



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 : 16489](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 16489)

To cite this version :

Carme, Lucie. *Variations interspécifiques de la liaison du bisphénol A et du bisphénol S aux protéines plasmatiques*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 66 p.

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

VARIATIONS INTERSPÉCIFIQUES DE LA LIAISON DU BISPHÉNOL A ET DU BISPHÉNOL S AUX PROTÉINES PLASMATIQUES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

CARME Lucie

Née le 05 novembre 1990 à Castres (81)

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 PICARD

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

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE
Spécialisé en Médecine de la Reproduction

*Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.
Hommages respectueux.*

A Madame le Professeur Véronique GAYRARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Spécialisée en Physiologie de la Reproduction et Endocrinologie

*Qui m'a guidée dans l'élaboration de ce travail et m'a permis de le mener à bien.
Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma vive gratitude pour son soutien, sa
gentillesse et sa disponibilité.*

A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Spécialisée en Pathologie de la Reproduction

*Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et de m'aider pour les
manipulations.
En témoignage de ma reconnaissance,
Sincères remerciements.*

A Flore GRANDIN et Glenn GAUDERAT

*Qui m'ont aidée dans l'élaboration de cette thèse et pour la réalisation des
manipulations,
Sincères remerciements.*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	10
1) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1.1 QU'EST-CE-QUE LE BISPHENOL A ?.....	12
1.2 UTILISATION DU BISPHENOL A.....	12
1.3 MODALITES D'EXPOSITION AU BISPHENOL A.....	14
1.4 DONNEES DE BIOSURVEILLANCE DE L'EXPOSITION HUMAINE AU BISPHENOL A	15
1.5 LES EFFETS DU BISPHENOL A SUR L'HOMME ET L'ANIMAL	16
1.5.1 <i>Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien ?</i>	16
1.5.2 <i>Les mécanismes d'action du bisphénol A</i>	16
1.5.3 <i>Les effets du bisphénol A</i>	17
1.6 CADRE REGLEMENTAIRE AUTOUR DE L'UTILISATION DU BISPHENOL A.....	18
1.6.1 <i>Cadre réglementaire européen</i>	18
1.6.2 <i>Cadre réglementaire national</i>	20
1.7 PHARMACOCINETIQUE DU BISPHENOL A.....	21
1.7.1 <i>Absorption</i>	21
1.7.2 <i>Distribution</i>	22
1.7.3 <i>Métabolisation</i>	22
1.7.4 <i>Elimination</i>	24
1.8 LIAISON DU BISPHENOL A AUX PROTEINES PLASMATIQUES.....	25
1.8.1 <i>Intérêt de l'étude de la fixation aux protéines plasmatiques</i>	25
1.8.2 <i>Détermination des paramètres de liaison aux protéines plasmatiques</i>	25
1.8.3 <i>Les protéines plasmatiques fixant le bisphénol A</i>	26
1.8.3.1 L'albumine	26
1.8.3.2 La Sex Hormone Binding Globulin.....	27
1.8.3.3 L'alpha fœto protéine	28
1.8.3.4 La transthyréine et la thyroxine-binding-globulin	28
1.8.4 <i>Particularités au cours de la gestation</i>	29
1.9 UNE ALTERNATIVE AU BISPHENOL A : LE BISPHENOL S.....	30

2) MATERIEL ET METHODES	31
2.1 OBJECTIF DU PROTOCOLE.....	31
2.2 MATERIEL TESTE	32
2.2.1 <i>Identification du matériel testé</i>	32
2.2.2 <i>Préparation des solutions de travail de BPA (BPS)</i>	32
2.2.3 <i>Préparation des solutions de surcharge en BPA et BPS tritié</i>	34
2.2.4 <i>Elaboration de la gamme de BPA (BPS) dans le tampon de dialyse</i>	35
2.2.5 <i>Préparation du plasma traité à la thyroxine</i>	35
2.3 SYSTEME BIOLOGIQUE	36
2.4 METHODOLOGIE EXPERIMENTALE.....	36
2.5 ANALYSE DES DONNEES.....	38
2.5.1 <i>Détermination du pourcentage de fixation</i>	38
2.5.2 <i>Détermination des paramètres de liaison</i>	38
2.5.3 <i>Détermination de la fixation spécifique à chaque protéine plasmatique</i> ..	39
2.5.4 <i>Détermination de la fixation du BPA dans du plasma dilué</i>	41
3) RESULTATS.....	43
3.1 INFLUENCE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN BPA ET BPS SUR LE POURCENTAGE DE FIXATION AUX PROTEINES PLASMATIQUES.....	43
3.1.1 <i>Bisphénol A</i>	43
3.1.2 <i>Bisphénol S</i>	45
3.2 COMPARAISON INTERSPECIFIQUE DU POURCENTAGE DE FIXATION AUX PROTEINES PLASMATIQUES	47
3.2.1 <i>Bisphénol A</i>	47
3.2.2 <i>Bisphénol S</i>	48
3.2.3 <i>Comparaison des pourcentages de fixation entre le bisphénol A et le bisphénol S</i>	49
3.3 ESTIMATION DES PARAMETRES DE LIAISON AUX PROTEINES PLASMATIQUES	50
3.4 VALIDATION DE LA METHODE PAR DILUTION DU PLASMA	53
3.5 DETERMINATION DE LA FIXATION A LA TRANSTHYRETINE ET L'ALBUMINE.....	55

4) DISCUSSION	56
4.1 DIFFERENCES ENTRE BISPHENOL A ET BISPHENOL S.....	56
4.2 COMPARAISON INTERSPECIFIQUE.....	56
4.3 PARAMETRES DE LIAISON ET CONTRIBUTION DES AUTRES PROTEINES.....	57
4.4 PARTICULARITE DE LA GROSSESSE.....	57
4.5 AMELIORATION DU PROTOCOLE D'ETUDE.....	58
4.6 CONCENTRATIONS TISSULAIRES ET LIMITES DES ETUDES IN VITRO.....	59
CONCLUSION	60
BIBLIOGRAPHIE	62
ANNEXE : PROCEDURE EXPERIMENTALE DE DIALYSE A L'EQUILIBRE	66

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique du bisphénol A	12
Figure 2 : Domaines d'utilisation des polycarbonates (source : fédération de la plasturgie, 2011)	13
Figure 3 : Domaines d'utilisation des résines époxydes (source : Plastics Europe, 2007).....	13
Figure 4 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (source : Inserm 2011)	23
Figure 5 : Structure chimique du bisphénol S	30
Figure 6 : Représentation théorique de la fixation d'un ligand en fonction de la concentration libre de ce même ligand	39
Figure 7 : Evolution de la fixation du BPA aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPA (faibles concentrations)	43
Figure 8 : Evolution de la fixation du BPA aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPA (fortes concentrations).....	44
Figure 9 : Evolution de la fixation du BPS aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPS (faibles concentrations)	45
Figure 10 : Evolution de la fixation du BPS aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPS (fortes concentrations)	45
Figure 11 : Comparaison interspécifique du pourcentage de fixation du BPA aux protéines plasmatiques. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes des 2 réplicats pour chaque concentration de 2,5 à 50 nM avec l'écart-type associé.	47
Figure 12 : Comparaison interspécifique du pourcentage de fixation du BPS aux protéines plasmatiques. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes des 2 réplicats pour chaque concentration de 2,5 à 50 nM avec l'écart-type associé.	48
Figure 13 : Comparaison interspécifique du pourcentage de fixation du BPA (en bleu) et du BPS (en rouge) aux protéines plasmatiques	49
Figure 14 : Relation entre le pourcentage de fixation du BPA prédit et le pourcentage de BPA mesuré (représentation par régression linéaire)	54
Figure 15 : Système de dialyse à l'équilibre.....	66

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des produits utilisés.	32
Tableau 2 : Equivalences entre les concentrations molaires et les concentrations massiques pour le BPA et le BPS.	32
Tableau 3 : Protocole d'élaboration des solutions de travail de BPA dans l'éthanol. .	33
Tableau 4 : Protocole d'élaboration des solutions de travail de BPS dans l'éthanol. .	33
Tableau 5 : Préparation des solutions de surcharge du BPA froid et radioactif.	34
Tableau 6 : Préparation des solutions de surcharge du BPS froid et radioactif.	35
Tableau 7 : Paramètres de liaison du BPA aux protéines plasmatiques.	50
Tableau 8 : Paramètres de liaison du BPS aux protéines plasmatiques.	50
Tableau 9 : Comparaison des pourcentages de fixation mesurés et prédits avec la dilution des plasmas.	53
Tableau 10 : Calcul des pourcentages de fixation à la TTR et à l'albumine sur du plasma de brebis dans le plasma natif (N) et traité à la T4 (T).	55

LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS

AFP : Alpha-foeto-protéine

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Bmax : Capacité maximale de fixation

BPA : Bisphénol A

BPA-G : Bisphénol A glucuronide

BPA-S : Bisphénol A sulfate

BPS : Bisphénol S

DHT : Dihydrotestostérone

DJ : Dose Journalière

DJT : Dose Journalière Tolérable

DPM : Désintégration par minute

ECHA : European Chemicals Agency / Agence Européenne des Substances Chimiques

EFSA : European Food Safety Authority / Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

Kd : Constante de dissociation à l'équilibre

NS : Constante de dissociation du complexe BPA-albumine

SHBG : Sex Hormone Binding Globulin

T4 : Thyroxine

TBG : Thyroxine Binding Globulin

TTR : Transthyréline

UE : Union Européenne

UGT2B1 : UDP-glucuronosyltransférase 2B1

INTRODUCTION

Le bisphénol A (BPA) est un monomère de diphénol couramment employé dans les plastiques de type polycarbonate ou les résines époxydes, et donc présent dans de nombreux emballages, canettes ou autres contenants alimentaires de la vie courante. L'exposition de l'Homme au BPA, principalement par voie orale, fait cependant l'objet de nombreux débats depuis que son rôle de perturbateur endocrinien œstrogène-mimétique a été mis en évidence.

La connaissance du niveau des concentrations plasmatiques du BPA chez l'Homme est essentielle à l'interprétation des résultats des études toxicologiques réalisées chez différentes espèces. Il est en effet fondamental de déterminer si ces concentrations sont équivalentes ou inférieures à celles associées à des effets délétères chez l'animal. Il est cependant couramment admis que seule la fraction libre du BPA, c'est-à-dire non liée à des protéines plasmatiques, est active et peut donc exercer un effet perturbateur endocrinien.

De ce fait, la seule connaissance des concentrations plasmatiques en BPA total (libre et lié aux protéines plasmatiques) n'est pas suffisante pour caractériser l'exposition interne à la forme active du BPA. Il est indispensable de connaître l'importance de la fraction libre afin de pouvoir interpréter convenablement ces concentrations.

L'objectif principal de notre étude était donc d'étudier la distribution plasmatique du BPA entre la fraction libre et la fraction liée aux protéines chez diverses espèces, ainsi que d'estimer les paramètres de liaison du BPA, qui sont la constante de dissociation à l'équilibre (K_d) et la capacité maximale de fixation (B_{max}). L'étude avait également pour objectifs secondaires de déterminer la contribution des différentes protéines plasmatiques à la fixation du BPA ainsi que l'existence ou non de liaisons saturables et non saturables.

Cette étude nous a ainsi permis de comparer la distribution du BPA plasmatique chez la femme (au premier trimestre de grossesse) à celle des espèces modèles (femelles macaque Rhésus, brebis, souris, rat) utilisées dans les études toxicologiques.

La passage trans-placentaire du BPA chez l'Homme ayant été montré (Schönfelder et al. 2002 ; Corbel 2013) la connaissance de la fraction libre de BPA dans le plasma maternel est importante pour prédire l'exposition fœtale à la forme active du BPA. Nous évaluerons donc également la distribution du BPA plasmatique chez la femme enceinte au dernier trimestre de grossesse et chez le nouveau-né humain.

L'approche expérimentale est fondée sur l'évaluation des paramètres de liaison du BPA aux protéines plasmatiques des espèces considérées par la technique de dialyse à l'équilibre.

Au vu de la polémique sur les risques liés à l'exposition au BPA, de nombreux substituts sont actuellement à l'étude, tel que le bisphénol S (BPS), que l'on trouve déjà dans de nombreux plastiques en remplacement du BPA. Un effet œstrogénomimétique ayant aussi été mis en évidence pour le BPS, il est pertinent de s'intéresser également à la distribution plasmatique de ce dernier, que nous avons donc inclus dans notre étude, selon un protocole similaire à celui que nous avons appliqué pour le BPA.

1) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Qu'est-ce-que le bisphénol A ?

Le bisphénol A (BPA), également appelé 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane, est un composé chimique de synthèse œstrogène-mimétique mis au point par le chimiste russe Alexandre Dianin à la fin du 19^{ème} siècle dans le but de limiter les fausses couches spontanées. Il ne fut cependant jamais utilisé dans ce but et son usage fut détourné au profit de l'industrie plastique à partir des années 1960.

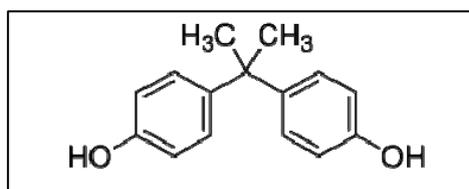


Figure 1 : Structure chimique du bisphénol A.

Le BPA, de formule chimique C₁₅H₁₆O₂, est issu de la condensation de deux phénols avec l'acétone. A température ambiante, le BPA se présente sous la forme d'un solide blanc en poudre, écailles ou cristaux, de masse molaire 228,29 g/mol, de faible odeur phénolique, et peu soluble dans l'eau (Falcy et al. 2013).

1.2 Utilisation du bisphénol A

Depuis plus de 50 ans, le BPA est utilisé couramment dans la production de plastiques de type polycarbonate et de résines époxydes.

Les polycarbonates sont largement utilisés dans l'industrie du plastique pour la fabrication d'un très grand nombre d'objets courants dont des contenants alimentaires de type bonbonnes d'eau réutilisables, biberons, vaisselle, mais également lunettes, Compact Disc,...

Les résines époxydes sont quant à elles principalement utilisées pour réaliser le revêtement intérieur des canettes, des boîtes de conserves ou des amalgames

dentaires, afin de protéger de l'oxydation les équipements et les objets qu'elles recouvrent.

Le BPA est également utilisé comme révélateur dans les papiers thermiques, ce qui implique donc que l'on en retrouve par exemple dans les tickets de caisse (ANSES 2011a). Il est également présent en tant qu'antioxydant dans le secteur de l'industrie automobile, comme composant des résines polyester, de polysulfone et de polyacrylate et intervient dans la synthèse des ignifugeants, ou retardateur de flammes, tels que le tétrabromobisphénol A et le bisphénol A bis (diphénylphosphate).

Les différents domaines d'utilisation du BPA sont résumés dans les figures 2 et 3 ci-dessous.

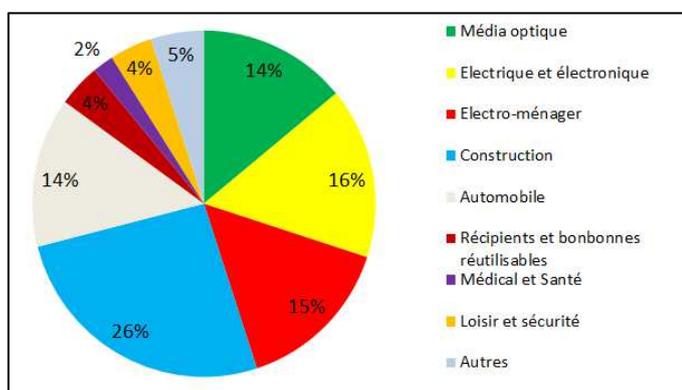


Figure 2 : Domaines d'utilisation des polycarbonates
(source : fédération de la plasturgie, 2011).

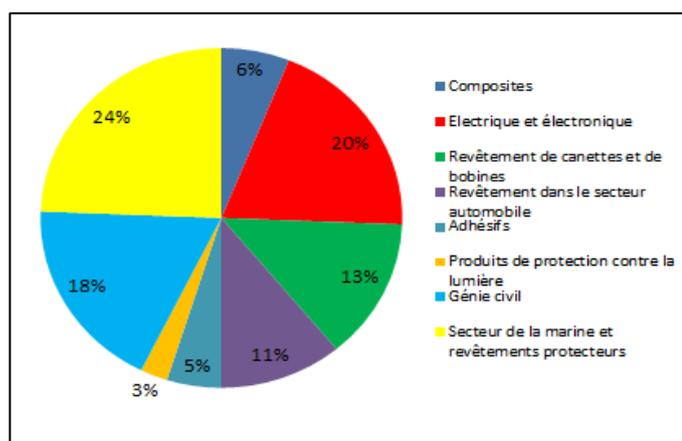


Figure 3 : Domaines d'utilisation des résines époxydes
(source : Plastics Europe, 2007).

Au niveau européen, la production annuelle de BPA s'élevait à 1,6 millions de tonnes en 2005. Cette production a tendance à augmenter chaque année, avec une augmentation annuelle de 10 % entre 2003 et 2006, principalement du fait de la forte demande en polycarbonates (ANSES 2011a).

1.3 Modalités d'exposition au bisphénol A

La très grande diversité d'utilisation du BPA et son vaste champ d'application entraînent fort logiquement une mise en contact quasi permanente de la population quelle que soit son âge, avec des objets ou consommables de la vie courante contenant du BPA.

Les trois voies d'exposition majeure au BPA sont la voie orale, et particulièrement alimentaire, la voie cutanée, notamment par le biais de la manipulation des tickets thermiques, et enfin l'inhalation des poussières.

L'exposition au BPA se fait essentiellement par le biais de l'alimentation, qui contribue notamment à 84 % de l'exposition totale pour les femmes enceintes (ANSES 2013a). Cette exposition par voie alimentaire se fait à partir de diverses sources.

Les produits conditionnés en boîtes de conserve représentent environ 50 % de l'exposition alimentaire totale répartie entre les conserves de légumes (35 - 45 %) et les plats composés et produits à base de viande et de poisson (10 - 15 %). Les viandes, abats et charcuteries représentent 17 % de l'exposition alimentaire totale, les produits de la mer entre 1 et 3 %. Enfin, la dernière voie d'exposition, représentant 25 à 30 % de l'exposition alimentaire totale, est d'origine indéterminée et correspond à une contamination diffuse (ANSES 2013b). L'eau distribuée dans les bonbonnes en polycarbonate constituerait également une part non négligeable de l'exposition au BPA.

Le type de conditionnement permet d'expliquer en partie cette exposition, notamment pour les aliments conditionnés en conserve. D'autres sources restent cependant à identifier pour expliquer les fortes teneurs mesurées dans certaines denrées alimentaires.

Concernant l'exposition par inhalation, par le biais de certains matériaux électriques ou revêtements qui contamineraient l'air ambiant, celle-ci a été estimée à moins de 10 % de l'exposition externe totale chez l'Homme (Geens et al. 2009).

1.4 Données de biosurveillance de l'exposition humaine au bisphénol A

L'exposition externe des adultes au BPA est estimée à des valeurs comprises entre 0,01 et 0,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel par jour en moyenne, avec une exposition maximale de 1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Chez le nouveau-né et le nourrisson jusqu'à 6 mois, l'exposition moyenne est de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel par jour, tandis que l'exposition des enfants de 6 à 36 mois diminue progressivement avec leur croissance pondérale. Les plus hautes valeurs d'exposition ont été décrites chez des enfants de 0 à 6 mois nourris avec des biberons en polycarbonate, et atteignaient en moyenne 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par jour (World Health Organisation 2011).

Les concentrations plasmatiques en BPA, qui sont le reflet de l'exposition interne, varient entre des valeurs non quantifiables (inférieures à 0,2 ng/mL) et 10 ng/mL pour l'ensemble de la population, avec une exposition interne moyenne comprise entre 1 et 3 ng/mL (Vandenberg et al. 2010). Les plus fortes concentrations seraient observées principalement chez le nouveau-né, au vu de leur faible capacité de glucuronidation qui pourrait les exposer à de plus fortes concentrations plasmatiques de BPA pour une même exposition externe (Aschberger et al. 2010).

L'exposition interne peut également être évaluée au travers de la quantité de BPA totale, incluant donc les métabolites, éliminée dans les urines, qui rend compte de la quantité de BPA absorbée quotidiennement. Cette évaluation quotidienne de l'exposition de l'Homme au BPA par contrôle biologique de l'excrétion urinaire a été estimée en moyenne à 0,01-0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ pour les adultes et 0,02-0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les enfants (World Health Organisation 2011).

Selon le site d'absorption du BPA, digestif ou cutané principalement, les concentrations plasmatiques attendues en BPA non conjugué sont cependant très différentes en raison de l'intense effet de premier passage hépatique qui suit l'absorption digestive.

1.5 Les effets du bisphénol A sur l'Homme et l'animal

1.5.1 Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien ?

Le BPA est défini comme un perturbateur endocrinien, c'est à dire comme une substance chimique d'origine naturelle ou artificielle capable de mimer ou de bloquer l'activité des hormones, entraînant donc des perturbations de l'activité du système endocrinien (ANSES 2011a). Un perturbateur endocrinien peut donc agir selon diverses modalités, notamment :

- en mimant l'action de l'hormone et entraînant donc la réponse correspondante
- en empêchant la fixation de l'hormone à son récepteur et donc ne permettant pas la réponse adaptée
- en perturbant ou bloquant la production des hormones ou de leur récepteur

1.5.2 Les mécanismes d'action du bisphénol A

Le BPA est un agoniste faible des récepteurs aux œstrogènes alpha et beta. On suppose que le BPA pourrait interagir également avec différents récepteurs :

- le récepteur aux androgènes, d'où un effet anti-androgénique modéré
- le récepteur des hydrocarbures aromatiques
- les récepteurs des hormones thyroïdiennes
- le récepteur membranaire aux œstrogènes couplé aux protéines G
- le récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes
- le récepteur gamma apparenté aux récepteurs aux œstrogènes

On ne peut donc réduire les effets du BPA à un simple effet œstrogénomimétique (ANSES 2013a).

1.5.3 Les effets du bisphénol A

Il a été prouvé que de fortes doses de BPA pouvaient entraîner une toxicité au niveau de la fonction de reproduction chez les rats, telle qu'une diminution de la production de spermatozoïdes et des troubles du développement des organes reproducteurs (Morrissey et al. 1987 ; Vom Saal et al. 1998). D'après le rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de 2011, le BPA aurait des effets avérés chez les animaux sur la fonction de reproduction, la glande mammaire, le métabolisme, le cerveau et le comportement. Ces effets ne sont cependant que suspectés chez l'Homme à l'heure actuelle.

Lors de la publication de son rapport en 2013, et en se basant sur l'ensemble des publications scientifiques parues à ce jour, l'ANSES s'est penchée sur l'évaluation des risques concernant 4 types d'effets pour l'enfant à naître et la femme enceinte :

- les effets sur le cerveau et le comportement
- les effets sur l'appareil reproducteur femelle
- les effets sur le métabolisme et l'obésité
- les effets sur la glande mammaire

Le rapport final de l'ANSES a conclu que le risque était négligeable pour les 3 premiers points, mais pas sur le dernier. Ils ont en effet mis en évidence, lors de l'exposition de la femme enceinte au BPA, un risque potentiel de modification de la structure de la glande mammaire chez l'enfant à naître, pouvant être à l'origine d'un développement tumoral ultérieur, à la fois chez l'homme et la femme, avec un niveau de confiance qui est toutefois qualifié de modéré.

La dernière réévaluation complète par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) de l'exposition au BPA et de sa toxicité a été publiée en janvier 2015. De nombreuses divergences existent entre l'ANSES et l'EFSA. Ainsi, les experts scientifiques de l'EFSA ont conclu qu'aux niveaux actuels d'exposition, le BPA ne présentait pas de risque pour la santé des consommateurs de tous les groupes d'âge. L'exposition par voie alimentaire ou par l'intermédiaire d'une combinaison d'autres sources (alimentation, poussière, cosmétiques et papier thermique) est considérablement inférieure à la dose journalière tolérable (DJT) qui a

été abaissée pour le BPA à 4 µg/kg par jour. Les estimations les plus élevées de l'exposition provenant d'une combinaison de sources diverses sont de trois à cinq fois inférieures à cette DJT (EFSA 2015).

En avril 2016, l'EFSA a mis en place un groupe de travail pour évaluer de nouveaux éléments scientifiques sur les effets potentiels du BPA sur le système immunitaire suite à la publication d'un rapport de l'Institut National Néerlandais pour la santé publique et l'environnement, qui évoquait de possibles effets sur le système immunitaire des fœtus et des jeunes enfants (Bakker et al. 2016).

1.6 Cadre réglementaire autour de l'utilisation du bisphénol A

1.6.1 Cadre réglementaire européen

En 2006, l'EFSA a réalisé une première évaluation complète des risques associés au BPA, fixant une DJT de 50 µg/kg de poids corporel par jour, et a conclu que le niveau d'exposition au BPA via l'alimentation et les boissons était inférieur à la DJT. De nouveaux avis ont été rédigés en 2008, 2009, 2010 et 2011 à la demande de la Commission Européenne. En 2010 est ainsi publié un nouvel avis prenant en compte l'ensemble des publications scientifiques les plus récentes, concluant notamment qu'en l'absence de preuves supplémentaires, la DJT resterait fixée à 50 µg/kg de poids corporel par jour, et que la suspicion de toxicité neurocomportementale du BPA n'était pas fondée.

En 2011, après la publication du rapport de l'ANSES relative au BPA pointant du doigt les dangers du bisphénol, l'EFSA a estimé que cela ne remettait pas en cause ses propres conclusions de 2006, considérant que l'étude de l'ANSES s'était limitée à identifier les dangers, et non pas à évaluer les risques comme l'EFSA l'avait réalisé. L'EFSA s'est cependant engagée à réexaminer la situation en évaluant dès leur parution des études en cours aux Etats-Unis sur la toxicité à faible dose.

En 2012, l'EFSA a donc rédigé un nouvel avis complet sur les risques liés à l'exposition au BPA par voie alimentaire. Les conclusions de l'étude, publiées en 2013, 2014 et 2015 sont que le BPA ne présente pas de risque pour les consommateurs aux niveaux actuels d'exposition. Cependant, l'EFSA a préconisé

une diminution significative de la DJT du BPA, qui a été fixée provisoirement à 4 µg/kg par jour.

A l'heure actuelle, l'emploi du BPA reste donc autorisé dans des matériaux en contact avec les aliments au sein de l'Union Européenne (UE) conformément au règlement 10/2011/EU relatif aux matériaux et articles en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. Il a cependant été défini une limite spécifique de migration de 60 µg/kg dans les aliments. Cette limite correspond à la quantité maximale de migration du BPA vers le milieu avec lequel il est en contact, par exemple par le biais d'un chauffage prolongé (EFSA 2015).

En janvier 2011, la Commission Européenne a cependant décidé que les biberons produits à partir de BPA seraient interdits de fabrication et d'importation en Europe d'après le règlement UE N° 321/2011.

Le 23 juin 2014, une réglementation plus restrictive a été votée dans le domaine des jouets. En effet, la Commission Européenne a modifié l'annexe II de la directive 2009/48/CE portant sur la sécurité des jouets, incluant une limite de migration de 0,1 mg/L pour le BPA.

En outre, le 19 mars 2014, à l'initiative de la France, le comité d'évaluation des risques de l'Agence Européenne des Substances Chimiques (ECHA) s'est montré favorable à un classement plus sévère du BPA en proposant la modification de son niveau de toxicité, passant de la catégorie « reprotoxique suspecté » à la catégorie « toxique pour la reproduction ».

L'ECHA a soumis cet avis à la Commission Européenne, laquelle a décidé le 19 juillet 2016, par le règlement 2016/1179, de classer le BPA comme substance de catégorie 1B toxique pour la reproduction. Sa nouvelle classification en tant que Cancérogène Mutagène Reprotoxique de catégorie 1, qui entrera en vigueur le 1^{er} mars 2018, pourrait entraîner l'application de mesures réglementaires plus sévères (INERIS).

1.6.2 Cadre réglementaire national

De son côté, la France a choisi d'appliquer des restrictions plus drastiques que celles exigées au niveau européen concernant l'usage du BPA.

En effet, la loi n° 2010-729 du 30 juin 2010 a suspendu la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché de biberons produits à base de BPA. Cependant, ces restrictions ont été ensuite élargies par l'Assemblée Nationale, qui a adopté la loi n°2012-1442 du 24 décembre 2012, interdisant le BPA dans tous les conditionnements, contenants ou ustensiles destinés à entrer en contact avec les aliments.

Le Conseil Constitutionnel a été saisi le 17 juin 2015 par le Conseil d'État à la demande de l'association Plastics Europe, qui affirmait que ces nouvelles restrictions définies par la loi n°2012-1442 portaient atteinte à la liberté d'entreprendre et à la Constitution.

La décision QPC n°2015-480 du Conseil Constitutionnel du 17 septembre 2015 a alors exclu de cette nouvelle loi la suspension de la fabrication et de l'exportation de tout conditionnement, contenant ou ustensile comportant du BPA et destiné à entrer en contact direct avec les denrées alimentaires. Elle a cependant maintenu la suspension de l'importation et de la mise sur le marché national des conditionnements, contenants ou ustensiles destinés à entrer en contact avec les aliments contenant du BPA. Le but est donc de bannir du sol français les contenants alimentaires avec du BPA, mais de ne pas empêcher son exportation sur le marché international.

En janvier 2014, le ministère français de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie a déposé une proposition de restriction auprès de l'ECHA sur l'utilisation du BPA dans les papiers thermiques. L'avis de l'ECHA devrait être connu en 2016, avis qui sera ensuite soumis à la Commission Européenne (INERIS).

1.7 Pharmacocinétique du bisphénol A

1.7.1 Absorption

Par voie orale :

Le BPA est absorbé très rapidement par voie digestive chez différentes espèces telles que le rat, la souris et le singe (Falcu et al. 2013) avec une absorption gastro-intestinale supérieure à 85 % chez le rat et le singe. Concernant l'Homme, le BPA administré est là encore totalement et rapidement absorbé par la voie digestive (Völkel et al. 2002). Il a également été mis en évidence chez le chien que le BPA pouvait être absorbé de façon très efficace par les muqueuses de la cavité buccale lors d'une exposition sublinguale, pouvant ainsi mener à une exposition interne plus importante que par la simple absorption gastro-intestinale (Gayraud et al. 2013).

Par voie cutanée :

Les premières études menées par Kaddar et al. en 2008 estimaient que seulement 10 % de la dose appliquée au niveau cutané était absorbée, évaluation qui avait été réalisée à partir d'un modèle de peau de porc. Cette valeur était cependant probablement sous-estimée au vu de l'étude de Zalko et al. en 2011, qui a mis en évidence, pour des durées d'incubation de 72 heures, une absorption de 65 % pour la peau d'oreille de porc et de 46 % pour des explants de peau humaine. Ce résultat est cependant à prendre avec précaution puisque le délai d'incubation de 72 heures était largement supérieur aux 24 heures recommandées pour l'intégrité de l'explant humain.

Bien que l'on n'ait pas encore réussi à l'heure actuelle à déterminer avec précision la valeur réelle de l'absorption cutanée du BPA, on ne peut cependant nier que celle-ci est possible, en quantité relativement importante au vu des premières études menées.

Par inhalation :

Il existe à l'heure actuelle peu de données permettant de quantifier l'absorption du BPA par inhalation. Cependant, étant donnée la toxicité systémique induite par des expositions répétées chez des rats exposés par inhalation, une forte absorption du BPA est également attendue par voie inhalée (ANSES 2011b).

1.7.2 Distribution

Le BPA est rapidement distribué dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Ainsi, chez des rates exposées 14 jours après la mise bas, on retrouve, 8 heures après l'exposition, 77 % de la dose administrée dans le lait, le sang, le plasma, mais aussi le foie, les reins et les poumons. Cependant, chez les rongeurs, les concentrations les plus élevées quelques heures après l'administration de BPA étaient retrouvées dans le foie et les reins (Falcy et al. 2013).

Il a en outre été montré que le passage trans-placentaire du BPA de la mère au fœtus était également possible chez de nombreuses espèces, telles que la femme (Schönfelder et al. 2002 ; Corbel 2013), la brebis (Corbel et al. 2013), et le rongeur (Doerge et al. 2011).

1.7.3 Métabolisation

Chez toutes les espèces étudiées, la voie métabolique majoritaire est la conjugaison du BPA à l'acide glucuronique pour former le BPA - glucuronide (BPA-G), conjugaison qui a lieu principalement dans le foie et dans une moindre mesure dans l'intestin. Cette réaction est catalysée par l'UGT2B1 (UDP - glucuronosyltransférase) chez le rat, alors que chez l'Homme, ce sont les isoformes UGT2B15 et UGT2B7 qui assurent cette métabolisation (Mazur et al. 2010).

Chez l'Homme, le pic plasmatique de la molécule conjuguée est atteint en 80 minutes et sa concentration plasmatique diminue de façon exponentielle avec une demi-vie de 89 minutes (Völkel et al. 2002). Une petite partie du BPA est également conjuguée au sulfate.

Chez les rongeurs, le BPA administré par voie orale subit aussi une glucuronidation très rapide, puis il est excrété par la bile, se dissocie de nouveau et revient à l'état libre. Réabsorbé alors au niveau intestinal, il passe de nouveau dans la circulation sanguine formant un cycle entéro-hépatique qui va se répéter à plusieurs reprises avant l'élimination définitive.

D'autres métabolites ont pu être mis en évidence chez les rongeurs, tels que le BPA sulfate (BPA-S) et le BPA hydroxylé, qui représentent moins de 10 % des

métabolites totaux. De façon très anecdotique, il existe également des doubles conjugués ou des dérivés méthoxylés.

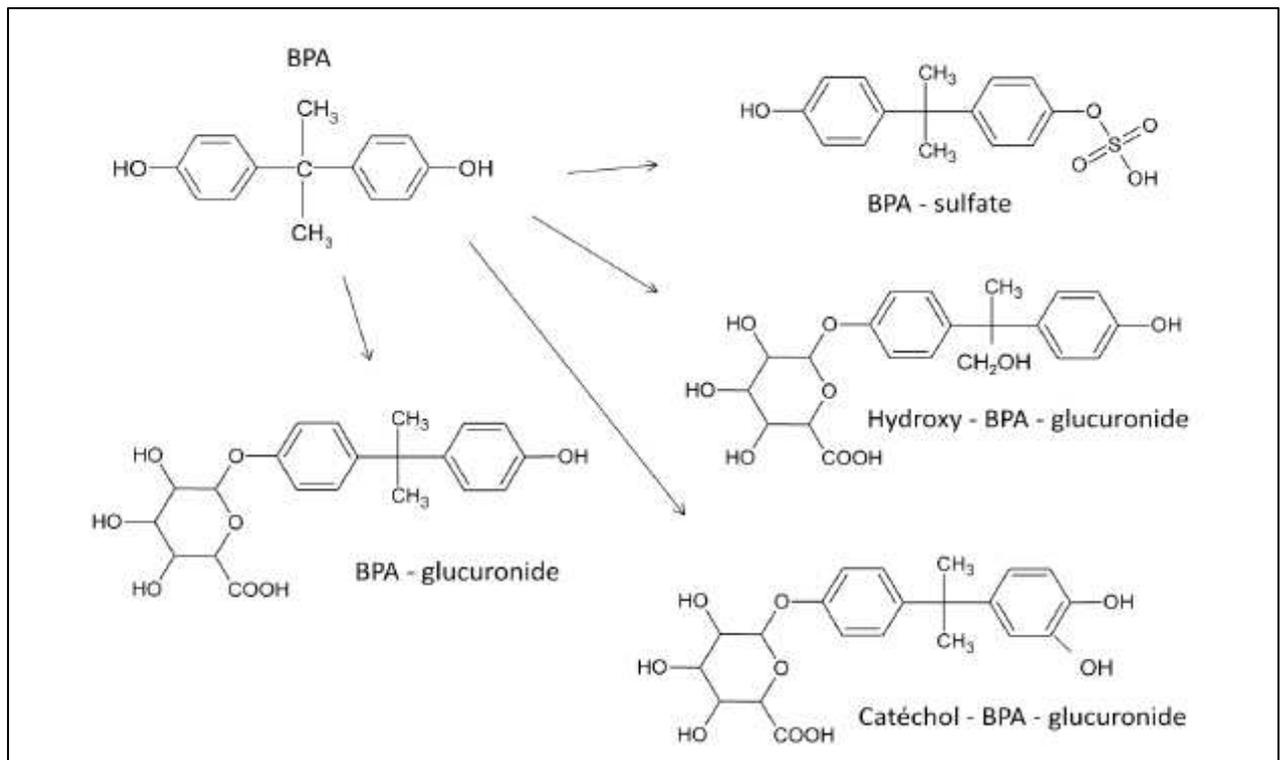


Figure 4 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (source : Inserm 2011).

Le BPA-G et le BPA-S représentent les voies de détoxification majeures du BPA car ces formes-là ne peuvent pas se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes. Cependant, il est possible qu'une déconjugaison se produise dans certains sites tissulaires spécifiques, ce qui amènerait à la transformation des métabolites en BPA libre, et donc de nouveau actif sur les récepteurs aux œstrogènes, par le biais de la bêta-glucuronidase et d'une arylsulfatase C (Ginsberg et Rice 2009). La bêta-glucuronidase existant non seulement dans l'intestin, mais également dans le placenta et le foie fœtal, cela pourrait entraîner une exposition du fœtus à du BPA libre (Aschberger et al. 2010).

1.7.4 Elimination

Chez l'Homme, le BPA est métabolisé en BPA-G au niveau hépatique puis éliminé sous cette forme par voie urinaire. La concentration urinaire atteint un pic 6 heures après administration puis diminue rapidement avec une demi-vie de 5 heures. Après administration orale chez l'Homme, la conjugaison et l'élimination sont rapides et quasiment totales (Völkel et al. 2002).

Chez le singe *Cynomolgus* exposé au BPA, 85 à 100 % de la dose administrée est également excrétée dans l'urine. La demi-vie plasmatique chez le singe Rhésus est décrite à des valeurs comprises entre 3,5 et 9 heures (Doerge et Fisher 2010).

Chez les rongeurs, après l'étape de glucuronidation hépatique, le BPA-G est excrété dans la bile et subit le cycle entéro-hépatique décrit précédemment. Quarante-cinq à 66 % de la dose administrée est donc excrétée dans la bile, ce qui conduira à une élimination plus lente chez les rongeurs que chez l'Homme. La principale voie d'excrétion chez le rat se fait par l'élimination fécale (50 - 83 % de la dose), majoritairement sous la forme de BPA libre issu de l'hydrolyse du BPA-G excrété dans la bile, tandis que seulement 10 à 40 % de la dose administrée est excrétée via les urines, sous la forme de BPA-G (82 %), de BPA libre (14 %) et de BPA-S (4 %) (ANSES 2011b).

Une étude récente réalisée chez la brebis gravide a montré que l'hydrolyse du BPA-G au niveau du compartiment fœtal représente la voie principale d'élimination du BPA-G piégé dans le compartiment fœtal (Gauderat et al. 2016).

1.8 Liaison du bisphénol A aux protéines plasmatiques

1.8.1 Intérêt de l'étude de la fixation aux protéines plasmatiques

Les effets potentiels du BPA sont liés aux concentrations plasmatiques, qui constituent donc le paramètre d'intérêt pour extrapoler les données expérimentales de l'animal à l'Homme et évaluer l'exposition interne au BPA. Les études de la pharmacocinétique du BPA réalisées chez diverses espèces animales ont montré que la clairance plasmatique du BPA est élevée et équivalente au débit sanguin hépatique, et que les concentrations plasmatiques en BPA prédites pour un même schéma d'exposition diffèrent peu entre les espèces (Collet et al. 2015).

Cependant, la connaissance des seules données pharmacocinétiques ne suffit pas à caractériser l'exposition interne à la forme active du BPA, et donc le risque d'apparition des effets toxiques de ce dernier. Il est en effet généralement admis que seule la fraction libre du BPA, c'est-à-dire non liée à des protéines plasmatiques, est active et peut exercer un effet de perturbateur endocrinien. La prise en charge du BPA par les protéines plasmatiques pourrait ainsi avoir un effet protecteur pour les tissus cibles de l'appareil reproducteur (Bendridi et al. 2002).

La connaissance de la fraction libre du BPA permettrait ainsi d'objectiver avec précision l'exposition interne au BPA des espèces étudiées et d'interpréter convenablement les concentrations plasmatiques.

1.8.2 Détermination des paramètres de liaison aux protéines plasmatiques

Le pourcentage de fixation du BPA a été étudié chez diverses espèces. Ainsi, la fraction libre s'élèverait à 6 % chez la brebis (Corbel et al. 2013), 5 % chez l'Homme (Csanady et al. 2002), 6 % chez le rat (Teeguarden 2005) et 5 % chez le macaque *Cynomologus* (Kurebayashi 2002).

Afin de pouvoir caractériser avec précision la liaison du BPA à une protéine plasmatique, il est important de déterminer les 2 paramètres qui caractérisent cette liaison, qui sont la constante de dissociation à l'équilibre (K_d), qui est l'inverse de la constante d'affinité, et la capacité maximale de fixation (B_{max}) qui correspond à la concentration en sites de liaison.

Chez le rat, la liaison du BPA aux protéines plasmatiques a été caractérisée au travers des valeurs de B_{max} et de K_d qui ont été respectivement estimées à 3100 μM et 195 μM par Teegarden en 2005. Ces résultats avaient cependant été obtenus à l'aide d'une analyse de type Scatchard, considérée aujourd'hui comme inacceptable, et nécessitent donc d'être réévalués.

Chez l'Homme, ces paramètres ont été estimés par la même approche : le B_{max} serait de 2000 nmol/mL et le K_d de 100 nmol/mL (Csanady et al. 2002).

1.8.3 Les protéines plasmatiques fixant le bisphénol A

1.8.3.1 L'albumine

L'albumine est une des protéines plasmatiques majeures, capable de lier une grande variété de ligands lipophiles, y compris les stéroïdes (Baker 2002).

La principale protéine liant le BPA dans le sang serait l'albumine, avec une liaison de faible affinité et de capacité élevée. En effet, d'une façon générale, l'affinité de l'albumine pour les stéroïdes et les composés lipophiles est faible, avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-4} M (Baker 2002).

La concentration moyenne en albumine dans le plasma humain est de 40 g/L, soit 580 nmol/mL. Cet écart entre la capacité maximale de fixation du BPA, évaluée à 2000 nmol/mL, et la concentration en albumine peut refléter de multiples sites de fixation sur l'albumine, mais également la contribution d'autres protéines plasmatiques à la fixation du BPA (Csanady et al. 2002).

1.8.3.2 La Sex Hormone Binding Globulin

La SHBG, ou Sex Hormone Binding Globulin, est la principale protéine de transport des hormones stéroïdes sexuelles chez l'Homme. C'est une protéine plasmatique liant de façon spécifique, contrairement à l'albumine, les androgènes et œstrogènes avec une affinité que l'on estime 4 à 5 fois supérieure à celle de l'albumine (Hammond 2011).

La concentration de la SHBG chez l'Homme est fortement corrélée à la masse de graisse, à la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'à l'influence des œstrogènes et des hormones thyroïdiennes. Les concentrations plasmatiques en SHBG sont faibles et varient entre 35 et 45 nmol/L chez la femme adulte. Il a été montré chez l'Homme que le BPA est capable de déplacer la testostérone et l'œstradiol (E2) de leurs sites de liaison à la SHBG humaine. Cependant, l'affinité de la liaison du BPA pour la SHBG serait très faible, la constante de dissociation à l'équilibre du complexe BPA-SHBG humaine, notée K_d BPA-SHBG étant estimée à une valeur 9000 fois plus élevée que celle du complexe E2-SHBG (Barini et al. 1993).

Chez la brebis, lors d'un essai préliminaire, nous avons montré que l'addition de dihydrotestostérone (DHT) au plasma ovin à une concentration de 0,3 µg/mL, entraînant une saturation des sites de liaison de la SHBG (Barini et al. 1993), ne modifiait pas le pourcentage de BPA lié aux protéines plasmatiques. Les valeurs moyennes de fixation ont ainsi été estimées respectivement à $97,3 \pm 0,79$ % et $96,9 \pm 0,75$ % en l'absence et en présence de DHT à des concentrations de BPA de 0,5 à 10 µg/mL. Cela nous a permis de confirmer que la SHBG ne contribuait pas significativement à la fixation du BPA aux protéines plasmatiques.

Ces données bibliographiques ainsi que notre essai préliminaire suggèrent donc que la SHBG a une très faible contribution à la liaison du BPA aux protéines plasmatiques et que le BPA serait majoritairement lié à l'albumine.

1.8.3.3 L'alpha foeto protéine

Chez le rat, l'alpha foeto protéine (AFP), est une protéine de transport des hormones stéroïdiennes que l'on trouve dans le liquide amniotique et le sang des foetus et nouveaux nés. L'AFP est capable de lier l'œstradiol avec une très forte affinité et spécificité. Il a cependant été montré que le BPA ne se lie pas de façon significative à l'AFP chez le rat (Milligan et al. 1998).

1.8.3.4 La transthyrétine et la thyroxine-binding-globulin

La transthyrétine (TTR) fait partie, avec l'albumine et la thyroxine-binding-globulin (TBG), des 3 principales protéines plasmatiques impliquées dans le transport des hormones thyroïdiennes. La TBG est responsable du transport de 67 % de la thyroxine circulante (T4). En dépit de sa faible capacité de liaison, elle possède en effet une forte affinité pour la T4. L'albumine serait en charge de 13 % de la T4 circulante, et la TTR des 20 % restants (Ganong et Jobin 2005).

La structure du BPA, qui présente des similitudes avec celle des hormones thyroïdiennes, laissait supposer une possible fixation du BPA aux protéines de transport des hormones thyroïdiennes. Ishihara et al. ont ainsi montré en 2003 que le BPA pouvait se lier à la TTR chez la caille.

L'évaluation des paramètres de liaison du BPA à la TTR et la TBG chez l'Homme a été réalisée par Cao et al. en 2011. Les constantes de dissociation à l'équilibre des complexes BPA-TBG et BPA-TTR ont été respectivement estimées à 1,7 μM (386 ng/mL) et 3,2 μM (735 ng/mL). Ces constantes sont très largement supérieures aux valeurs des K_d des complexes TTR-T4 et TBG-T4, ce qui indique que le BPA aux concentrations observées chez l'Homme ne devrait pas interférer avec la liaison de la T4 à la TBG et la TTR.

En revanche, étant donné les valeurs relativement élevées des concentrations plasmatiques en TTR chez l'Homme et le faible pourcentage de saturation de la TTR par la T4 estimé à 1 % environ, la fraction de BPA liée à la TTR pourrait représenter une part significative du BPA plasmatique. Il serait intéressant d'évaluer l'importance

de cette fraction car la liaison du BPA à la TTR pourrait favoriser la capture du BPA par le tissu nerveux en maintenant des concentrations élevées dans le liquide céphalo-rachidien et créant ainsi un gradient de concentration en faveur du passage dans le tissu nerveux (Kassem et al. 2006).

1.8.4 Particularités au cours de la gestation

Des modifications des concentrations en protéines plasmatiques sont observées au cours de la gestation chez différentes espèces.

Chez la femme, les concentrations fœtales en albumine sont environ supérieures de 20 % aux concentrations maternelles au moment du terme (Hill et Abramson 1988). Il a également été mis en évidence des modifications de l'affinité de l'albumine fœtale, qui serait plus faible pour certaines substances (Rane et al. 1971).

En outre, au cours du dernier trimestre de la grossesse, la concentration en SHBG augmente d'un facteur 5 à 10 chez la femme enceinte (Hammond 2011). Les concentrations plasmatiques en SHBG, qui varient usuellement entre 35 et 45 nmol/L chez la femme adulte, peuvent ainsi augmenter jusqu'à 400 nmol/L au cours du dernier trimestre de grossesse (Barini et al. 1993).

Les variations des concentrations en protéines plasmatiques au cours de la gestation, ainsi que les différences d'affinité pour l'albumine entre la mère et le fœtus, conduisent à formuler l'hypothèse selon laquelle la fixation du BPA et le ratio entre les concentrations des formes libres et liées de ce xeno-œstrogène pourraient être différentes chez l'adulte et le fœtus. Cette différence de fixation pourrait avoir un impact sur la distribution du BPA entre les circulations maternelles et fœtales, et ainsi être à l'origine d'une sensibilité accrue du fœtus vis-à-vis du BPA.

La connaissance du pourcentage de BPA libre est donc essentielle pour prédire l'exposition fœtale à la forme active du BPA.

1.9 Une alternative au bisphénol A : le bisphénol S

Face à la polémique et aux incertitudes entourant le BPA, et au vu des réglementations croissantes concernant son utilisation, il est devenu nécessaire de chercher des composés chimiques pouvant se substituer au BPA au sein de l'industrie plastique. Une de ces alternatives est le bisphénol S (BPS) de formule chimique $C_{12}H_{10}O_4S$.

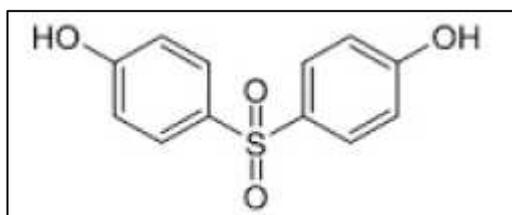


Figure 5 : Structure chimique du bisphénol S.

A l'heure actuelle, le BPS est de plus en plus utilisé en tant que monomère pour la synthèse de polyethersulfones en remplacement des polycarbonates pour la fabrication de biberons. Il est également utilisé comme révélateur dans les papiers thermiques en substitution du BPA.

Il a cependant été montré que le BPS posséderait, tout comme le BPA, un effet œstrogéno-mimétique (Kuruto-Niwa et al. 2005).

Nous étudierons donc également, en parallèle du BPA, la fixation du BPS aux protéines plasmatiques chez diverses espèces.

2) MATERIEL ET METHODES

2.1 Objectif du protocole

Les résultats mis en évidence dans la bibliographie suggèrent que dans les conditions d'exposition humaine au BPA, la fraction libre du BPA plasmatique est de l'ordre de 4 %. La majorité du BPA serait liée à l'albumine, une fraction non négligeable du BPA pourrait être liée à la TTR, et les fractions liées à la SHBG et à la TBG seraient quant à elles très faibles.

L'objectif de ce protocole était de :

- valider ces prédictions pour l'Homme et de comparer la liaison du BPA aux protéines plasmatiques de l'Homme à celles des espèces modèles utilisées pour les études toxicologiques : le macaque Rhésus, la brebis et les rongeurs (rat, souris).
- évaluer la liaison du BPA aux protéines plasmatiques au cours de la grossesse à partir des prélèvements réalisés chez la femme enceinte au cours du dernier trimestre de grossesse et du sang de cordon ombilical de nouveau-né humain.

L'approche expérimentale a été basée sur la détermination des fractions de BPA libre et lié aux protéines plasmatiques par la technique de dialyse à l'équilibre en utilisant du BPA ou du BPS avec une large gamme de concentrations allant de 2,5 nM à 1000 µM.

La fixation du BPA aux protéines plasmatiques a été également évaluée chez la brebis avec du plasma natif et du plasma additionné de T4 de façon à saturer la TBG et la TTR et d'évaluer l'importance de la fixation du BPA à ces protéines.

2.2 Matériel testé

2.2.1 Identification du matériel testé

Le tableau 1 ci-dessous résume les caractéristiques principales des produits utilisés.

Bisphénol A	Bisphénol S
$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ poudre blanche Masse molaire : 228,29 g/mol pureté $\geq 99\%$	$(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2\text{SO}_2$ poudre blanche Masse molaire : 250,27 g/mol pureté $\geq 98\%$
Fournisseur : Sigma-Aldrich (réf : 239658)	Fournisseur : Sigma-Aldrich (réf : 03039)

Tableau 1 : Caractéristiques des produits utilisés.

2.2.2 Préparation des solutions de travail de BPA (BPS)

La gamme de concentration s'étend de 2,5 nM à 1 mM, soit une valeur environ 5-10 fois supérieure au K_d supposé du complexe albumine-BPA. Nous avons ainsi utilisé les concentrations suivantes : 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 250 nM, 1,25 μM , 5 μM , 25 μM , 250 μM et 1000 μM . Le tableau 2 ci-dessous rappelle les équivalences en ng/mL pour plus de clarté.

μM	0,0025	0,005	0,01	0,05	0,250	1,25	5	25	250	1000
BPA (ng/mL)	0,6	1,1	2,3	11,4	57,1	285,4	1141,5	5707,2	57072,5	228290
BPS (ng/mL)	0,6	1,2	2,5	12,5	62,57	312,8	1251,3	6256,8	62567,5	250270

Tableau 2 : Equivalences entre les concentrations molaires et les concentrations massiques pour le BPA et le BPS.

Dans un premier temps, les solutions mères et solutions de travail de BPA et de BPS dans l'éthanol ont été préparées conformément au protocole décrit dans les tableaux 3 et 4.

Solution de BPA froide	Concentration	Préparation de la solution
Solution mère (SM)	34,3 µg/µL	17,2 mg de BPA dans 0,5 mL d'éthanol
Solution de travail 1 (ST1) <i>Dilution au 10^{ème}</i>	3,431 µg/µL	100 µL de SM + 900 µL éthanol
Solution de travail 2 (ST2) <i>Dilution au 100^{ème}</i>	0,343 µg/µL	10 µL de SM + 990 µL éthanol
Solution de travail 3 (ST3) <i>Dilution au 1000^{ème}</i>	0,034 µg/µL	10 µL de ST1 + 990 µL de solution éthanol
Solution de travail 4 (ST4) <i>Dilution au 10000^{ème}</i>	0,003 µg/µL	10 µL de ST2 + 990 µL de solution éthanol

Tableau 3 : Protocole d'élaboration des solutions de travail de BPA dans l'éthanol.

Solution de BPS froide	Concentration	Préparation de la solution
Solution mère (SM)	29,1 µg/µL	14,5 mg de BPS dans 0,5 mL d'éthanol
Solution de travail 1 (ST1) <i>Dilution au 10^{ème}</i>	2,909 µg/µL	100 µL de SM + 900 µl éthanol
Solution de travail 2 (ST2) <i>Dilution au 100^{ème}</i>	0,291 µg/µL	10 µL de SM + 990 µl éthanol
Solution de travail 3 (ST3) <i>Dilution au 1000^{ème}</i>	0,029 µg/µL	10 µL de ST1 + 990 µL d'éthanol
Solution de travail 4 (ST4) <i>Dilution au 10000^{ème}</i>	0,003 µg/µL	10 µL de ST2 + 990 µL d'éthanol

Tableau 4 : Protocole d'élaboration des solutions de travail de BPS dans l'éthanol.

La solution mère et les solutions de travail ont été conservées à 4°C pendant la durée de l'étude.

2.2.3 Préparation des solutions de surcharge en BPA et BPS tritié

Les solutions de travail ont ensuite été utilisées afin de préparer des solutions de surcharge en BPA (BPS) froid et BPA (BPS) tritié pour chaque concentration de la gamme de BPA (BPS).

La solution de BPA tritié utilisée comme traceur avait une pureté radiochimique de 100 % et une radioactivité spécifique de 2,5 Ci/mmol soit 5550000 dpm/mmole, ce qui correspond à 24311 dpm/ng.

La solution de BPS tritié utilisée comme traceur avait une pureté radiochimique de 99,3 % et une radioactivité spécifique de 1,7 Ci/mmol soit 3774000 dpm/mmole, ce qui correspond à 15072 dpm/ng.

Les solutions de surcharge en BPA et BPS ont été élaborées selon les protocoles décrits dans les tableaux 5 et 6.

Solution de surcharge de BPA (nmol/mL)	0,0025	0,005	0,01	0,05	0,25	1,25	5	25	250	1 000
Solution de travail	0	0	0	ST4	ST3	ST2	ST2	ST1	SM	SM
Volume ST (µL)	0	0	0	55	33	17	69	34	34	138
Volume BPA tritié (µL)	23	46	92	92	92	92	92	92	92	92
Volume Ethanol (µL)	207	184	138	83	105	121	69	103	103	0
Volume total (µL)	230	230	230	230	230	230	230	230	230	230

Tableau 5 : Préparation des solutions de surcharge du BPA froid et radioactif.

Solution de surcharge (nmol/mL)	0,0025	0,005	0,01	0,05	0,25	1,25	5	25	250	1 000
Solution de travail	0	0	0	SM4	SM3	SM2	SM2	SM1	SM	SM
Volume ST (µL)	0	0	0	44	29	15	62	31	31	124
Volume BPS tritié (µL)	6,1	12,2	24,5	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0
Volume Ethanol (µL)	154	148	136	80	95	109	62	93	93	0
Volume total (µL)	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160

Tableau 6 : Préparation des solutions de surcharge du BPS froid et radioactif.

2.2.4 Elaboration de la gamme de BPA (BPS) dans le tampon de dialyse

Les gammes de concentrations de BPA et de BPS dans le tampon de dialyse ont été préparées extemporanément par l'addition de 10 µL de chacune des solutions de surcharge à 0,9 mL de tampon de dialyse. Ce tampon à pH = 7,4 est issu du mélange de Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ et NaCl dilués dans un litre d'eau.

2.2.5 Préparation du plasma traité à la thyroxine

Une solution mère de T4 à la concentration de 10 mg/mL a été préparée à partir d'une pesée de 10 mg de T4 (fournisseur : Sigma) dans 1 mL de NaOH 0,033 M (soit 1,32 g de NaOH dilué dans 1 litre d'H₂O). Cent µL de cette solution ont été ajoutés à 20 mL de plasma. De la solution de NaOH à 0,033 M a été ajoutée dans les mêmes proportions au plasma sans T4 pour les mesures de liaison.

2.3 Système biologique

L'étude a été menée à partir de mélanges de plasmas d'individus femelles de chacune des espèces suivantes :

- brebis adulte de race Lacaune (Service de physiologie de l'ENVT, 50 mL)
- souris femelle Swiss (Biochemed, 50 mL)
- rat femelle (Biochemed, 50 mL)
- singe macaque Rhesus (Biochemical Primate Research Centre, 50 mL)
- femmes enceintes (premier et dernier trimestre de grossesse, protocole PPE-VG-Modelexpo-Biosurveillance, 52 mL)
- plasma issu du sang de cordon humain (protocole PPE-VG-Modelexpo-Biosurveillance, 52 mL)

Pour les espèces ovine et humaine, le sang recueilli dans un tube hépariné a été centrifugé à 3000 G pendant 10 minutes et le plasma séparé a été conservé à -20°C dès le prélèvement et jusqu'au moment de la réalisation de la dialyse à l'équilibre.

2.4 Méthodologie expérimentale

Les paramètres de liaison du BPA (BPS) aux protéines plasmatiques ont été évalués par la technique de la dialyse à l'équilibre, en utilisant du BPA (BPS) tritié comme traceur radioactif.

Le protocole détaillé de la réalisation d'une dialyse à l'équilibre est présenté en Annexe. Cette méthode repose sur l'utilisation de deux demi-cellules en Téflon (Diachema 16-10, Braun Scientetec, ZA, Courtaboeuf, Les Ulis, France). Ces demi-cellules sont séparées par une membrane en cellulose semi-perméable qui exclut le passage des substances de poids moléculaire supérieur à 5000 Da.

Neuf cent μL de plasma et 900 μL de solution de BPA ou de BPS (froid et radioactif) sont introduits respectivement dans le compartiment plasma et le compartiment tampon de la cellule de dialyse. Les 20 cellules de dialyse sont ensuite soumises à une rotation constante de 20 rotations par minute à 37°C pendant une

heure, temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de part et d'autre de la membrane de dialyse (Csanady et al. 2002).

A l'issue de la dialyse, 600 μ L sont alors récupérés dans les compartiments plasma et dialysat. Dix mL de liquide scintillant (Ultima Gold) sont ajoutés à chacune des solutions et la radioactivité est alors évaluée à l'aide d'un analyseur à scintillation liquide Tri-Carb.

Les dialyses à l'équilibre sont réalisées en duplicate à partir de l'ensemble des pools de plasmas natifs de chaque espèce pour chacune des 10 concentrations de BPA et de BPS testées. Les mesures sont répétées en simple avec du plasma traité à la T4.

2.5 Analyse des données

2.5.1 Détermination du pourcentage de fixation

Les concentrations en BPA (BPS) dans le plasma dialysé (PE) sont calculées à partir de la concentration plasmatique nominale en BPA (PT) et de la radioactivité de part et d'autre de la membrane de dialyse (équation 1).

$$PE = PT \times \frac{dpm_{\text{plasma dialysé}}}{dpm_{\text{tampon}} + dpm_{\text{plasma dialysé}}} \quad (1)$$

Les équations 2 et 3 donnent les concentrations en BPA libre (F) et lié (B).

$$F = PE \times \frac{dpm_{\text{tampon}}}{dpm_{\text{plasma dialysé}}} \quad (2)$$

$$B = PE - F \quad (3)$$

Pour chaque concentration de BPA (BPS), on obtient donc des couples de valeurs (B, F) où B et F sont respectivement les concentrations en BPA (BPS) lié et libre. Nous pouvons donc déterminer les fractions libres et liées pour chaque concentration et pour chaque espèce.

2.5.2 Détermination des paramètres de liaison

Les concentrations en BPA lié aux protéines sont mises en relation avec la concentration en BPA libre (figure 6). Selon le modèle de fixation comprenant une fixation saturable spécifique de forte affinité et de faible capacité (par exemple à la TTR) et une fixation de forte capacité et de faible affinité (à l'albumine), la relation définie par l'équation (4) a été utilisée pour évaluer par régression non linéaire les paramètres de fixation (B_{max} , K_d et NS) du BPA (BPS).

$$B = \frac{B_{\text{max}1} \times F}{K_{d1} + F} + \frac{B_{\text{max}2} \times F}{K_{d2} + F} \quad (4)$$

avec B et F respectivement les concentrations molaires de BPA (BPS) lié et libre, $B_{\text{max}1}$ et $B_{\text{max}2}$ les capacités maximales de fixation et K_{d1} et K_{d2} les constantes

de dissociation à l'équilibre, respectivement d'une liaison de forte affinité et saturable à la TTR et d'une liaison de faible affinité et non saturable à l'albumine.

Cette équation peut être simplifiée si l'on considère que F est négligeable devant $Kd2$ dans le cas d'une liaison de faible affinité :

$$B = \frac{B_{max1} \times F}{Kd1 + F} + NS \times F \quad \text{avec} \quad NS = \frac{B_{max2}}{Kd2} \quad (5)$$

avec NS la constante de liaison non spécifique du complexe BPA (BPS)-albumine. Les valeurs de B_{max} et Kd sont déterminées par régression non linéaire à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

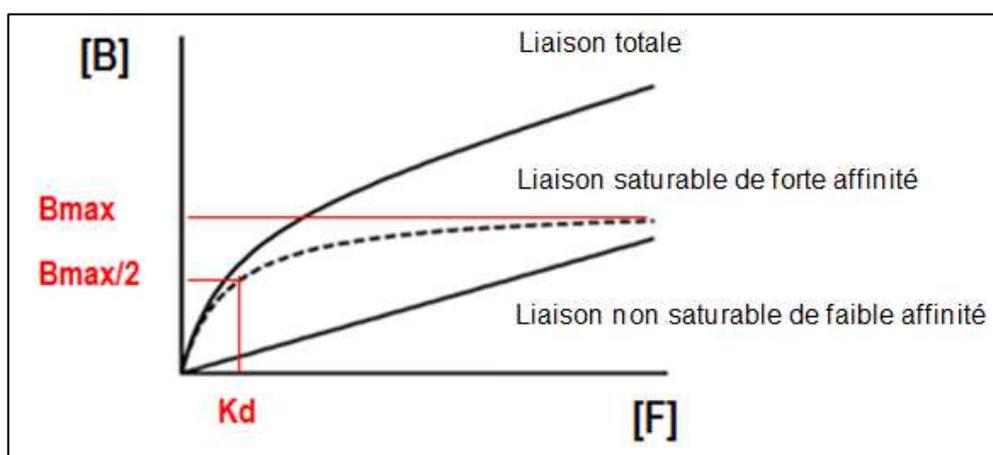


Figure 6 : Représentation théorique de la fixation d'un ligand en fonction de la concentration libre de ce même ligand.

2.5.3 Détermination de la fixation spécifique à chaque protéine plasmatique

Le but est de déterminer la part de chaque protéine impliquée dans le transport du BPA (BPS).

La T4 a été ajoutée dans le plasma testé afin de saturer les sites de liaison de la TTR et ainsi de comparer le pourcentage obtenu de BPA (BPS) lié à l'albumine à celui observé dans les conditions normales de fixation.

Dans le plasma natif (non traité avec de la T4), le BPA va se répartir entre les fractions liées à la TTR ($\%TTR_{bound}$), à l'albumine ($\%alb_{bound-N}$), et la fraction libre

(%free_N) (équation 6). Dans le plasma additionné de T4, le BPA va se répartir entre la fraction liée à l'albumine (%alb_{bound-T}) et la fraction libre (%free_T) (équation 7).

$$\text{Plasma natif (N) sans T4 : } 100 = \% \text{ TTR}_{\text{bound}} + \% \text{ alb}_{\text{bound-N}} + \% \text{ free}_N \quad (6)$$

$$\text{Plasma traité (T) avec T4 : } 100 = \% \text{ alb}_{\text{bound-T}} + \% \text{ free}_T \quad (7)$$

Il est généralement considéré (Sitteri et al. 1982) que la distribution du BPA entre la fraction liée à l'albumine et la fraction libre est indépendante de la présence d'une protéine de liaison spécifique, ce qui nous permet d'établir la relation définie par l'équation (8).

$$\frac{\% \text{ alb}_{\text{bound-N}}}{\% \text{ free}_N} = \frac{\% \text{ alb}_{\text{bound-T}}}{\% \text{ free}_T} = \frac{100 - \% \text{ free}_T}{\% \text{ free}_T} \quad (8)$$

En divisant la relation (6) par %free_N, on obtient l'équation 9.

$$\frac{100}{\% \text{ free}_N} = \frac{\% \text{ TTR}_{\text{bound}}}{\% \text{ free}_N} + \frac{\% \text{ alb}_{\text{bound-N}}}{\% \text{ free}_N} + 1 \quad (9)$$

L'équation 9 peut être simplifiée à l'aide de l'équation 8, afin de déterminer le pourcentage de BPA lié spécifiquement à la TTR (équation 10).

$$\% \text{ TTR}_{\text{bound}} = 100 - \% \text{ free}_N \times \left(\frac{\% \text{ alb}_{\text{bound-T}}}{\% \text{ free}_T} + 1 \right) \quad (10)$$

Que l'on peut écrire sous la forme suivante :

$$\% \text{ TTR}_{\text{bound}} = 100 - \% \text{ free}_N \times N \quad (11)$$

$$\text{avec } N = \left(\frac{\% \text{ alb}_{\text{bound-T}}}{\% \text{ free}_T} + 1 \right)$$

A partir du pourcentage de BPA libre pour chacune des concentrations de BPA dans le plasma traité (%free_T), on pourra ainsi en déduire le pourcentage de BPA lié à l'albumine dans le plasma traité (%alb_{bound-T}) à l'aide de l'équation (7).

Le pourcentage de BPA lié à la TTR dans le plasma natif est calculé pour chacune des concentrations de BPA à l'aide de l'équation (11), ce qui permet donc de déterminer le pourcentage de BPA lié à l'albumine dans le plasma natif ($\%alb_{bound-N}$) en remplaçant $\%TTR_{bound}$ et $\%free_N$ dans l'équation (6).

2.5.4 Détermination de la fixation du BPA dans du plasma dilué

Etant donné que nous n'avons identifié qu'une seule liaison dont les valeurs de B_{max} sont très largement supérieures aux concentrations maximales de la gamme, nous avons décidé d'utiliser des solutions de plasmas dilués afin de déterminer plus précisément les valeurs des paramètres de cette liaison.

La dilution du plasma d'un facteur 100 dans du tampon de dialyse a été choisie afin de diminuer le B_{max} d'un facteur 100, et d'obtenir un B_{max} de l'ordre de 100 μM , soit une valeur dix fois inférieure à la limite supérieure de notre gamme de concentrations. Cependant, il convenait au préalable de s'assurer que la dilution du plasma ne modifiait pas la constante de dissociation K_d .

Afin de valider la mesure du B_{max} à partir de plasma dilué, nous avons tout d'abord évalué les valeurs de B_{max} et de K_d par régression non linéaire, selon la technique présentée précédemment (cf chapitre 2.5.2), avec du plasma de brebis dilué au 100^{ème} en utilisant la même gamme de concentrations. En utilisant ces valeurs mesurées de B_{max} et K_d , nous avons prédit les pourcentages de fixation du BPA attendus pour du plasma dilué au 80^{ème}, 60^{ème}, 40^{ème}, 20^{ème} et du plasma non dilué à partir de l'équation 5 simplifiée en divisant le B_{max} par le facteur de dilution et en conservant la valeur de K_d .

$$B = \frac{B_{max1} \times F}{K_d(1+F)} \quad (5)$$

Nous avons ensuite comparé les pourcentages de fixation obtenus expérimentalement à partir du plasma dilué au 1/100^{ème} avec ceux que nous avons

prédits pour une concentration plasmatique en BPA de 1,5 μM afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle le K_d n'était pas modifié par la dilution, et donc de valider la méthode de mesure à partir du plasma dilué.

3) RESULTATS

3.1 Influence des concentrations plasmatiques en BPA et BPS sur le pourcentage de fixation aux protéines plasmatiques

A l'aide des formules (1), (2) et (3) présentées dans la partie 2.5.1, nous avons donc pu obtenir les pourcentages de fixation en fonction des concentrations en BPA (BPS).

Les figures présentées dans cette partie représentent l'évolution du pourcentage de fixation aux protéines plasmatiques pour la gamme de concentrations en BPA et BPS étudiée, qui s'étend jusqu'à 1000 μM (soit 228290 ng/mL pour le BPA et 250275 ng/mL pour le BPS). Pour plus de lisibilité, les plus faibles concentrations, jusqu'à 50 ng/mL, sont également représentées séparément dans un second graphique.

3.1.1 Bisphénol A

Les figures 7 et 8 présentées ci-dessous montrent l'évolution du pourcentage de fixation du BPA en fonction de la concentration plasmatique en BPA.

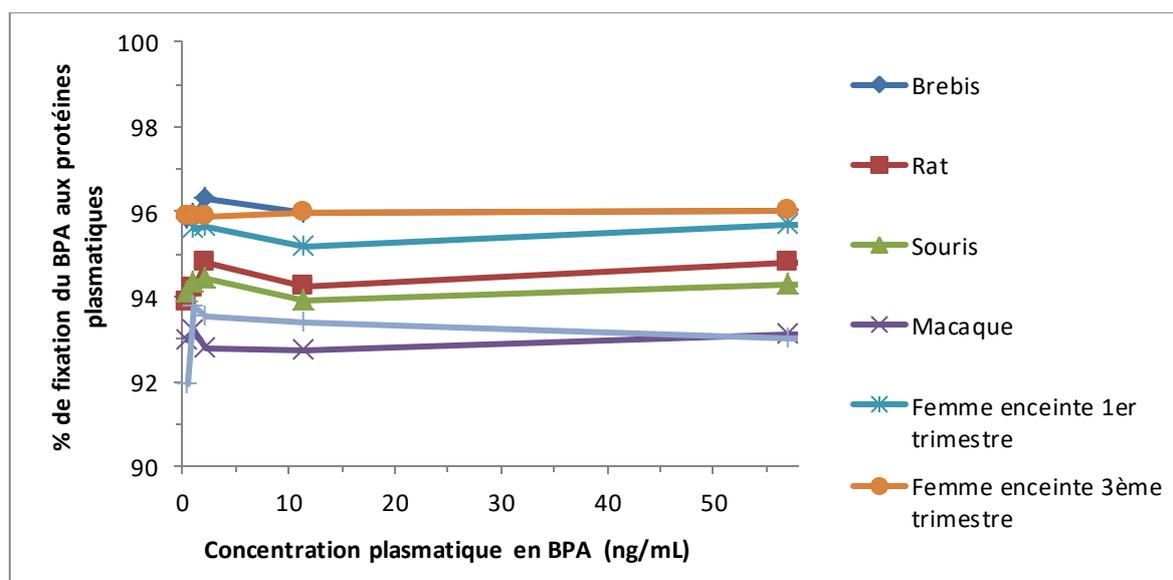


Figure 7 : Evolution de la fixation du BPA aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPA (faibles concentrations).

La figure 7 montre que le pourcentage de fixation ne varie pas pour des concentrations en BPA inférieures à 50 ng/mL pour l'ensemble des espèces étudiées.

L'observation de ces courbes ne nous permet donc pas de mettre en évidence la liaison spécifique dans cette gamme de concentrations. En effet, le caractère saturable de la liaison se serait traduit par une diminution du pourcentage de fixation.

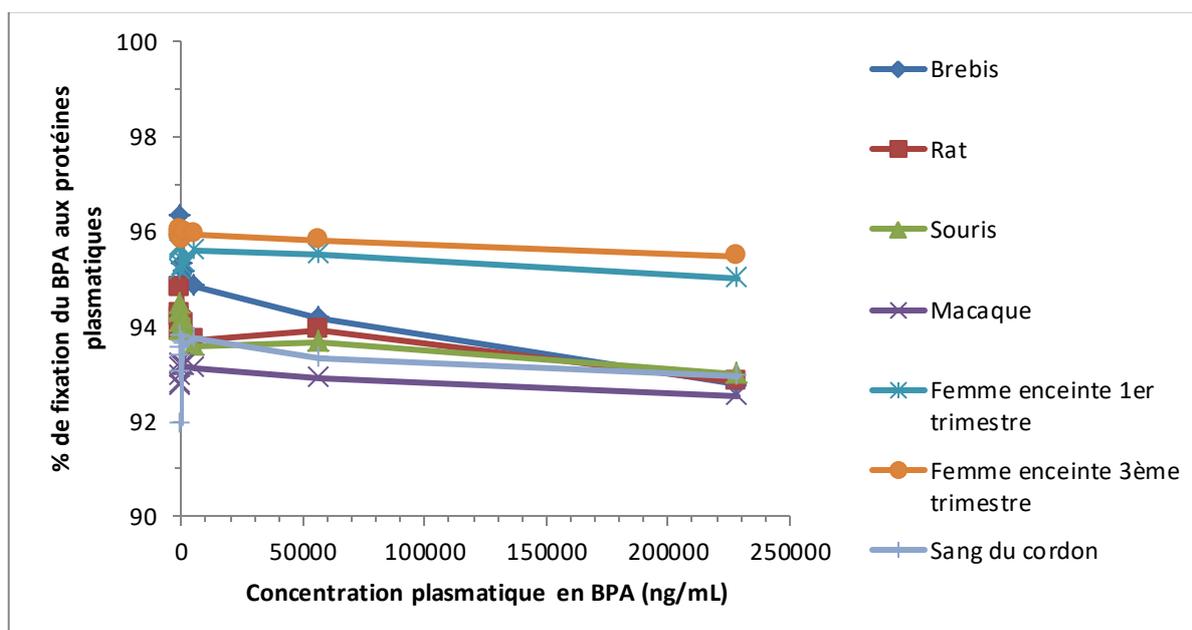


Figure 8 : Evolution de la fixation du BPA aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPA (fortes concentrations).

Pour les concentrations plus importantes (figure 8), à partir de 285 ng/mL, on note une très légère diminution du pourcentage de BPA lié, ce qui correspond probablement au début de saturation de l'albumine. Nous n'avons cependant pas saturé totalement l'albumine, ce qui indique que la saturation de l'albumine nécessiterait d'utiliser des concentrations en BPA très largement supérieures à la concentration maximale utilisée ici.

3.1.2 Bisphénol S

Les figures 9 et 10 présentées ci-dessous montrent l'évolution du pourcentage de fixation du BPS en fonction de la concentration plasmatique en BPS.

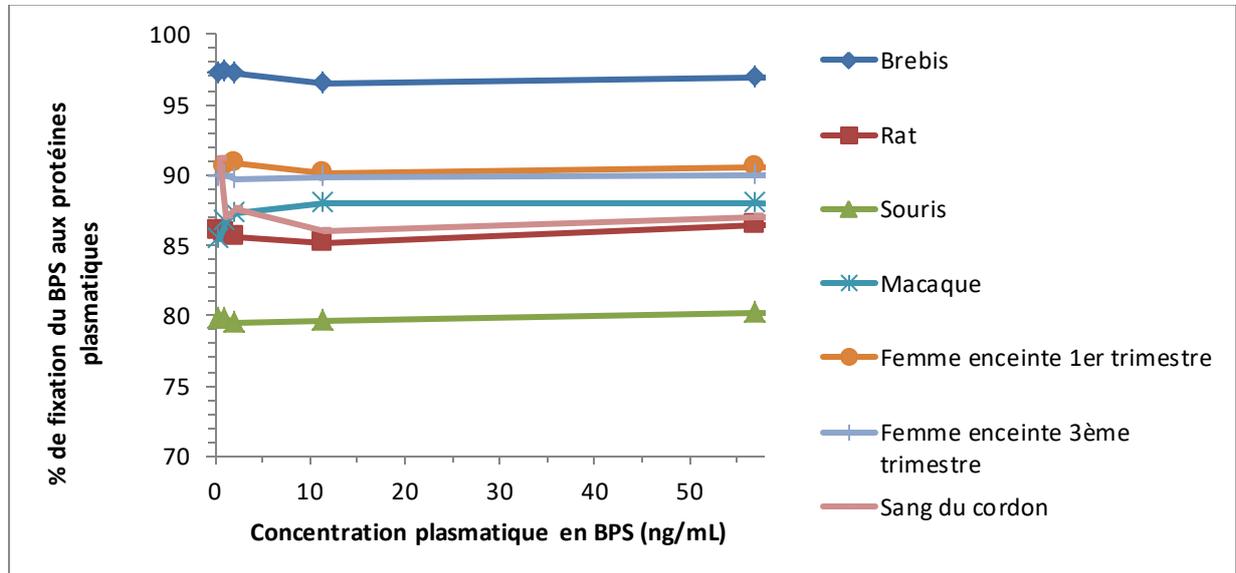


Figure 9 : Evolution de la fixation du BPS aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPS (faibles concentrations).

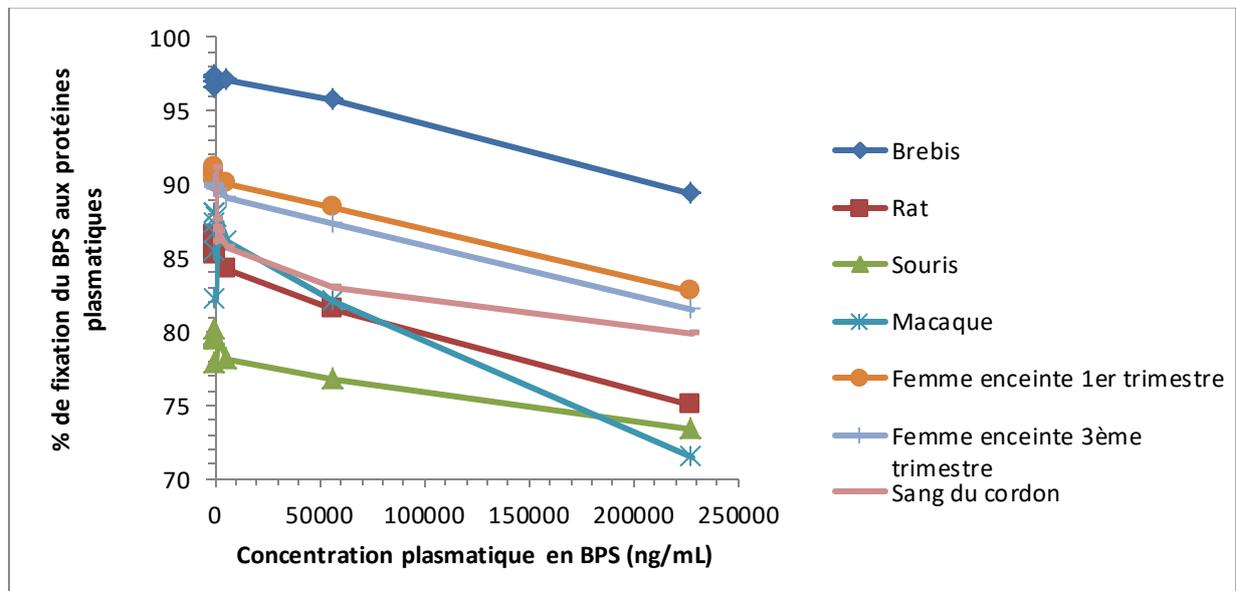


Figure 10 : Evolution de la fixation du BPS aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations plasmatiques en BPS (fortes concentrations).

Tout comme pour le BPA, nous ne mettons pas en évidence la liaison spécifique attendue pour les faibles concentrations et cela pour l'ensemble des espèces étudiées.

Cependant, lorsque l'on étudie l'ensemble de la gamme de concentrations, on note une diminution marquée du pourcentage de BPS fixé pour les concentrations élevées de BPS quelle que soit l'espèce.

Cette diminution correspond à une saturation de l'albumine qui, bien qu'encore incomplète, est beaucoup plus importante qu'elle ne l'était pour le BPA. Deux raisons peuvent expliquer cette meilleure saturation :

- une capacité maximale de fixation plus faible, et donc un B_{max} plus faible
- une affinité moins importante, et donc un K_d plus élevé

La détermination des paramètres de liaison doit nous permettre de déterminer l'origine de ces différences de liaison entre le BPA et le BPS.

3.2 Comparaison interspécifique du pourcentage de fixation aux protéines plasmatiques

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne \pm écart type.

3.2.1 Bisphénol A

Les pourcentages moyens de fixation du BPA aux protéines plasmatiques mesurés sur la gamme de concentrations de 2,5 à 50 nM, correspondant aux concentrations maximales de BPA décrites chez l'Homme, sont présentés dans la figure 11 ci-dessous. Le calcul des moyennes sur l'ensemble de cette gamme a été rendu possible par le fait que nous avons montré dans la partie précédente que le pourcentage de fixation ne variait pas pour de faibles concentrations (figure 7).

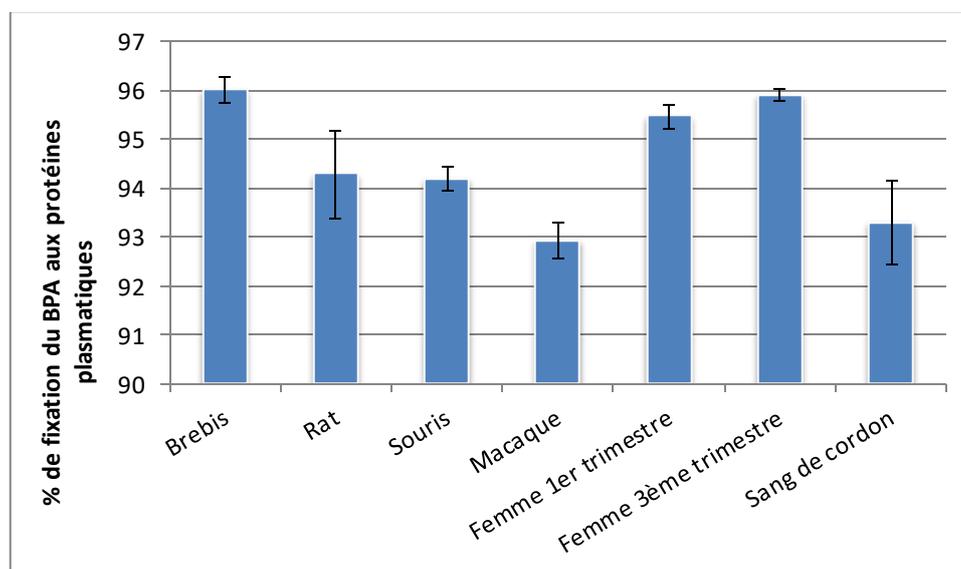


Figure 11 : Comparaison interspécifique du pourcentage de fixation du BPA aux protéines plasmatiques. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes des 2 réplicats pour chaque concentration de 2,5 à 50 nM avec l'écart-type associé.

Les pourcentages de fixation moyens sont de 96,0 % \pm 0,3 % pour la brebis. Cette valeur est légèrement supérieure aux données de la littérature, où la fraction liée de BPA était estimée à 94 % (Corbel et al. 2013).

Concernant le rat et la souris, les valeurs moyennes respectives de 94,3 % ($\pm 0,9$) et 94,2 % ($\pm 0,2$) suggèrent qu'il n'y a pas de différence entre ces 2 espèces, conformément aux données de la littérature (Teeguarden 2005).

Le pourcentage de fixation chez le macaque est lui un peu inférieur à celui des autres espèces avec une moyenne de 92,9 % ($\pm 0,4$).

Concernant la femme enceinte, il ne semble pas y avoir de différence entre le 1^{er} et le 3^{ème} trimestre de grossesse, avec un pourcentage de fixation moyen de 95,7 % ($\pm 0,2$).

On note cependant une nette différence entre le sang de femme enceinte à différents stades de grossesse et le sang de cordon, pour lequel la fixation du BPA est plus faible (93,3 % $\pm 0,8$).

3.2.2 Bisphénol S

Les pourcentages moyens de fixation du BPS aux protéines plasmatiques en fonction des espèces, mesurés sur la gamme de concentrations en BPS de 2,5 à 50 nM, sont présentés dans la figure 12 ci-dessous. Tout comme pour le BPA, le calcul des moyennes est utilisable puisque pour les faibles concentrations, le pourcentage de fixation n'est pas influencé par la concentration en BPS (figure 9).

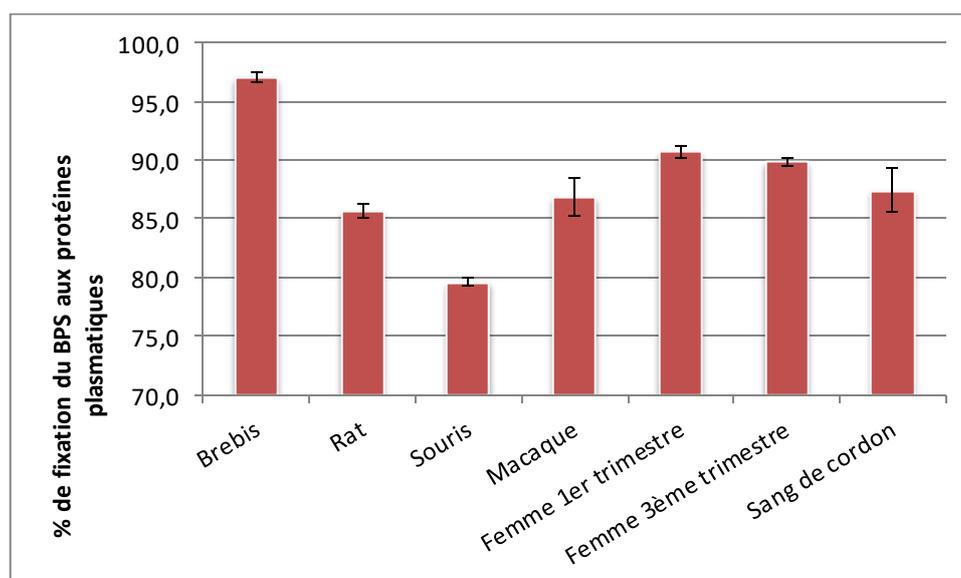


Figure 12 : Comparaison interspécifique du pourcentage de fixation du BPS aux protéines plasmatiques. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes des 2 réplicats pour chaque concentration de 2,5 à 50 nM, avec l'écart-type associé.

C'est chez la brebis que l'on trouve le pourcentage de fixation du BPS le plus élevé, avec une moyenne de 97,0 % ($\pm 0,4$).

Les pourcentages de fixation les plus faibles sont observés chez la souris, avec une moyenne de 79,6 % ($\pm 0,4$) et le rat (85,6 % $\pm 0,6$).

Contrairement au BPA, nous n'avons pas observé de différence de fixation entre la femme enceinte au 1^{er} et 3^{ème} trimestre de grossesse et le sang de cordon : les moyennes sont respectivement de 90,7 % ($\pm 0,5$), 89,9 % ($\pm 0,3$) et 87,5 % ($\pm 1,8$).

3.2.3 Comparaison des pourcentages de fixation entre le bisphénol A et le bisphénol S

Comme on peut le voir à l'aide de la figure 13, seule la brebis ne présente pas de différence majeure de fixation entre le BPA et le BPS. Pour les autres espèces, la fixation aux protéines plasmatiques du BPS est significativement plus faible que celle du BPA. On peut citer par exemple le cas de la souris, avec un pourcentage de liaison du BPA de 94,2 % contre 79,6 % pour le BPS, soit une différence de 15,5 %.

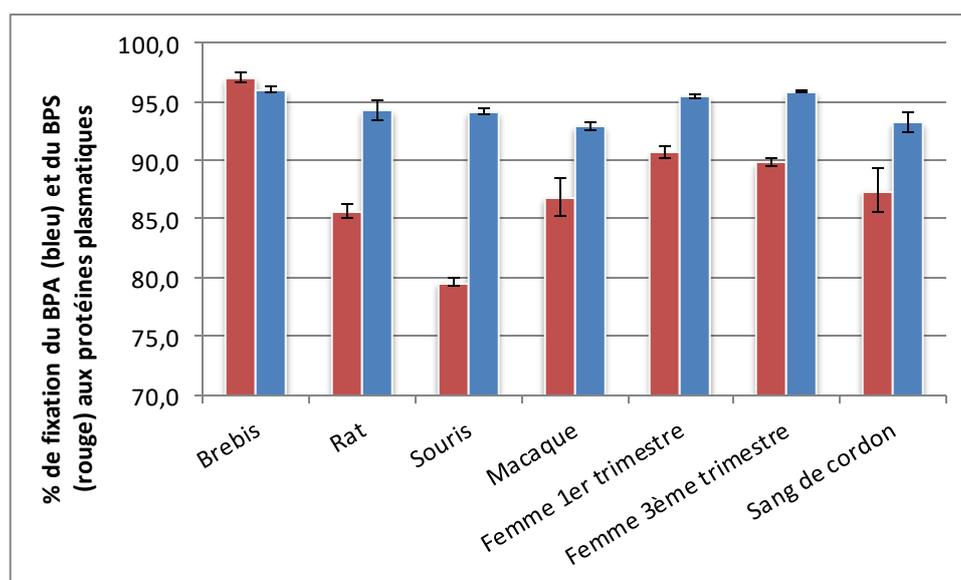


Figure 13 : Comparaison interspécifique du pourcentage de fixation du BPA (en bleu) et du BPS (en rouge) aux protéines plasmatiques.

Le pourcentage de BPS libre circulant est donc 2 à 3 fois plus important que le pourcentage de BPA libre pour 4 des 5 espèces étudiées.

3.3 Estimation des paramètres de liaison aux protéines plasmatiques

Nous avons déterminé comme expliqué précédemment les paramètres de liaison du BPA et du BPS aux protéines plasmatiques. Etant donné que nous n'avons pas pu mettre en évidence la liaison spécifique pour les faibles concentrations, la régression non linéaire a donc été réalisée sur l'équation (4) simplifiée.

$$B = \frac{B_{\max 2} \times F}{K_d 2 + F}$$

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 7 et 8 ci-dessous.

Espèce	Bmax (µM)	Intervalle de confiance 95 %	Kd (µM)	Intervalle de confiance 95 %
Brebis	1811	1006-2616	81	43-119
Rat	3692	73-7310	222	0-446
Souris	4799	2940-6658	301	181-420
Singe	11188	0-24310	887	0-1825
Femme 1^{er} trimestre	10150	0-20420	478	0-968
Femme 2^{eme} trimestre	8425	4500-12350	357	188-526
Sang de cordon	10560	0-28480	733	0-1995

Tableau 7 : Paramètres de liaison du BPA aux protéines plasmatiques.

Espèce	Bmax (µM)	Intervalle de confiance 95 %	Kd (µM)	Intervalle de confiance 95 %
Brebis	1044	846-1241	31	25-38
Rat	1108	896-1319	184	147-222
Souris	1940	1477-2404	507	381-633
Singe	860	560-1161	131	81-181
Femme 1^{er} trimestre	1338	1101-1574	138	112-164
Femme 2^{eme} trimestre	1332	1198-1466	151	135-167
Sang de cordon	1399	595-2203	207	78-336

Tableau 8 : Paramètres de liaison du BPS aux protéines plasmatiques.

Concernant le BPA, il apparaît clairement que les valeurs obtenues sont difficilement interprétables. En effet, les intervalles de confiance, que ce soit pour le K_d ou pour le B_{max} , sont très larges et ne nous permettent pas de comparer les valeurs obtenues.

Cette variabilité dans les valeurs obtenues s'explique probablement par les valeurs très élevées des capacités maximales de fixation du BPA à l'albumine. En effet, les concentrations maximales en BPA utilisées étaient de 1000 μM . Or, ici, les valeurs de B_{max} estimées sont très largement supérieures à 1000 μM , ce qui signifie que les valeurs de B_{max} ont été extrapolées au-delà de notre gamme de concentrations, d'où l'incertitude de notre estimation.

Pour évaluer correctement le B_{max} , il faudrait augmenter notre gamme de concentrations, afin que les B_{max} obtenus se trouvent à l'intérieur de cette gamme. Cela n'est malheureusement pas réalisable puisque la concentration de 1000 μM correspond à la limite de solubilité du BPA : il n'est donc pas possible de dépasser cette concentration.

Nous avons montré précédemment, dans le 3.2.1, que concernant le BPA, le pourcentage de fixation était plus faible dans le sang de cordon que chez la femme enceinte. Cependant, l'imprécision des résultats obtenus pour le BPA ne nous permet pas de déterminer si cette différence est due à un B_{max} plus faible ou à un K_d plus élevé.

L'alternative que nous avons choisie est d'utiliser du plasma dilué, afin d'abaisser suffisamment le B_{max} pour qu'il soit environ dix fois inférieur à la concentration maximale en BPA de la gamme. Nous avons donc réalisé un essai préliminaire sur du plasma dilué de brebis afin de valider cette méthode (cf 2.5.4).

Concernant le BPS, l'extrapolation des données est possible puisque les valeurs de B_{max} sont proches de 1000 μM , correspondant à la concentration maximale de BPS utilisée. De ce fait, les intervalles de confiance sont réduits et les valeurs interprétables.

La souris présente la constante de dissociation du BPS la plus élevée, avec une valeur de 507 μM (381-633), valeur qui est en moyenne trois fois supérieure aux valeurs mesurées chez la brebis, le rat, le singe et l'Homme. Cela est tout à fait cohérent avec les données mises en évidence précédemment, où nous avons pu

montrer que le pourcentage de fixation du BPS chez la souris était particulièrement bas.

C'est chez la brebis que l'on trouve la constante de dissociation la plus faible, avec un K_d de 31 μM (25-38), ce qui est là encore cohérent avec le fort taux de fixation du BPS que nous avons observé.

Chez la femme, le trimestre de la grossesse ne semble pas avoir d'influence sur l'affinité du BPS ou sur la capacité maximale de fixation.

3.4 Validation de la méthode par dilution du plasma

Comme expliqué précédemment, nous avons tout d'abord évalué les valeurs de Bmax et de Kd par régression non linéaire, avec du plasma de brebis dilué au 100^{ème} en utilisant la gamme de concentrations habituelle. Les valeurs de Bmax et de Kd ont été estimées à 54 μM et 221 μM , ce qui correspond donc à un Bmax de 5400 μM pour du plasma non dilué et un Kd inchangé de 221 μM . En utilisant ces valeurs, nous avons estimé les pourcentages de fixation du BPA pour les dilutions au 80^{ème}, 60^{ème}, 40^{ème}, 20^{ème} et le plasma non dilué. Le tableau 9 ci-dessous indique les valeurs des pourcentages de fixation mesurés et prédits pour une concentration donnée de 1,5 μM .

Dilution	% de fixation mesuré	% de fixation prédit
0	95,3	96,0
20	62,0	54,9
40	49,9	37,8
60	37,8	28,9
80	29,7	23,3
100	24,5	19,5

Tableau 9 : Comparaison des pourcentages de fixation mesurés et prédits avec la dilution des plasmas.

Afin de voir si les valeurs prédites et mesurées étaient significativement différentes, nous avons analysé par régression linéaire la relation entre le pourcentage de BPA prédit en fonction du pourcentage de BPA mesuré pour la concentration de 1,5 μM (figure 14).

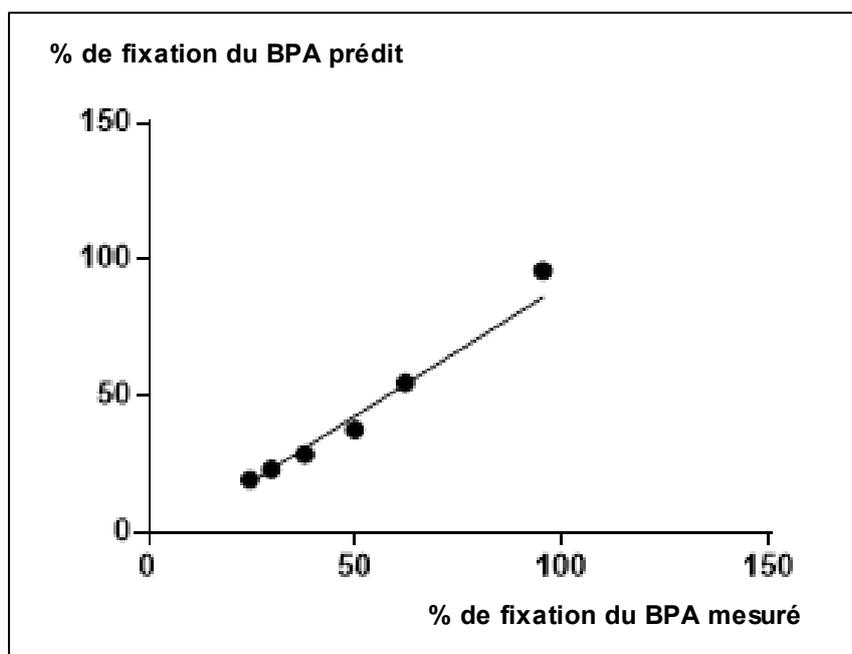


Figure 14 : Relation entre le pourcentage de fixation du BPA prédit et le pourcentage de BPA mesuré (représentation par régression linéaire).

L'équation de la droite obtenue est $Y = 0,96X - 5,172$, avec un intervalle de confiance à 95 % pour la pente qui est de $[0,732-1,197]$ et un intervalle de confiance pour l'ordonnée à l'origine de $[-13,65 - 3,30]$.

L'intervalle de confiance de la pente contient la valeur 1. De ce fait, nous pouvons en conclure que la pente n'est pas significativement différente de 1. De même, l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine contient 0, donc cette ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0.

En conséquence, les pourcentages de fixation prédits ne diffèrent pas de ceux évalués expérimentalement après dilution des plasmas.

Cela nous permet donc de valider le modèle de dilution que nous avons élaboré, et ainsi de conclure que le K_d n'est pas influencé par la dilution du plasma. Cette technique de dilution pourrait donc être utilisée dans le cadre de notre étude afin de déterminer les paramètres de liaison du BPA chez les autres espèces.

3.5 Détermination de la fixation à la transthyrétine et l'albumine

Nous avons saturé la TTR en utilisant de la T4 afin de pouvoir déterminer la fixation à chaque protéine plasmatique.

Un premier essai préliminaire a été réalisé sur du plasma de brebis. Les mesures ont été réalisées en simple, sur notre gamme de concentrations habituelle, avec et sans ajout de T4 afin de saturer la TTR. Les résultats de cet essai sont présentés dans le tableau 10.

% libre N	% libre T	% albumine T	%TTR N	% albumine N
3,5	3,5	96,5	0,01	96,5
4,6	4,9	95,1	5,91	89,5
4,7	5,1	94,9	7,59	87,7
4,6	4,5	95,5	0	96,7
4,6	4,7	95,3	3,23	92,2
4,8	4,8	95,2	0	95,3
4,9	4,8	95,2	0	97,3
4,8	5,0	95,0	4,66	90,5
5,1	5,2	94,8	3,33	91,6
5,8	6,2	93,8	7,75	86,5

Tableau 10 : Calcul des pourcentages de fixation à la TTR et à l'albumine sur du plasma de brebis dans le plasma natif (N) et traité à la T4 (T).

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure. En effet, on note une trop grande variabilité pour les pourcentages de fixation estimés à la TTR. De ce fait, au vu des résultats peu probants, l'expérience n'a pas été répétée chez les autres espèces.

4) DISCUSSION

4.1 Différences entre bisphénol A et bisphénol S

Conformément aux données de la littérature (Corbel et al. 2013, Kurebayashi 2012), la fraction libre en BPA varie entre 4 et 7 % selon les espèces. Notre étude nous a permis de mettre en évidence une différence majeure concernant la liaison aux protéines plasmatiques entre le BPA et le BPS, avec une fraction libre de BPS 2 à 3 fois plus importante que celle du BPA. Ces différences de fixation entre BPA et BPS peuvent s'expliquer soit par une capacité maximale de fixation plus faible, soit par une constante de dissociation plus élevée pour le BPS. Les résultats que nous avons obtenus lors de l'évaluation des paramètres de liaison suggèrent une modification de ces 2 paramètres.

La mise en évidence d'une fraction libre plus importante du BPS devrait à l'avenir être prise en compte dans l'évaluation du risque lié à l'exposition au BPS, puisque les concentrations plasmatiques en BPS libre, et donc actif, sont 2 à 3 fois supérieures à celle du BPA pour un même niveau de concentration.

4.2 Comparaison interspécifique

L'étude des pourcentages de fixation chez les différentes espèces peut être utilisée afin d'évaluer la pertinence des modèles utilisés dans le cadre d'une extrapolation interspécifique. Ainsi, concernant le BPA, la brebis semble être l'espèce modèle présentant le plus de similitudes en termes de pourcentage de fixation avec l'Homme.

Pour le BPS, il semblerait à l'inverse que ce soient le macaque et le rat qui présentent le plus de similitudes avec l'Homme. Pour le modèle souris, le pourcentage de BPS libre élevé (20,4 %) doit être pris en compte pour l'extrapolation des données à l'Homme.

4.3 Paramètres de liaison et contribution des autres protéines

Les valeurs de Bmax obtenues dans notre étude pour le BPA et le BPS sont très élevées. Sachant que la concentration plasmatique en albumine chez l'Homme est de 580 μM , et que les valeurs de Bmax obtenues étaient toutes supérieures voire très largement supérieures à 1000 μM (estimées à 5400 μM chez la brebis), on peut supposer que l'albumine possède plusieurs sites de fixation pour le BPA (10) et le BPS (2 à 3).

L'étude de l'évolution des concentrations libres en fonction des concentrations liées ne nous a pas permis de mettre en évidence de liaison spécifique et saturable du BPA et du BPS. Nous ne pouvons cependant pas rejeter l'hypothèse de l'existence de ce type de liaison, puisqu'il est fort probable que la très forte capacité de fixation du BPA et du BPS de l'albumine ait masqué une liaison de haute affinité à une protéine plasmatique.

Les résultats obtenus nous confirment cependant clairement la prépondérance de l'albumine en tant que protéine de liaison du BPA.

4.4 Particularité de la grossesse

L'étude du pourcentage de fixation du BPA nous a permis de mettre en évidence une différence entre le sang de femme enceinte au 1^{er} et 3^{ème} trimestre de grossesse et le sang de cordon, où l'on trouve une valeur de fixation plus faible à 93,3 % ($\pm 0,8$) contre 95,7 % ($\pm 0,2$) pour la mère. Ces différences pourraient être expliquées par des modifications de l'affinité, mais également des concentrations de l'albumine fœtale (Hill et Abramson 1988 ; Rane et al. 1971).

Cette fraction libre plus élevée du BPA dans le sang fœtal pourrait être à l'origine d'une sensibilité accrue du fœtus vis-à-vis du BPA, qui serait donc exposé à des concentrations en BPA libre environ 2 fois plus élevées que celle de l'adulte pour un même niveau de concentration plasmatique.

Contrairement au BPA, nous n'avons pas observé pour le BPS de différence de fixation significative entre la femme enceinte au 1^{er} et 3^{ème} trimestre de grossesse et le sang de cordon, que ce soient pour les pourcentages de fixation ou pour les

valeurs de Bmax et Kd, ce qui souligne l'existence de différences de distribution plasmatique du BPA et du BPS dans le sang fœtal.

4.5 Amélioration du protocole d'étude

Le principal problème auquel nous avons été confrontés lors de cette étude est l'imprécision de nos mesures.

La détermination des Bmax et Kd pour le BPA s'est heurtée à une difficulté méthodologique liée au fait que les valeurs de Bmax étaient supérieures à la concentration maximale de BPA dans le plasma, ce qui a nécessité l'extrapolation des données à l'origine d'imprécisions. La technique de dilution des plasmas, que nous avons pu valider au cours de cette étude, semble être une alternative judicieuse pour remédier à cette difficulté. Il conviendrait donc de reproduire l'ensemble des mesures du BPA en utilisant un plasma dilué au 100^{ème}, afin de déterminer plus précisément les valeurs de Bmax et de Kd. De plus, le fait de travailler sur des plasmas dilués nous permettrait d'en utiliser en quantités moindres, mais également de pouvoir réaliser ces mesures sur du plasma de rongeurs nouveaux nés.

Cette approche n'a pas permis la détermination précise des pourcentages de liaison et des paramètres de liaison aux protéines spécifiques telle que la TTR. Nos résultats suggèrent que si la TTR lie le BPA, cette liaison contribue à moins de 10 % de la liaison du BPA aux protéines plasmatiques. En effet, la précision de nos mesures est en moyenne de 0,45 %, ce qui ne nous permet pas d'évaluer une fixation spécifique si elle n'a pas une contribution supérieure à 10 % à la liaison du BPA.

Une autre alternative à la saturation des protéines spécifiques par les ligands pourrait être le chauffage du plasma. Dans ces conditions, toutes les liaisons thermolabiles sont inactivées, et seule la liaison à l'albumine persiste. Cette méthode permettrait, en utilisant les mêmes calculs que ceux effectués avec saturation par la T4, de déterminer l'importance de la fixation spécifique aux protéines plasmatiques autres que l'albumine.

4.6 Concentrations tissulaires et limites des études in vitro

L'étude que nous avons menée avait pour but de déterminer les fractions libres en BPA et BPS plasmatiques, qui sont nécessaires pour prédire l'exposition à la forme active de ces 2 composés, mais également pour extrapoler les résultats obtenus dans des modèles cellulaires ou des modèles d'explants qui n'utilisent pas ou peu de protéines dans le milieu de culture. En l'absence de protéines, les concentrations qui produisent des effets *in vitro* doivent être comparées aux concentrations plasmatiques de la forme libre du BPA ou du BPS.

En effet, il est généralement considéré que les concentrations de la forme libre d'une substance dans le plasma sont équivalentes aux concentrations intracellulaires de la substance libre et active.

Il est cependant important de prendre en compte le fait que les concentrations libres dans le plasma ne sont pas toujours égales aux concentrations libres tissulaires, particulièrement pour les substances fortement liées aux protéines ou ionisées. Ces variations peuvent être expliquées par l'existence d'un gradient de pH entre les cellules et le plasma qui, selon l'ionisation de la substance en présence, influencerait les concentrations intracellulaires. L'autre hypothèse serait l'existence d'un processus qui faciliterait l'interaction de la fraction liée extracellulaire avec la surface cellulaire et la dissociation avec les protéines de liaison. La prise en charge par les cellules se ferait donc à partir de la fraction libre, et selon un gradient de pH, mais également selon un processus médié par les protéines de liaison. Un tel processus de prise en charge par l'albumine a été ainsi mis en évidence dans les hépatocytes et les cardiomyocytes (Poulin et al. 2016).

Il semble donc nécessaire d'adapter les modèles pharmacocinétiques actuels en tenant compte non seulement de la concentration plasmatique libre en BPA, mais également de ce processus de prise en charge cellulaire médié par les protéines de liaison.

L'existence d'un tel mécanisme met également en évidence les limites des modèles *in vitro*, les protéines de liaison étant souvent présentes dans des concentrations différentes des conditions *in vivo*.

CONCLUSION

L'étude que nous avons réalisée nous a permis de mettre en lumière plusieurs particularités concernant la fixation du BPA et du BPS aux protéines plasmatiques.

Concernant le BPA, les fractions libres obtenues sont relativement conformes aux données de la littérature, et varient entre 4 et 7 %.

Un des points majeurs de notre étude est que la fraction libre en BPS se révèle par contre être 2 à 3 fois plus importante que celle du BPA pour 4 des 5 espèces considérées. Une telle variation de la fraction libre pourrait avoir des conséquences directes sur la toxicité du BPS, et nécessite de ce fait des investigations plus poussées. De plus, les fortes disparités interspécifiques concernant le pourcentage de fixation du BPS doivent être prises en compte pour l'extrapolation des données toxicologiques de modèles animaux à l'Homme.

La détermination des paramètres de liaison du BPA avec l'albumine a été limitée par la concentration maximale de BPA obtenue dans le tampon de dialyse. Cependant, la technique de dilution des plasmas semble pouvoir résoudre ce problème. L'étude de la liaison du BPA avec du plasma dilué nous permettra probablement de déterminer les paramètres de liaison du BPA aux protéines plasmatiques.

En dépit de ces incertitudes, nos résultats ont cependant pu confirmer que le BPA se liait majoritairement avec l'albumine avec une capacité maximale de fixation très élevée. La contribution de la TTR à la liaison du BPA n'a pas pu être évaluée. Nos résultats nous permettent seulement d'estimer qu'elle représente moins de 10 % de la liaison du BPA aux protéines plasmatiques.

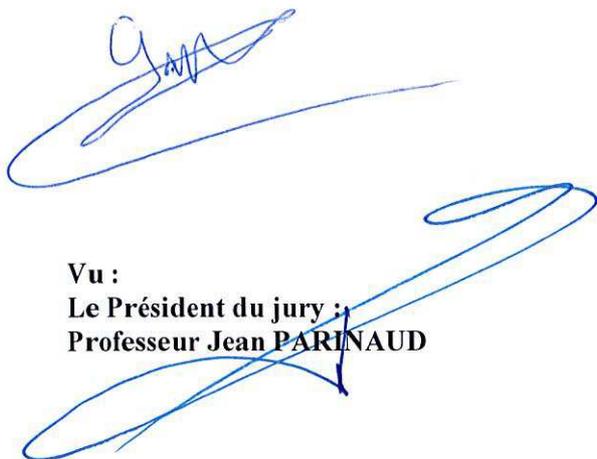
Les résultats préliminaires de cette étude concernant le BPA sont en adéquation avec la littérature. Toutefois, il est primordial pour le BPS d'approfondir l'étude de sa liaison aux protéines plasmatiques afin d'évaluer le risque lié à son exposition, risque qui pourrait être accru par des fractions libres en BPS bien supérieures à celles du BPA.

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 **CARME Lucie** intitulée «**Variations interspécifiques de la liaison du bisphénol A et du bisphénol S aux protéines plasmatiques.**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 28 juillet 2016
Professeure Véronique GAYRARD
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jean PARINAUD

Melle CARME Lucie
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 203/06/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

BIBLIOGRAPHIE

ANSES (2011a) Dossier de presse : effets sanitaires et usages du Bisphénol A. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/content/bisph%C3%A9nol> [consulté le 23 septembre 2015].

ANSES (2011b) Rapport d'expertise collective : Effets sanitaires du Bisphénol A. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM-Ra-BisphenolA.pdf> [consulté le 30 septembre 2015].

ANSES (2013a) Evaluation des risques du bisphénol A(BPA) pour la santé humaine. Tome 1. Rapport d'expertise collective. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0.pdf> [consulté le 12 octobre 2015].

ANSES (2013b) Dossier de presse : Evaluation des risques sanitaires du bisphénol A. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/system/files/PRES2013CPA09.pdf> [consulté le 12 octobre 2015].

ASCHBERGER K, CASTELLO P, HOEKSTRA E et INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION (2010). Bisphenol A and baby bottles challenges and perspectives. [en ligne]. Luxembourg : Publications Office. [Consulté le 24 juillet 2016]. Disponible à l'adresse : <http://dx.publications.europa.eu/10.2788/97553>.

BAKER M E (2002). Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *The Journal of Endocrinology*. Vol. 175, n° 1, pp. 121-127.

BAKKER J, HAKKERT B C, HESSEL E.V.S., LUIT R.J., PIERSMA A.H., SIJM DTHM, RIETVELD A.G., VAN BROEKHUIZEN F.A., VAN LOVEREN H et VERHOEVEN JK (2016). Bisphenol A: Part 2. Recommendations for risk management. *RIVM rapport 2015-0192* [en ligne]. 2016. [Consulté le 23 septembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://rivm.openrepository.com/rivm/handle/10029/600660>.

BARINI A, LIBERALE I et MENINI E (1993). Simultaneous determination of free testosterone and testosterone bound to non-sex-hormone-binding globulin by equilibrium dialysis. *Clinical chemistry*. Vol. 39, n° 6, pp. 936-941.

BENDRIDI N, MAPPUS E, GRENOT C, LEJEUNE H, YVES CUILLERON C et PUGEAT M (2002). Intravenous injection of human sex steroid hormone-binding globulin in mouse decreases blood clearance rate and testicular accumulation of orally administered [2-125I]iodobisphenol A. *Steroids*. Vol. 67, n° 7, pp. 637-645.

CAO J, GUO L-H, WAN B et WEI Y (2011). In vitro fluorescence displacement investigation of thyroxine transport disruption by bisphenol A. *Journal of Environmental Sciences (China)*. Vol. 23, n° 2, pp. 315-321.

COLLET S, PICARD-HAGEN N, LACROIX M Z, PUEL S, VIGUIÉ C, BOUSQUET-MELOU A, TOUTAIN P-L et GAYRARD V (2015). Allometric scaling for predicting

human clearance of bisphenol A. *Toxicology and Applied Pharmacology*. mai 2015. Vol. 284, n° 3, pp. 323-329.

CORBEL T, GAYRARD V, VIGUIE C, PUEL S, LACROIX M Z, TOUTAIN P-L et PICARD-HAGEN N (2013). Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure. *Biology of Reproduction*. 18 juillet 2013. Vol. 89, n° 1, pp. 11-11.

CORBEL T (2013). *Mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition foetale au Bisphénol A* [en ligne]. Thèse pour l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse, INSA. [Consulté le 05 mai 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.theses.fr/2013ISAT0034>.

CSANADY G, OBERSTE-FRIELINGHAUS H, SEMDER B, BAUR C, SSSCHNEIDER K et FILSER J (2002). Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Archives of Toxicology*. Vol. 76, n° 5-6, pp. 299-305.

DOERGE DR et FISHER JW (2010). Background paper on metabolism and toxicokinetics of bisphenol A. dans : *Proceedings of the WHO/HSE/FOS/11.1 Expert Meeting on Bisphenol A (BPA'10)*.

DOERGE DR, TWADDLE NC, VANLANDINGHAM M, BROWN RP et FISHER JW (2011). Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 255, n° 3, pp. 261-270.

EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES, FLAVOURINGS AND PROCESSING AIDS (CEF) (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Opinion on BPA. *EFSA Journal*. Vol. 13, n° 1, pp. 3978.

FALCY, JARGOT D, LA ROCCA B, MIRAVAL S, PILLIÈRE F, ROBERT S, SIMONNARD A (2013). Bisphénol A (FT 279) - Fiche toxicologique - INRS. www.inrs.fr/fichetox [en ligne]. 2013. [Consulté le 27 juin 2016]. Disponible à l'adresse : http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_279.

GANONG WF et JOBIN M (2005). *Physiologie médicale*. Bruxelles : De Boeck. p303.

GAUDERAT G, PICARD-HAGEN N, TOUTAIN P-L, CORBEL T, VIGUIÉ C, PUEL S, LACROIX MZ, MINDEGUIA P, BOUSQUET-MELOU A et GAYRARD V (2016). Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environment International*. Vol. 86, pp. 52-59.

GAYRARD V, LACROIX MZ, COLLET SH, VIGUIÉ C, BOUSQUET-MELOU A, TOUTAIN P-L et PICARD-HAGEN N (2013). High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 121, n° 8, pp. 951-956.

GEENS T, ROOSENS L, NEELS H et COVACI A (2009). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*. Vol. 76, n° 6, pp. 755-760.

GINSBERG G et RICE DC (2009). Does Rapid Metabolism Ensure Negligible Risk from Bisphenol A? *Environmental Health Perspectives*. Vol. 117, n° 11, pp. 1639-1643.

HAMMOND GL (2011). Diverse Roles for Sex Hormone-Binding Globulin in Reproduction. *Biology of Reproduction*. Vol. 85, n° 3, pp. 431-441.

HILL MD et ABRAMSON FP (1988). The significance of plasma protein binding on the fetal/maternal distribution of drugs at steady-state. *Clinical Pharmacokinetics*. Vol. 14, n° 3, pp. 156-170.

INERIS Information réglementaire : Substitution BPA. [en ligne]. [Consulté le 29 juin 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.ineris.fr/substitution-bpa/fr/information-reglementaire>.

ISHIHARA A, NISHIYAMA N, SUGIYAMA S-I et YAMAUCHI K (2003). The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 134, n° 1, pp. 36-43.

KADDAR N, HARTHÉ C, DÉCHAUD H, MAPPUS E et PUGEAT M (2008). Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Part A. Vol. 71, n° 8, pp. 471-473.

KASSEM NA, DEANE R, SEGAL MB et PRESTON JE (2006). Role of transthyretin in thyroxine transfer from cerebrospinal fluid to brain and choroid plexus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. Vol. 291, n° 5, pp. R1310-1315.

KUREBAYASHI H (2002). Disposition of a Low Dose of Bisphenol A in Male and Female Cynomolgus Monkeys. *Toxicological Sciences*. Vol. 68, n° 1, pp. 32-42.

KURUTO-NIWA R, NOZAWA R, MIYAKOSHI T, SHIOZAWA T et TERAO Y (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. janvier 2005. Vol. 19, n° 1, pp. 121-130.

MAZUR CS, KENNEKE JF, HESS-WILSON JK. et LIPSCOMB JC (2010). Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. Vol. 38, n° 12, pp. 2232-2238.

MILLIGAN SR, KHAN O et NASH M (1998). Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 112, n° 1, pp. 89-95.

MORRISSEY RE, GEORGE JD, PRICE CJ, TYL RW, MARR MC et KIMMEL CA (1987). The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*. Vol. 8, n° 4, pp. 571-582.

POULIN P, BURCZYNSKI FJ et HADDAD S (2016). The Role of Extracellular Binding Proteins in the Cellular Uptake of Drugs : Impact on Quantitative In Vitro-to-In Vivo Extrapolations of Toxicity and Efficacy in Physiologically Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Research. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 105, n° 2, pp. 497-508.

RANE A, LUNDE PK., JALLING B, YAFFE SJ et SJÖQVIST F (1971). Plasma protein binding of diphenylhydantoin in normal and hyperbilirubinemic infants. *The Journal of Pediatrics*. Vol. 78, n° 5, pp. 877-882.

SCHÖNFELDER G, WITTFOHT W, HOPP H, TALSNESS CE, PAUL M et CHAHOUD I (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 110, n° 11, pp. A703-707.

SIITERI PK, MURAI JT, HAMMOND GL, NISKER JA, RAYMOURE WJ et KUHN R W (1982). The serum transport of steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research*. 1982. Vol. 38, pp. 457-510.

TEEGUARDEN JG (2005). Evaluation of Oral and Intravenous Route Pharmacokinetics, Plasma Protein Binding, and Uterine Tissue Dose Metrics of Bisphenol A: A Physiologically Based Pharmacokinetic Approach. *Toxicological Sciences*. Vol. 85, n° 2, pp. 823-838.

VANDENBERG LN, CHAHOUD I, HEINDEL JJ, PADMANABHAN V, PAUMGARTTEN FJR et SCHOENFELDER G (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* Vol. 118, n° 8, pp. 1055-1070.

VÖLKEL W, COLNOT T, CSANÁDY G, FILSER JG et DEKANT W (2002). Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 15, n° 10, pp. 1281-1287.

VOM SAAL FS, COOKE PS, BUCHANAN DL, PALANZA P, THAYER KA, NAGEL S C, PARMIGIANI S et WELSHONS WV (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and Industrial Health*. Vol. 14, n° 1-2, pp. 239-260.

WORLD HEALTH ORGANISATION (2011). WHO | Toxicological and health aspects of bisphenol A. Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting. [en ligne]. 2011. [Consulté le 25 août 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.who.int/foodsafety/publications/bisphenol-a/en/>.

ZALKO D, JACQUES C, DUPLAN H, BRUEL S et PERDU E (2011). Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*. Vol. 82, n° 3, pp. 424-430.

ANNEXE : Procédure expérimentale de dialyse à l'équilibre

- Allumer le bain marie
- Mettre les membranes dans l'eau distillée pendant 30 minutes, puis dans le tampon de dialyse pendant 30 minutes
- Placer la membrane sur la petite demi-cellule de dialyse, puis adapter la deuxième demi-cellule (orifices face à face)
- Empiler les cellules sur le support (orifices en face, demi-cellule large en bas)
- Obturer les orifices de sortie
- Distribuer 0,9 mL de la solution de surcharge (orifice supérieur de la grande demi-cellule)
- Distribuer 0,9 mL de plasma dans l'autre demi-cellule
- Refermer les orifices en diagonale
- Placer dans le bain marie à 37°C en rotation
- Temps de dialyse : 1 heure
- Récupérer les fractions de dialysat et de plasma
- Mettre les cellules dans un bain décontaminant (1 heure)
- Essuyer les supports des cellules

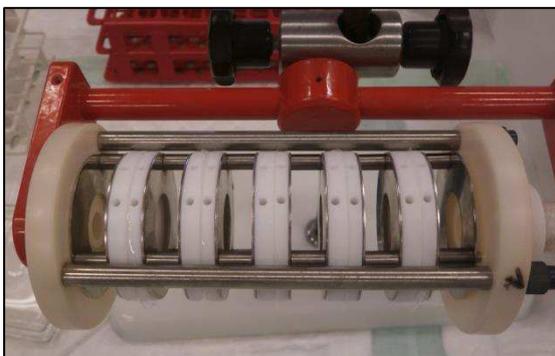


Figure 15 : Système de dialyse à l'équilibre.

NOM : CARME

PRENOM : Lucie

TITRE : Variations interspécifiques de la liaison du bisphénol A et du bisphénol S aux protéines plasmatiques

Le bisphénol A (BPA) est un perturbateur endocrinien présent dans les plastiques de nombreux objets de la vie courante et qui est de plus en plus fréquemment remplacé par le bisphénol S (BPS).

Cette étude avait pour but de déterminer la fraction libre et donc active de BPA et de BPS dans le plasma, ainsi que les paramètres qui caractérisent la liaison aux protéines plasmatiques : la capacité maximale de fixation et la constante de dissociation à l'équilibre.

Cette étude a été menée chez la femme à 2 stades de grossesse, ainsi que chez les espèces modèles utilisées lors des études toxicologiques : rat, souris, macaque et brebis.

La fraction libre en BPA varie selon les espèces entre 4 et 7 %, avec une capacité maximale de fixation très élevée, et une liaison majoritaire à l'albumine. Concernant le BPS, les fractions libres sont 2 à 3 fois plus élevées pour 4 espèces. Ces différences doivent être prises en compte dans le cadre des extrapolations in vitro-in vivo et interspécifiques.

MOTS-CLES : bisphénol A, bisphénol S, fixation aux protéines plasmatiques, fraction libre, constante de dissociation, capacité maximale de fixation

TITLE: Interspecies variations in binding of bisphenol A and bisphenol S plasma protein

Bisphenol A is an endocrine disruptor contained in everyday plastics products, which is more and more replaced by bisphenol S (BPS).

The purpose of this study was to determine the unbound active fraction of BPA and BPS in plasma, and to evaluate the maximal binding capacity and the equilibrium dissociation constant. This study was conducted on women, at two stages of pregnancy, but also on model species commonly used in toxicology studies, such as rat, mouse, macaque and ewe.

The unbound fraction of BPA varies between 4 and 7 % depending on the species, with a very high binding capacity. The main part of BPA is bound to albumin. Concerning BPS, unbound fractions are two or three times higher for 4 studied species. These differences should be taken into account for in vivo-in vitro and interspecies extrapolations.

KEYWORDS : bisphenol A, bisphenol S, plasma protein binding, unbound fraction, dissociation constant, maximal binding capacity