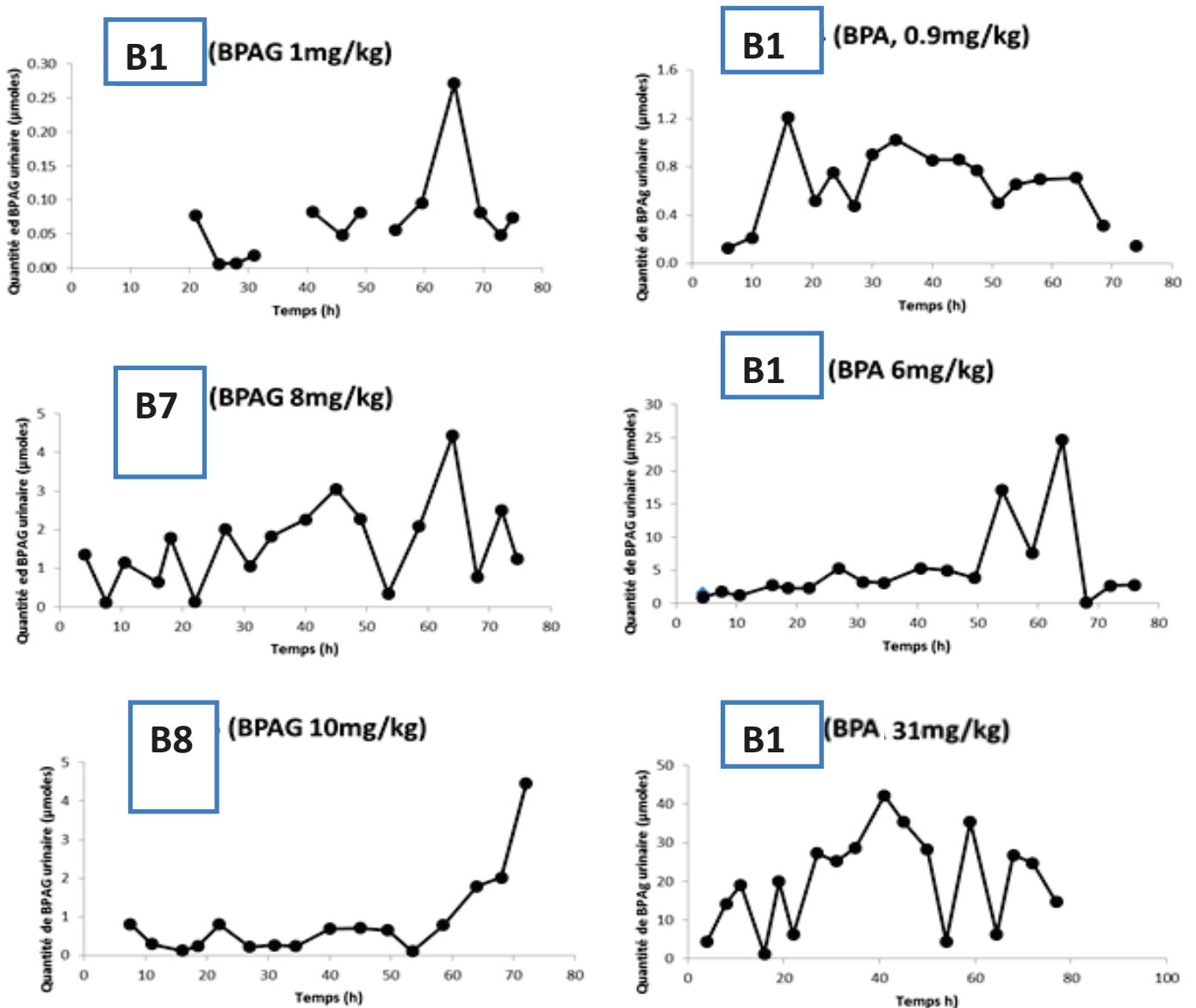


Figure 12 : Evolution des quantités de BPA-G recueillies dans les urines maternelles des brebis dont le fœtus a reçu une perfusion de BPA-G [1, 8 et 10mg/kg par jour] ou de BPA [0.9, 6 et 31mg/kg par jour].

Les quantités de BPA-G éliminées dans les urines maternelles ont été généralement plus faibles au cours des premières 24h qui suivent le lancement de la perfusion. Ces quantités ont fluctué ensuite au cours du temps. Le Tableau 10 donne les quantités de BPA total recueillies dans les urines au cours de la perfusion fœtale de BPA ou de BPA-G.

Tableau 10 : Quantités de BPA-G, BPA-S et BPA total (BPAtot) éliminées dans les urines maternelles au cours de la perfusion fœtale de BPA ou de BPA-G.

Fœtus	Perfusion fœtale	Dose (mg/(kg.j))	Dose tot (μmoles)	BPA-G (μmoles)	BPA-S (μmoles)	BPA _{tot} (μmoles)	BPA tot (% dose)	BPA-S (% quantité éliminée)
B9	BPA	0.9	32	-	-	-	-	-
B14	BPA	0.9	34	11	-	11	32	-
B15	BPA	3.6	172	65	0.4	65	38	0.4
B10	BPA	5.7	170	92.5	2.5	95	56	3
B2	BPA	5.7	186	37	7	44	23	16
B1	BPA	6.2	163	40	7	47	23	15
B11	BPA	31.2	890	364	6	370	42	2
Fœtus	Perfusion fœtale	Dose (mg/(kg.j))	Dose tot (μmoles)	BPA-G (μmoles)	BPA-S (μmoles)	BPA _{tot} (μmoles)	BPA tot (% dose)	BPA-S (% quantité éliminée)
B13	BPA-G	0.2	-	-	-	-	-	-
B12	BPA-G	1.0	29	0.9	0.4	1.3	5	9
B4	BPA-G	1.1	21	4	1	5	26	18
B6	BPA-G	1.8	29	-	-	-	-	-
B3	BPA-G	2.3	42	7	3	10	23	33
B7	BPA-G	8.1	193	29	2	31	16	5
B8*	BPA-G	10	195	16	0.3	16	8	2

La fraction de la dose de BPA perfusée au fœtus éliminée dans les urines maternelles sur 72 heures a peu varié en fonction de la dose de BPA (23-56%), sa valeur moyenne a été estimée à $36 \pm 13\%$.

La fraction de la dose de BPA-G perfusée au fœtus éliminée dans les urines maternelles sur 72 heures a été plus variable, de 5 à 26%, de façon indépendante de la dose administrée avec une valeur moyenne de $16 \pm 9\%$, soit environ la moitié de la valeur obtenue pour le BPA.

Le BPA-S a représenté entre 0.4 et 33% de la quantité de BPA éliminée dans les urines. La fraction moyenne de BPA éliminée sous la forme de BPA-S dans les urines tend à être plus importante lorsque les fœtus ont reçu une administration de BPA-G que lors d'une administration de BPA.

III.7. Biodistribution du BPA et de ses métabolites

Le tableau 11 donne les concentrations de BPA, BPA-G et BPA-S dans les tissus des quatre fœtus de l'étude pilote.

Tableau 11 : Concentrations de BPA, BPA-G et BPA-S dans les tissus des fœtus de l'étude pilote. Les fœtus B1 et B2 ont reçu une perfusion IV de BPA à la dose 6 mg/(kg.j), les fœtus B3 et B4 ont reçu une perfusion IV de BPA-G aux doses respectives de 2 et 1 mg/(kg.j). Les mesures ont été réalisées au bout de 72h de perfusion IV fœtale de BPA ou de BPA-G.

Echantillons	Fœtus B1			Fœtus B2		
	BPA (ng/g)	BPA-G (ng/g)	BPA-S (ng/g)	BPA (ng/g)	BPA-G (ng/g)	BPA-S (ng/g)
Cotylédon	7	19	< LOQ	19	14	17
Foie	6600	3692	209	43	1989	36
Surrénales				183	38	19
Rein	1016	2153	118	47	3928	36
TAP	1264	1303	187	130	1485	24
Testicule				57	2767	24
Ovaire	338	215	35			
Utérus	839	3262	210			
Glandes mammaires	324	2266	110			
Hémis. cérébraux	175	71	< LOQ	18	218	< LOQ
Tronc cérébral	390	132	< LOQ	33	343	< LOQ
Cervelet	278	216	< LOQ			
Hypothalamus	408	150	< LOQ			
Liquide amniotique	47	579	188	< LOQ	1477	< LOQ
Contenu stomacal	658	5114	1627	< LOQ	1774	< LOQ
Urine	38	21263	1260	< LOQ	6768	66
Css Sang fœtal	31	5254	140	14	6127	134

Echantillons	Fœtus B3			Fœtus B4		
	BPA (ng/g)	BPA-G (ng/g)	BPA-S (ng/g)	BPA (ng/g)	BPA-G (ng/g)	BPA-S (ng/g)
Cotylédon	27	1221	20	12	1192	29
Foie	260	4952	90	61	2585	60
Surrénales	280	4097	36			
Rein	170	4893	48	80	1911	22
TAP	86	1950	39	43	1036	18
Testicule				30	1548	18
Ovaire						
Utérus	24	5446	43			
Glande mammaire	85	2989	42			
Hémis. cérébraux	21	233	< LOQ	3	59	< LOQ
Tronc cérébral	6	289	< LOQ	3	163	< LOQ
Cervelet	70	358	< LOQ	12	126	< LOQ
Hypothalamus	45	370	< LOQ	8	62	< LOQ
Liquide amniotique	17	8601	264			
Contenu stomacal	16	5947	99	< LOQ	1577	< LOQ
Urine	< LOQ	15662	209	< LOQ	5683	59
Css Sang fœtal	< LOQ	12243	110	< LOQ	5165	64

Le BPA et le BPA-G ont été quantifiés dans tous les tissus prélevés. Le BPA-S a été également retrouvé dans tous les prélèvements, hormis dans le cerveau. Les fœtus perfusés avec du BPA ont présenté des concentrations tissulaires en BPA supérieures à leur concentration plasmatique.

Au sein des tissus cibles des œstrogènes (ovaires, utérus, tissu mammaire), les concentrations en BPA ont été environ 10-25 fois supérieures aux concentrations plasmatiques (330ng/g-839ng/g). Les fœtus (B3 et B4) ayant reçu une perfusion de BPA-G ont présenté des concentrations tissulaires en BPA au moins 10-300 fois supérieures aux concentrations plasmatiques (<LOQ), les concentrations les plus importantes ont été observées au niveau du foie, des surrénales et des reins.

Ces données sont à considérer avec précaution car le rendement d'extraction de cette méthode n'a pas été évalué.

Le tableau 12 présente pour chaque tissu prélevé les moyennes des ratios des concentrations tissulaires (en nmol/g) de BPA ou de BPA-G rapportées à la dose de BPA ou de BPA-G reçue (en nmol/kg de poids corporel).

Tableau 12 : Moyennes des ratios des concentrations tissulaires en BPA ou BPA-G en nmol/g de tissu sur la dose de BPA ou de BPA-G reçue en nmol/kg de poids corporel (n = nombre d'individus pris en compte pour le calcul de la moyenne / [BPA] = concentration tissulaire en BPA / [BPA-G] = concentration tissulaire en BPA-G).

Les brebis dont les tissus fœtaux ont été analysés sont :

- après perfusion de BPA → B14 (2.6nmol/kg/min de BPA), B9 (2.8 nmol/kg/min), B15 (11 nmol/kg/min), B10 (17 nmol/kg/min), B11 (95 nmol/kg/min).
- Après perfusion de BPA-G → B5 (1,6 nmol/kg/min de BPA-G), B12 (1.7 nmol/kg/min), B6 (3.1nmol/kg/min), B7 (14 nmol/kg/min), B8 (17 nmol/kg/min)

Echantillon	Perfusion BPA				Perfusion BPA-G			
	Ratio [BPA]/dose		Ratio [BPA-G]/dose		Ratio [BPA]/dose		Ratio [BPA-G]/dose	
	Moyenne.10 ⁻³	n	Moyenne.10 ⁻³	n	Moyenne.10 ⁻³	n	Moyenne.10 ⁻³	n
Cervelet	7.0	5	50	5	12	5	392	5
Cotylédon	7.6	5	138	5	16	5	1500	5
Foie	6.9	5	364	5	30	5	3100	5
Gonade	12	4	168	5	17	5	830	5
Glande Mammaire	11	3	338	2	15	5	2500	5
Hémisphère Cérébral	15	5	30	5	7.5	5	300	5
Hypothalamus	7.3	5	41	5	11	4	220	4
Hypophyse	5.2	5	129	5	15	5	960	5
Rein	15	5	530	5	24	5	4000	5
Surrénales	13	5	243	5	17	5	2300	5
Tissu Adipeux Périrénal	11	5	196	5	14	5	1400	5
Tronc Cérébral	44	5	92	5	30	5	440	5
Utérus	5.3	3	637	2	11	5	3300	5
Thyroïde	8.6	4	235	4	16	2	925	2

Après une perfusion fœtale de BPA-G, le BPA est détecté dans les tissus fœtaux.

Les concentrations dans différents tissus en BPA et BPA-G ont été évaluées pour les fœtus de 10 brebis après perfusion de BPA ou BPA-G.

Les fœtus ayant reçu du BPA sont ceux des brebis B14, B9, B15, B10, B11. Ceux ayant reçu du BPA-G sont ceux des brebis B5, B12, B6, B7, B8.

- **Concentrations tissulaires et plasmatiques en BPA ou BPA-G après perfusion de BPA**

Le BPA est retrouvé dans tous les tissus examinés. Les concentrations les plus importantes sont observées au niveau des reins, du tissu adipeux périrénal, des surrénales et du SNC.

Le BPA-G est distribué de façon beaucoup plus hétérogène. Les concentrations les plus importantes sont observées au niveau du plasma, de l'utérus, des reins et du foie.

Les ratios concentration/dose (en molaire) de BPA et de BPA-G fluctuent sensiblement en fonction de la dose de BPA sans qu'aucune tendance générale de leur évolution ne soit mise en évidence en fonction de la dose.

- **Concentrations tissulaires et plasmatiques en BPA ou BPA-G après perfusion de BPA-G**

Du BPA est retrouvé à des ratios concentration/dose (en molaire) du même ordre de grandeur que ceux obtenus après administration de BPA. Les concentrations en BPA les plus importantes sont observées au niveau du foie et des reins, des gonades et des surrénales. Les concentrations en BPA-G les plus élevées sont observées au niveau du plasma, des reins, de l'utérus et du foie.

Les concentrations plasmatiques et tissulaires en BPA-G sont 10 fois plus élevées à l'issue d'une perfusion de BPA-G que celles observées après une perfusion de BPA.

Le ratio concentration/dose (en molaire) de BPA et de BPA-G fluctuent sensiblement en fonction de la dose de BPA-G sans qu'aucune tendance générale de leur évolution ne soit mise en évidence en fonction de la dose.

En résumé, les concentrations tissulaires en BPA obtenues après perfusion de BPA-G sont du même ordre de grandeur que celles obtenues après perfusion de BPA à dose molaire équivalente mais les concentrations tissulaires en BPA-G obtenue après perfusion de BPA-G sont très supérieures à celles obtenues après perfusion de BPA à dose molaire équivalente.

IV. Discussion

Les objectifs de notre étude étaient d'évaluer l'élimination du BPA-G au niveau de l'unité fœto-placentaire, d'analyser les mécanismes d'élimination du BPA-G fœtal et de poursuivre la caractérisation de l'exposition fœtale au BPA et à ses métabolites aux niveaux tissulaire et plasmatique.

- **Données plasmatiques et urinaires**

- **Élimination des métabolites du BPA par le fœtus ovin**

La pharmacocinétique fœtale du BPA est caractérisée par une clairance élevée (187ml/kg.min) dont la composante principale est la clairance placentaire fœto-maternelle qui s'élève à 80 ml/kg.min. Ceci est en accord avec les travaux de Corbel et al. (2013) qui ont mis en évidence une clairance fœtale totale de 200 mL/(kg.min). Ce résultat suggère que le fœtus est capable d'éliminer le BPA rapidement, même pour de fortes doses.

La fraction moyenne de la dose de BPA administrée au fœtus qui est recueillie dans les urines maternelle sous forme de BPA-G est de 36%. Cette valeur est cohérente avec celle estimée à partir des données plasmatiques maternelles (26±10%). La différence d'estimation peut être liée à la fraction de BPA éliminée dans les urines sous la forme de BPA-S (0.4-30%), non prise en compte lors des estimations réalisées à partir des données plasmatiques.

La fraction de la dose de BPA-G perfusée au fœtus éliminée dans les urines maternelles a été plus variable, de 5 à 26%, de façon indépendante de la dose administrée avec une valeur moyenne de 16± 9 %, soit environ la moitié de la valeur obtenue pour le BPA. Pour le fœtus qui a reçu la plus forte dose de BPA-G, la fraction de la dose de BPA-G administrée au fœtus éliminée dans les urines maternelles (8%) est cohérente avec la faible valeur estimée à partir des données plasmatiques maternelles (2.5%). Ce résultat est à mettre en relation avec la part de la clairance fœtale du BPA-G attribuée à la clairance placentaire fœto-maternelle, dont la valeur maximale a été estimée à 20% à partir des données plasmatiques maternelles.

- **Pharmacocinétique fœtale du BPA et BPA-G**

Les concentrations plasmatiques fœtales en BPA ont varié de façon relativement proportionnelle à la dose de BPA administrée au fœtus pour des doses de BPA supérieures ou égales à 3.6 mg/(kg.j). Pour des doses de BPA administrées de l'ordre de 5 mg/(kg.j), la concentration plasmatique fœtale, à l'équilibre, de BPA a été de 20 ng/ml, ce qui est cohérent avec les données obtenues par Corbel et al (2013).

En revanche, nos données suggèrent que la pharmacocinétique fœtale du BPA-G n'est pas linéaire. La clairance moyenne du BPA-G a été de l'ordre de 0.1 ml/kg.min pour des doses de BPA-G comprises entre 1 et 2 mg/kg. Pour les doses élevées de BPA-G (8 et 10 mg/kg), la clairance du BPA-G a été estimée à une valeur environ 4-5 fois supérieure (0.3-0.5 ml/kg.min). Ces données suggèrent que si le taux de conversion de BPA en BPA-G est indépendant de la dose de BPA, la non proportionnalité de la clairance du BPA-G avec le niveau d'exposition au BPA-G pourrait expliquer la non proportionnalité des concentrations plasmatiques fœtales en BPA-G avec la dose de BPA.

○ **Hydrolyse fœtale du BPA-G**

Le BPA a été seulement détecté dans le plasma du fœtus qui a reçu une perfusion de BPA-G dans la cavité amniotique à la forte dose de 10 mg/(kg.j) (17 nmoles/(kg.min)). La concentration moyenne de BPA de ce fœtus (23 ng/ml) a été du même ordre de grandeur que celle d'un fœtus perfusé avec du BPA à une dose molaire équivalente (6 mg/(kg.j), 17 nmoles/(kg.min)). Cette observation est cohérente avec l'hypothèse d'une hydrolyse importante du BPA-G en BPA. Dans ce dernier cas, le ratio entre les concentrations plasmatiques fœtales de BPA et de BPA-G a été proche de celui observé lors de la perfusion de BPA, ce qui conforte l'hypothèse de l'hydrolyse du BPA-G.

Ainsi, le BPA-G pourrait être hydrolysé dans différents tissus ou liquides au sein de l'unité foeto-placentaire, notamment au niveau du liquide amniotique ou de l'intestin comme cela a été suggéré chez le fœtus de rongeurs pour le glucuronide de p-phényl acide benzoïque (Nanbo et al., 1982). Cette hydrolyse pourrait alors modifier l'exposition fœtale au BPA.

○ **Sous quelle forme le BPA-G passe-t-il du fœtus ovin à sa mère ?**

Si on fait l'hypothèse selon laquelle le BPA-G passe la barrière placentaire sous une forme inchangée, la concentration à l'équilibre de BPA-G dans le sang maternel peut être prédite ($C_{SS\ BPA-G\ prédite}$) à partir de la dose de BPA-G ($Dose_{\ BPA-G\ urine}$) qui passe du fœtus à la mère, estimée à partir du pourcentage de la dose retrouvée dans les urines maternelles ($\mu moles$), de la clairance du BPA-G ($Cl_{\ BPA-G\ mère}$) chez la brebis gravide (3.5 ml/(kg.min), 245ml/min) selon l'équation 4. Ceci est valable en faisant l'hypothèse que tout le BPA-G qui passe à la mère est éliminé dans les urines sous forme de BPA-G.

Equation 4 :

$$C_{SS\ BPA-G\ prédite} = \frac{Dose_{\ BPA-G\ urine}}{Cl_{\ BPA-G\ mère}}$$

Pour les deux plus fortes doses de BPA-G, 8 mg/(kg.j) (16% de la dose éliminée dans les urines maternelles, soit 2.2 nmoles/(kg.min), 3kg de poids corporel, 7nmoles/min) et 10 mg/(kg.j) (8% de la dose éliminée dans les urines maternelles, soit 1.3 nmoles/(kg.min), 2.5kg de poids corporel, soit 3.4nmoles/min), les valeurs prédites des concentrations plasmatiques maternelles en BPA-G sont respectivement 29nM (12ng/ml) et 14nM (6ng/ml). Les données des valeurs observées correspondantes sont <LOQ (5 ng/ml) et 11ng/ml, respectivement.

A partir de l'hypothèse selon laquelle le BPA-G hydrolysé au niveau de l'unité foeto-placentaire passe la barrière placentaire sous la forme de BPA, la C_{ss} de BPA dans le sang maternel peut être prédite à partir de la même équation que pour l'hypothèse 1, en remplaçant les données concernant le BPA-G par celles du BPA. D'après cette hypothèse, les concentrations à l'équilibre de BPA prédites dans le plasma maternel sont inférieures à la LOQ (1ng/ml), soit 0.9 et 0.4 ng/ml pour les doses de 8 et 10 mg/(kg.j). Les concentrations plasmatiques en BPA-G correspondantes devraient être de l'ordre de 20 et 8ng/ml, soit du même ordre de grandeur que les valeurs prédites pour un passage direct du BPA-G.

Les données plasmatiques maternelles ne nous permettent donc pas de conclure sur la forme sous laquelle le BPA-G est éliminé du compartiment fœtal.

Pour mettre à l'épreuve l'hypothèse d'un passage du BPA-G sous la forme de BPA, il faudrait administrer une dose très élevée de BPA-G pour pouvoir détecter du BPA dans la circulation maternelle (100-200 mg/(kg.j), 4-8 mg/(kg.h)). Dans ce cas, la durée de la perfusion IV pourrait être de quelques heures puisque les données obtenues sur la brebis dont le fœtus a reçu la plus forte dose de BPA (30 mg/(kg.j)) montrent que les concentrations plasmatiques maternelles en BPA ont atteint une valeur d'équilibre 3h après le début de la perfusion fœtale de BPA. Les données obtenues pour une forte dose de BPA-G ne pourraient cependant pas être extrapolées à celles attendues pour de plus faibles doses de BPA-G car nos données suggèrent fortement la non linéarité de la pharmacocinétique fœtale du BPA-G.

Une alternative pourrait être de prélever le sang depuis la veine utérine de façon à évaluer la forme prépondérante de BPA éliminée à partir de l'unité foeto-placentaire lors de la perfusion fœtale de BPA-G et d'évaluer la clairance foeto-maternelle du BPA-G. En effet, si une petite partie de la dose de BPA-G passe du fœtus à la mère, la concentration plasmatique est trop faible pour être quantifiée à partir du sang périphérique, car elle sera immédiatement diluée dans le volume sanguin total de la mère (volume sanguin maternel = 20 à 30 fois le volume sanguin fœtal en fin de gestation). En prélevant le sang directement depuis les vaisseaux utérins, la dilution serait limitée.

- **Données tissulaires**

- **Hydrolyse fœtale du BPA-G**

Les données obtenues à partir des concentrations tissulaires en BPA et BPA-G sont en accord avec les données plasmatiques concernant l'hydrolyse du BPA au sein de l'organisme fœtal.

Après une perfusion fœtale de BPA-G, le BPA est détecté dans les tissus fœtaux. Ceci suggère une hydrolyse du BPA-G. De plus, le ratio entre les concentrations tissulaires et plasmatiques de BPA varie de 2 à 4 alors que ce ratio pour le BPA-G est de l'ordre de 0.3, le BPA est donc distribué dans les tissus de façon plus importante que le BPA-G, ce qui est en accord avec les propriétés plus lipophiles du BPA par rapport à ses métabolites.

Les concentrations tissulaires en BPA obtenues après perfusion de BPA-G sont du même ordre de grandeur que celles obtenues après perfusion de BPA à dose molaire équivalente ce qui va dans le sens d'une hydrolyse majeure du BPA-G en BPA. L'équivalence des concentrations tissulaires en BPA dans les deux conditions ne peut pas s'expliquer par des concentrations en BPA-G équivalentes.

- **Pharmacocinétique fœtale du BPA et BPA-G**

Les concentrations tissulaires et plasmatiques en BPA-G obtenue après perfusion de BPA-G sont dix fois plus importantes que celles obtenues après perfusion de BPA à dose molaire équivalente, ce qui est cohérent avec un taux de glucuronidation de l'ordre de 10% lors de perfusion de BPA.

- **Exposition du système nerveux central (SNC) au BPA et au BPA-S**

Le BPA conjugué pourrait traverser la barrière hémato-encéphalique via les transporteurs impliqués dans le passage des œstrogènes conjugués.

Les travaux réalisés chez le fœtus ovin ont mis en évidence une forte activité sulfatase au niveau du SNC (Purinton et al., 1999). La non détection de BPA-S dans le tissu nerveux (mesuré aux niveaux de la glande mammaire, des hémisphères cérébraux, du tronc cérébral, du cervelet, de l'hypothalamus) après la perfusion fœtale de BPA ou de BPA-G est cohérente avec cette hypothèse.

Conclusion

Nous avons pu montrer qu'environ 30 et 15%, du BPA et du BPA-G respectivement administrés au fœtus étaient éliminés via l'organisme maternel essentiellement sous forme de BPA-G (>90%) dans les urines maternelles. En effet, l'élimination du BPA-G à partir de l'unité fœto-placentaire pourrait résulter de la clairance placentaire fœto-maternelle du BPA formé par hydrolyse du BPA-G comme le suggèrent les données obtenues pour le fœtus qui a reçu la plus forte dose de BPA-G.

L'ensemble de ces données ne nous permettent cependant pas de déterminer sous quelle forme le BPA-G passe la barrière placentaire à partir des données plasmatiques maternelles ; les mécanismes intervenant dans l'élimination fœtale du BPA-G restent en partie inconnus.

Nos données suggèrent que le BPA-G formé par métabolisation fœtale est piégé dans le compartiment foeto-amnio-placentaire de par son incapacité à passer la barrière placentaire. L'hypothèse émise à partir de ces observations est que le BPA-G piégé du côté fœtal est éliminé progressivement sous la forme du BPA après son hydrolyse par les glucuronidases présentes dans l'intestin, les tissus fœtaux et/ou le liquide amniotique.

Parallèlement à cela, l'étude des concentrations tissulaires fœtales en BPA et en ses métabolites a conforté l'hypothèse de l'hydrolyse du BPA-G en BPA. En effet, les concentrations tissulaires en BPA obtenues après perfusion de BPA-G sont du même ordre de grandeur que celles obtenues après perfusion de BPA à dose molaire équivalente ce qui va dans le sens d'une hydrolyse majeure du BPA-G perfusé au fœtus en BPA.

L'ensemble de ces résultats suggère une déconjugaison des métabolites inactifs en BPA actifs au sein des tissus fœtaux, suggérant qu'à dose équivalente le BPA-G serait susceptible d'entraîner des effets similaires à ceux du BPA pour le fœtus, c'est-à-dire une perturbation hormonale de type oestrogénomimétique au niveau des tissus cibles. Ainsi, la mise en évidence de l'hydrolyse majeure du BPA-G en BPA dans l'unité foeto-placentaire pourrait être complétée et précisée par l'évaluation de l'effet œstrogène-mimétique du BPA-G administré au fœtus, qui proviendrait de sa réactivation en BPA. Pour ce faire, il est possible de mesurer les concentrations de biomarqueurs tels que la LH, la prolactine ou encore la FSH, au cours de perfusions de BPA ou de BPA-G. En effet, ces hormones peuvent être modulées par les œstrogènes circulants dans l'organisme fœtal.

Il semble également nécessaire de préciser les caractéristiques des échanges du BPA-G entre le fœtus et sa mère, ce qui pourrait être mis en place sur le modèle ovin avec des perfusions fœtales de très fortes doses de BPA-G ou en cathétérissant la veine utérine directement.



Enfin, de nombreuses inconnues persistent quant aux enzymes responsables de l'hydrolyse, telles que leur diversité, leurs substrats, leur quantification ou encore leurs localisations précises. La connaissance de ces différents éléments pourrait permettre de préciser l'exposition fœtale au BPA et à ses métabolites, et d'aider les experts à évaluer si l'exposition fœtale humaine au BPA-G peut présenter un risque pour la santé.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Véronique GAYRARD, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de PUTHON Morgane intitulée « **Caractérisation de l'élimination du Bisphénol A et de ses formes conjugués par le fœtus ovin présentée pour l'obtention du grade de Docteur Vétérinaire, diplôme d'Etat.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 20 avril 2015
Professeure Véronique GAYRARD
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

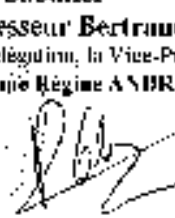
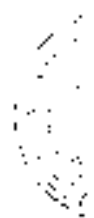
Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jean PARVALE



Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse
Monsieur Jean-Claude BRETHES



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTAUDERT
Par délégation, la Vice-Présidente du CRMT
Madame Régine ANDRÉ DORICOTTI

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Bibliographie

- Anses.** Evaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine : Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective. *Tome 1, Edition scientifique*, mars 2013.
- Anses.** Avis en réponse à la consultation de l'EFSA sur son projet d'avis concernant l'évaluation des risques pour la santé humaine consécutifs à une exposition alimentaire au Bisphénol A, mars 2014.
- www.anses.fr/fr/content/bisphénol consulté le 03 avril 2015
- Ashby J, Tinwell H, Haseman J.** Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed *in utero*. *Regul Toxicol Pharmacol* 30, 156–166, 1999.
- Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB.** Transfer of bisphenol A across the human placenta. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 393:e1–7, 2010.
- Barry JS, Anthony RV.** The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology*, 69:55–67, 2008.
- Bazer FW, Spencer TE, Thatcher WW.** Growth and development of the ovine conceptus. *J Anim Sci.* 90(1):159-70, 2012.
- Becker K, Goen T, Seiwert M et al.** GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212(6), 685-692, 2009.
- www.bisphenol-a-europe.org, page consultée le 27/06/14.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM et al.** Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 119, 131-137, 2011.
- Brock JW, Yoshimura Y, Barr JR et al.** Measurement of bisphenol A levels in human urine. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 11, 323-328, 2001.
- Cagen SZ, Waechter JM, Dimond SS et al.** Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 50, 36-44, 1999.
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA et al.** Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113(4), 391-395, 2005.
- Calafat, A.M., J. Weuve, X. Ye et al.,** Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 117(4), 639-44, 2009.
- Cariot A, Dupuis A, Albouy-Llaty M et al.** Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta* 100, 175-182, 2012.
- Carwile JL, Luu HT, Bassett LS et al.** Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect*, 117, 1368-1372, 2009.
- CE,** European Union Risk Assessment Report - Environment Addendum - 4,4' isopropylidenediphenol (Bisphenol-A) - Part 1 Environment. Commission Européenne. Joint Research Centre, EUR 24588 EN, Luxembourg, avril 2008.
- Cho, C.Y., B.S. Shin, J.H. Jung et al.,** Pharmacokinetic scaling of bisphenol A by species-invariant time methods. *Xenobiotica* 32(10), 925-34, 2002.
- Collet SH, Picard-Hagen N, Vigié C et al.** Estrogenicity of Bisphenol A: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicological Sciences* 117 (1), 54-62, 2010.
- Collier AC, Ganley NA, Tingle MD et al.** UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochem Pharmacol* 63, 409–419, 2002.
- Corbel T, Gayrard V, Vigié C et al.** Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: toxicokinetic mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol. Reprod* 89 (1), 11, 2013.
- Corbel T, Perdu E, Gayrard V et al.** Conjugation and Deconjugation Reactions within the Fetoplacental Compartment in a Sheep Model: A Key Factor Determining Bisphenol A Fetal Exposure. *Drug Metab Dispos*, 43(4):467-76, 2015.

- Coughtrie MW, Burchell B, Leakey JE**, et al. The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol Pharmacol* 34, 729–735, 1988.
- Csanady, G.A., H.R. Oberste-Frielinghaus, B. Semder** et al. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 76(5-6), 299-305, 2002.
- Dawes G**. Foetal and neonatal physiology. *Year book medical publisher*, 1969.
- Déchaud H, Ravard C, Claustrat F** et al. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (SHBG). *Steroids* 64 (5), 328-334, 1999.
- Dodds EC, Lawson W**. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137, 996, 1936.
- Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M** et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 247, 158–165, 2010.
- Domoradzki JY, Pottenger LH, Thornton CM** et al. Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-monoglucuronide in CD Sprague Dawley rats at three gestational stages. *Toxicological Sciences* 76, 21–34, 2003.
- Domoradzki JY, Thornton CM, Pottenger LH** et al. Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal Sprague-Dawley rats following oral administration. *Toxicological Sciences* 77, 230–242, 2004.
- Dziegielewska KM, Evans CAN, Fossan G** et al. Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal sheep during development. *Journal of Physiology* 300, 441-455, 1980.
- Edlow AG, Chen M, Smith NA** et al. Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod Toxicol* 34(1), 1-7, 2012.
- Elsby R, Maggs JL, Ashby J** et al. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A : implications for extrapolation to humans. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 103–113, 2001.
- EFSA**, Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A). *The EFSA Journal* 428, 1-75, 2006.
- EFSA**, Draft Scientific Opinion to the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs, 2014.
- www.efsa.europa.eu, consulté le 28 mars 2015
- Fenichel P, Dechaux H, Harthe C** et al. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod* 27(4), 983-90, 2012.
- García-Prieto A, Lunar ML, Rubio S** et al. Determination of urinary bisphenol A by coextractive microextraction and liquid chromatography-fluorescence detection. *Anal Chim Acta* 630, 19–27, 2008.
- Gayrard V, Lacroix MZ, Collet SH** et al. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect* 121(8), 951-6, 2013.
- Geens T, Goeyens L, Covaci A**. Are potential sources of human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 339-347, 2011.
- Ginsberg G, Rice DC**. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environmental Health Perspectives* 117, 1639–1643, 2009.
- Hanioka N, Naito T, Narimatsu S**. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 74(1), 33-6, 2008.
- Hawksworth G, Drasar BS, Hill MJ**. Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J Med Microbiol* 4(4), 451-9, 1971.

- He Y, Miao M, Herrinton LJ** et al. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environmental Research*, 109(5), 629-633, 2009.
- Hong YC, Park EY, Park MS** et al. Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population. *Toxicol Lett* 184, 139–144, 2009.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA** et al. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401, 763–764, 1999.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y** et al. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17, 2839-2841, 2002.
- Inoue K, Kato K, Yoshimura Y** et al. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J Chromatography* 749, 17–23, 2000.
- Inoue H, H Yokota, T Makino** et al. Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab Dispos* 29(8), 1084-7, 2001.
- Inoue H, Yuki G, Yokota H** et al. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metabolism and Disposition* 31, 140–144, 2003.
- Inserm**, Effets sur la reproduction du bisphénol A, rapport préliminaire, juin 2010.
- Jenkin G, Heap RB, Symons DB** et al. Pituitary responsiveness to synthetic LHRH and pituitary LH content at various reproductive stages in the sheep. *J Reprod Fertil*, 49(2), 207-14, 1977.
- Kasper-Sonnenberg M, Wittsiepe J, Koch HM** et al. Determination of bisphenol a in urine from mother child pairs-results from the duisburg birth cohort study, Germany. *J.Toxicol Environ Health A* 75(8-10), 429-437, 2012.
- Koch HP, Ritschel WA**. Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik, 232-240, 1986.
- Kubo K, Arai O, Ogata R**. Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett* 304, 73–76, 2001.
- Kuester RK, Sipes IG**. Prediction of metabolic clearance of bisphenol A (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane) using cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 35, 1910–1915, 2007.
- Kurebayashi, H, Harada R, Stewart RK** et al. Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 68(1), 32-42, 2002.
- Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y**. Disposition of a low dose of bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 73(1), 17-25. 55, 2003.
- Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y** et al. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66, 1160-1164, 2007.
- Lacroix MZ, Puel S, Collet SH** et al. Simultaneous quantification of Bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85, 2053-2059, 2011.
- www.legifrance.gouv.fr , consulté le 25 juillet 2014.
- Mahalingaiah S, Meeker JD, Pearson KR** et al. Temporal variability and predictors of urinary Bisphenol A concentrations in men and women. *Environmental Health Perspectives* 116(2), 173-178, 2008.
- Mao L, Sun C, Zhang H** et al. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with pnitrobenzoyl chloride. *Analytica Chimica Acta* 522(2), 241-246, 2004.
- Markey CM, Luque EH, Munoz DT** et al. *In utero* exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65, 1215-1223, 2001.
- Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A**. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDPglucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 110 (2), 193-196, 2002.

- Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR.** *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* 14, 149–157, 2001.
- Meffin PJ, Zilm DM, Veenendaal JR.** Reduced clofibric acid clearance in renal dysfunction is due to a futile cycle. *JPharmacol Exp Ther* 227, 732-738, 1983.
- Moors S, Blaszkewicz M, Bolt HM et al.** Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by fast and simple method using SPE and GCMS. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 787-798, 2007.
- Nambo T.** Studies on the absorption mechanism for the glucuronide of p-phenyl benzoic acid in fetal compartment. *J Pharmacobiodyn* 5(12), 988-93, 1962.
- Nepomnaschy PA, Baird DD, Weinberg CR et al.** Withinperson variability in urinary bisphenol A concentrations: measurements from specimens after longterm frozen storage. *Environmental Research* 109, 734-737, 2009.
- Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa Ret al.** Placental transfer of conjugated Bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environmental Health Perspectives* 118(9), 1196-1203, 2010.
- Nunez A, Kannan K, Giesy J et al.** Effects of bisphenol A. on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42, 917–922, 2001.
- Otaka H, Yasuhara A, Morita M.** Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and clean-up by solid-phase extraction. *Analytical Science* 19, 1663-1666, 2003.
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S et al.** Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 28(4), 258–63, 2008.
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA et al.** The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A is dependent on the route of administration. *Toxicological Sciences* 54, 3–18, 2000.
- Pretheban M, Hammond G, Bandiera S et al.** Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 159, 159–166, 2011.
- Purinton SC, Newman H, Castro MI,** Ontogeny of estrogen sulfatase activity in ovine fetal hypothalamus, hippocampus, and brain stem. *Am J Physiol* 276 : R1647–R1652, 1999.
- Rowland M, Tozer TN.** Clinical Pharmacokinetics Concepts and Applications. *Lea and Febiger,* Philadelphia, 3rd ed, p. 163,1995.
- Rubin BS.** Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127, 27–34, 2011.
- Schonfelder G, Flick B, Mayr E et al.** *In utero* exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia* 4, 98–102, 2002a.
- Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H et al.** Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal placental unit. *Environ Health Perspect* 110, A703–A707, 2002b.
- Snyder RW, SC Maness, KW Gaido et al.** Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 168(3), 225-34, 2000.
- Sperker B, Backman JT, Kroemer HK et al.** Interindividual variability in expression and activity of human β -glucuronidase in liver and kidney: consequences for drug metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281, 914–920, 1997.
- Strassburg CP, Strassburg A, Kneip Set al.** Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut* 50, 269-265, 2002.
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N et al.** Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomedical Chromatography* 18, 501-507, 2004.
- Szeto HH.** Pharmacokinetics in the ovine maternal-fetal unit. *Annual review pharmacology and toxicology* 22, 221-243, 1982.

- Takahashi O, Oishi S.** Disposition of orally administered 2, 2-Bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect* 108, 931–935, 2000.
- Takeuchi T, Tsutsumi O.** Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 76–8, 2002.
- Taylor JA, FS Vom Saal, WV Welshons et al.** Similarity of bisphenol a pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect* 119(4), 422-30, 2011.
- Teeguarden JG, Calafat AM, Ye X et al.** Twenty four hour human urine and serum profiles of bisphenol A during high-dietary exposure. *Toxicological Sciences* 123, 48-57, 2011.
- Teitelbaum SL, Britton JA, Calafat AM et al.** Temporal variability in urinary concentrations of phthalate metabolites, phytoestrogens and phenols among minority children in the United States. *Environmental Research* 106, 257-269, 2008.
- Triendl R.** Genes may solve hormone-disrupter debate. *Nature* 409:274, 2001.
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC et al.** Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 68, 121–146, 2002.
- Tyl, R.W., C.B. Myers, M.C. Marr et al.** Two generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 104(2), 362-84, 2008.
- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ et al.** Urinary, circulating and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118, 1055–1070, 2010.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB et al.** Hormones and endocrine disrupting chemicals: low-dose effects and non monotonic dose responses. *Endocr Rev* 33, 378-455, 2012.
- Vandentorren S, Zeman F, Morin L et al.** Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study: implications for a large-scale biomonitoring studies. *Environmental Research* 111, 761-764, 2011.
- Volkel W, T Colnot, GA Csanady et al.** Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15(10), 1281-7, 2002.
- Volkel W, N Bittner, and W Dekant.** Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 33(11), 1748-57, 2005.
- Volkel W, Kiranoglu M, Fromme H.** Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett* 179(3), 155-162, 2008.
- vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL et al.** A physiological based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 14, 239–260, 1998.
- vom Saal FS, Hughes C.** An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*, 113, 926–933, 2005.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS.** Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology* 147, s56 s69, 2006.
- Welshons WV, Nagel SC, Thayer KA et al.** Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals : fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health* 15, 12–25, 1999.
- WHO. Doerge DR, Fischer JW.** Aspects of Bisphenol A metabolism and toxicokinetics of Bisphenol. *Toxicological and Health*, 2010.
- Wolff MS, Engel SM, Berkowitz GS et al.** Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environmental Health Perspectives* 116, 1092- 1097, 2008.
- Yamada H, Furuta I, Kato EH et al.** Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 16, 735–739, 2002.

- Yang YJ, Hong YC, Oh SY et al.** Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environmental Research* 109(6), 797-801, 2009.
- Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL et al.** Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 831, 110-115, 2006.
- Ye X, Bishop AM, Needham LL et al.** Automated on-line column-switching HPLC/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Analytica Chimica Acta* 622, 150-156, 2008a.
- Ye X, Pierik FH, Hauser R, et al.** Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the generation R study. *Environmental Research* 108, 260-267, 2008b.
- Ye X, Pierik FH, Angerer J et al.** Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian mother and child cohort study (MoBa). *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212, 481-491, 2009.
- Yokota, H., H. Iwano, M. Endo et al.** Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDPglucuronosyltransferase UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 340 (Pt 2), 405-9, 1999.
- Zalko D, Soto AM, Dolo L et al.** Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD mice. *Environ Health Perspect* 111, 309-19, 2003.
- Zhang Z, Alomirah H, et al.** Urinary bisphenol a concentrations and their implications for human exposure in several Asian countries. *Environmental Science and Technology* 45(16), 7044-7050, 2011.

Toulouse, 2015

NOM : PUTHON

PRENOM : Morgane

TITRE : CARACTERISATION DE L'ELIMINATION DU BISPHENOL A ET DE SES FORMES CONJUGUEES PAR LE FŒTUS OVIN

RESUME : Le Bisphénol A (BPA) est un composé œstrogénomimétique utilisé en plasturgie. Le modèle du fœtus ovin instrumenté a permis de montrer que le fœtus est capable de métaboliser le BPA en BPA-glucuronide (BPA-G) inactif qui s'accumule dans le compartiment fœtal, ce qui soulève la question du risque lié à la réactivation du BPA-G au niveau des tissus cibles fœtaux. Une approche toxicocinétique a été utilisée chez le fœtus ovin pour évaluer les modalités d'élimination du BPA et du BPA-G à partir du compartiment fœtal ainsi que l'exposition fœtale au BPA et à ses métabolites. L'analyse des données maternelles indique qu'une partie du BPA ou du BPA-G administrée au fœtus est éliminée dans les urines de la mère (majoritairement sous forme de BPA-G). L'évaluation des concentrations tissulaires fœtales en BPA et en BPA-G conforte l'hypothèse de la réactivation du BPA au niveau des tissus fœtaux, suggérant qu'à dose équivalente le BPA-G pourrait entraîner des effets similaires à ceux du BPA pour le fœtus.

MOTS-CLES : BISPHENOL A, BPA-GLUCURONIDE, FOETUS, METABOLISME FŒTAL, OVIN, PARAMETRES TOXICOCINETIQUES, UNITE FOETOMATERNELLE

ENGLISH TITLE : CHARACTERIZATION OF THE ELIMINATION OF BISPHENOL A AND ITS CONJUGATED METABOLITES

ABSTRACT: Bisphenol A (BPA) is an estrogenic compound used in plastic industry. The physiological model of the instrumented ovine fetus has revealed that the ovine fetus is able to metabolize the BPA in BPA-glucuronide (BPA-G) which is trapped into the fetoplacental unit, raising the question of a possible reactivation of BPA-G after fetal hydrolysis. A toxicokinetic approach was used in fetal sheep to evaluate the modalities of BPA and BPA-G clearance from the fetal compartment and the fetal exposures to BPA and its metabolites. The analysis of maternal data suggests that the BPA or BPA-G infused to the fetus is eliminated in maternal urine (mainly as BPA-G). The analysis of tissue fetal concentrations of BPA and its metabolites supports the hypothesis that BPA-G can be reactivated in fetal tissues, suggesting that at a same molar dose, BPA-G could have similar effects than BPA concerning the fetus.

KEYWORDS : BISPHENOL A, BPA-GLUCURONIDE, FETUS, FETAL METABOLISM, OVINE, TOXICOKINETIC PARAMETERS, FETO-MATERNAL UNITY