

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Tanguy CORBEL

le : lundi 9 décembre 2013

Titre :

Mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition foetale
au Bisphénol A

JURY

Madame le Docteur Pascale Chavatte-Palmer
Monsieur le Docteur Claude Emond
Monsieur le Professeur Pierre-Louis Toutain
Madame le Professeur Nicole Picard-Hagen

Monsieur le Professeur René Habert
Monsieur le Professeur Frederick S. vom Saal
Madame le Docteur Marlène Lacroix
Madame le Professeur Véronique Gayrard

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

UMR 1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology INRA/INP/UPS

Directeur(s) de Thèse :

Madame le Professeur Nicole PICARD-HAGEN
Madame le Professeur Véronique GAYRARD

Rapporteurs :

Madame le Docteur Pascale CHAVATTE-PALMER
Monsieur le Professeur René HABERT

A Madame Pascale Chavatte-Palmer et Monsieur René Habert qui ont accepté de consacrer de leur temps à la lecture et l'appréciation de ce manuscrit. A Monsieur Claude Emond, Monsieur Frederick vom Saal, Madame Marlène Lacroix et Monsieur Pierre-Louis Toutain qui ont accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineur.

A Nicole Picard-Hagen et Véronique Gayrard pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Je les remercie pour leur dynamisme, leur disponibilité, leur investissement dans ce projet et leur soutien indéfectible. Les manip s'enchaînent, les souvenirs s'accumulent autour d'une brebis, autour d'une table d'opération, autour d'un placenta (oh il est beau celui-là aujourd'hui) ou simplement autour d'un café. Qu'elles trouvent à travers ces quelques mots mes plus sincères remerciements.

A Mr Alain Bousquet-Melou qui m'ont accueilli au sein du laboratoire, plus tout à fait l'UMR 181, à peine l'UMR 1331.

A Mr Pierre-Louis Toutain pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son dynamisme.

A Catherine Viguié, notre chef d'équipe. Faire partie de l'équipe « Pesticides, Perturbateurs Endocriniens » c'est un peu faire partie d'une famille avec ses bons et moins bons (ils sont rares !) moments. Je la remercie pour ses conseils pertinents, ses remarques constructives, ses relectures toujours très justes et ses « élagages » d'abstract (250 mots, pas un de plus).

A Sophie Gil et Daniel Zalko, qui ont accepté de suivre ce projet en faisant partie de mon comité de thèse. Je les remercie pour leurs conseils et suggestions constructives pour améliorer ce travail.

A Marlène Lacroix et Sylvie Puel, notre « analytical team » pour leur participation active dans ce projet, pour le développement des méthodes de dosage, pour leur disponibilité (euh, je viens vous voir pour savoir quand est-ce qu'on pourrait doser du BPA ? Comment ça « encore » ?!!).

A Elisabeth Perdu qui m'a formé aux techniques *in vitro* et *ex vivo*. Je la remercie pour sa disponibilité, sa gentillesse en toutes circonstances, ses nombreuses réponses à toutes mes questions, tous mes mails (... et je lui prie de m'excuser de l'avoir dérangée pendant ses vacances pour l'envoi en urgence d'un manomètre !).

A Didier Concordet, Céline Laffont-Rousset et Faouzi Lyazrhi pour leurs conseils en statistiques et leur disponibilité.

A Alain Berrebi pour sa disponibilité, ses conseils et pour nous avoir ouvert les portes de la maternité Paule de Viguier. A l'ensemble du personnel hospitalier, sages-femmes et aides-soignants, pour leur gentillesse durant nos longues heures d'attente avant la récupération d'un placenta (une délivrance !!).

A Elisabeth Jeunesse et l'ensemble des zootechniciens de l'Ecole Vétérinaire, Jean-Pierre Gau, Sylvain Bruyas, Valentin Rodriguez et Cédric Lacassagne pour leur disponibilité, leur bonne humeur et leur aide précieuse pendant les phases animales, les chirurgies.

A tout le personnel du laboratoire, Simone Baurès, Valérie Defforge, Christiane Mouilleron, Marie-Françoise Raymond, pour les publis introuvables, les commandes urgentes, les déplacements imprévus. Aux membres de l'équipe E7 pour les discussions, les cafés, les fous rires partagés. Parce que ce travail ne serait pas ce qu'il est sans la participation de chacun d'entre eux.

A mes anciens collègues du « bureau des thésards », Séverine Collet et Béatrice Roques pour leur accueil, leur gentillesse, leur présence tout simplement. A Maleck Vasseur, « mon frangin, mon poteau, mon copain » de thèse, pour toutes nos soirées (que la décence m'interdit de décrire, enfin heureusement aucune soirée dans une cave avec les loups !), nos délires, nos discussions inoubliables. J'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autres. A eux trois, car ces trois ans n'auraient pas été si formidables sans eux ... Aux étudiants, stagiaires de passage pour leur participation aux manip : Rémy Méreaux, Jean-Pascal Bournazel, Coralie Petiot, Julie Martinel, Adrien Levasseur, Amal Cherif. Aux nouveaux collègues du « bureau des thésards », Davy Guignard et Glenn Gauderat, je leur souhaite de s'épanouir autant que moi dans ce laboratoire.

A mes amis d'enfance (depuis presque 25 ans pour certains !), Nolwenn, Franck, Déborah, Marianne, Anne-Claire, Laëtitia, Sabrina, Virginie et leur conjoint. Je les remercie pour leur amitié sans faille, leur présence à des moments difficiles.

Aux mousquetaires de Guingamp, Alex, Emilie, Louise-Marie et Yohan pour ce qu'ils sont tout simplement, pour leur compréhension face à un coup de téléphone qui tarde à arriver.

A Sarah, Anne-Sophie, Marie-Raphaëlle pour un week-end partagé à Amsterdam, pour des vacances en Israël, pour votre affection, votre soutien, vos encouragements, votre capacité à rendre chaque visite inoubliable. Qu'ils trouvent tous à travers ces lignes, l'expression de mon amitié et ma tendresse la plus sincère.

A Lionel. Sans lui ces trois années auraient été bien plus fades et moins intenses.

A mon père, cette thèse lui est dédiée, pour tout ce qu'il m'a appris et apporté.

A ma mère, qui m'a toujours soutenu, encouragé, poussé vers l'avant tout au long de ces années. Tout ceci n'aurait été possible sans elle.

A Fabienne et Julien, ma sœur et mon frère, à Mickaël et Sabrina, mon beau-frère et ma belle-sœur. Je les remercie de leur soutien et de leurs encouragements. A mes neveux et nièces, Kenan, Gallen, Kiara, Ewen et Aela pour toute la joie qu'ils me procurent.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Une partie des travaux de cette thèse ont fait l'objet de publications et de communications orales ou affichées.

1. Publications

Lacroix M Z, Puel S, Collet S H, **Corbel T**, Picard-Hagen N, Toutain P-L, Viguie C and Gayrard V. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* **2011**; 85: 2053-2059.

Corbel T, Gayrard V, Viguie C, Puel S, Lacroix M Z, Toutain P-L and Picard-Hagen N. Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure. *Biol Reprod* **2013**; 89(1):11, 1-9.

2. Communications orales

Corbel T, Gayrard V, Viguie C, Puel S, Lacroix M Z, Toutain P-L and Picard-Hagen N. Characterization of maternal and fetal Bisphenol A disposition in a physiologically-based sheep model. *12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. 8-12 July 2012, Noordwijkerhout, The Netherlands.*

Corbel T, Gayrard V, Viguie C, Puel S, Lacroix M Z, Toutain P-L and Picard-Hagen N. Characterization of maternal and fetal Bisphenol A disposition in a physiologically-based sheep model. *4th Health Food Symposium. 18-19 July 2012, Toulouse, France.*

Corbel T, Perdu E, Lacroix M Z, Puel S, Gayrard V, Viguie C, Toutain P-L, Zalko D and Picard-Hagen N. The free/conjugated Bisphenol A ratio in feto-placental compartment: a key parameter determining Bisphenol A prenatal exposure. *International Conference of the National Endocrine Disruptor Research Program (PNRPE). 10-11 December 2012, Paris, France.*

Corbel T, Perdu E, Lacroix M Z, Puel S, Gayrard V, Viguie C, Toutain P-L, Zalko D and Picard-Hagen N. The free/conjugated Bisphenol A ratio in feto-placental compartment: a key parameter determining Bisphenol A prenatal exposure. *4th Symposium on Veterinary Sciences Toulouse-München-Zaragoza. 11-12 April 2013, Toulouse, France.*

Corbel T, Gayrard V, Perdu E, Puel S, Lacroix M Z, Berrebi A, Zalko D, Gil S, Viguie C, Toutain P-L and Picard-Hagen N. Exposition fœtale au bisphénol A : Mécanismes toxicocinétiques. *Journées d'Animation Scientifique Département Santé Animale, 15-18 Octobre 2013, Cap d'Agde, France*

3. Communications affichées

Martinel J, **Corbel T**, Gayrard V, Lacroix M Z, Puel S, Viguie C, Toutain P-L and Picard-Hagen N. Bidirectional placental transfer of BPA and its metabolite using the human perfused placental cotyledon model. *4th Symposium on Veterinary Sciences Toulouse-München-Zaragoza. 11-12 April 2013, Toulouse, France.*

Corbel T, Gayrard V, Berrebi A, Gil S, Lacroix M Z, Puel S, Viguie C, Toutain P-L and Picard-Hagen N. Bidirectional placental transfer of BPA and its metabolite using the human perfused placental cotyledon model. *49th Congress of the European Societies of Toxicology. 1-4 September 2013, Interlaken, Switzerland.*

SOMMAIRE

VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	1
SOMMAIRE.....	3
ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX.....	12
INTRODUCTION GENERALE.....	13
CHAPITRE 1 : Etude bibliographique	17
I. Le Bisphénol A : production, utilisations, réglementation et risques sanitaires	17
I1. Structure et propriétés physico-chimiques	17
I2. Production et utilisation du BPA.....	18
<i>I21. Historique.....</i>	<i>18</i>
<i>I22. Production du BPA.....</i>	<i>18</i>
<i>I23. Principales utilisations du BPA.....</i>	<i>19</i>
I3. Aspects réglementaires	21
<i>I31. Dose Journalière Admissible du BPA</i>	<i>21</i>
<i>I32. DJA et controverse</i>	<i>22</i>
<i>I33. Limite de Migration Spécifique du BPA.....</i>	<i>22</i>
<i>I34. Réglementations et interdictions.....</i>	<i>23</i>
I4. Risque sanitaire du BPA : effets avérés, suspectés	25
II. Exposition humaine et toxicocinétique du BPA.....	27
II1. Exposition externe au BPA	28
<i>II11. Exposition par voie orale.....</i>	<i>28</i>
<i>II12. Exposition par inhalation.....</i>	<i>30</i>

II13.	<i>Exposition par voie cutanée</i>	30
II14.	<i>Modélisation de l'exposition externe au BPA.....</i>	32
II2.	Toxicocinétique du BPA	32
II21.	<i>Absorption digestive du BPA.....</i>	33
II22.	<i>Distribution du BPA dans l'organisme.....</i>	33
II23.	<i>Liaison du BPA aux protéines plasmatiques</i>	34
II24.	<i>Biodisponibilité du BPA par voie orale.....</i>	34
II25.	<i>Métabolisme du BPA.....</i>	34
II26.	<i>Élimination du BPA.....</i>	36
II27.	<i>Modélisation de la dose interne d'exposition au BPA.....</i>	37
II3.	Exposition de la population humaine au BPA : données de biosurveillance	38
II31.	<i>Données urinaires.....</i>	38
II32.	<i>Estimation de la dose journalière absorbée à partir des données urinaires....</i>	41
II33.	<i>Données plasmatiques ou sériques.....</i>	41
II34.	<i>Incohérence entre les données issues des études de biosurveillance et l'exposition interne estimée</i>	42
II4.	L'exposition fœtale au BPA.....	43
II41.	<i>Le sang du cordon ombilical et le ratio materno-fœtal</i>	43
II42.	<i>Le placenta</i>	44
II43.	<i>Le liquide amniotique</i>	46
II44.	<i>Transfert placentaire du BPA et du BPA-G.....</i>	46
II45.	<i>Toxicocinétique du BPA chez le fœtus : données expérimentales chez l'animal..</i>	47
III.	La physiologie fœtale et les échanges materno-fœtaux	50
III1.	Le placenta et les échanges materno-fœtaux.....	50

III11.	<i>Structure du placenta</i>	50
III12.	<i>Les échanges materno-fœtaux</i>	54
III2.	La circulation sanguine fœtale.....	57
III3.	Métabolisme placentaire	59
III31.	<i>Réaction de phase I</i>	59
III32.	<i>Réaction de phase II.....</i>	60
III4.	Le métabolisme fœtal.....	61
III41.	<i>Réactions de phase I</i>	61
III42.	<i>Réactions de phase II.....</i>	62
Objectifs et stratégie de la thèse		66
Chapitre 2 : Etudes expérimentales		71
I.	Etude préliminaire: Purification et paramètres pharmacocinétiques du BPA-G	71
I1.	Introduction et objectifs.....	71
I2.	Méthodologie expérimentale	72
I21.	<i>Purification du BPA-G.....</i>	72
I22.	<i>Etude pilote : Administration de BPA-G à deux brebis</i>	73
I3.	Résultats	74
I31.	<i>Purification du BPA-G.....</i>	74
I32.	<i>Etude pilote : Administration de BPA-G à deux brebis</i>	74
I4.	Article 1	76
I5.	Conclusion.....	86
II.	Caractérisation de l'exposition interne maternelle et fœtale au BPA et à ses métabolites chez l'ovin	87
II1.	Introduction et objectifs.....	87

II2. Article 2	89
II3. Etude complémentaire 1 : Elimination urinaire maternelle du BPA-G après une administration intra-amniotique de BPA-G chez le fœtus ovin	101
II31. Introduction et objectifs.....	101
II32. Méthodologie expérimentale	102
II33. Résultats	104
II4. Conclusion.....	106
III. Transfert placentaire du BPA et de son principal métabolite, le BPA-G chez l'homme	110
III1. Introduction et objectifs.....	110
III2. Article 3	112
III3. Conclusion.....	145
IV. Balance conjugaison/déconjugaison du BPA et de ses métabolites dans l'unité fœto-placentaire ovine	148
IV1. Introduction et objectifs.....	148
IV2. Article 4	150
IV3. Etude complémentaire 2 : Hydrolyse du BPA-G par le testicule ovin par une approche <i>in vivo</i> de cathétérisation de la veine testiculaire.....	179
IV31. Introduction et objectifs.....	179
IV32. Méthodologie expérimentale	179
IV33. Résultats	181
IV4. Conclusion.....	183
Discussion générale et Perspectives.....	186
Références bibliographiques	198

ABREVIATIONS

β-Gluc : β-glucuronidase

ABC : ATP Binding Cassette transporters

ANOVA : Analysis of Variance (US), analyse de la variance

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

AUC : Area Under the Curve (US), aire sous la courbe

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

BPA : Bisphénol A

BPA-G : Bisphénol A-Glucuronide

BPA-S : Bisphénol A-Sulfate

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

BSA : Bovine Serum Albumin (US), albumine sérique bovine

CE : Commission Européenne

Cl : Clairance

CMR : Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique

Css : steady-state Concentration (US), concentration à l'équilibre

CYP : Cytochromes P450

DJA : Dose Journalière Admissible

e.g. : *exempli gratia*, par exemple

EFSA : European Food Safety Authority (US), Autorité européenne de sécurité des aliments

EPA : Environmental Protection Agency (US), Agence de protection de l'environnement

FDA : Food and Drug Administration (US), Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux

i.v. : intraveineux

i.e. : *id est*, c'est à dire

IPCS : International Programme of Chemical Safety (US), Programme international sur la sécurité chimique

K_m : Constante de Michaelis-Menten

LMS : Limite de Migration Spécifique

LOAEL : Low Observed Adverse Effect Level (US), Dose la plus faible pour laquelle un effet délétère est observé

LOD : Limit Of Detection (US), Limite de détection

LOQ : Limit Of quantification (US), Limite de quantification

MDR : Multidrug Resistance Protein

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MRP : Multidrug Resistance-associated Protein

MRT : Mean Residence Time (US), Temps moyen de résidence

NA : Non Applicable

ND : Non Déterminé

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level (US), Dose la plus élevée pour laquelle aucun effet délétère n'est observé

NR : Non Renseigné

OATP : Organic Anion-transporting Polypeptide

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P-gp : P-glycoprotéine

PBPK : Physiologically-Based Pharmacokinetic model (US), Modèle pharmacocinétique fondé sur des paramètres physiologiques

PE : Perturbateur Endocrinien

PK : Pharmacocinétique

REACH : Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals (US),
Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques

SD : Standard Deviation (US), écart-type (**ET**)

SE : Standard Error, erreur standard (**ES**)

SI : Standart Interne

SLC : Solute Carrier Transporters

SULT : Sulfotransférase

t_{1/2} : Temps de demi-vie d'élimination

TK : Toxicocinétique

UDPGA : Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique

UGT : Uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase

UPLC-MS : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance couplée à la
Spectrométrie de Masse

V_{max} : Vitesse maximale

V_{ss} : steady-state Distribution Volume (US), Volume de distribution à l'équilibre

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique du BPA.	17
Figure 2. Les différentes utilisations du BPA.....	19
Figure 3. Frise chronologique des réglementations mises en place par les différents gouvernements visant à réduire l'utilisation du BPA.....	24
Figure 4. Représentation schématique des définitions de l'exposition externe, la dose interne d'exposition et l'exposition interne.....	27
Figure 5. Schéma conceptuel d'exposition au BPA.....	28
Figure 6. Principales réactions de conjugaison du BPA.....	35
Figure 7. Placentation cotylédonnaire ovine et discoïde humaine.	53
Figure 8. Localisation des principaux transporteurs exprimés au niveau du placenta humain.....	56
Figure 9. Représentation schématique de la circulation sanguine fœtale.	58
Figure 10. Représentation schématique de l'évolution au cours de la grossesse des mécanismes d'échanges materno-fœtaux et des capacités de détoxification hépatique fœtale.....	65
Figure 11. Décours temporel des concentrations plasmatiques de BPA-G pendant et après une perfusion i.v. de 1 mg/(kg.j) de BPA-G pendant 24 heures chez deux brebis (B1 et B2).....	74
Figure 12. Représentation schématique de l'étude longitudinale.....	88
Figure 13. Décours temporel des concentrations plasmatiques de BPA-G pendant et après une perfusion i.v. de BPA-G à la dose de 3.54 mg/(kg.j) pendant 24 heures chez un fœtus ovin représentatif à 4 mois de gestation.	101
Figure 14. Quantité cumulée de BPA-G éliminée dans les urines maternelles au cours du temps chez une brebis dont un des conceptus a reçu par voie intra-amniotique 50 mg de BPA-G	105
Figure 15. Schéma du système de perfusion du placenta isolé humain.....	111

Figure 16. Clairances transplacentaires materno-fœtales et fœto-maternelles du BPA et du BPA-G, évaluées <i>ex vivo</i> sur le placenta isolé humain	146
Figure 17. Concentrations plasmatiques de BPA-G (ng/mL) dans la veine jugulaire et la veine testiculaire au cours de la perfusion de BPA-G.....	181
Figure 18. Exposition interne maternelle et fœtale suite à une administration maternelle de BPA à la dose de 2 mg/(kg.j) (perfusion i.v. pendant 24 heures).....	187
Figure 19. Echanges materno-fœtaux du BPA dans le modèle ovin à 4 mois de gestation.	189
Figure 20. Echanges materno-fœtaux du BPA-G dans le modèle ovin à 4 mois de gestation.....	189
Figure 21. Extraction placentaire materno-foetale et fœto-maternelle du BPA chez la femme à terme et la brebis en fin de gestation.....	193
Figure 22. Evolution de la clairance intrinsèque hépatique de glucuronoconjugaison et sulfoconjugaison du BPA au cours de la gestation chez le fœtus ovin.....	195

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les différentes catégories de PE.....	14
Tableau 2. Principales propriétés physico-chimiques du BPA.....	17
Tableau 3. Transfert percutané du BPA sur des explants de peau humaine ou de porc..	30
Tableau 4. Estimation des doses internes d'exposition au BPA des enfants, des femmes enceintes et des adultes	37
Tableau 5. Concentrations urinaires en BPA rapportées dans la population humaine à partir des études de biosurveillance.....	39
Tableau 6. Concentrations en BPA dans le sang de cordon ombilical et le serum maternel rapportées dans la littérature.....	45
Tableau 7. Les différents types histologiques de placentas.....	51
Tableau 8. Isoformes de cytochrome P450 mises en évidence au niveau du foie fœtal humain.....	62
Tableau 9. Activité UGT dans le foie fœtal chez l'homme.	63
Tableau 10. Principaux paramètres PK du BPA-G chez deux brebis après une perfusion i.v. de BPA-G pendant 24 heures à la dose de 1 mg/(kg.j).....	75
Tableau 11. Concentration en BPA-G (µg/mL) des différents fluides biologiques de l'unité foeto-placentaire.....	105
Tableau 12. Répartition de la dose de BPA-G dans les liquides biologiques fœtaux et maternels.....	106
Tableau 13. Index de clairance materno-fœtal moyen ($\pm$ ET) du BPA selon la concentration d'albumine utilisée dans les milieux de perfusion maternel et fœtal.....	145
Tableau 14. Comparaison des clairances placentaires maternelle et fœtale du BPA chez la brebis et la femme.	191
Tableau 15. Rapport des concentrations fœto-maternel en BPA chez la brebis et la femme.	192

INTRODUCTION GENERALE

Depuis ces dernières décennies, la notion de perturbateurs endocriniens (PE) est au centre des débats scientifiques, politiques et publics. Avec la multiplication par 400 de la production mondiale de substances chimiques depuis les années 1930 [1] et l'augmentation des désordres ou des altérations de fonctions endocrines, un lien entre l'exposition à des substances chimiques de plus en plus présentes dans notre quotidien et l'incidence de certains troubles endocriniens a été suggéré. Ainsi, la notion de perturbation endocrinienne est apparue dès les années 1980. En 1996, suite au colloque de Weybrigde (Royaume-Uni) sur l'impact des PE sur la santé humaine et l'environnement organisé par la Commission Européenne (CE) et l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), les PE ont été définis comme « toute substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale » [2]. En parallèle, l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA) a défini comme PE « tout agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme » [3].

La définition communément admise aujourd'hui est celle du programme international sur la sécurité chimique (IPCS) définissant tout PE comme « une substance ou un mélange de substances exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations » [4].

Ainsi, pour qu'une substance soit déclarée PE, il est donc nécessaire de démontrer une altération de la fonction endocrine qui soit associée à des conséquences délétères sur l'organisme. Cependant, définir une molécule en tant que PE est difficile du fait de la diversité des effets et de la complexité des mécanismes mis en jeu. Différentes caractéristiques importantes doivent être prises en compte dans l'étude des PE :

- La diversité des mécanismes d'action et des effets

- Les multiples voies d'exposition (voie orale, notamment alimentaire, voie aérienne, voie cutanée)
- La diversité des PE auxquels nous pouvons être exposés, incluant aussi bien des molécules d'origine anthropique (pesticides, cosmétiques, médicaments, divers produits d'origine industrielle) que des molécules d'origine naturelle que l'on peut retrouver dans l'alimentation humaine et animale (Tableau 1). De plus, l'exposition simultanée à plusieurs de ces molécules peut conduire à ce qu'on appelle l'effet cocktail, où les effets de plusieurs PE peuvent s'antagoniser, s'additionner ou être synergiques [5].

Origine	Classe	Exemples ^a
Naturelle	Hormones naturelles	
	Phyto-œstrogènes	<i>Génistéine, Daïdzéine, Coumestrol, ...</i>
	Myco-œstrogènes	<i>Zéaralénone, ...</i>
Anthropique	Produits phyto-sanitaires	
	Herbicides	<i>Alachlor, Amitrole, Atrazine, ...</i>
	Fongicides	<i>Prokloraz, Vinclozoline, ...</i>
	Insecticides	<i>Methoxychlor, Permetrine, Chlordécone, ...</i>
	Nématocides	<i>Aldicarb, Dibromochloropropane, ...</i>
	Polluants de l'industrie chimique	<i>Bisphenol A, Dioxines, Phtalates, Métaux lourds, Polybromobiphényles (PBB), Polybromodiphényléthers (PBDE), Polychlorobiphényles (PCB), ...</i>
	Médicaments	<i>Ethinil-œstradiol, Diéthylstilbestrol (DES), ...</i>
	Cosmétiques	<i>Parabens, Phtalates, ...</i>

Tableau 1. Les différentes catégories de PE

^a d'après [6, 7]. La liste des exemples de PE est non-exhaustive.

- La fenêtre d'exposition est également un élément clé pour l'analyse du risque. La période fœtale et périnatale représente une période critique d'exposition aux PE qui peuvent exercer des effets développementaux ou organisationnels s'exprimant immédiatement, ou apparaissant plus tard au cours de la vie après une période de latence entre l'exposition et la manifestation de la perturbation [8].
- Enfin, une des complexités (mais aussi une des controverses) que représente l'étude des PE est l'expression de leurs effets selon des schémas qui diffèrent de ceux de la toxicologie classique. La mise en évidence d'effets des PE à de faibles doses ne s'exprimant pas forcément à des doses plus élevées remet en question le

postulat selon lequel l'effet dépend de la dose. Ainsi, le concept de courbe dose-réponse non-monotone (courbe en « U » ou « U inversé ») décrit pour certaines hormones ou certains neurotransmetteurs peut s'appliquer également aux PE [9].

Dans le cadre de notre projet de recherche, nous avons ciblé comme molécule d'intérêt le Bisphénol A (BPA) et une exposition pendant la phase critique de la gestation. Le BPA, molécule largement utilisée par l'industrie plasturgique et considérée comme un PE du fait de ses propriétés œstrogéno-mimétiques depuis la conférence de Chapell Hill [10], fait partie des substances les plus étudiées depuis une quinzaine d'années, et a fait l'objet d'une médiatisation importante et de nombreux débats aux niveaux scientifique, politique et sociétal. Ainsi, les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit effectués au sein de l'équipe « Pesticides, Perturbateurs Endocriniens » de l'UMR 1331 TOXALIM INRA/ENVT ont pour objectifs de déterminer les mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition fœtale au BPA. Ces travaux ont été menés sous la direction de Nicole Picard-Hagen et de Véronique Gayrard.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera consacré à la synthèse des données bibliographiques relatives à la problématique de la thèse. Les objectifs de ce travail seront ensuite présentés ainsi que la stratégie expérimentale et les approches méthodologiques qui ont été choisies pour y répondre.

Le deuxième chapitre sera consacré aux études expérimentales mises en place pour répondre à notre principal objectif : la détermination des mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition fœtale au BPA.

L'ensemble des résultats sera enfin discuté et mis en perspective dans la dernière partie de ce manuscrit.

CHAPITRE 1

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Etude bibliographique

I. Le Bisphénol A : production, utilisations, réglementation et risques sanitaires

I1. Structure et propriétés physico-chimiques

Le Bisphénol A (BPA), 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, est une molécule de petite taille issue de la catalyse acide de deux phénols avec une cétone, de formule brute $C_{15}H_{16}O_2$ et de poids moléculaire 228.3 g/mol (Figure 1).

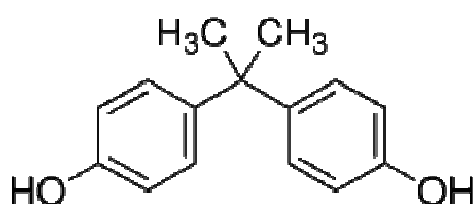


Figure 1. Structure chimique du BPA.

Le BPA est composé de deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone.

Les propriétés physico-chimiques du BPA sont présentées dans le Tableau 2. Avec un coefficient de partage *n*-octanol/eau de 3.32, le BPA est donc une substance relativement lipophile.

N° CAS (Chemical Abstract Service)	80-05-7
Formule chimique brute	$C_{15}H_{16}O_2$
Masse moléculaire	228.3 g/mol
Solubilité dans l'eau	0.12 – 0.30 g/L
Densité	1.1 - 1.2 à 25°C
Coefficient de partage <i>n</i> -octanol/eau (log P_{ow})	3.32
Constante d'ionisation (pKa)	9.6 – 10.2

Tableau 2. Principales propriétés physico-chimiques du BPA

Le BPA est classé comme substance irritante, nocive, pouvant induire des lésions oculaires graves, une sensibilisation de la peau par contact et présentant un risque d'altération de la fertilité selon la directive CE 67/548/CEE, et même susceptible de nuire au fœtus selon le règlement CE 1272/2008 [11].

I2. Production et utilisation du BPA

I21. Historique

Le BPA, produit chimique organique, a été synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe Alexandre P. Dianin. La première description de son activité œstrogénique a été rapportée par Dodds et Lawson en 1936, deux biochimistes anglais qui, après avoir administré du BPA à des rattes ovariectomisées, ont observé des modifications de l'épithélium vaginal [12]. Le BPA a été, en effet, étudié dans les années 1930, lors de la recherche d'œstrogènes de synthèse à visée thérapeutique. Néanmoins, il ne fut jamais utilisé en tant que tel du fait d'une activité œstrogénique relativement faible par rapport à celle de l'œstradiol. L'industrie pharmaceutique lui préférera un autre composé de synthèse étudié au cours de la même décennie et présentant une plus forte puissance œstrogénique : le diéthylstilbestrol (connu en France sous le nom de distilbène) [13].

Tombé dans l'oubli pendant une dizaine d'années, le BPA refait surface en 1953 grâce à Herman Schnell de la firme Bayer, qui développe un nouveau type de plastique à partir de la polymérisation de monomères de BPA, le polycarbonate. Les propriétés du BPA une fois polymérisé (haute résistance à la chaleur, caractéristiques optiques, facilité d'utilisation) en ont fait une molécule de choix pour l'industrie des plastiques.

I22. Production du BPA

Le BPA est un des produits chimiques dont les tonnages de production sont les plus importants à travers le monde avec une capacité de production mondiale de l'ordre de 5.2 millions de tonnes par an [14]. La production annuelle de l'Asie, des Etats-Unis (USA) et de l'Union Européenne (UE) représente respectivement 45, 24 et 28% de la production mondiale [14]. Du fait de son tonnage de production important (>1000 tonnes/an), le BPA comme toute substance chimique est soumis à la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) mise en place en 2007 par l'Union Européenne. Le dossier d'enregistrement de ces substances chimiques est composé de deux parties : un dossier technique et un rapport sur la sécurité chimique dans lequel doit apparaître une évaluation des dangers pour la santé humaine, des dangers pour l'environnement, ainsi que l'évaluation de l'exposition et la

caractérisation du risque pour les substances répondant aux critères de classification CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique) [15].

I23. Principales utilisations du BPA

Le BPA se retrouve dans de nombreux objets de la vie quotidienne, essentiellement sous forme de polycarbonates mais également sous forme de résines époxy-phénoliques (Figure 2).

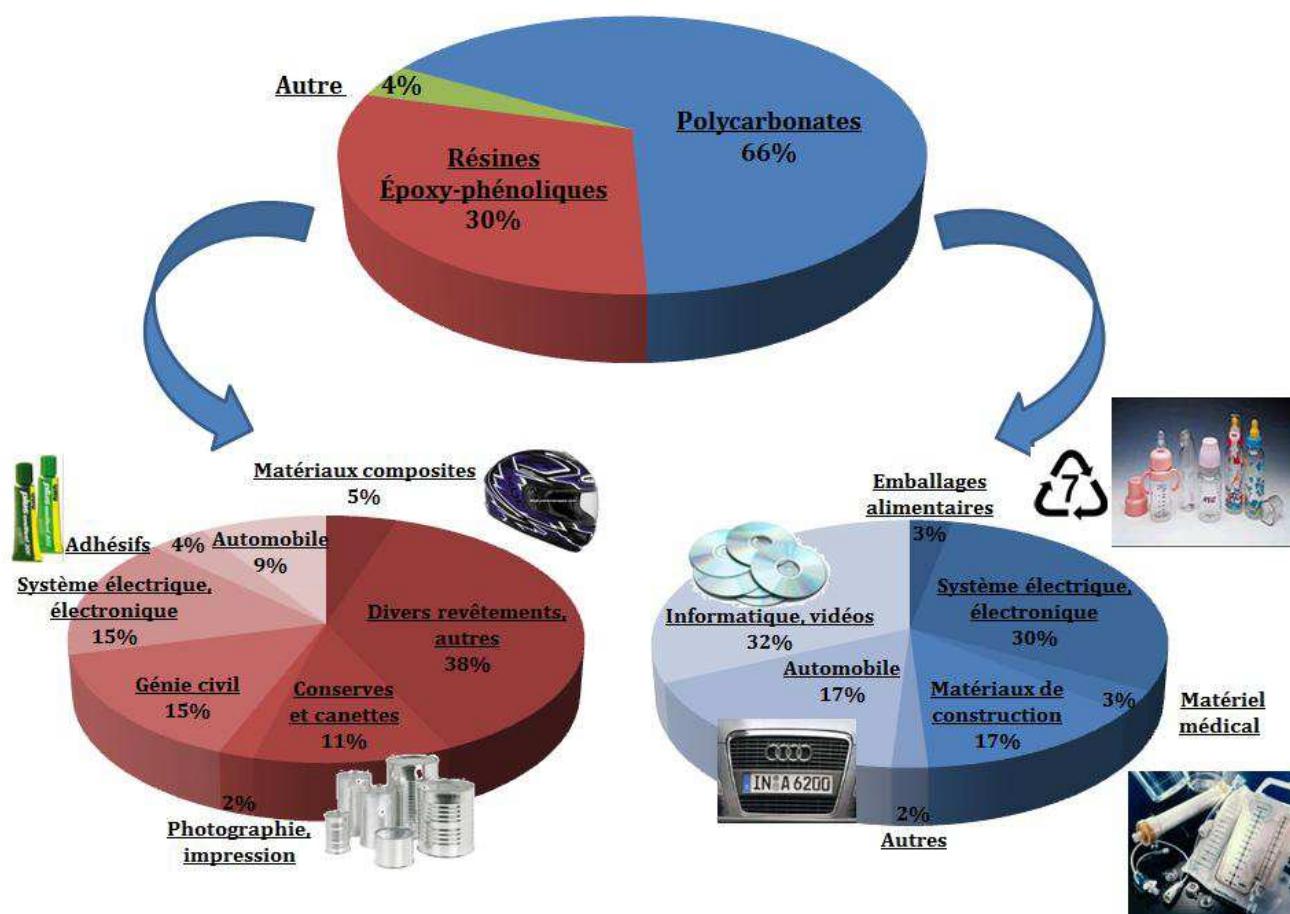


Figure 2. Les différentes utilisations du BPA.

Le BPA est principalement utilisé soit sous forme de polycarbonates (66% de la production mondiale) ou de résines époxy-phénoliques (30% de la production mondiale) (Adapté d'après [20]).

Environ 66% de la production mondiale de BPA est utilisée pour la fabrication de plastique de type polycarbonate, 30% dans celle de résines époxy-phénoliques [16].

Le polycarbonate est un plastique issu de la polymérisation de 50 à 100 monomères de BPA par trans-estérification. Sa production est peu coûteuse et le plastique obtenu est transparent, léger, relativement rigide et résistant à la chaleur (jusqu'à 125°C). L'utilisation des polycarbonates est variée (Figure 2), ils interviennent dans la fabrication de supports audio/video (CD, DVD), de matériel électrique et électronique, de certains matériaux de construction, de matériel à usage médical (cathéter, système de perfusion, raccords, robinets, ...) et enfin d'emballages alimentaires (bouteilles plastique, bonbonnes de fontaine d'eau, boîtes en plastique pour la conservation des aliments [16]). Les emballages en polycarbonate sont identifiables par la présence du logo de recyclage contenant le chiffre 7.

Le BPA est également utilisé dans la fabrication de résines époxy-phénoliques (30% de la production mondiale [16]), issues de la condensation d'épichlorhydrine et de monomère de BPA. Caractérisées par leur capacité de protection contre la corrosion, leur stabilité thermique et leur résistance mécanique, elles sont principalement utilisées dans l'industrie automobile, maritime et l'industrie agro-alimentaire qui utilise notamment ces résines pour le revêtement interne des boîtes de conserves et des canettes en métal pour protéger le métal de la corrosion et empêcher une contamination de la denrée alimentaire par le métal (Figure 2).

De façon moins importante, le BPA entre dans la composition d'autres polymères et de résines (polyesters, polysulfones, polychlorure de vinyle résines vinylesters, ...) pour ses pouvoirs antioxydant, liants et durcisseurs [17]. Des dérivés du BPA peuvent également être retrouvés dans les retardateurs de flamme bromés (Tétrabromo-Bisphenol A, TBBPA). Le BPA est aussi utilisé dans le domaine de la santé bucco-dentaire pour la fabrication de composites et d'amalgames dentaires à partir de Bisphénol A glycidyl methacrylate (bis-GMA) ou de Bisphénol A dimethacrylate (bis-DMA) [18]. Enfin, le BPA est utilisé comme révélateur chimique dans les papiers thermiques, tels que les tickets de caisse ou encore les reçus des distributeurs automatiques de billets.

I3. Aspects réglementaires

Du fait de la réglementation REACH, le BPA est soumis à enregistrement. Ainsi, une évaluation des dangers pour la santé humaine a été effectuée qui a permis l'établissement de seuils réglementaires concernant le BPA.

I31. Dose Journalière Admissible du BPA

La Dose Journalière Admissible (DJA) représente la quantité maximale de BPA pouvant être ingérée chaque jour durant toute une vie sans entraîner d'effets néfastes pour la santé. L'estimation de cette dernière repose sur le calcul, soit de la dose pour laquelle aucun effet délétère n'est observé (NOAEL, No Observed Adversed Effect Level), soit de la plus faible dose pour laquelle un effet délétère est observé (LOAEL, Lowest Observed Adversed Effect Level) pondérée respectivement par un facteur de sécurité de 100 ou 1000, prenant en compte l'extrapolation des données expérimentales de l'animal de laboratoire à l'homme (différence interspécifiques), les différences interindividuelles, ainsi que l'extrapolation de la NOAEL à partir de la LOAEL pour le facteur de sécurité de 1000.

Les résultats des études de reprotoxicité du BPA menées par Tyl *et al.* en 2002 et 2008, respectivement sur trois générations de rats [19] et deux générations de souris [20] ont servi de base aux agences réglementaires européenne (EFSA, European Food Safety Authority) et américaine (FDA, Food and Drug Administration) pour déterminer cette DJA. Ainsi, ces études ont mis en évidence une toxicité systémique (diminution du poids corporel) et hépatique du BPA pour des doses supérieures à la dose de 5 mg/(kg.j), correspondant à la NOAEL [19, 20].

Ainsi l'EFSA en 2006 en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la NOAEL déterminée dans les études de Tyl *et al.*, a estimé la DJA du BPA à 50 µg/(kg.j). La FDA en 2008, a appliqué un facteur de sécurité de 1000 à la LOAEL, estimée à 50 mg/(kg.j) à partir des deux études de Tyl *et al.*, et a ainsi fixé également la DJA à 50 µg/(kg.j). La DJA du BPA a donc été fixée en Europe et aux USA à 50 µg/(kg.j).

I32. DJA et controverse

Actuellement, il existe une controverse autour de la DJA du BPA qui divise le monde scientifique. Les études de Tyl *et al.* utilisées pour définir cette valeur ont été menées selon les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) et selon des standards BPL (Bonne Pratique de Laboratoire). Néanmoins, certains scientifiques émettent des réserves depuis plusieurs années quant à la valeur de cette DJA. En effet, un grand nombre d'études a montré des effets du BPA, notamment sur la fonction de reproduction, chez des rongeurs exposés à de faibles doses [21]. Vom Saal et Hughes en 2005 ont publié une synthèse bibliographique regroupant 115 études *in vivo* dont 94 rapportent des effets avérés du BPA pour des doses inférieures à la LOAEL. Parmi ces 94 études, 31 rapportent des effets à des doses inférieures à la DJA. Dans cette revue, les auteurs dénoncent également les conflits d'intérêts qui existeraient pour certaines études financées par l'industrie chimique. Ainsi, sur 11 études financées par l'industrie, aucune ne rapporte d'effet du BPA à de faibles doses [21].

Le débat au sein de la communauté scientifique sur le BPA soulève la question de la pertinence des approches scientifiques utilisées dans les études BPL qui ne seraient pas adaptées à l'étude de certains PE, remettant en cause les principes de toxicologie classique (courbes dose-réponse non-monotones, latence entre la période d'exposition et les effets, ...). Cette controverse qui divise le monde scientifique met en avant la nécessité de développer de nouveaux modèles pertinents vis-à-vis de l'homme pour évaluer les risques liés à une exposition au BPA.

I33. Limite de Migration Spécifique du BPA

Le BPA est utilisé dans la fabrication d'emballages alimentaires et peut donc contaminer les aliments. Une limite de migration spécifique (LMS), correspondant à la quantité maximale de BPA dans les denrées alimentaires a été définie au niveau européen (Directive 2004/19/CE). Cette LMS a pour objectif de garantir que le contenant à base de BPA destiné à entrer en contact avec des denrées alimentaires ne présente aucun risque pour la santé. Ainsi, la LMS du BPA a été fixée à 0.6 mg/kg d'aliment sur la base de la DJA [22].

I34. Réglementations et interdictions

Face aux incertitudes soulevées par les agences quant à l'évaluation du risque pour la santé humaine d'une exposition au BPA et face aux inquiétudes grandissantes de l'opinion publique largement relayées par les médias, les autorités réglementaires ont pris différentes mesures visant à réduire l'utilisation du BPA (Figure 3).

Ainsi, en France, la loi 2010-729 du 30 juin 2010 suspend « la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit et onéreux de biberons à base de BPA ». Il a fallu ensuite attendre 2011 pour que cette mesure devienne commune à l'ensemble des pays membres de l'UE. La loi française est intervenue deux ans après l'annonce du gouvernement canadien de l'interdiction de la vente de biberons fabriqués à partir de BPA. La proposition par le gouvernement canadien d'un règlement modifiant la loi sur les produits dangereux pour y inclure les biberons en polycarbonate contenant du BPA en juin 2009 a fait de ce pays le premier à légiférer sur le BPA.

Aux USA, certains états ont interdit la vente de biberons contenant du BPA, c'est le cas par exemple de l'état de Washington et du Connecticut. Mais il n'existe pas pour l'instant de législation commune à l'ensemble du pays.

En France, depuis le 1^{er} janvier 2013, la loi visant à l'interdiction de la fabrication et de la vente de biberons contenant du BPA a été étendue à tous les contenants alimentaires à destination des nourrissons et des enfants de moins de trois ans. En 2015, l'ensemble des contenants alimentaires, qu'ils soient à destination des enfants ou des adultes, devront être dépourvus de BPA (Loi 2012-1442 du 24 décembre 2012).

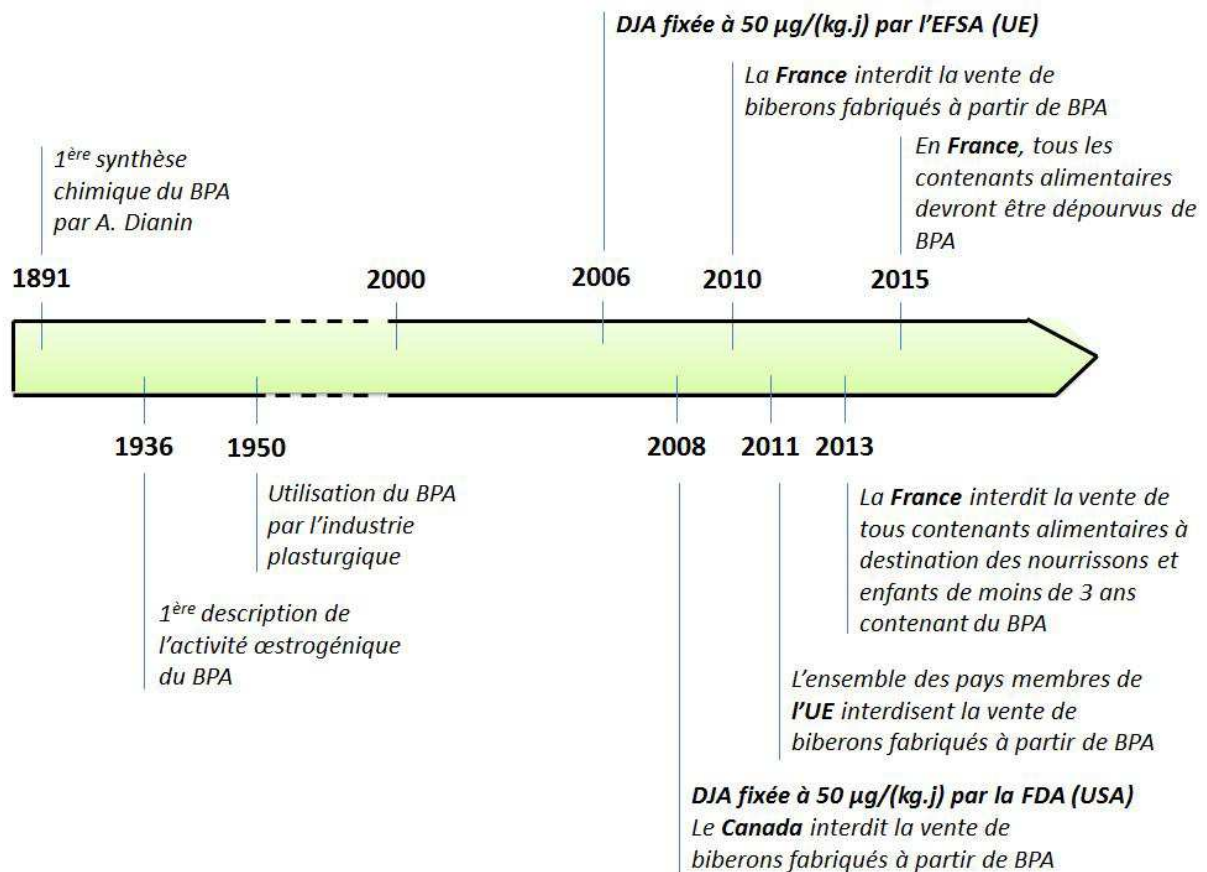


Figure 3. Frise chronologique des réglementations mises en place par les différents gouvernements visant à réduire l'utilisation du BPA.

Depuis 2010, le gouvernement français incite les industriels à rechercher des substituts potentiels au BPA et a, à travers plusieurs saisines (2009-SA-0331, 2010-SA-097), mandaté l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) pour évaluer les risques des composés de la famille des bisphénols (Bisphénol B, M, S, F, AF, AP, BADGE).

L'ANSES conclut dans son rapport de 2013 sur l'évaluation des risques du BPA pour la santé humaine que « les données toxicologiques disponibles ne sont pas suffisantes pour évaluer la toxicité des bisphénols M, S, B, AP, AF, F, BADGE. Il n'est donc pas possible de conduire une évaluation des risques sanitaires liés à une utilisation de ces composés dans des produits de consommation, ce qui doit inciter à la plus grande précaution en matière de substitution par ces composés. » [17].

I4. Risque sanitaire du BPA : effets avérés, suspectés

En 2010, la direction générale de la santé a saisi l'ANSES en vue de demander une expertise sur le BPA, prenant en compte tous les types d'effets toxiques, et pas uniquement les effets reprotoxiques et/ou liés à la perturbation endocrinienne. Un groupe de travail a donc été mandaté par l'ANSES pour réaliser cette évaluation et a rendu son rapport en 2013. Les effets du BPA sur la fonction de reproduction mais aussi sur le comportement, le métabolisme et le système cardiovasculaire, sur la thyroïde, et sur l'intestin ont été évalués. Chaque type d'effet a été ensuite qualifié en termes d'effets avérés, suspectés ou controversés chez l'animal et chez l'homme.

Ainsi, aucun effet avéré n'a été identifié chez l'homme [17]. Chez l'animal, ont été considérés comme effets avérés :

- l'augmentation de la survenue de kystes ovariens, les modifications hyperplasiques de l'endomètre, l'avancement de l'âge de la puberté, les modifications histologiques sur la neurogenèse, lors d'exposition pré et post-natales,
- l'altération de la production spermatique lors d'exposition à l'âge adulte,
- les effets sur la lipogenèse suite à une exposition prénatale, périnatale ou à l'âge adulte,
- les effets sur les glandes mammaires (accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire à l'âge adulte et développement de lésions hyperplasiques intracanalaires en lien avec une exposition pré ou périnatale au BPA).

Les effets sur la maturation ovocytaire dans un contexte de procréation médicalement assistée et les effets sur les pathologies cardiovasculaires et le diabète ont été considérés comme effets suspectés chez l'homme [17].

Ainsi, le BPA reste à l'heure actuelle au centre des débats scientifiques, sociétaux et politiques. Les pouvoirs politiques sous la pression sociétale et selon le principe de précaution de la constitution ont pris des mesures ces dernières années visant à terme à interdire l'utilisation du BPA dans les contenants alimentaires. Mais cette interdiction soulève la question de la substitution du BPA.

Pour extrapoler les effets observés des modèles animaux à l'homme, il est nécessaire de connaître l'exposition interne au BPA.

Dans la seconde partie de l'étude bibliographique, sont présentés les différentes sources d'exposition au BPA, les données sur la toxicocinétique du BPA et les résultats des études de biosurveillance sur l'exposition interne de la population humaine au BPA.

II. Exposition humaine et toxicocinétique du BPA

L'exposition externe correspond à la quantité totale de BPA à laquelle un individu peut être exposé quotidiennement, quelle que soit la voie d'exposition.

La dose interne d'exposition correspond à la dose de BPA absorbée, *i.e.* la dose totale de BPA à laquelle l'individu est exposé en tenant compte de facteurs physiologiques et/ou pharmacocinétiques propres à chaque voie d'exposition, l'absorption pour la voie orale, le taux de pénétration cutanée et le taux d'absorption par inhalation. Cette dose interne d'exposition peut aussi être déterminée par les quantités de BPA total éliminées dans les urines, reflet de la quantité de BPA absorbée et éliminée par voie urinaire.

L'exposition interne correspond aux concentrations sanguines ou plasmatiques, et reflètent l'exposition de l'individu à la forme active du BPA. Ces termes sont illustrés sur la Figure 4.

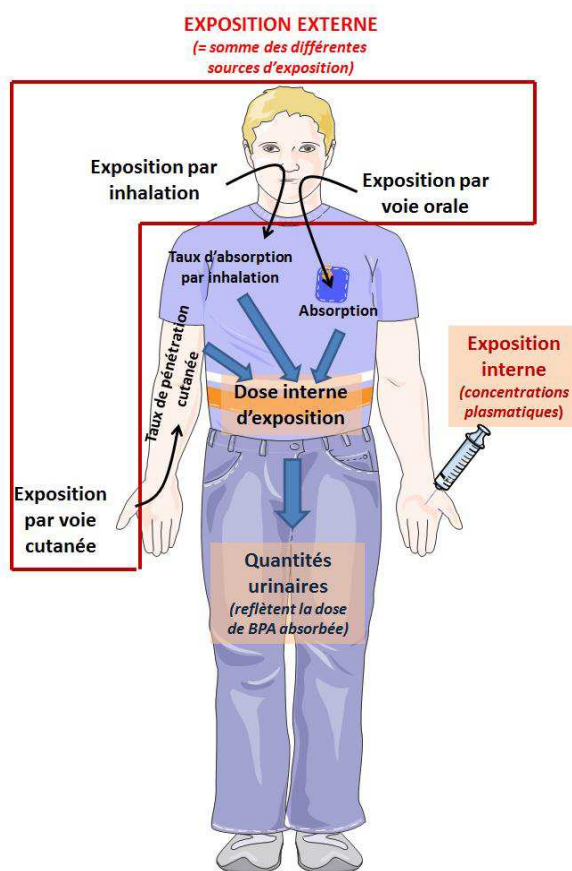


Figure 4. Représentation schématique des définitions de l'exposition externe, la dose interne d'exposition et l'exposition interne.

II1. Exposition externe au BPA

La principale voie d'exposition de la population humaine au BPA est la voie orale. Cependant, les populations humaines sont également exposées au BPA par voie cutanée et par inhalation. L'ANSES dans son rapport sur l'évaluation des risques du BPA pour la santé humaine de 2013 a développé un schéma conceptuel d'exposition au BPA, en tenant compte des différents usages du BPA dans la vie courante et la contribution des différentes utilisations du BPA aux différentes sources d'exposition (Figure 5).

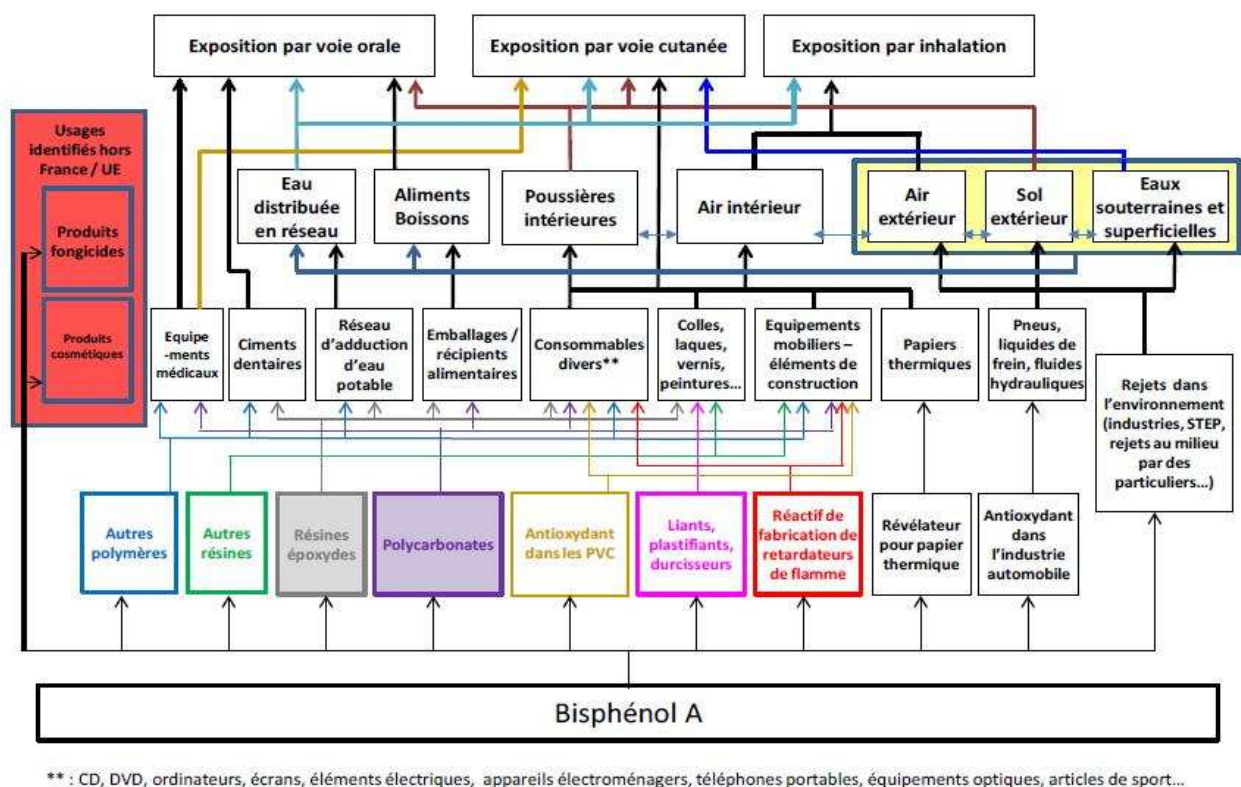


Figure 5. Schéma conceptuel d'exposition au BPA.

Ce schéma représente les possibles compartiments et voies d'exposition de la population française au BPA selon les usages possibles du BPA. Ce schéma construit par l'ANSES est issu d'une enquête de filière auprès des industriels français (d'après [17]).

II11. *Exposition par voie orale*

La voie orale au BPA constitue la voie majeure d'exposition de la population humaine au BPA et est liée principalement à la contamination des denrées alimentaires par les emballages. En effet, en raison de processus de polymérisation incomplète, des résidus de BPA peuvent migrer du contenant (canettes, boîtes de conserve, emballage

plastique) vers le contenu en particulier au moment du conditionnement (stérilisation, par exemple) ou lorsque les contenants subissent des variations de température ou de pH.

La synthèse de Geens *et al.* (2010) portant sur la contamination des aliments par le BPA selon différents conditionnements (métal, verre, brique, plastique type polyéthylène téréphtalate (PET)) a montré que les niveaux de BPA les plus élevés sont détectés dans les aliments conditionnés en boîte de conserve métallique [23]. Ainsi, pour un même type d'aliment le conditionnement en boîte métallique peut augmenter d'un facteur 10, voire 100 le niveau de contamination alimentaire.

L'étude sur l'alimentation totale réalisée par l'ANSES et s'appuyant sur les données de consommations alimentaires de l'étude INCA (étude individuelle nationale des consommations alimentaires), prenant en compte les aliments les plus consommés et les aliments peu consommés mais susceptibles d'être fortement contaminés, révèle que les concentrations en BPA dans les aliments conditionnés varient de la limite de détection (0.21 µg/kg) jusqu'à plusieurs dizaines de µg/kg. De manière inexpliquée, les niveaux les plus élevés de BPA (jusqu'à 30 µg/kg) ont été mesurés dans les viandes, les abats et les poissons [17].

La présence de BPA dans les eaux destinées à la consommation humaine a été également mise en évidence dans une étude française en 2012 : sur 8 échantillons d'eaux distribuées en réseau (eau du robinet), le BPA a été détecté dans tous les échantillons avec un rang de concentrations allant de 2 à 17 ng/L [24]. Ces niveaux restent donc très faibles et la contribution de la contamination de l'eau du robinet à l'exposition humaine reste mineure. Les eaux conditionnées en bouteille plastique de type polycarbonate présentent des niveaux plus élevés pouvant atteindre plusieurs centaines de ng/L. Ces niveaux augmentent au cours du temps et peuvent atteindre plusieurs microgrammes par litre, en particulier lorsque l'eau subit une augmentation de température [25-27]. De même, le passage au lave-vaisselle ou au micro-onde de contenants en polycarbonate peut augmenter l'hydrolyse des polymères de BPA et entraîner la contamination des denrées alimentaires [28].

Ainsi le mode de vie et les habitudes alimentaires peuvent déterminer l'exposition humaine au BPA. La consommation importante d'aliments ou de boissons

conditionnés dans des emballages contenant du BPA est corrélée avec des expositions internes plus élevées [29, 30].

II12. Exposition par inhalation

L'utilisation du BPA dans les processus de fabrications de certains revêtements de sol, certaines peintures, matériel électrique ou électronique conduit à la contamination de l'air ambiant par des particules de BPA et constitue une source d'exposition de la population humaine. Plusieurs études ont ainsi quantifié le BPA dans les poussières intérieures et rapportent des concentrations en BPA très variables allant de concentrations inférieures à la limite de détection (LOD) jusqu'à environ 20 µg/g dans des échantillons de poussière collectés par aspiration dans des habitations aux USA [31-33] et en Europe [34, 35]. L'étude de Geens *et al.* rapporte une concentration moyenne de BPA dans les poussières intérieures de 2 µg/g. A partir de cette valeur et en tenant compte qu'un individu ingère environ 20 mg de poussières par jour, les auteurs estiment que l'exposition par inhalation au BPA (environ 40 ng/j) représenterait moins de 10% de l'exposition externe totale [34].

II13. Exposition par voie cutanée

La pénétration cutanée du BPA a fait l'objet de plusieurs études menées *in vitro* sur des explants de peau humaine ou de porc. Ces études sont synthétisées dans le Tableau 3 :

Modèle	Dose BPA	Modalité d'exposition	Durée	Transfert percutané	Référence
Peau de porc n=6	¹⁴ C-BPA 10 µg/mL ^a	Appliqué sur la peau	2 hr	3.0±1.8%	[36]
			5 hr	6.9±0.9%	
			10 hr	11.4±4.4%	
Peau humaine n=11	550 µg	Non renseigné	48 hr	13%	[37]
Peau de porc n=3	¹⁴ C-BPA 2.75 µg/cm ²	Appliqué sur la peau	72 hr	65.3±8.2%	[38]
Peau humaine n=3				45.6±6.2%	
Peau humaine n=7					
	¹⁴ C-BPA 1.82 µg/cm ²	Appliqué sur la peau	24 hr	8.6±2.1%	[39]

Tableau 3. Transfert percutané du BPA sur des explants de peau humaine ou de porc.

^a la quantité totale de BPA appliquée à la surface de la peau n'est pas renseignée

Si les études de Kaddar *et al.* [36], Morck *et al.* [37] et Demierre *et al.* [39] montrent un taux de pénétration variant de 3 à 13%, l'étude de Zalko *et al.* [38] rapporte un taux de transfert percutané nettement plus élevé respectivement de 45.6 et 65.3% pour la peau humaine et la peau de porc. Cette différence pourrait s'expliquer en partie par une durée d'application plus longue (72 hr *versus* 10, 24 ou 48 hr). En outre, le modèle de peau sur inserts dans des plaques de culture, utilisé par Zalko *et al.* est un système de diffusion statique (immersion du tissu), alors que les autres études utilisent un système d'explant placé dans une chambre de diffusion.

En 2010, Biedermann *et al.* ont montré que le contact avec un papier thermique (par exemple, un ticket de caisse) contenant environ 10 mg de BPA par gramme de papier pendant 5 secondes entre ses doigts entraînait une pénétration de 0.2 à 6 µg de BPA *in toto* [40]. Cette pénétration est augmentée sur la peau grasse ou humide. Ainsi, l'exposition serait de l'ordre de 0.05 µg/kg à chaque contact, correspondant à 0.1% de la DJA. Même dans un contexte professionnel, entraînant des contacts réguliers avec du papier thermique pendant 10 heures par jour (hôtesses de caisses, par exemple), ce pourcentage ne dépasserait pas les 3% de la DJA.

In vivo, chez le rat, Marquet *et al.* ont montré que le BPA pénètre rapidement la peau après une application de 2 mg de [¹⁴C]-BPA (0.2 mg/cm²) entre les omoplates [41]. Le pourcentage de la dose absorbée (urine + fèces + carcasse) était de 23% chez les animaux sacrifiés 64 heures après une exposition de 8 heures et seulement 12.5% pendant la période d'exposition de 8 heures. Ces résultats suggèrent que le BPA pourrait s'accumuler dans la couche lipophile du *stratum corneum* (couche cornée de la peau) et pourrait être relargué lentement dans le réseau vasculaire drainant la zone exposée. Les auteurs ont ainsi montré que le flux d'absorption cutané ne variait pas au cours du temps et était d'environ 2 µg/(cm².h).

Si ces études mettent bien en évidence que le BPA peut franchir la barrière cutanée, elles restent discutables du fait des doses relativement importantes appliquées sur la peau et mériteraient des investigations supplémentaires. Actuellement, il est considéré que l'exposition par voie cutanée ne participe que minoritairement à l'exposition externe totale de la population humaine au BPA, avec une exposition

externe moyenne de l'ordre de 20-30 ng/(kg.j), soit 6-15% de l'exposition externe totale (EFSA, consultation publique 2013).

II14. Modélisation de l'exposition externe au BPA

En prenant en compte l'ensemble des sources d'exposition présentées ci-dessus et les comportements de consommation, la quantité quotidienne de BPA à laquelle est exposé un individu a pu être estimée. Ainsi en 2006, l'EFSA a évalué cette exposition externe pour un individu adulte à 1.5 µg/(kg.j), 5.3 µg/(kg.j) pour des enfants d'un an et demi et de l'ordre de 10 µg/(kg.j) pour des nourrissons de 3 à 6 mois nourris avec des biberons en polycarbonate [42]. Le National Toxicology Program (NTP) en 2008, dans son programme sur les effets potentiels du BPA sur le développement et sur la fonction de reproduction, a estimé l'exposition externe humaine au BPA respectivement à 1-11 µg/(kg.j) et 0.2-1 µg/(kg.j) pour des nouveau-nés nourris au lait maternisé ou allaités. Pour les nourrissons de 6 à 12 mois, pour les enfants entre 1.5 et 6 ans et pour le reste de la population, cette exposition a été estimée respectivement à 1.65-13 µg/(kg.j), 0.043-14.7 µg/(kg.j) et 0.008-1.5 µg/(kg.j) [43].

Actuellement, les modélisations de l'exposition au BPA de la population humaine estiment que l'exposition externe totale est d'environ 900 et 200 ng/(kg.j), respectivement pour les enfants de 6 mois à 10 ans et les adultes (EFSA, consultation publique 2013).

Ces estimations de doses externes restent inférieures à la DJA mais suggèrent que les nourrissons et les enfants en bas âge constituent une population plus exposée que le reste de la population.

II2. Toxicocinétique du BPA

Les données toxicocinétiques (TK) du BPA ont fait l'objet de nombreuses publications utilisant différents modèles animaux (rongeurs, brebis, primates non-humains, homme) avec différents voies d'administration (orale, intraveineuse, sous-cutanée) et sur des individus à différents stades physiologiques (juvéniles, adultes, femelles gravides et/ou en lactation). L'ensemble des paramètres pharmacocinétiques ainsi déterminés permet de caractériser le devenir du BPA dans l'organisme, depuis son absorption jusqu'à son élimination. Les paramètres PK sont décrits dans cette partie

pour l'homme, le rat, modèle classique d'étude en toxicologie et le mouton, notre modèle d'étude.

II21. Absorption digestive du BPA

La principale voie de contamination de la population humaine étant l'alimentation, l'absorption du BPA au niveau du tractus digestif est sans doute un élément clé pour comprendre le devenir du BPA dans l'organisme. Deux études expérimentales menées chez l'homme ont montré que le d₁₆-BPA, un isotope stable du BPA, était quasiment entièrement absorbé au niveau du tube digestif après une administration orale. En effet, 118% et 90% de la dose de d₁₆-BPA ont été retrouvés dans les urines après l'administration orale, respectivement de 5 mg et 25 µg de d₁₆-BPA [44, 45]. Chez le rat, la fraction absorbée du BPA a été évaluée, respectivement à 77% et 67% pour une dose administrée par voie orale de 100 µg/kg [46] et 100 mg/kg [47]. Chez le mouton, l'absorption du BPA après une voie orale à la dose de 100 mg/kg a été estimée à 100% [47].

II22. Distribution du BPA dans l'organisme

Le volume de distribution à l'équilibre est le paramètre PK représentant la distribution tissulaire du BPA, il correspond au volume fictif dans lequel se distribue le BPA pour être à l'équilibre avec les concentrations plasmatiques. Le volume de distribution du BPA a été évalué après une administration i.v. à la dose de 1 à 5 mg/kg chez le rat et le mouton, respectivement à 5 L/kg et 0.5 L/kg [47, 48].

Le volume de distribution du BPA a été estimé chez l'homme à environ 2 L/kg avec une approche allométrique [48], ou avec un modèle PB-PK (modèle pharmacocinétique fondé sur des paramètres physiologiques) [49]. Cette dernière étude a montré également que le BPA, de par sa nature lipophile, se distribuait largement dans tous les tissus du corps humain avec des niveaux supérieurs aux concentrations sériques, à l'exception des muscles et du tissu adipeux [49].

II23. Liaison du BPA aux protéines plasmatiques

Le BPA est lié à plus de 90% aux protéines plasmatiques, majoritairement à l'albumine [50], mais également à la SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) [51]. Ainsi, chez l'homme, la fraction libre de BPA, donc biologiquement active, est de 5% [50].

II24. Biodisponibilité du BPA par voie orale

La biodisponibilité du BPA absorbée par le tractus digestif a été évaluée à moins de 2% chez le mouton, le porc et le chien, 3% chez le rat et 6% chez la souris dans une étude de comparaison interspécifique de la TK du BPA [47]. Des données similaires ont été obtenues par Doerge *et al.* chez le rat (2,8%) et chez le singe Rhésus (1%) [46, 52].

Cette faible biodisponibilité du BPA par voie orale associée à une absorption quasi-totale au niveau du tractus digestif suggère un fort effet de premier passage hépatique et/ou intestinal. Ainsi, le BPA est intensément métabolisé au niveau du foie et/ou de l'intestin avant de rejoindre la circulation générale.

II25. Métabolisme du BPA

Le métabolisme du BPA fait appel essentiellement à des réactions enzymatiques de phase II, consistant à ajouter un groupement hydrosoluble (acide glucuronide, groupement sulfate, glutathion, ...) au composé parent. Le foie reste l'organe principal de conjugaison et de métabolisation des xénobiotiques, même si des activités de conjugaison ont été décrites dans les intestins, les reins, les gonades ou encore le placenta. Ces réactions de conjugaison conduisent à la formation de composés hydrosolubles pouvant être ensuite éliminés par voie urinaire ou biliaire.

La principale voie de métabolisation du BPA est la glucuronoconjugaison, *i.e.* l'ajout d'un acide glucuronique à la molécule de BPA (Figure 6). La réaction est catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases (uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase (UGT)) et conduit donc à la formation du BPA-Glucuronide (BPA-G) avec un poids moléculaire de 404 g/mol (1.8 fois supérieur au poids moléculaire du BPA) [53].

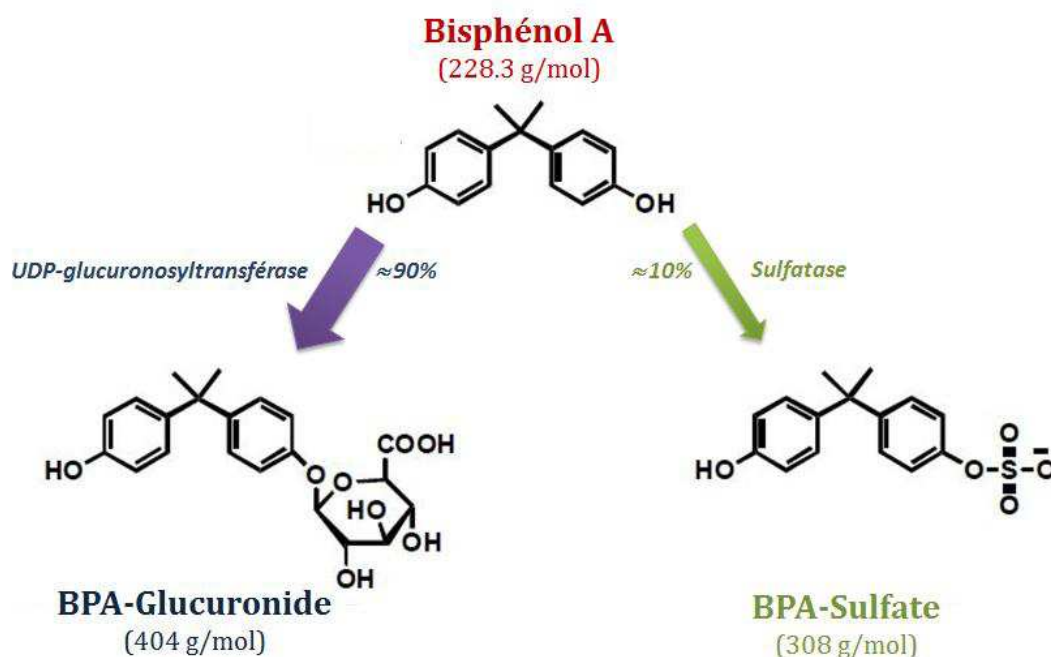


Figure 6. Principales réactions de conjugaison du BPA.

Les deux principaux métabolites du BPA décrits dans la littérature sont le BPA-Glucuronide (BPA-G) et le BPA-Sulfate (BPA-S).

La sulfoconjugaison du BPA, *i.e.* l'ajout d'un groupement sulfate, a également été décrite chez plusieurs espèces dont l'homme. La réaction est catalysée par les sulfotransférases (SULT) et conduit donc à la formation du BPA-Sulfate (BPA-S) avec un poids moléculaire de 308 g/mol (1.3 fois supérieur au poids moléculaire du BPA) (Figure 6). Néanmoins, sur des hépatocytes isolés incubés en présence de BPA, le BPA-S ne représenterait pas plus de 20%, 18% et 10% des métabolites formés respectivement chez le rat, le singe et l'homme [54].

Ces deux métabolites du BPA de nature hydrosoluble sont dépourvus par eux-mêmes de pouvoir œstrogénique [55]. Ces réactions de glucurono- et sulfoconjugaison constituent donc des mécanismes de détoxification de l'organisme vis-à-vis du xénobiotique.

Chez les rongeurs, notamment la souris, d'autres métabolites que le BPA-G et le BPA-S ont été identifiés après une administration de 50 mg/kg de ^3H -BPA. Il s'agit de métabolites di-conjugués, de conjugués méthylés, déshydratés et/ou hydroxylés, ainsi que des dérivés catéchols, identifiés dans les urines, les fèces, le foie et le tractus digestif [56]. *In vitro*, la formation d'isopropylhydroxyphenol (produit par le clivage du BPA), de

conjugués glutathion, et de dimères de BPA a été observée sur des fractions subcellulaires hépatiques (microsomes et S9) de souris incubées en présence de BPA [57].

A l'heure actuelle, ces métabolites n'ont pas été décrits chez l'homme. L'étude comparative de la toxicocinétique du BPA a montré que chez le mouton et le porc, plus de 98% du BPA administré par voie orale était métabolisé sous forme de BPA-G [47].

Les enzymes responsables de la conjugaison du BPA (UGT et SULT) sont présentes à la fois dans le foie et l'intestin. Toutefois, chez l'homme, l'intestin ne semble participer que très minoritairement au métabolisme du BPA. En effet, sur des microsomes hépatiques ou intestinaux incubés avec du BPA, la clairance intrinsèque intestinale, *i.e.* la capacité de métabolisation du BPA par l'intestin, est 80 fois plus faible que la clairance intrinsèque hépatique chez l'homme, alors que le rapport de l'activité métabolique entre le foie et l'intestin est seulement de 2 chez le rat [58].

Ainsi, le coefficient d'extraction hépatique calculé comme le rapport de la clairance plasmatique du BPA sur le débit sanguin du foie, qui représente la proportion de la dose qui sera épurée (*i.e.* métabolisée) au niveau du foie est proche de 1 chez l'homme. A partir de la clairance du BPA estimée entre 30-40 mL/(kg.min) [47-49] et du débit sanguin hépatique de l'ordre de 35 mL/(kg.min), le coefficient d'extraction hépatique est de l'ordre de 0.8 chez l'homme, ce qui signifie que 80% de la dose de BPA est métabolisée par effet de premier passage hépatique.

La différence de métabolisme du BPA entre les rongeurs et l'homme et notamment l'existence d'un cycle entéro-hépatique chez les rongeurs soulève la question de la pertinence en termes de PK de ces modèles animaux vis-à-vis de l'homme.

II26. Elimination du BPA

Avec une clairance plasmatique relativement élevée (80-90% du débit sanguin hépatique), le temps de demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$) du BPA est généralement inférieur ou égal à une heure, à la fois chez l'homme [48, 49] et dans des modèles animaux (rongeurs, mouton, porc, chien) [47]. Le BPA est rapidement métabolisé au niveau du foie en conjugués hydrosolubles qui pourront ensuite être éliminés de l'organisme par voie urinaire ou par voie fécale.

Chez l'homme, les deux études expérimentales de Volkel *et al.* ont montré qu'après une administration de d₁₆-BPA, la quasi-totalité de la dose se retrouvait dans les urines sous forme de BPA-G [44, 45]. Ils ont ainsi estimé la clairance plasmatique du BPA-G à environ 2 mL/(kg.min), soit à une valeur équivalente au débit de filtration glomérulaire, ce qui suggère que l'élimination du BPA-G chez l'homme est essentiellement rénale.

A l'inverse, chez le rat, seulement 20 à 40% de la dose de BPA administrée par voie orale est éliminée dans les urines sous forme de BPA-G, le reste de la dose étant excrété dans les fèces sous forme de BPA non-conjugué [59]. Cette différence dans les voies d'élimination du BPA-G entre les rongeurs et l'homme soulève à nouveau la question de la pertinence du modèle rongeur vis-à-vis de l'homme en termes de PK.

II27. Modélisation de la dose interne d'exposition au BPA

A partir des sources identifiées d'exposition au BPA et des paramètres pharmacocinétiques du BPA, il est possible d'estimer la dose interne d'exposition de la population humaine au BPA. Dans son rapport d'évaluation, l'ANSES a estimé les doses internes d'exposition au BPA, *i.e.* la quantité de BPA absorbée, via les différentes voies d'exposition (inhalation, cutanée, alimentaire) pour différentes populations : adultes, femmes enceintes et enfants de plus de 3 ans. Ces calculs ont pris en compte le taux d'absorption par inhalation estimé à 100% par défaut, le taux d'absorption cutané fixé à 27% à partir des études de pénétration cutanée du BPA sur des explants de peau (cf §II13) et la biodisponibilité du BPA par voie orale fixée à 3% sur la base notamment des données de Doerge *et al.* [17, 46]. Selon les calculs de l'ANSES, les enfants de plus de 3 ans et les femmes enceintes seraient les populations les plus exposées au BPA (Tableau 4).

Population	Dose interne estimée en µg/(kg.j)		
	Minimum	Maximum	Moyenne
Enfants (+ de 3 ans)	$2.50.10^{-4}$	$1.32.10^{-2}$	$2.46.10^{-3}$
Femmes enceintes	$2.20.10^{-4}$	$1.70.10^{-2}$	$1.97.10^{-3}$
Adultes	$2.60.10^{-4}$	$5.60.10^{-3}$	$1.34.10^{-3}$

Tableau 4. Estimation des doses internes d'exposition au BPA des enfants, des femmes enceintes et des adultes

Adapté de [17].

II3. Exposition de la population humaine au BPA : données de biosurveillance

Les études de biosurveillance décrivant l'exposition humaine au BPA se sont multipliées ces 15 dernières années. L'intérêt de ces études de biosurveillance est qu'elles permettent de connaître les niveaux circulants (plasma, sérum) et excrétés (urines) de BPA associés à une exposition environnementale.

L'exposition humaine au BPA est ubiquitaire. Ainsi, une étude américaine a montré que du BPA total était détecté dans plus de 90% des urines d'une population de référence (enfants, adolescents et adultes) de près de 2500 individus [60]. De même, le BPA a été détecté dans différents liquides et tissus biologiques : plasma, sérum mais également salive, liquide amniotique et lait maternel, tissu adipeux et placenta (voir revue [61]).

Les matrices les plus étudiées pour décrire l'exposition humaine sont les urines et le plasma ou le sérum. En général, les données sont exprimées en terme de BPA total (BPA aglycone + BPA conjugué), même si de plus en plus d'études déterminent la part du BPA conjugué en mesurant le BPA total avant et après hydrolyse enzymatique des conjugués par la β -glucuronidase. Cette méthode ne permet cependant pas de distinguer la part du BPA-G et du BPA-S.

La détermination des concentrations plasmatiques de BPA aglycone est particulièrement importante car cette forme non-conjuguée représente la forme active dotée d'une activité œstrogénique. Les concentrations urinaires permettent de déterminer la quantité de BPA absorbée par l'organisme, *i.e.* la dose interne d'exposition.

II31. Données urinaires

Le Tableau 5 présente les résultats des principales études de biosurveillance évaluant l'exposition humaine au BPA à partir de données urinaires. La majorité de ces études rapportent des taux de détection du BPA total entre 75 et 100%. Les concentrations urinaires de BPA total rapportées chez l'homme sont comprises en moyenne entre 1 et 10 ng/mL [61].

Année	Population	Effectif Sexe Age	Méthode analytique	LOD (ng/mL)	Taux de détection	Concentration urinaire (ng/mL) Moyenne géométrique ou [étendue]			Référence
						BPA Aglycone	BPA conjugué	BPA total	
2004	Chinoise	10 hommes 10 femmes	HPLC + détection fluorescence	2.7	60% 100%			[ND-395] [3-374]	[62]
2005	Américaine	184 hommes 210 femmes	GC-MS	0.1	96% 94%			1.63 1.12	[63]
2005	Américaine	9 filles de 9 ans 24 adultes	HPLC + détection par capture d'électron	0.5	89% 52%			2.4 (Méd) 0.47 (Méd)	[64]
2005	Allemande	6 adultes	HPLC-MS/MS	1.14	0%			<LOD	[45]
2008	Américaine	314 enfants 6-11 ans 713 adolescents 12-19 ans 950 adultes 20-59 ans 537 adultes >60 ans	HPLC-MS/MS	0.4	92.6% sur l'ensemble des échantillons			4.3 2.8 2.4 2.3	[60]
2008	Allemande	315 échantillons prélevés chez 203 adultes (collectés en 2005) 31 femmes 30 enfants 5-6 ans	SPE + HPLC-MS/MS	5 (LOQ) 0.3 0.3	0% NR NR	<LOQ [ND-2.5] [ND-0.9]		NR [ND-6.5] [ND-7.5]]	[65]
2008	Allemande	404 femmes enceintes	SPE + HPLC-MS/MS	0.36	90.8%			[ND-35.2]	[66]
2009	Allemande	137 enfants 3-5 ans 145 enfants 6-8 ans 149 enfants 9-11 ans 168 adolescents 12-14 ans	LC-MS/MS	0.25	99% sur l'ensemble des échantillons			3.55 2.72 2.22 2.42	[67]
2009	Américaine	41 enfants prématurés	SPE + HPLC-MS/MS	0.4	100% (BPA total) 92% (BPA aglycone)	[ND-17.3]		[1.6-946]	[68]
2012	Américaine	31 femmes et hommes de 11-66 ans	SPE + LC-MS/MS	0.01 (BPA aglycone) 0.05 (conjugués)	97% (BPA aglycone) 87% (BPA-G) 36% (BPA-diS*)	[ND-18.7] 0.701	BPA-G [ND-65.2] BPA-diS* [ND-6.16]		[69]
2013	Espagnole	479 femmes enceintes au 1 ^{er} trimestre et 3 ^{ème} trimestre de grossesse 130 enfants de 4 ans	LC-MS	0.1	100% 99.4% 100%			2.1 [ND-122.8] 1.8 [ND-103.7] 3.1 [0.5-33.3]	[70]

Tableau 5. Concentrations urinaires en BPA rapportées dans la population humaine à partir des études de biosurveillance.

LC : Chromatographie liquide ; GC : Chromatographie gazeuse ; HPLC : Chromatographie liquide à haute performance ; SPE : Extraction en phase solide ; MS : Spectrométrie de Masse ; ND : non-détectable ; NR : non-renseigné ; Méd : Médiane

* BPA-disulfate. Les auteurs ont également détecté dans moins de 20% des échantillons des dérivés chlorés du BPA (mono-, di- et trichlorés).

Seule l'étude de Volkel *et al.* ne met pas en évidence de BPA dans 6 échantillons urinaires analysés [45]. Le faible effectif d'échantillons et une limite de détection (LOD) relativement élevée (1.14 ng/mL) pourraient expliquer ce résultat contradictoire avec les autres études.

A l'inverse, deux études rapportent des concentrations de BPA total atteignant plusieurs centaines de ng/mL. Mao *et al.* en 2004 rapportent ainsi des concentrations urinaires jusque 0.4 µg/mL dans une cohorte chinoise de 10 hommes et 10 femmes [62]. Les concentrations urinaires les plus élevées de BPA total jusqu'à 0.95 µg/mL ont été observées dans une cohorte de 41 enfants américains prématurés [68]. Ces concentrations relativement élevées détectées chez ces enfants pourraient être liées à l'utilisation de dispositifs médicaux contenant du BPA.

Les niveaux moyens de BPA total détecté dans les urines semblent varier selon les tranches d'âges étudiées. Ainsi les études de Liu *et al.* et Calafat *et al.* ont mis en évidence des niveaux respectivement 5 et 2 fois plus élevés chez des enfants âgés de 6 à 11 ans par rapport à des individus adultes [60, 64]. Becker *et al.* en 2009 ont comparé les concentrations urinaires de BPA total chez des enfants et des adolescents allemands et ont montré que la moyenne géométrique des concentrations urinaires chez des enfants de 3 à 5 ans était 1.13 fois plus élevée que la moyenne des concentrations urinaires observée chez des adolescents de 12 à 14 ans (3.55 ng/mL vs. 2.42 ng/mL) [71]. Cependant, deux études de 2013 ont décrit respectivement des concentrations urinaires de BPA total de l'ordre de 0.5 ng/mL chez un groupe de 16 enfants italiens âgés de 6 à 14 ans [72] et de l'ordre de 0.9 ng/mL chez 12 nouveau-nés américains âgés de 7 à 44 jours allaités ou nourris avec du lait maternisé [73].

Le statut physiologique semble également modifier les concentrations urinaires. Ainsi, les concentrations urinaires de BPA total dans une population de 400 femmes américaines enceintes sont plus élevées que les concentrations détectées dans le reste de la population, avec des valeurs atteignant 35 ng/mL [66]. En 2013, une étude portant sur près de 500 femmes espagnoles enceintes rapporte des concentrations urinaires de BPA total comprises respectivement entre 0.1(LOD)-122.8 ng/mL et 0.1(LOD)-103.7 ng/mL au 1^{er} et 3^{ème} trimestre [70]. Cependant, il est difficile d'établir une relation entre les concentrations urinaires de BPA et la grossesse en l'absence de suivi de ces femmes

enceintes avant la grossesse ou de comparaison avec un groupe témoin suivi en parallèle.

La plupart des études de biosurveillance évaluant l'exposition humaine au BPA à partir d'échantillons urinaires ne déterminent que les concentrations urinaires en BPA total. Pour la première fois en 2012, la part des deux conjugués majoritaires du BPA, le BPA-G et le BPA-S ont été quantifiés sur des échantillons urinaires (n=31). Le BPA-G, le BPA-S et le BPA aglycone ont représenté respectivement 57%, 7% et 32% du BPA total détecté dans l'urine [69]. Cependant, cette part importante de BPA dans les urines n'a pas été retrouvée par Harthé *et al.* en 2013 qui ont montré que le BPA-G représentait 80% du BPA total dans les urines de 24 patients français [74].

II32. Estimation de la dose journalière absorbée à partir des données urinaires

Les données urinaires permettent de déterminer l'exposition humaine au BPA : en effet, en admettant que la quasi-totalité du BPA absorbé est éliminée dans les urines, le taux quotidien d'entrée du BPA dans l'organisme (dose interne d'exposition) peut être estimé par le produit des concentrations urinaires moyennes de BPA total et du volume d'urines produites pendant 24 heures.

Ainsi, la dose journalière absorbée décrite dans la littérature ces dernières années a été estimée à une valeur comprise entre 10 et 100 ng/(kg.j) [17].

La corrélation entre l'estimation de la dose journalière absorbée à partir des données urinaires et l'estimation à partir des sources d'exposition (§II14) a été évaluée par Morgan *et al.* en 2011 pour un groupe de 81 enfants américains. Ils ont montré que la dose interne journalière moyenne estimée à partir des échantillons urinaires de ces enfants était de 197 ng/(kg.j). En tenant compte de l'environnement et des habitudes alimentaires de ces enfants, ils ont estimé une dose interne d'exposition de l'ordre de 157 ng/(kg.j) [75]. Les deux méthodes apportent donc une estimation concordante de la dose interne journalière.

II33. Données plasmatiques ou sériques

Les concentrations plasmatiques (ou sériques) en BPA non-conjugué rapportées dans la littérature chez des adultes sains sont généralement de l'ordre du nanogramme

par millilitre (revue [61]). Le taux de détection du BPA dans les échantillons plasmatiques est plus faible que dans les urines et certaines études n'ont pas mis en évidence de BPA aglycone dans leurs échantillons [45, 76]. De la même manière que dans les urines, il semble que la forme majoritaire dans le sang soit le BPA-G. Liao et Kannan dans leur étude en 2012 ont montré que le BPA-G représentait 46% du BPA total sérique alors que le BPA aglycone et le BPA-S ne représenteraient respectivement que 20% et 34% [69].

Certaines études indiquent une prévalence élevée de l'exposition interne au BPA des femmes enceintes. Ainsi, Lee *et al.*, Padmanabhan *et al.* et Zhang *et al.* rapportent des concentrations plasmatiques en BPA (BPA total pour Lee *et al.* 2008, et BPA aglycone pour Padmanabhan *et al.* 2008 et Zhang *et al.* 2013) atteignant respectivement 66.68, 22.23 et 29.0 ng/mL au moment de l'accouchement [77-79]. Ces valeurs élevées sont toutefois à considérer avec précaution et pourraient être dues à l'environnement médical de ces femmes au moment de l'accouchement, notamment *via* le matériel de perfusion susceptible de contenir du BPA.

II34. Incohérence entre les données issues des études de biosurveillance et l'exposition interne estimée

Lors d'expositions relativement régulières au BPA, l'exposition interne (*i.e.* les concentrations plasmatiques) peut être estimée à partir de la clairance du BPA et de la dose d'exposition interne estimée à partir des données urinaires ou des scénarios d'exposition des agences réglementaires, grâce à l'équation suivante :

$$\text{Exposition interne} = \frac{\text{Dose interne}}{\text{Clairance}} \quad \text{Équation 1}$$

Ainsi, en admettant une dose interne de la population d'environ 100 ng/(kg.j) et une clairance du BPA de l'ordre de 30 mL/(kg.min) [47-49], l'exposition interne estimée serait de l'ordre de 2 pg/mL, soit une valeur 500 fois plus faible que les valeurs de concentrations plasmatiques rapportées dans la littérature (revue [61]).

L'adéquation entre la dose interne estimée à partir des différentes sources d'exposition et les quantités de BPA retrouvées dans les urines (correspondant à la dose

de BPA absorbée) suggère que les concentrations plasmatiques sont surestimées. Cette surestimation des concentrations plasmatiques pourrait être liée :

- à un biais analytique. En effet, les concentrations plasmatiques sont souvent proches des LOQ des méthodes analytiques et pourraient donc être mal estimées,
- à une hydrolyse des composés conjugués au cours de la préparation des échantillons ou du dosage,
- à une contamination des échantillons au moment du prélèvement ou du traitement,
- à un manque de spécificité de certaines méthodes analytiques (dosage ELISA, chromatographie phase gazeuse ou liquide, spectrométrie de masse).

Une autre hypothèse serait que des pics de concentrations plasmatiques élevés puissent survenir temporairement et que la voie oro-gastrique ne serait pas la seule voie d'entrée du BPA. Ainsi, une étude récente réalisée au laboratoire a montré que la voie sublinguale pourrait être à l'origine des concentrations plasmatiques élevées. En effet, en administrant du BPA par voie sublinguale chez le chien, l'AUC (aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA) est 100 fois plus élevée que celle observée après une administration orale de BPA [80]. Ainsi l'absorption du BPA par voie sublinguale entraîne une exposition interne plus élevée au BPA aglycone en court-circuitant de l'effet de premier passage hépatique.

II4. L'exposition fœtale au BPA

A l'heure actuelle, les données d'exposition fœtale au BPA associées aux expositions maternelles sont limitées et ont été évaluées à travers les concentrations en BPA dans le sang de cordon ombilical, dans le liquide amniotique et dans le placenta.

II41. Le sang du cordon ombilical et le ratio materno-fœtal

La comparaison des niveaux de BPA total détecté dans le sang de cordon et dans le plasma maternel permet d'apprécier le degré d'exposition du fœtus en fonction de l'exposition de sa propre mère. Les principales données de biosurveillance disponibles sont présentées dans le Tableau 6.

Le rapport entre les concentrations maternelles et fœtales est relativement variable, certaines études rapportent un rapport moyen supérieur à 1, *i.e.* des concentrations plasmatiques supérieures dans le plasma maternel [77, 81], d'autres au contraire rapportent des concentrations supérieures dans le plasma fœtal [82, 83]. Cependant, ces études sont souvent limitées en nombre d'échantillons et évaluent rarement le rapport de concentrations pour un couple mère-fœtus mais comparent uniquement les moyennes des concentrations entre les plasmas maternels et fœtaux.

Récemment, les niveaux de BPA, BPA-G et BPA-S ont été déterminés dans des échantillons de sang de cordon à l'issue d'interruption médicale de grossesse pendant le deuxième trimestre de grossesse [84]. Les auteurs ont montré ainsi que le BPA aglycone, le BPA-G et le BPA-S sont détectés respectivement, dans 47, 76 et 96% des échantillons avec des niveaux extrêmement variables pour le BPA (<0.05-52.26 ng/mL) et le BPA-S (<0.025-9.37 ng/mL) ; les niveaux de BPA-G s'étendent de la LOD (0.05 ng/mL) jusqu'à 3.05 ng/mL. En moyenne, le BPA aglycone, le BPA-G et le BPA-S représentent respectivement 36, 19 et 45% du BPA total (aglycone + conjugués). De plus, dans 75% des échantillons, les niveaux de concentrations des conjugués sont supérieurs aux niveaux de concentrations de BPA aglycone [84].

II42. Le placenta

Schonfelder *et al.* en 2002 ont évalué les concentrations de BPA aglycone dans 37 échantillons de placenta à terme. Ils ont ainsi détecté du BPA dans tous les échantillons avec une étendue de 1 à 105 ng/g de tissu et une valeur moyenne de 11 ng/g [81]. Une étude menée sur une cohorte espagnole a détecté du BPA aglycone dans 20% des échantillons de placenta avec une étendue de 0.7 ng/g à 34.9 ng/g [85]. Cao *et al.* en 2012 ont analysé 128 échantillons placentaires collectés entre 1999 et 2008 entre 8 et 20 semaines de grossesse à partir d'une cohorte québécoise : du BPA aglycone a été détecté sur 88% des échantillons avec une moyenne de 12.6 ng/g (étendue 0.55-165 ng/g). Le BPA total a été dosé après hydrolyse enzymatique sur 54 des 128 échantillons, le BPA-G a été détecté dans 50 échantillons avec une valeur moyenne de 17.2 ng/g (étendue 0.10-178 ng/g) [86].

Année	Population	Effectif/échantillons	Méthode analytique	LOD (ng/mL)	Taux de détection	Concentration BPA (ng/mL) Moyenne ± écart-type [étendue]			Référence
						BPA Aglycone	BPA Conjugué	BPA Total	
2002	Japonaise	37 femmes 1 ^{er} trimestre	ELISA	0.5	NR	1.5 ± 0.197			[82]
		37 femmes 3 ^{ème} trimestre			NR	1.4 ± 0.148			
		32 sang de cordon			NR	2.2 ± 0.318			
2002	Allemande	37 sang de cordon	GC-MS	0.01	100%	2.9 ± 0.411 [0.2-9.2]			[81]
		+ sérum maternel			100%	4.4 ± 0.641 [0.3-18.9]			
2003	Japonaise	9 sang de cordon	HPLC	0.04	100%	0.62 ± 0.13 [0.45-0.76]			[83]
		+ sérum maternel			100%	0.46 ± 0.20 [0.21-0.79]			
2003	Malaysienne	180 sang de cordon	GC-MS	0.05	88%			[ND-4.05]	[87]
2008	Coréenne	300 sang de cordon	HPLC-GC-MS	0.625	40%			1.13 ± 0.08 [ND-8.86]	[77]
		+ sérum maternel			84%			9.04 ± 0.81 [ND-66.48]	
2012	Française	106 sang de cordon (garçons groupe contrôle)	RIA	0.08	100%	1.12 ± 0.86* [0.14-4.76]			[88]
		46 sang de cordon (garçons cryptorchides)			100%	1.26 ± 1.13 [0.14-4.75]			
2013	Américaine	85 sang de cordon de fœtus de 13-24 SG	LC-MS/MS	<u>BPA+BPA-G</u>	47% (BPA)	MG 0.16	<u>BPA-G</u>	MG 0.79	[84]
				0.05	76% (BPA-G)	[ND-52.26]	MG 0.14	[0.08-62.77]	
				<u>BPA-S</u> 0.025	96% (BPA-S)		[ND-5.41] <u>BPA-S</u> MG 0.32 [ND-12.65]		

Tableau 6. Concentrations en BPA dans le sang de cordon ombilical et le serum maternel rapportées dans la littérature.

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; LC : Chromatographie liquide ; GC : Chromatographie gazeuse ; HPLC : Chromatographie liquide à haute performance ; MS : Spectrométrie de Masse ; RIA : RadioImmuno Assay ; ND : non-déTECTable ; NR : non-renseigné ; MG : Moyenne géométrique ; Méd : Médiane

II43. Le liquide amniotique

Les concentrations de BPA dans le liquide amniotique ont été évaluées à différents stades de la grossesse. Ainsi Ikezuki *et al.* en 2002 ont détecté des concentrations de BPA aglycone 8 fois plus élevées dans le liquide amniotique en début de grossesse (15-18 semaines de grossesse) comparativement à celles mesurées à terme (8.3 ng/mL vs 1.1 ng/mL) [82]. Les auteurs suggèrent que le fœtus en début de grossesse serait plus exposé au BPA non conjugué du fait de capacités limitées de métabolisation. Cependant une étude publiée en 2012 rapporte des concentrations nettement plus faibles dans le liquide amniotique : au second trimestre de grossesse, du BPA a ainsi été détecté dans 16 échantillons sur 20 avec une étendue de valeurs de concentrations de BPA total variant du non-détectable (LOD = 0.1 ng/mL) à 0.75 ng/mL, du BPA aglycone a été détecté dans 9 de ces échantillons (étendue 0.31-0.43 ng/mL). Au troisième trimestre, du BPA a été détecté dans 2 échantillons sur 20 et seulement 1 échantillon présentait une concentration de BPA totale supérieure à la LOQ (0.42 ng/mL) [89]. Les auteurs suggèrent que le BPA-G ne représenterait qu'une faible proportion du BPA total présent dans le liquide amniotique (entre 9 et 17%). Ces résultats obtenus chez l'homme sont en contradiction avec les données expérimentales obtenues sur des modèles animaux (rongeurs, primates non-humains, ovins) montrant des niveaux de BPA-G supérieurs aux niveaux de BPA aglycone dans le liquide amniotique [56, 90, 91].

II44. Transfert placentaire du BPA et du BPA-G

Le transfert placentaire du BPA a été évalué *ex vivo* en utilisant le modèle du placenta humain perfusé. En 2010, Morck *et al.* et Balakrishnan *et al.* ont ainsi estimé le taux de transfert placentaire materno-fœtal du BPA à 19% et 27% après avoir perfusé du BPA aux concentrations respectives de 114 ng/mL et 10 ng/mL pendant 150 et 180 minutes [37, 92].

In vivo, Nishikawa *et al.* ont montré que 0.09% d'une dose de 800 ng/mL (2 µM) de BPA-G perfusée dans l'artère utérine de rattes gravides était transféré aux fœtus. Les auteurs ont également détecté du BPA aglycone dans le fœtus et le liquide amniotique

(5.5% et 33% de la dose transférée en équivalent molaire), suggérant une hydrolyse du conjugué au niveau du placenta et/ou du compartiment fœtal [93].

II45. Toxicocinétique du BPA chez le fœtus : données expérimentales chez l'animal

Il existe peu de données sur la toxicocinétique du BPA dans le compartiment fœtal. Quelques études ont déterminé le devenir du BPA après une administration maternelle chez des animaux gravides en utilisant principalement des modèles rongeurs.

Le BPA est rapidement transféré au compartiment fœtal après une administration i.v. maternelle de BPA. Shin *et al.* ont montré que la concentration fœtale maximale était atteinte 36 minutes après une administration i.v. de 2 mg/kg de BPA à des rattees gravides (17-19 jours de gestation). Le rapport fœto-maternel des AUC_{0-8h} était de 2 et le $t_{1/2}$ n'a pas été différent chez les rats femelles et chez les fœtus (2.5 vs 2.2 heures) [94]. Zalko *et al.* en 2003 ont montré que 4.13% de la dose de BPA administrée par voie sous-cutanée (25 µg/kg) à des souris à 17 jours de gestation était détectée dans l'ensemble des fœtus de la portée (% de la radioactivité administrée) 24 heures après l'administration [56].

Le stade de gestation influence aussi la disposition du BPA dans l'unité foeto-placentaire. Ainsi, Doerge *et al.* ont montré une augmentation du rapport entre les concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G chez le fœtus après une administration i.v. de BPA à la dose de 100 µg/kg chez des rats femelles gravides aux stades 12, 16 et 20 jours de gestation, alors que ce rapport n'est pas modifié chez les mères [95]. Cette étude suggère une apparition progressive au cours du temps des activités métaboliques chez le fœtus de rat.

L'exposition interne fœtale au BPA-G est élevée, notamment en fin de gestation [90, 91]. Chez le singe rhésus, Patterson *et al.* ont montré que le rapport entre les AUC_{0-8h} du BPA-G et du BPA chez le fœtus était de 64 après une administration i.v. de 100 µg/kg de *d*₆-BPA à des femelles gravides (121-139 jours de gestation, terme à 165 jours). De plus, le rapport fœto-maternel des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G était respectivement de 0.45 et 4.4 [90]. Le $t_{1/2}$ du BPA-G dans le compartiment fœtal a été estimé à 5.3 heures. De même chez le mouton, Viguié *et al.* ont montré que

l'administration répétée de BPA à la dose de 5 mg/(kg.j) par voie sous-cutanée du 28^{ème} jour de gestation jusqu'au terme (145 jours) conduisait au moment de la délivrance (césarienne programmée) à un rapport BPA-G/BPA respectivement de 1380 et 1331 dans le sang de cordon et dans le liquide amniotique. Le rapport fœto-maternel des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G était respectivement de 0.7 et 28 [91].

Ainsi, ces données montrent que la principale source d'exposition de la population humaine est l'alimentation. Le BPA est rapidement et presque entièrement absorbé, puis efficacement métabolisé au niveau du foie en conjugués hydrosolubles éliminés ensuite dans les urines.

Chez les femmes enceintes, le BPA est capable de franchir la barrière placentaire conduisant à une exposition du fœtus. Cette exposition fœtale dépend des échanges placentaires entre la mère et le fœtus et de la capacité de détoxification du fœtus.

Les caractéristiques physiologiques et métaboliques de l'unité fœto-placentaire nécessaire à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'exposition du fœtus sont décrites dans la troisième partie.

III. La physiologie fœtale et les échanges materno-fœtaux

Le degré d'exposition du fœtus est dépendant de l'exposition de sa mère, du transfert placentaire depuis la circulation maternelle vers la circulation fœtale et vice-versa, et enfin de ses propres capacités de métabolisation et/ou d'élimination des toxiques. Afin d'évaluer les mécanismes impliqués dans l'exposition du fœtus aux PE, il est nécessaire de comprendre les échanges placentaires materno-fœtaux mais aussi fœto-maternels et le devenir des xénobiotiques dans le compartiment fœto-placentaire.

III1. Le placenta et les échanges materno-fœtaux

Chez les mammifères euthériens (mammifères hors marsupiaux et monotrèmes), le placenta est un organe autonome, transitoire et évolutif d'échanges entre la mère et le fœtus. Il assure l'approvisionnement du fœtus en oxygène et en nutriments et sa protection en jouant le rôle de filtre sélectif et en permettant l'évacuation de déchets depuis le compartiment fœtal. Il remplit ainsi chez le fœtus les fonctions assurées par les poumons, les reins, l'intestin chez l'adulte. Le développement du placenta commence très tôt au cours de la gestation dès l'invasion de l'endomètre par le blastocyste, soit 6-7 jours post-conception chez l'homme et à 17 jours post-conception chez la brebis au moment de l'apposition du blastocyste à l'endomètre.

III11. Structure du placenta

La formation du placenta est liée à une apposition du trophoblaste (couche externe du blastocyste) sur la muqueuse utérine. C'est cette apposition plus ou moins profonde et invasive qui détermine les différents types histologiques de placentation. Ainsi, le nombre de couches cellulaires séparant les circulations sanguines maternelle et fœtale est fonction du degré d'invasion du trophoblaste et du degré de destruction de l'épithélium utérin. Grosser, en 1909, a ainsi classé les placentas de mammifères en trois types [96] : la placentation la moins invasive où l'on retrouve le maximum de couches cellulaires séparant les deux circulations sanguines, est appelée épithéliochoriale et concerne les équidés et les suidés. La circulation sanguine maternelle est séparée de la circulation fœtale par l'endothélium vasculaire maternel, le tissu conjonctif

(mésenchyme utérin), l'épithélium utérin puis l'épithélium fœtal (trophoblaste), le tissu conjonctif (mésoderme fœtal) et enfin l'endothélium vasculaire fœtal (Tableau 7).

Chez les ruminants, il existe une érosion partielle de la muqueuse utérine, diminuant localement le nombre de couches cellulaires séparant les deux circulations. Une couche syncytiale se forme à partir de l'épithélium utérin et du trophoblaste par fusion de cellules binucléées du trophoblaste avec des cellules utérines [97]. Ce type de placentation est appelé placentation syndesmochoriale ou synépithéliochoriale (Tableau 7). La placentation endothéliochoriale des carnivores quant à elle conserve l'endothélium vasculaire qui vient directement au contact du trophoblaste.

Enfin, chez les primates et les rongeurs, la placentation est dite hémochoriale et est caractérisée par le contact direct du trophoblaste avec la circulation sanguine du fait de l'érosion importante de la muqueuse utérine et de l'endothélium vasculaire maternel (Tableau 7).

		Placentation			
		Epithéliochoriale	Syndesmochoriale	Endothéliochoriale	Hémochoriale
Tissus maternels	Endothélium vasculaire	+	+	+	-
	Tissu conjonctif	+	+	-	-
	Epithélium utérin	+	+/-	-	-
Tissus fœtaux	Trophoblaste	+	+	+	+
	Tissu conjonctif	+	+	+	+
	Endothélium vasculaire	+	+	+	+
Espèces		<i>Jument, Truie</i>	<i>Vache, Brebis, Chèvre</i>	<i>Chatte, Chienne</i>	<i>Femme, Rongeurs, Primates</i>

Tableau 7. Les différents types histologiques de placentas.

+ : couche cellulaire présente ; - : couche cellulaire absente ; +/- : couche cellulaire en partie érodée. D'après [96]

Dans cette partie, nous détaillerons plus particulièrement la placentation ovine et humaine du fait de l'utilisation dans notre projet du modèle intégratif ovin et du modèle de placenta humain perfusé.

Chez les ovins, la placentation est donc syndesmochoriale et le placenta se présente sous forme cotylédonnaire, *i.e.* les structures d'échange materno-fœtales sont délimitées sous forme de placentomes. On dénombre 60 à 80 placentomes par placenta (Figure 7-A,B). Le poids du placenta augmente pendant les trois premiers mois de gestation puis se stabilise pour atteindre environ 300-400 g au moment du terme [98]. Chaque placentome est approvisionné par une veine et une artère choriale. Les veines et les artères de chaque placentome se regroupent pour donner respectivement deux veines ombilicales et deux artères ombilicales qui s'entremêlent pour former le cordon ombilical. Le placentome est formé d'une partie fœtale, le cotylédon qui correspond à l'épithélium chorial et d'une partie maternelle appelée caroncule, correspondant à un épaissement local de l'épithélium utérin, ces deux unités au sein du placentome forment des villosités interdigitées (Figure 7-D). Cette organisation en villosités permet d'augmenter la surface d'échange. Au niveau de ces villosités maternelles, on peut observer des lacs sanguins où s'accumule du sang maternel venant au contact direct du trophoblaste au niveau de zones d'érosion de la muqueuse utérine et de l'endothélium vasculaire maternel, ce qui réduit chez cette espèce la distance qui sépare les circulations maternelle et fœtale, caractéristique histologique qui permet de rapprocher la placentation ovine syndesmochoriale de la placentation humaine hémochoriale [99, 100].

Chez l'homme, la placentation est de type discoïde. Le placenta se présente sous la forme d'un disque d'environ 20 cm de diamètre et de 3 cm d'épaisseur (Figure 7-A,C). Comme pour la placentation cotylédonnaire, on distingue au niveau du placenta humain des sous-unités fonctionnelles indépendantes appelées cotylédons. Le placenta humain à terme compte 10 à 40 cotylédons séparés latéralement les uns des autres par des septa placentaires (Figure 7-E) [101]. Le cotylédon est composé d'un arbre vilieux constitué de capillaires fœtaux, d'un stroma et d'une couche cellulaire trophoblastique (formée du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste issu de la fusion de cellules cytotrophoblastiques). Du fait de l'importante destruction de l'épithélium utérin, l'arbre vilieux est directement au contact du sang maternel [102]. Comme chez le mouton, chaque arborescence est irriguée côté fœtal par une artère et une veine choriale se regroupant toutes au niveau du plateau chorial pour former le cordon ombilical composé chez l'homme d'une veine et de deux artères.

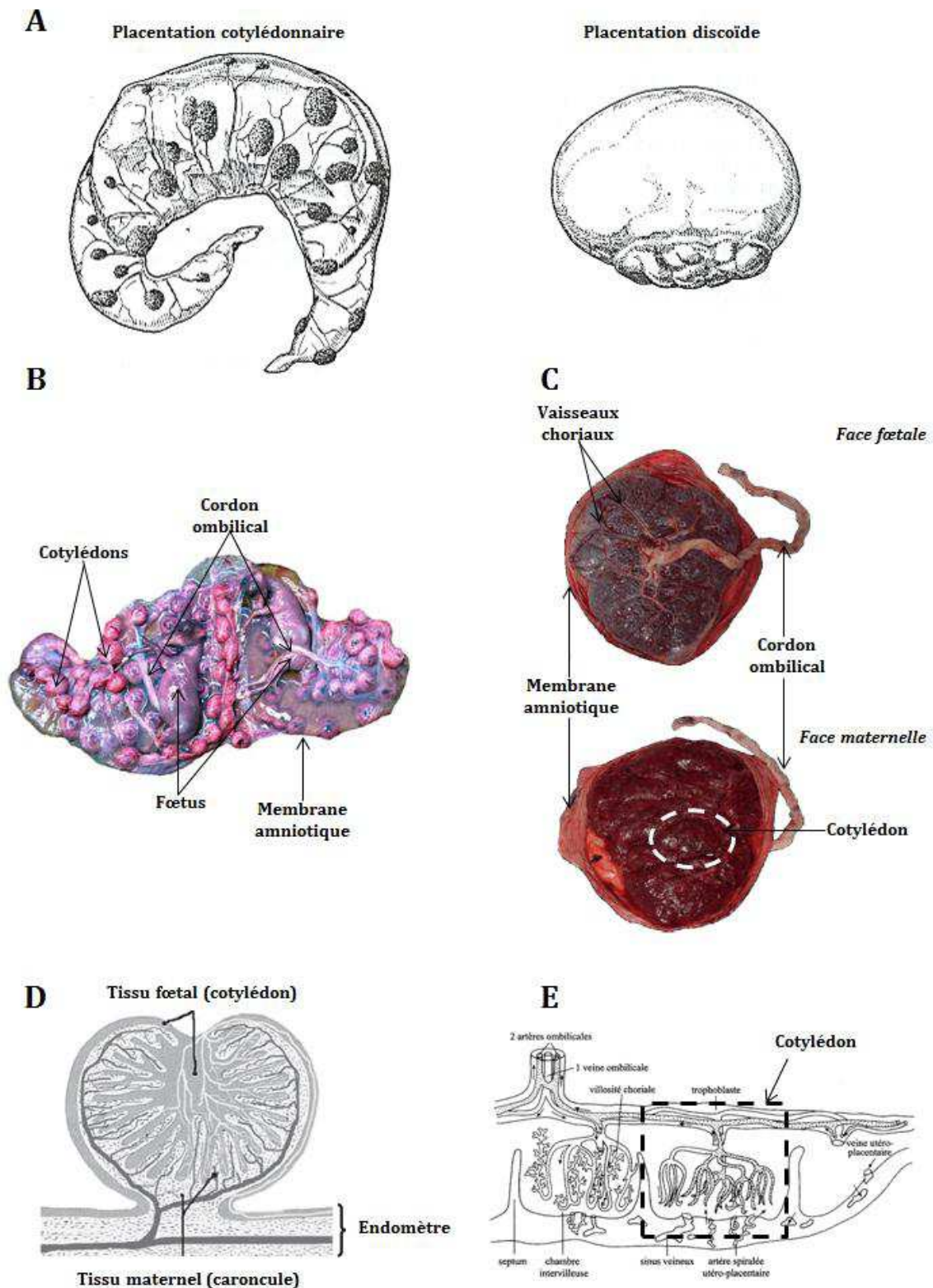


Figure 7. Placentation cotylédonnaire ovine et discoïde humaine.

A, Représentation schématique d'un placenta cotylédonnaire (à gauche) et d'un placenta discoïde (à droite) [103]. B, Placenta ovin (gestation double) [104]. C, Placenta humain face fœtale et face maternelle [105]. D, Détail d'un cotylédon ovin [106]. E, Détail d'un placenta humain [103].

III12. Les échanges materno-fœtaux

Les transferts de molécules ou substances à travers le placenta peuvent se faire selon quatre processus : la phagocytose ou la pinocytose, la diffusion passive ou facilitée et le transport actif [101]. Cependant, la phagocytose et la pinocytose ne représentent qu'un processus relativement mineur par rapport à la diffusion ou au transport actif [102].

Par la suite, nous détaillerons en particulier les mécanismes de la diffusion passive et du transport actif qui participent principalement au transfert placentaire des xénobiotiques.

a) Diffusion passive

La diffusion passive est dépendante d'un gradient de concentration qui s'établit entre les deux circulations, elle ne requiert pas d'énergie et n'est pas saturable. Elle concerne notamment le transfert de l'oxygène mais aussi de certaines molécules de faible poids moléculaire (<600 Da), suffisamment liposolubles et non-ionisées. La diffusion passive est décrite par la loi de Fick (Equation 2) où le taux de diffusion (V_{diff} , moles/s) est fonction des concentrations dans les circulations fœtales et maternelles (C_F et C_M , moles/cm³), de la surface d'échange (S , cm²), de l'épaisseur du placenta (a , cm) et du coefficient de diffusion de la molécule (D , cm²/s) :

$$V_{diff} = \frac{D \times S \times (C_M - C_F)}{a} \quad \text{Équation 2}$$

La diffusion d'une substance à travers le placenta est également dépendante des débits sanguins placentaires (utérin et ombilical), du pH du sang maternel et fœtal, des propriétés physicochimiques de la substance et de sa liaison aux protéines plasmatiques.

Les changements morphologiques que subira le placenta au cours de la grossesse, telles que l'augmentation de la surface d'échange (de 3.4 m² à 28 semaines de grossesse à 12.6 m² à terme chez l'homme), la diminution de distance séparant la circulation fœtale du sang maternel (de 50-100 µm en début de grossesse à 4-5 µm à terme chez l'homme) et l'augmentation du débit sanguin utérin (de 50 mL/min à 10 semaines de

grossesse à 600 mL/min en fin de gestation chez l'homme), auront un impact important également sur les processus d'échanges materno-fœtaux [102].

b) Diffusion facilitée

La diffusion facilitée nécessite la présence de transporteurs placentaires spécifiques mais ne nécessite pas d'énergie. Il s'agit d'un système saturable. Ainsi, la diffusion facilitée concerne notamment le transfert placentaire du glucose depuis la circulation maternelle vers le compartiment fœtal, et met en jeu les protéines de transport spécifiques du glucose, Glut-1 et Glut-3, présentes dans les cellules endothéliales fœtales et dans les membranes du syncytiotrophoblaste chez l'homme et le mouton [99, 107-109].

c) Transport actif

Le transport actif de substances à travers le placenta met en jeu des transporteurs spécifiques et nécessite de l'énergie, généralement issue de l'hydrolyse de l'ATP ou provenant d'un gradient électrochimique apporté par les ions Na^+ , Cl^- ou H^+ [102]. Les substances ionisées, relativement hydrosolubles ou de poids moléculaire important sont ainsi prises en charge par des transporteurs pour permettre leur transfert à travers la barrière placentaire. Si l'expression des transporteurs au niveau du placenta humain est bien décrite, il existe peu de données chez le mouton. La majorité des transporteurs exprimés au niveau du placenta appartiennent à deux grandes familles : la famille des ABC Transporters (ATP-Binding Cassette) et la famille des SLC Transporters (Solute Carrier) [102, 110-112].

Parmi les ABC Transporters, les plus importants sont la P-glycoprotéine, protéine d'efflux de la famille des Multidrug resistance Protein (P-gp/MDR-1), les membres de la famille des MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) (MRP1, 2, 3 et 5) et BCRP (Breast Cancer Resistant Protein). Les SLC transporters sont représentés par les membres de la famille des OATP (Organic Anion-Transporting polypeptide), des OAT (Organic Anion Transporter) et par des transporteurs de cations organiques (Noradrenaline transporter (NET), Serotonin transporter (SERT), Organic cation transporter (OCTN)) (Figure 8).

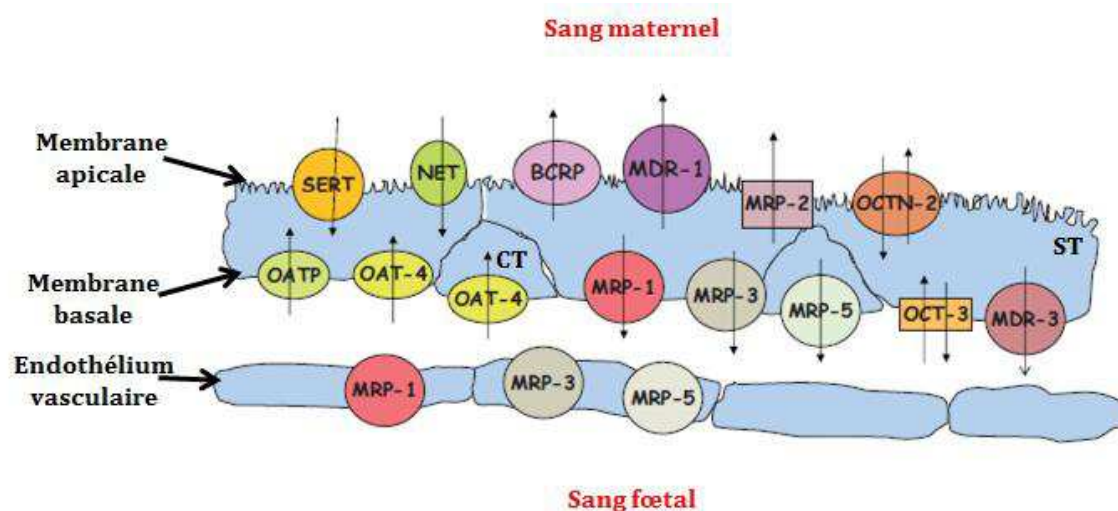


Figure 8. Localisation des principaux transporteurs exprimés au niveau du placenta humain.

CT, cytotrophoblaste. ST, syncytiotrophoblaste. BCRP, breast cancer resistance protein. MDR, multidrug resistance protein. MRP, multidrug resistance-associated protein. NET, noradrenalin transporter. OAT, organic anion transporter. OATP, organic anion-transporting polypeptide. OCTN, organic cation transporter. SERT, serotonin transporter. (Modifié d'après [110]).

P-gp (MDR-1), BCRP et MRP2 sont localisés sur la membrane apicale (orientée vers le côté maternel), suggérant un efflux du compartiment foetal vers la circulation maternelle (Figure 8).

La P-gp, protéine membranaire d'efflux accepte généralement comme substrats des molécules organiques non-chargées, faiblement basiques d'une taille comprise entre 200 et 1900 Dalton [113]. La localisation apicale de P-gp suggère un rôle dans la protection du fœtus en transportant activement toute substance (médicaments, xénobiotiques) vers la circulation maternelle [110] et en limitant l'accès des substrats de cette pompe d'efflux au compartiment foetal [111]. BCRP prend en charge les composés conjugués exogènes mais également endogènes tels que certains sulfo ou glucurono-conjugués stéroïdiens [114]. D'après Evseenko *et al.*, BCRP est exprimé à la fois au niveau syncital et endothélial permettant un transfert bidirectionnel de ces substrats. Les autres membres de la famille des MRP (MRP1, 3 et 5) sont essentiellement présents sur l'endothélium vasculaire foetal et sur la membrane basale du syncytiotrophoblaste [111].

Ces transporteurs interviennent dans la protection du fœtus vis-à-vis des xénobiotiques en limitant leur pénétration vers le compartiment foetal, mais également

en garantissant l'exportation vers le compartiment maternel soit des déchets du fœtus lui-même, soit de substances d'origine maternelle ayant traversé le placenta.

L'expression de certains transporteurs (P-gp, BCRP) diminue au cours de la gestation [110]. L'expression plus forte en début de gestation pourrait permettre d'assurer la protection du fœtus au début de son développement, mais pourrait entraîner une exposition accrue du fœtus aux toxiques et aux xénobiotiques en fin de gestation.

III2. La circulation sanguine fœtale

La dynamique de la circulation fœto-placentaire, adaptée transitoirement à la vie in utero est très différente de celle de l'adulte. La circulation sanguine fœtale est caractérisée par trois court-circuits, appelés shunt, qui permettent de satisfaire 3 impératifs de la circulation fœtale :

- privilégier le cerveau et le cœur, grands consommateurs d'oxygène
- court-circuiter le poumon (où les résistances vasculaires sont élevées)
- assurer un débit sanguin maximal au niveau du placenta où les résistances vasculaires sont basses.

La Figure 9 présente schématiquement la circulation sanguine fœtale avec les débits des différents organes à la fois chez le fœtus humain et le fœtus ovin.

Alors que chez l'adulte, les poumons sont l'organe de l'hématose, c'est le placenta qui joue ce rôle chez le fœtus en captant l'oxygène (O_2) de la circulation maternelle. Le sang fœtal pauvre en O_2 arrive au placenta par les artères ombilicales avec un débit d'environ 300 mL/min et 550 mL/min respectivement chez le fœtus humain et le fœtus ovin, ce qui représente 50% du débit cardiaque fœtal (débit cardiaque combiné, DCC) [115]. Le sang fœtal va alors s'oxygéner par simple diffusion passive à partir de l' O_2 présent dans le sang maternel qui arrive au placenta par l'artère utérine à un débit de 600 mL/min et 1000 mL/min respectivement chez la femme et la brebis [115].

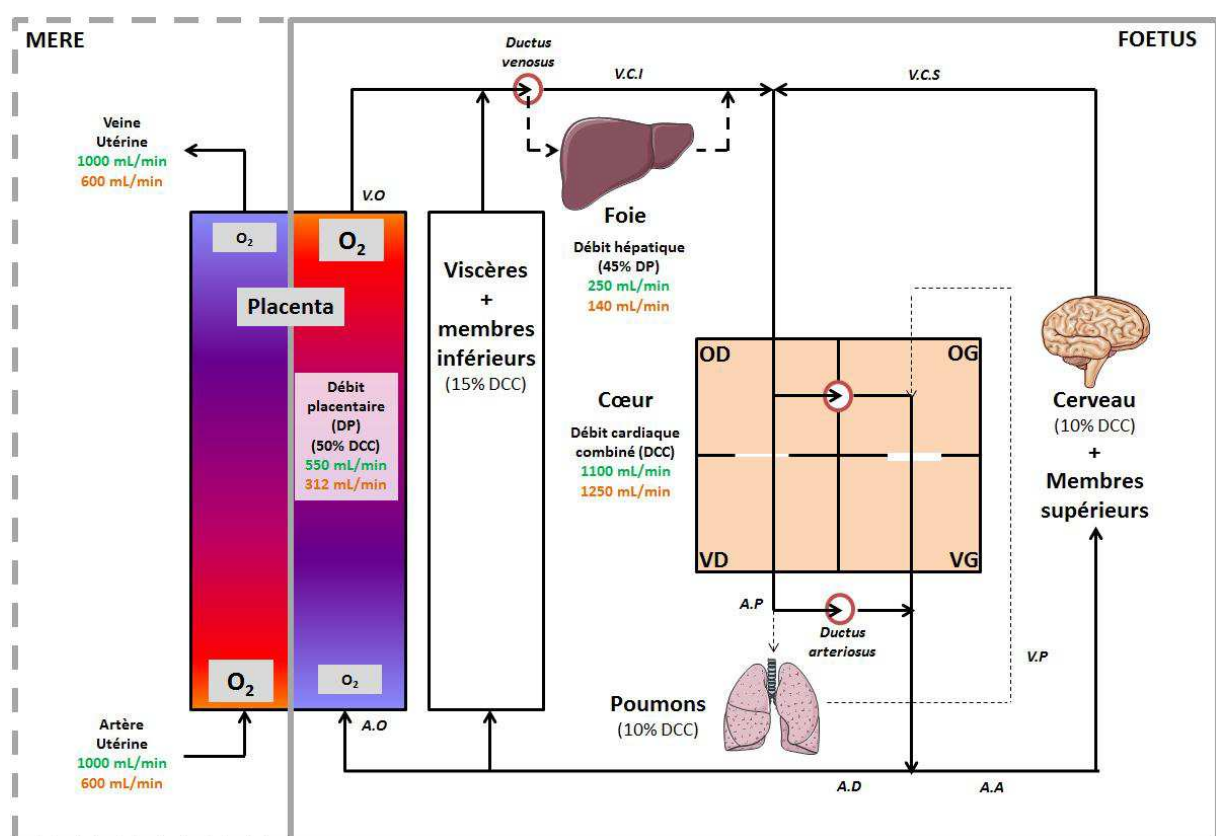


Figure 9. Représentation schématique de la circulation sanguine fœtale.

D'après [96, 115, 116]. Les débits sanguins chez le fœtus ovin et chez le fœtus humain sont respectivement indiqués en vert et en orange.

A.A, aorte ascendante ; A.D, aorte descendante ; A.O, artère ombilicale ; A.P, artère pulmonaire ; DCC, débit cardiaque combiné ; DP, débit placentaire ; OD, oreillette droite ; OG, oreillette gauche ; V.C.I, veine cave inférieure ; V.C.S, veine cave supérieure ; VD, ventricule droit ; VG, ventricule gauche ; V.P, veines pulmonaires

Le sang enrichi quitte le placenta par la ou les veines ombilicales et remonte vers cœur *via* le *ductus venosus* qui est le premier shunt que rencontre le sang fœtal. Le *ductus venosus* permet l'apport du sang oxygéné au cœur en court-circuitant la circulation hépatique. Environ 55% du débit placentaire ne passe pas par le foie et rejoint directement l'oreillette droite [96, 115]. 30% du sang atteignant l'oreillette droite passe directement dans l'oreillette gauche par le *foramen ovale*, second shunt de la circulation sanguine fœtale qui permet de diriger préférentiellement le sang enrichi vers la circulation générale plutôt que vers les poumons.

Le sang atteignant le ventricule droit (70% du débit cardiaque fœtal) rejoint l'artère pulmonaire. Seul 10% du sang vient irriguer les poumons [96]. Le reste du sang est dévié vers l'aorte par le *ductus arteriosus*, troisième shunt de la circulation sanguine

foetal qui comme le *foramen ovale* privilégie l'apport du sang oxygéné vers la circulation générale.

Le sang du ventricule gauche, provenant du *foramen ovale* et du retour veineux pulmonaire, est expulsé en direction de l'aorte ascendante irriguant le cerveau et les membres supérieurs et de l'aorte descendante irriguant les membres inférieurs et le placenta.

A la naissance l'interruption de la circulation placentaire lors de la rupture du cordon et le dépliement des poumons qui prennent le relais du placenta pour les échanges gazeux auront pour conséquence la fermeture des shunts physiologiques et l'instauration de la circulation sanguine adulte.

III3. Métabolisme placentaire

Bien que l'activité métabolique placentaire soit très faible par rapport à l'activité métabolique hépatique, le placenta peut métaboliser certaines substances avant leur transfert vers le compartiment foetal [111]. Le placenta exprime des cytochromes P450 et des enzymes de conjugaison, il est donc capable de catalyser des réactions de phase I, correspondant principalement à des réactions d'oxydations, et des réactions de phase II, correspondant à des réactions de conjugaison.

III31. Réaction de phase I

Les cytochromes P450 (CYP) catalysent des réactions d'oxydation de nombreux composés au sein des cellules trophoblastiques. Si l'expression placentaire de nombreux cytochromes a pu être mise en évidence par PCR, leurs activités n'ont généralement pas été décrites. Comme pour les transporteurs, leur expression varie au cours de la gestation avec une expression plus importante lors du premier trimestre chez l'homme, suggérant une expression maximale des cytochromes lors du développement précoce, lorsque le fœtus est le plus sensible aux xénobiotiques [102]. De nombreux facteurs peuvent modifier les activités métaboliques placentaires tels que des comportements maternels à risque comme la prise de drogue, la consommation d'alcool ou de tabac [102]. Ainsi, le CYP1A1, impliqué dans la bioactivation de nombreux composés comme par exemple les hydrocarbures aromatiques polycycliques, et exprimé au niveau du

placenta, est fortement induit par le tabac [111]. Cette induction peut être augmentée par la consommation d'alcool.

Le placenta exprime également des cytochromes P450 impliqués dans la métabolisation des stéroïdes, avec en particulier l'expression du CYP11A1 catalysant le clivage de la chaîne latérale du cholestérol, et l'expression du CYP19 catalysant l'aromatisation de l'androstènedione en œstrogène [117]. L'expression de ce dernier a également été mise en évidence dans le placenta ovine [118].

D'autres enzymes de phase I sont exprimées dans le placenta humain telles que la quinone réductase qui métabolise certains carcinogènes et mutagènes ainsi que l'oxyde nitrique synthase, une enzyme qui permet la production d'oxyde nitrique contribuant notamment au tonus des vaisseaux placentaires [117].

III32. Réaction de phase II

Le placenta présente également des enzymes catalysant des réactions de phase II. La glutathione S-transférase (GST), enzyme catalysant la conjugaison de composés électrophiles biologiquement actifs au glutathion tripeptide endogène, intervient dans la protection du fœtus vis-à-vis du stress oxydatif [117]. Au niveau du placenta, la GST est exprimée tout au long de la gestation et semble jouer un rôle important dans la conjugaison des stéroïdes, plus que dans la détoxification des xénobiotiques [102, 117].

Chez l'homme, vers la 8ème semaine de grossesse, une activité époxyde hydrolase (EH) est détectée au niveau du placenta [102, 117]. Cette enzyme catalyse la conversion des époxydes en transglycols ou transdihydrodiols protégeant ainsi le fœtus contre les effets toxiques des époxydes maternels apportés par exemple par certains traitements anti-épileptiques (acide valproïque, phénytoïne) [111]. Les dérivés époxydes de la phénytoïne ou de l'acide valproïque sont susceptibles d'entraîner des malformations fœtales [119].

Le placenta possède également une activité N-acétyltransférase (NAT) et déacylase (DAC) permettant la détoxification d'arylamines présentes notamment dans la fumée de cigarettes. Ces enzymes sont également susceptibles de bioactiver certaines arylamines en métabolites carcinogènes pouvant être toxiques pour le fœtus en particulier lors d'une exposition pendant une phase précoce de développement [117].

Les sulfotransférases placentaires (SULT) sont d'une grande importance pour la sulfoconjugaison des stéroïdes et des catécholamines. Cette voie de conjugaison placentaire serait également une voie importante de biotransformation de certains xénobiotiques [102].

L'expression d'UDP-glucuronosultransférases (UGT) a été mise en évidence au niveau du placenta dès le premier trimestre de grossesse et cette enzyme est active tout au long de la gestation, et représente une voie essentielle de métabolisation des stéroïdes et des xénobiotiques [102, 120].

L'activité glucuronidase (β -Gluc) a été observée dans le placenta humain au premier trimestre de grossesse à des taux 10000 fois plus faible que l'activité UGT [121, 122]. Cette enzyme pourrait être responsable de la formation de composés actifs à partir de composés conjugués, et donc de la réactivation de certains toxiques.

III4. Le métabolisme fœtal

Le foie est l'organe majeur de la métabolisation chez l'adulte, et il joue également un rôle important pendant la vie fœtale. Bien qu'il se mette en place et se développe très précocement (1^{er} trimestre de grossesse chez l'homme [123]), il n'acquiert ses activités enzymatiques que progressivement avec des niveaux d'activité très variables par rapport aux niveaux observés chez l'adulte.

III41. Réactions de phase I

La présence de CYP450 (CYP) dans le foie fœtal humain a été démontrée dans les années 1970 [124]. Par la suite, plusieurs isoformes ont été mises en évidence et leur activité a été caractérisée essentiellement sur des microsomes hépatiques fœtaux isolés. Les isoformes présentes dans le foie fœtal humain sont présentées dans le Tableau 8.

Isoforme	Substrat identifié	Méthode	Variation d'expression au cours de la gestation	Référence
CYP3A7	Déhydroépiandrosterone 3-sulphate <i>N</i> -méthylalanine Ethylmorphine <i>N,N</i> -D-méthylaniline <i>N,N</i> -D-méthylnitrosamine Aminopyrine <i>p</i> -nitroanisole 7-éthoxycoumarine Procarcinogènes (aflatoxine B1)	Microsomes hépatiques fœtaux	Activité supérieure à 20 SG par rapport à l'activité à terme	[125] [126]
CYP1A1	2-acétylaminofluorène	Immunohistochimie Western-blot	Non renseignée	[127] [128]
CYP2D6*	Dextromethorphan	Microsomes hépatiques fœtaux	Enzyme non-déTECTable avant 20 SG	[129]
CYP2E1*	Ethanol	Microsomes hépatiques fœtaux	Enzyme détectée jusqu'à 24 SG	[130]

Tableau 8. Isoformes de cytochrome P450 mises en évidence au niveau du foie fœtal humain

D'après [123].

SG, semaines de grossesse.

*L'expression et l'activité de ces deux isoformes sont controversées : Ladona *et al.* en 1991 n'ont mis en évidence ni la présence de la protéine *CYP2D6* ni d'activité catalytique envers les substrats habituels de l'isoforme (dextromethorphan, codéine) à partir de microsomes hépatiques fœtaux humains [131].

La présence d'ARNm ou de la protéine CYP2E1 n'a pas été détectée dans les études de Jones *et al.* et Vieira *et al.* à partir d'échantillons de foie fœtal [132, 133].

Chez le mouton, l'activité catalytique des isoformes CYP3A, 2B et 2C dans l'hydroxylation de la progestérone a été mise en évidence sur des microsomes hépatiques fœtaux [134].

III42. Réactions de phase II

Chez l'adulte, les réactions de phase II permettent la formation de métabolites généralement plus hydrosolubles que la molécule parent, permettant ainsi leur élimination par voie biliaire ou urinaire. Chez le fœtus, ces voies d'élimination conduisent à l'excrétion des métabolites dans le liquide allantoïdien ou dans le liquide amniotique, ce dernier étant réingurgité par le fœtus. Ainsi, les métabolites hydrosolubles, peu transférés à travers la barrière placentaire pour rejoindre la circulation maternelle, peuvent s'accumuler dans le liquide amniotique.

Les enzymes de conjugaison les plus étudiées dans le foie fœtal sont les UGT et les SULT.

En 1987, Leakey *et al.* ont caractérisé l'activité des UGT envers 8 substrats sur des microsomes de foies fœtaux prélevés sur des fœtus après une interruption médicale de grossesse (IMG) (groupe « fœtal »), sur des fœtus morts *in utero* ou juste après la naissance (entre 37-41 SG et 4 jours *post-partum*) (groupe « terme ») ou à partir de microsomes de foies adultes prélevés sur des personnes décédées après une hémorragie cérébrale (groupe « adulte ») [135]. Pour 5 des substrats étudiés, l'activité UGT ne diffère pas entre le groupe « fœtal » et le groupe « terme » mais reste inférieure d'un facteur 3 à 10 à l'activité du groupe « adulte » (Tableau 9). L'activité métabolique vis-à-vis du 5-hydroxytryptamine est similaire entre les trois groupes mettant en évidence une activité constante au cours de la grossesse. Pour la bilirubine et l'androsterone, une évolution nette de l'activité UGT est observée entre le groupe « fœtal » et « terme », avec une activité dans le groupe « terme » restant néanmoins inférieure à l'activité du groupe « adulte » (Tableau 9). D'autres substrats ont été testés *in vitro*, mais pour la plupart d'entre eux, l'activité chez le fœtus apparaît toujours plus faible que chez l'adulte [123].

Substrats	Activité UGT (exprimée en % de l'activité dans le foie adulte)	
	Groupe « fœtal »	Groupe « terme »
Bilirubine	<1%	6%
Androsterone	3%	13%
Testosterone	8%	11%
Oestrone	30%	31%
5-hydroxytryptamine	109%	121%
1-naphtol	5%	9%
2-aminophenol	6%	6%
4-nitrophenol	10%	11%

Tableau 9. Activité UGT dans le foie fœtal chez l'homme.

Les activités (nmol/(min.mg de protéines microsomales)) ont été déterminées pour huit substrats des UGT et exprimées pour les groupes « fœtal » et « terme » en pourcentage des activités respectives dans le foie humain adulte (d'après [135]).

En outre, Strassburg *et al.* en 2002 ont évalué l'expression (ARN_m) de 13 isoformes d'UGT dans le foie chez le fœtus (20 semaines de gestation), chez le nouveau-né (7 à 24 mois) et chez l'adulte (25-75 ans). Aucune expression des isoformes n'a été détectée dans le foie fœtal humain à 20 semaines de gestation, alors que les transcrits sont présents chez le nouveau-né à des niveaux néanmoins inférieurs à ceux de l'adulte [136].

Chez le mouton, peu d'études ont été réalisées. La glucuronidation de la morphine et de l'acétaminophène a été démontrée *in vitro* dans le foie fœtal à des niveaux inférieurs à ceux évalués chez l'adulte [137, 138].

Des études portant sur la capacité du foie fœtal à sulfoconjuguer diverses substances (médicaments, stéroïdes) menées sur des fractions cytosoliques de foie fœtal humain ont montré des activités des SULT similaires, voire supérieures à celles détectées chez l'adulte [139-141]. La sulfoconjugaison représenterait ainsi une voie de métabolisation et de détoxification chez le fœtus humain, notamment au début du deuxième trimestre de grossesse, l'expression et l'activité des SULT étant observées dès 14 semaines de grossesse [141].

Ces données montrent que le fœtus au cours de son développement acquiert des capacités métaboliques vis-à-vis des xénobiotiques. Au début de la gestation, sa susceptibilité vis-à-vis de substances toxiques est accrue du fait de ses capacités métaboliques extrêmement limitées. Parallèlement aux modifications morphologiques du placenta qui entraînent une augmentation des échanges materno-fœtaux, le fœtus va développer ses propres capacités de détoxification afin de se protéger de l'exposition à des xénobiotiques (Figure 10).

Ces mécanismes (transfert placentaire et métabolisme fœtal) semblent être des éléments clés pour déterminer l'exposition fœtale à un xénobiotique.

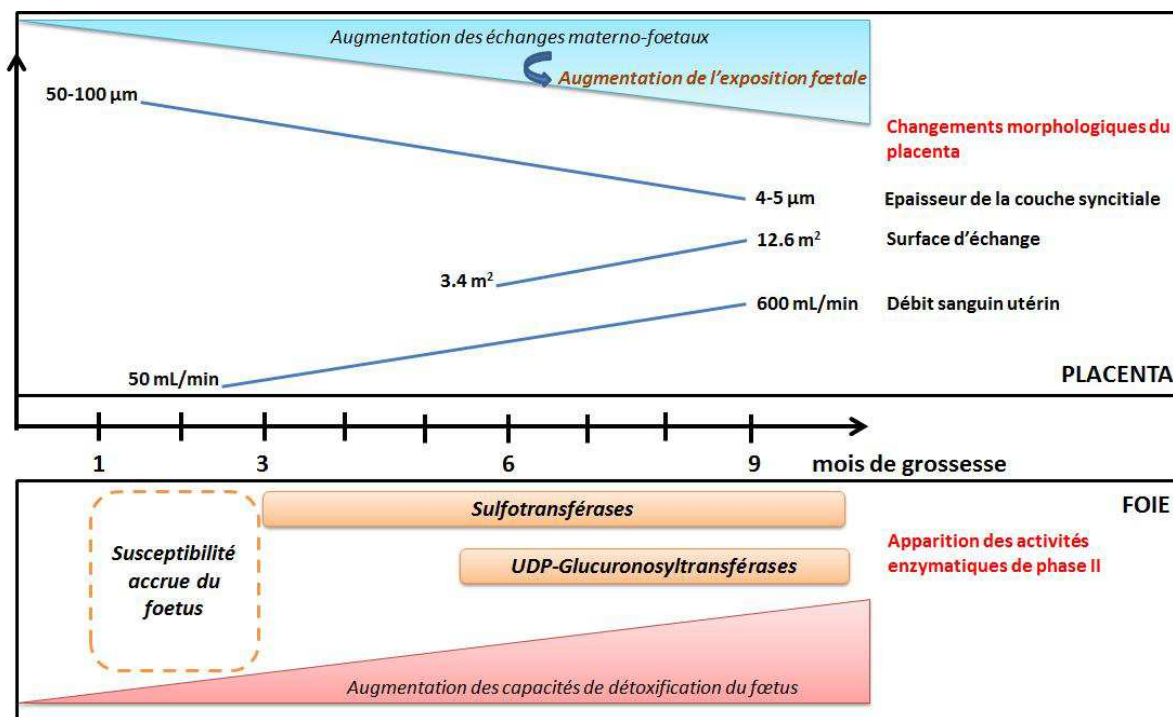


Figure 10. Représentation schématique de l'évolution au cours de la grossesse des mécanismes d'échanges materno-fœtaux et des capacités de détoxification hépatique fœtale.

Objectifs et stratégie de la thèse

La synthèse bibliographique a mis en évidence que l'exposition de la population humaine au BPA est ubiquitaire. Les femmes enceintes et les jeunes enfants représentent une population à risque, potentiellement surexposée à ce PE. L'évaluation de l'exposition fœtale à des xénobiotiques PE constitue une étape critique pour évaluer le risque lié à l'exposition maternelle aux xénobiotiques. Le passage transplacentaire du BPA depuis la circulation maternelle a été démontré par la mise en évidence de niveaux détectables de BPA (aglycone ou total) dans le sang de cordon ombilical à la naissance, dans le liquide amniotique et dans le tissu placentaire. Cependant, ces données restent ponctuelles (essentiellement à la naissance), avec des niveaux variables dans les différents compartiments du conceptus en fonction des études. Par conséquent, il est difficile d'évaluer le caractère prédictif de l'exposition interne fœtale au BPA, à partir des concentrations dans des liquides biologiques comme le liquide amniotique ou le sang maternel.

Le niveau d'exposition interne fœtale aux xénobiotiques dépend d'un grand nombre de facteurs, dont :

- le niveau d'exposition interne maternelle, déterminé par l'exposition externe, la voie d'exposition et la clairance maternelle qui peut être soumise à des variations au cours de la gestation [142]
- le passage transplacentaire qui dépend de la structure placentaire et des propriétés physicochimiques des molécules
- la liaison du PE aux protéines du plasma maternel et fœtal. En effet, seule la concentration libre du PE peut franchir la barrière placentaire et l'importance de la liaison du PE aux protéines fœtales (dépendant de la concentration en protéines plasmatiques et de leur affinité) détermine l'exposition à la forme libre du PE qui représente la forme active.
- le métabolisme du PE par l'unité fœto-placentaire qui dépend de la maturité des systèmes enzymatiques métaboliques impliqués dans l'inactivation des

xénobiotiques et d'une éventuelle bioactivation des métabolites du PE au niveau des tissus fœtaux et/ou du placenta.

- la possible recirculation du PE entre les liquides amniotiques et la circulation fœtale. Au cours de la gestation, les métabolites produits par le fœtus et qui sont éliminés par les reins fœtaux peuvent s'accumuler dans le liquide amniotique en raison d'un défaut de transfert placentaire. L'ingestion du liquide amniotique et/ou son absorption dans le sang fœtal qui irrigue la partie fœtale du placenta pourrait donc accroître l'exposition du fœtus au PE suite à la réactivation d'une fraction des métabolites par les tissus fœto-placentaires.

Ces différents facteurs capables de moduler l'exposition interne aux xénobiotiques sont influencés par l'environnement hormonal du fœtus et son stade de développement. Seul un modèle intégratif fondé sur des considérations physiologiques permet de prendre en compte ces différents facteurs simultanément.

Dans ce contexte, notre projet de thèse vise à développer de nouvelles approches et de nouveaux modèles pertinents vis-à-vis de l'homme pour déterminer les mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition au BPA de l'unité fœto-placentaire. Le but de ce projet est de pouvoir prédire l'exposition interne du fœtus au BPA chez l'homme. Notre hypothèse était que les particularités métaboliques et physiologiques de l'unité materno-fœto-placentaire pourraient entraîner une surexposition du fœtus conduisant à une susceptibilité accrue du fœtus à la toxicité du BPA pendant cette période critique du développement.

1) Dans un premier temps, nous avons développé au laboratoire le modèle intégratif physiologique du fœtus ovin instrumenté à 4 mois de gestation, qui prend en compte les principaux processus métaboliques (hydrolyse, conjugaison) et les processus de transport et d'élimination (recirculation, transfert placentaire, clairance plasmatique). Ce modèle a été choisi pour sa pertinence vis-à-vis de l'homme en termes de toxicocinétique du BPA [47, 143] et de physiologie fœtale [99]. Historiquement, ce modèle a d'ailleurs été largement utilisé pour étudier la physiologie de la gestation chez l'homme. Le fait que la brebis soit une espèce monotoque, *i.e.* qui donne habituellement naissance à un ou deux agneaux par portée, de grande taille et avec une durée de gestation relativement longue (145 jours) autorise la réalisation de perfusions et de

prélèvements sanguins du côté fœtal et du côté maternel et de prélèvements de liquide amniotique, qui ne peuvent être envisagés sur des modèles rongeurs conventionnels. Ce modèle physiologique nous a permis de décrire la disposition du BPA et de son principal métabolite, le BPA-G dans les compartiments fœto-maternels et de caractériser les paramètres toxicocinétiques maternels et fœtaux du BPA et du BPA-G.

Pour évaluer l'effet de la gestation sur les paramètres toxicocinétiques maternels, nous avons entrepris une étude longitudinale durant laquelle le BPA a été administré à quatre périodes à des brebis : avant la mise à la reproduction, à 1 mois et 4 mois de gestation et 1 mois après la mise-bas (Chapitre 2.II).

Si ce modèle nous permet de prédire l'exposition du fœtus ovin en fin de gestation, l'extrapolation des expositions fœtales à l'homme et aux stades de gestation plus précoces nécessite de prendre en compte les différences interspécifiques ainsi que les modifications au cours de la gestation des processus physiologiques qui déterminent l'exposition fœtale. C'est la raison pour laquelle nous avons, dans un deuxième temps, approfondi les mécanismes toxicocinétiques impliqués dans les différences d'exposition interne du complexe fœto-maternel, le passage du BPA et de ses métabolites à travers le placenta et les activités métaboliques fœto-placentaires.

2) Pour extrapoler les expositions fœtales de notre modèle ovin à l'homme, il est nécessaire de prendre en compte les différences interspécifiques de placentation. En collaboration avec A. Berrebi (CHU Paule de Viguié, Toulouse) et S. Gil (INSERM UMR-S 767, Paris), nous avons développé et validé un système de perfusion de placenta isolé humain en double circuit ouvert pour quantifier le passage transplacentaire du BPA. Ce système de perfusion d'un cotylédon isolé est le modèle de choix pour caractériser le transport materno-fœtal et fœto-maternel de xénobiotiques chez l'homme [144, 145]. Le transfert placentaire, évalué au moment du terme représente l'exposition maximale comparativement aux stades plus précoces de gestation. En outre, nous avons choisi un système de perfusion ouvert qui nous permet d'évaluer les clairances materno-placentaire et fœto-placentaire.

Par ailleurs, compte tenu des niveaux élevés de BPA-G plasmatiques observés dans l'unité fœto-placentaire de différents modèles animaux [90, 91], nous avons évalué

également le passage transplacentaire du BPA-G, à la fois dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel (Chapitre 2.III).

3) L'exposition interne du complexe fœto-maternel au BPA parent et à ses métabolites, au cours du développement, est déterminée par la balance entre les activités maternelle, placentaire et fœtale de conjugaison du BPA (conduisant à une inactivation du BPA) et de déconjugaison (conduisant à une réactivation du BPA-G et du BPA-S en BPA).

Pour prédire l'exposition du fœtus humain à un stade critique de l'organogenèse, il est nécessaire de prendre en compte les différences physiologiques interspécifiques ainsi que l'évolution au cours de la gestation des processus métaboliques. L'objectif de cette troisième partie de notre projet de thèse menée en collaboration avec D. Zalko (INRA UMR 1331, Toulouse) était donc de quantifier les activités métaboliques du fœtus ovin à différents stades de développement.

Les activités de conjugaison du BPA par les UGT et les SULT et de déconjugaison du BPA-G et BPA-S par les β -glucuronidase et sulfatase ont été évaluées *in vitro* sur des fractions subcellulaires hépatiques de brebis adultes et de fœtus ovin mâle et femelle à deux stades gestationnels (55 et 120 jours, correspondant au 1^{er} et dernier tiers de la gestation) et ont été comparées à celles de fractions subcellulaires hépatiques humaines du commerce.

La balance conjugaison-déconjugaison a été évaluée *ex vivo* sur le modèle ovin, sur les gonades fœtales et adultes et sur le placenta après incubation des tissus avec du BPA, du BPA-G ou du BPA-S radiomarqué (Chapitre 2.IV).

CHAPITRE 2

ETUDES EXPERIMENTALES

Chapitre 2 : Etudes expérimentales

I. Etude préliminaire: Purification et paramètres pharmacocinétiques du BPA-G

I1. Introduction et objectifs

Le BPA est un contaminant alimentaire issu de l'industrie plasturgique considéré comme un perturbateur endocrinien du fait de ses propriétés œstrogéniques. Chez l'homme, le BPA est métabolisé au niveau du foie principalement en BPA-G. Cette réaction est considérée comme un mécanisme de détoxification car le BPA-G est dénué d'activité œstrogénique. Pour l'analyse du risque pour la santé humaine relative à une exposition au BPA, il est important de prendre en compte la biotransformation du BPA en BPA-G. En outre, les niveaux urinaires de BPA-G représentent la dose interne à laquelle la population est exposée.

En général, les méthodes analytiques qui évaluent à la fois les niveaux de BPA et de BPA-G utilisent des enzymes extraites d'*Helix pomatia* qui induisent l'hydrolyse des conjugués. Les niveaux de conjugués sont alors déterminés par soustraction après avoir dosé sur le même échantillon d'abord le BPA aglycone, puis le BPA total après hydrolyse. Cette méthode nécessite donc deux analyses pour le même échantillon et présente l'inconvénient d'hydrolyser l'ensemble des conjugués (glucurono-, sulfoconjugués).

Pour réaliser un dosage direct du BPA et du BPA-G, il est nécessaire de purifier le métabolite. Certains laboratoires ont tenté de le purifier à partir de matrices biologiques ou de le produire à partir de préparations de microsomes [44, 54, 57]. Mais, ces techniques coûteuses ont permis d'obtenir des quantités relativement limitées de BPA-G.

C'est pourquoi notre laboratoire en collaboration avec la plateforme Axiom de l'UMR 1331 Toxalim, Toulouse a développé une méthode de purification de BPA-G, dans le but de développer une méthode analytique permettant le dosage simultané du BPA et du BPA-G dans des matrices biologiques et également de déterminer les paramètres PK du BPA-G sur le modèle ovin, ce qui nécessite des quantités importantes de BPA-G.

Compte-tenues des quantités importantes de BPA-G retrouvées dans les urines de brebis après une administration orale de BPA [47], notre stratégie a consisté à purifier du BPA-G à partir d'urines de brebis.

La purification du BPA-G et le dosage simultané de BPA et BPA-G dans le plasma ont été réalisés par M. Lacroix et ont donné lieu à une publication dans la revue *Talanta*, à laquelle nous sommes associés. Notre contribution dans ce travail a été de participer à la purification du BPA-G (collecte des urines et purification) par chromatographie Flash et de réaliser la phase animale et l'analyse des paramètres toxicocinétiques du BPA-G administré après purification à deux brebis. La méthodologie expérimentale et les résultats sont présentés dans la partie I2 et dans la partie I3.

La purification du BPA-G et la validation du dosage simultané du BPA et du BPA-G sont présentées dans la partie I4.

I2. Méthodologie expérimentale

I21. Purification du BPA-G

Une solution de BPA à 100 mg/mL a été préparée extemporanément dans un mélange éthanol/huile de maïs (v:v 1:9).

4 brebis adultes de race Lacaune ont reçu une administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg par gavage naso-oesophagien et une sonde urinaire de Foley (Vygon, Ecouen, France) a été placée dans l'urètre. La totalité des urines de ces 4 brebis a été collectée 1, 3, 6 et 9 heures après l'administration.

Les fractions urinaires ont été pré-concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis ont été purifiées par une technique de Chromatographie Flash avec un CombiFlash Companion® (Teledyne Isco, Wierde, Belgique). Les molécules présentes dans les urines ont été séparées grâce à un gradient H₂O/Méthanol et la détection a été réalisée par un détecteur UV (longueur d'onde de détection $\lambda=225\text{nm}$). Les fractions récoltées ont été ensuite évaporées sous flux d'air puis lyophilisées afin de retirer les molécules d'eau. L'identification du BPA-G a été réalisée par un détecteur à barrettes de diode et par spectrométrie de masse et sa structure chimique a été vérifiée par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Dans un premier temps, la quantification du BPA-G purifié a été

réalisée après hydrolyse enzymatique avec un système de Chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC®, Watters Milford MA, USA) utilisant un gradient Acétonitrile/H₂O couplé à un spectromètre de masse à triple quadripôle (Xevo®, Watters Milford MA, USA) en utilisant une gamme standard de BPA dans du plasma (1-100 µg/mL). Après la quantification d'une première fraction urinaire, les quantités de BPA-G ont été directement déterminées en utilisant une gamme standard de BPA-G dans du plasma (0.01-20 µg/mL).

122. Etude pilote : Administration de BPA-G à deux brebis

La purification du BPA-G a permis de réaliser une étude pilote sur 2 brebis auxquelles le BPA-G a été perfusé par voie i.v. pendant 24 heures à la dose de 1 mg/(kg.j).

Des prélèvements sanguins ont été réalisés lors des dernières heures de perfusion (6 prélèvements entre la 21^{ème} et la 24^{ème} heure de perfusion) pour évaluer les concentrations plasmatiques à l'équilibre (C_{ss}) et après l'arrêt de la perfusion pendant 48 heures afin de suivre la décroissance des concentrations plasmatiques de BPA-G.

Les concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G ont été déterminées par UPLC-MS/MS après extraction à l'acétonitrile avec une gamme de concentrations de BPA et de BPA-G allant respectivement de 1 à 500 ng/mL et 20 à 500 ng/mL.

Le décours temporel des concentrations plasmatiques de BPA-G a été analysé avec le logiciel WinNonlin® (Pharsight Corporation, USA) par une approche non-compartimentale. L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de t_0 à l'infini ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) a été obtenue en divisant la dernière concentration quantifiée par la pente terminale estimée par régression linéaire. La clairance (Cl) a été obtenue en divisant la dose de BPA-G par l' $AUC_{0 \rightarrow \infty}$. Le volume de distribution à l'équilibre (V_{ss}) et le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) ont été déterminés selon des équations classiques de pharmacocinétique [146].

13. Résultats

131. Purification du BPA-G

8 grammes de BPA-G ont été purifiés à partir des urines des 4 brebis d'une pureté variant de 51 à 86%, en fonction des fractions recueillies.

132. Etude pilote : Administration de BPA-G à deux brebis

La Figure 11 ci-dessous représente le déroulement temporel des concentrations plasmatiques de BPA-G pour les deux brebis :

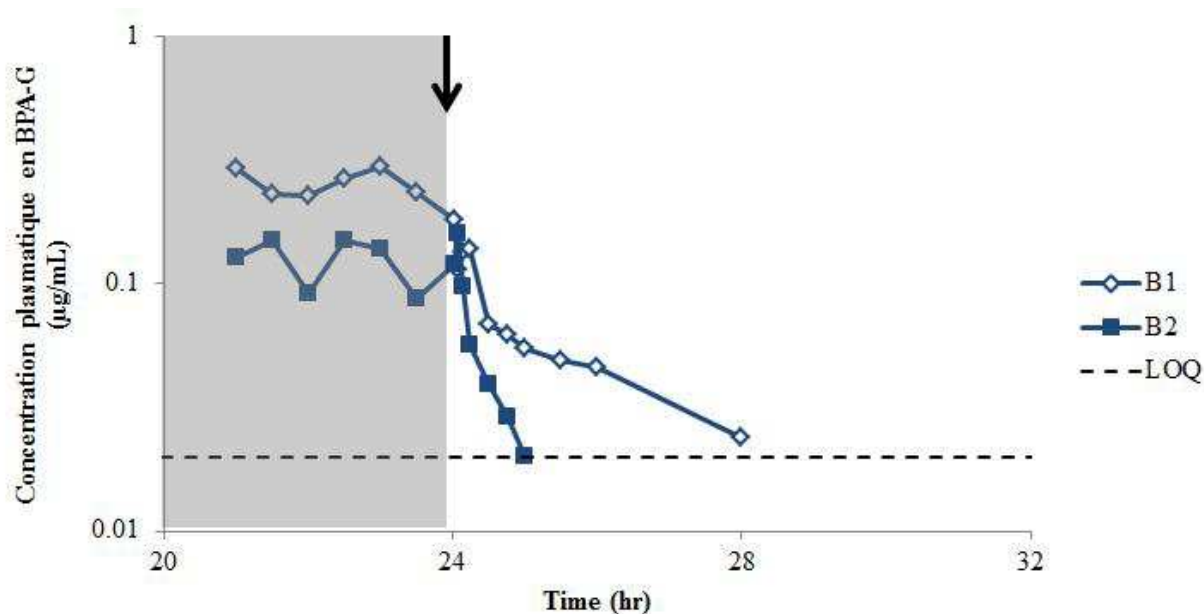


Figure 11. Déroulement temporel des concentrations plasmatiques de BPA-G pendant et après une perfusion i.v. de 1 mg/(kg.j) de BPA-G pendant 24 heures chez deux brebis (B1 et B2).

L'encart gris à gauche représente les dernières heures de perfusion (état d'équilibre) et la flèche noire représente l'arrêt de la perfusion au bout de 24 heures. La ligne pointillée représente la limite de quantification du dosage du BPA-G (0.02 µg/mL).

Les brebis B1 et B2 ont présenté en fin de perfusion respectivement des concentrations plasmatiques (C_{ss}) moyennes de BPA-G de 258 ± 32 et 124 ± 28 ng/mL. Les concentrations plasmatiques décroissent rapidement après l'arrêt de la perfusion. La LOQ est atteinte respectivement au bout de 3 heures et une heure après l'arrêt de la perfusion pour la brebis 1 et la brebis 2. Aucune de ces deux brebis n'a présenté de niveaux détectables de BPA aglycone après l'administration de BPA-G.

A partir de la dose de BPA-G administrée et des concentrations plasmatiques à l'équilibre (C_{ss}), la clairance du BPA-G a été calculée avec l'équation suivante :

$$Clairance = \frac{Dose}{C_{ss}} \quad \text{Équation 3}$$

La clairance du BPA-G a été évaluée à respectivement à 2.69 et 5.58 mL/(kg.min) pour la brebis B1 et la brebis B2 à partir de l'équation 3.

Le Tableau 10 présente les principaux paramètres PK du BPA-G obtenus en analysant les données avec une approche non-compartmentale :

Paramètres	Brebis 1	Brebis 2
AUC $\mu g/mL.hr$	4.11	1.77
Cl mL/(kg.min)	4.06	9.41
$t_{1/2} hr$	2.39	0.50
Vss L/kg	2.36	5.33

Tableau 10. Principaux paramètres PK du BPA-G chez deux brebis après une perfusion i.v. de BPA-G pendant 24 heures à la dose de 1 mg/(kg.j)

Les paramètres PK du BPA-G diffèrent d'une brebis à l'autre. Le $t_{1/2}$ et la clairance plasmatique du BPA-G sont respectivement 5 fois plus élevé et 2 fois plus faible chez la brebis B1 comparativement à la brebis B2. Pour la brebis B2, il est possible que le $t_{1/2}$ du BPA-G soit sous-estimé du fait d'une mauvaise estimation de la pente terminale d'élimination en raison de la LOQ élevée. Cela expliquerait aussi la clairance plasmatique relativement élevée chez cette brebis, surestimée par rapport à la clairance déterminée avec l'équation 3. Néanmoins, les clairances du BPA-G déterminées de 3 à 9 mL/(kg.min) restent inférieures à la clairance plasmatique du BPA (25-40 mL/(kg.min)) précédemment évaluée au laboratoire [47].

I4. Article 1

"Simultaneous quantification of Bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations."

Lacroix M Z, Puel S, Collet S H, **Corbel T**, Picard-Hagen N, Toutain P-L, Viguié C and Gayrard V

Talanta (2011), 85(4), 2053-2059



Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations

M.Z. Lacroix^{a,b}, S. Puel^{a,b}, S.H. Collet^{a,b}, T. Corbel^{a,b}, N. Picard-Hagen^{b,a},
P.L. Toutain^{b,a}, C. Viguié^{a,b,*}, V. Gayrard^{b,a}

^a INRA, UMR1331, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), F-31027 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, INP, ENVT, UPS, EIP, TOXALIM, UMR1331, F-31027 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2011

Received in revised form 7 July 2011

Accepted 9 July 2011

Available online 19 July 2011

Keywords:

Bisphenol A

Bisphenol A-Glucuronide

Toxicokinetic

Mass spectrometry

UPLC

Flash chromatography

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a widely used plasticizer that can contaminate food and the wider environment and lead to human exposure. In humans, it is mainly metabolized to bisphenol A-glucuronide (BPA-G) and eliminated in the urine. As BPA causes adverse physiological effects at low doses, it is necessary to document the toxicokinetics of both molecules for risk assessment. Because BPA-G is not available as an analytical standard, it is usually quantified after the assay of BPA, following an enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase. With this approach, two separate assays are required for BPA and BPA-G quantification, which can lead to critical pitfalls in terms of accuracy and analysis time. To overcome this problem, we have developed a new method for the isolation and purification of BPA-G from urine by flash chromatography. Large amounts of BPA-G (1 g) were isolated and characterized by mass spectrometry and NMR. This BPA-G is suitable for an use as analytical standard and enabled us to develop a novel method for the simultaneous quantification of BPA and BPA-G in biological matrices by UPLC/MS/MS. It has also been used for *in vivo* toxicokinetic studies in sheep. The method of quantification was validated according FDA guidelines and used to monitor the time course of plasma and urine concentrations of BPA or BPA-G following their administration. The simultaneous quantification of BPA and BPA-G was compared to the commonly used method for urine and plasma samples. For plasma samples, the results obtained with the direct assay of BPA-G were similar to those obtained by quantification after enzymatic hydrolysis. With urine samples, the simultaneous quantification appeared to be more suitable than the hydrolysis method for the BPA-G determination.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bisphenol A (BPA) is a monomer widely used in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics used in food packaging. The human exposure to BPA occurs mainly by ingestion of food and water contaminated by residual monomers of BPA released from by food contact with the polymeric packaging materials. It has been shown that BPA can cause adverse effects in laboratory animals exposed to lower doses than the recommended tolerable dose intake (TDI 50 μ g/kg/d) [1]. The polemic concerning the TDI established by the regulatory authorities and the scientific community might arise from the physiological differences between rodents and humans in terms of the toxicokinetics (TK) [2].

In humans, BPA is metabolized in the liver to its glucurono-conjugated form (BPA-G) and eliminated mainly in urine [3,4]. Glucuronidation is considered to be a detoxification mechanism, because BPA-G does not possess estrogenic activity [5]. The estimation of the transformation of BPA into BPA-G is of great concern for the risk analysis for human health based on animal studies [2], underlying the urgent need for rapid and reliable methods to assay BPA-G in different biological matrices. As a BPA-G analytical standard is not commercially available, BPA-G is usually quantified by LC/MS/MS by analysing the BPA produced after the hydrolysis of the BPA-G with commercial enzyme from *Helix Pomatia* which has both β -glucuronidase and aryl-sulfatase activities [6,7]. Therefore BPA-G concentrations are calculated by subtraction of the unconjugated BPA assayed before hydrolysis from the total BPA found after hydrolysis. Consequently two separated analyses of BPA are required to calculate the concentration of the BPA metabolite. Furthermore, this method has limitations linked to the fact that BPA-G is not discriminated from the other conjugated metabolites which can also be hydrolysed by β -glucuronidase (Sulfo-, glucosulfo-derivatives) [8]. Some laboratories have developed methods to

* Corresponding author at: INRA, UMR1331, TOXALIM, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des Capelles 31076 Toulouse cedex 3, France.
Tel.: +33 561 193913; fax: +33 561 193917.
E-mail address: c.viguié@envt.fr (C. Viguié).

isolate BPA-G from urine [3], bile [9] or liver microsomes [10]. These methods are time consuming and expensive and produce only limited amounts of BPA-G at any one time [3,9]. Toxicokinetic investigations involving the *in vivo* administration of BPA-G and its determination in several matrices and tissues often require large amounts of this compound. It is noteworthy that several instances including US NIEHS have been working on BPA metabolites synthesis, which raises the hope that other standards might be soon available for the scientific community to work with.

The first goal of the present study was therefore to develop a method to isolate and purify large amounts of BPA-G. During the last decade, hybrid systems of gravity column chromatography and conventional HPLC for rapid preparative chromatography with pre-packed cartridges have been commercialized as “Flash Chromatography” systems and cartridges. These systems allow higher sample loads than preparative HPLC with good separation of compounds from matrices and other contaminants. They were developed for the purification of synthetic products [11] but few studies have addressed the isolation of compounds from biological matrices [12]. Thus, in this study we applied the flash chromatography technique to purify BPA-G from urine after the administration of BPA to sheep.

The second goal of this study was to develop and validate an UPLC/MS/MS method according to the Food and Drug Administration (FDA) guidelines for the simultaneous quantification of BPA and BPA-G in urine and plasma. The method was evaluated for its suitability to monitor simultaneously BPA and BPA-G in biological matrices for TK investigations. Finally, this new method was compared to the common method using enzymatic hydrolysis for the determination of BPA and BPA-G.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bisphenol A, acetonitrile (AcN), methanol (MeOH), ethanol (EtOH), corn oil, Tris-HCl buffer, sodium chloride (NaCl), β -glucuronidase from *Helix Pomatia* and deuterated (d16) bisphenol A (BPA-d16) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Water was obtained from an ultrapure water (18.2 M Ω) system (Elga Labwater Veolia, Anthony, France).

Working concentrated solutions were prepared by serial dilutions of BPA and BPA-G in AcN/H₂O (50/50, v/v) to obtain final concentrations of each analyte of 10,000, 1000, 100, 10, 1, and 0.1 μ g/mL.

Standard and quality control (QC) solutions were obtained by diluting working solutions in drug-free sheep plasma or urine to obtain concentrations ranging from 1 ng/mL to 500 μ g/mL for the standard curve calibrators and from 2.5 ng/mL to 250 μ g/mL for the QC samples. Calibrators and QC solutions were stored at -20°C in 100 μ L aliquots.

The stock solution of the internal standard (IS, BPA-d16) was prepared in AcN at a concentration of 1 mg/mL and stored at -20°C . A new working IS solution was prepared each week by diluting the stock solution in ultrapure water and storing at 4°C .

2.2. Animal treatment and sample collection

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of humane animal care under agreement number 31-242 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture.

2.2.1. Oral administration of BPA for urine collection and sample processing

For oral administration, BPA powder was extemporaneously dissolved in EtOH/corn oil (1:9, vol:vol) at 100 mg/mL. A BPA dose of

100 mg/kg body weight (b.w.) was orally administered to one ewe (61 kg) using a naso-oesophagian tube. Total urine samples were collected 1, 2.5 and 3.5 h after the oral administration via a Foley catheter placed in the urethra and immediately chilled in ice. A volume of approximately 250 mL was obtained for BPA-G isolation with flash Chromatography.

2.2.2. Intravenous administration of BPA and BPA-G for pharmacokinetic studies and sample processing

BPA powder was extemporaneously dissolved in EtOH/propylene glycol (1:49, vol:vol) at 5 mg/mL and purified BPA-G solution (40 mg/mL) was diluted in EtOH/NaCl buffer 0.1% (1:49, vol:vol) to give 3 mg/mL. A BPA dose of 0.5 mg/kg b.w. was intravenously (IV) administered to three ewes (61.5 ± 4.0 kg) via an indwelling catheter inserted into the left jugular vein just prior to the BPA administration. In a second trial, BPA-G was infused intravenously for 24 h at a constant rate of 0.68 μ g/(kg min) corresponding to a total BPA-G dose of 1 mg/(kg d) to two ewes (35 and 40 kg) into the left jugular vein via an indwelling catheter as previously described [13].

Serial blood samples were collected before and at 2, 4, 8, 15, 20, 30 min and 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36 and 48 h after BPA administration and every 30 min during the second trial of BPA-G infusion starting 21 h after the beginning of the infusion and 2, 4, 8, 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 32 and 48 h after the end of the infusion.

Blood samples were collected in heparinized tubes by direct puncture of the right jugular vein, immediately chilled in ice and centrifuged for 30 min at $3000 \times g$ at 4°C . The resulting plasma was stored at -20°C until assay.

After the intravenous administration of BPA, urine samples were collected as described above at 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 and 36 h.

All urine samples were centrifuged for 10 min at $3000 \times g$ at 4°C and then aliquoted into glass tubes in 1 mL fractions and stored at -20°C .

2.3. BPA-G purification by flash chromatography

Pooled urine samples were concentrated with a rotavapor at 50°C to obtain a volume of approximately 30 mL. Pre-concentrated urine samples were injected on the flash chromatographic system with a H₂O/MeOH gradient elution (Supplementary material). The collected BPA-G fractions (10 mL) were pooled and dried under a stream of air at 50°C . The dried residue was dissolved in 4 mL of EtOH, filtered under vacuum, and stored at -20°C .

2.4. Analytical instrumentation and conditions

2.4.1. Instrumentation

BPA and BPA-G identification and quantification were performed with an Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC[®]) coupled to a Xevo[®] triple quadrupole mass spectrometer and an Acquity PDA detector (Waters, Milford, MA, USA). BPA, BPA-G and the internal standard were separated on an Acquity BEH[®] C18 column (2.1 mm $\times$ 100 mm; 1.7 μ m; Waters). Samples were ionised in negative electrospray ionisation mode (ESI⁻). The capillary voltage and source temperature was set at 2.2 kV and 150°C , respectively. The desolvation temperature and nitrogen flow rate were set at 650°C and 1200 L/h, respectively. Argon was used as the collision gas at a flow rate of 0.12 mL/min.

2.4.2. BPA-G identification

The BPA-G fractions collected by flash chromatography were eluted on the C18 column with a H₂O/AcN gradient ($t(0 \rightarrow 1 \text{ min})$: 10% AcN; $t(1 \rightarrow 10 \text{ min})$: 90% AcN). BPA-G was identified by diode

array detection (DAD) with wavelengths ranging from 190 to 500 nm; MS full scan with a mass range of 50–800 Da. The MS/MS daughter scan was set at $m/z = 403$ corresponding to the $[M-H]^-$ BPA-G ion parent with a collision energy of 20 eV and with a mass range of 50–500 Da. BPA-G chemical structure was checked by 1H and ^{13}C NMR (Supplementary material).

2.4.3. Methods of quantification

2.4.3.1. Quantification after enzymatic hydrolysis. The aliquots of purified BPA-G obtained from the first purification run were diluted a thousand fold in sheep plasma. Fifty microliters of these BPA-G and of BPA spiked plasma samples were incubated for 2 h at 37 °C with 30 μ L of β -glucuronidase from *Helix Pomatia* and 420 μ L of Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4). After incubation, the samples were centrifuged at $20,000 \times g$ at 4 °C for 10 min. BPA in supernatant (100 μ L) was quantified as described below. Aliquots of the fractions obtained from the subsequent purification runs were directly quantified with spiked BPA-G plasma samples as described below.

2.4.3.2. Simultaneous BPA and BPA-G quantification. BPA and BPA-G in urine or plasma samples (100 μ L) were purified by protein precipitation/dilution with 150 μ L AcN and 50 μ L of the IS (BPA-d16). BPA and BPA-G were eluted on the C18 column with a H_2O /AcN gradient ($t(0 \rightarrow 0.5 \text{ min})$: 10% AcN; $t(0.5 \rightarrow 4 \text{ min})$: 90% AcN). The quantification of BPA and BPA-G was by using Multiple Reaction Monitoring, MRM transitions and collision energies (Ecoll) for quantification were 227 > 212 Ecoll = 28 eV for BPA, 241 > 142 Ecoll = 20 eV for BPA-d16 and 403 > 227 Ecoll = 30 eV for BPA-G. Chromatographic data were monitored by Targetlynx[®] software (Waters, Milford, MA, USA).

2.5. Validation procedure

BPA and BPA-G standard curves and quality controls (QC) were prepared separately to avoid potential contamination. The quantification method for each molecule was validated according to the Food and Drug Administration (FDA) guidelines in term of selectivity, linearity, repeatability and reproducibility [14]. Selectivity was tested by comparing six blank plasma (or urine) chromatograms with chromatograms at the limits of quantification (LOQ). Limit of detection (LOD) was defined as the estimated concentration with a signal equal to three times the mean noise of six blank matrices at the retention time of the analytes. Calibration curves were calculated using WinNonlin[®] 5.2 software (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). Linear ($Y = aX + b$) and quadratic ($Y = aX^2 + bX + c$) models were tested with weightings: 1, $1/X$ and $1/X^2$ (X = nominal concentration). The linearity of the calibration curve was assessed using three approaches: (1) the calculation of the relative standard deviation between the nominal concentration and the concentration obtained with the model (RSD%), which should be lower than $\pm 15\%$ (except at the LOQ, $\pm 20\%$), (2) the visual inspection of the residual distribution which should be randomized around the mean [15] and, (3) a lack of fit test to check the goodness of fit of the model [16,17]. The LOQ were defined as the lowest concentration of the calibration curve that could be quantified with a precision lower than 20% and within an accuracy range of 80–120%. Intra-day and inter-day precisions and accuracy of BPA and BPA-G were calculated from three different days and with six replicates of QC samples at three concentration levels (low, middle and high) covering the range of standard curve concentrations. Matrix effects were quantitatively estimated with the matrix factor (MF). MF is defined as the ratio of analyte peak area in the presence of matrix ions to the analyte peak area in the absence of matrix ions [18]. BPA-G matrix factor was calculated at three concentrations levels

0.01; 0.1 and 1 μ g/mL for plasma and 1; 10 and 100 μ g/mL for urine covering the range of each calibration curve.

3. Results and discussion

3.1. BPA-Gluc purification

3.1.1. Optimization of flash chromatography

Normal phase flash chromatography used with silica cartridges was first checked for its ability to separate BPA-G from BPA and other interfering urine components. Thin layer chromatography (TLC) was used for the mobile phase selection [12] and the best separation between BPA and BPA-G was obtained with a CH_2Cl_2 /EtOH (70/30) mixture. Gradient elution with this selected mixture and sample loading were optimized according to the general method used for the transposition of TLC to flash chromatography [19]. However, because of its high polarity, BPA-G was strongly retained on the silica and eluted in the last fractions of the gradient, which made accurate UV detection difficult. Consequently, reverse phase flash chromatography was tested with a C18 cartridge. The solvent and gradient elution developed for semi-preparative chromatography were adapted for flash chromatography [12]. A good separation between BPA, BPA-G and interfering urine components was obtained with a H_2O /MeOH gradient elution in less than 40 min and after injection of 4 mL of pre-concentrated urine (Supplementary material).

3.1.2. BPA-Gluc identification

The fractions collected by flash chromatography were pooled and analyzed by LC-UV and LC-MS/MS. For both methods of detection, no interference was observed on the chromatograms, with only one peak that was eluted at $t_R = 2.5$ min. With UV detection, this peak had maximum absorbance at the following wavelengths: $\lambda_{abs} = 190, 230$ and 280 nm corresponding to the transitions of the phenol function. In mass spectrometry, one peak was observed at $t_R = 2.5$ min at $m/z = 403$ which corresponded to the deprotonated parent ion $[M-H]^-$ of BPA-G. MS/MS was performed at $m/z = 403$ with 20 eV of collision energy; the resulting fragments gave characteristic ions at $m/z = 227$ and $m/z = 175$ corresponding to the BPA and glucuronic acid moieties, respectively and at $m/z = 113$ corresponding to the loss of CO_2 and H_2O from the glucuronic acid moiety (Fig. 1). Chemical structure was confirmed by 1H and ^{13}C NMR and results were similar to those described in the literature [5,9] (Supplementary material).

3.1.3. Calculation of the amount of purified BPA-G

Initially the BPA-G obtained from the first purification was quantified by UPLC/MS/MS after enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase using a BPA spiked plasma standard curve (1–100 μ g/mL). The BPA concentration measured after enzymatic hydrolysis was 22.7 ± 1.0 mg/mL corresponding to 40.3 ± 1.8 mg/mL of BPA-G after correction for the difference in molecular weights. For this first attempt, the method of BPA-G purification appeared to be promising in terms of amount. Fractions were then directly quantified with a spiked BPA-G plasma standard curve (0.01–20 μ g/mL), which showed that 1036 mg of BPA-G could be purified from one ewe. The time-course of the presence of BPA-G in the urine indicated that the yield could be optimized by collecting urines samples for much longer after BPA administration than 3.5 h (Fig. 4).

3.2. Simultaneous quantification of BPA and BPA-G

3.2.1. Optimization of the UPLC/MS/MS assays

The extraction procedure for the BPA and BPA-G was a simple AcN dilution/precipitation for plasma and urine samples to mini-

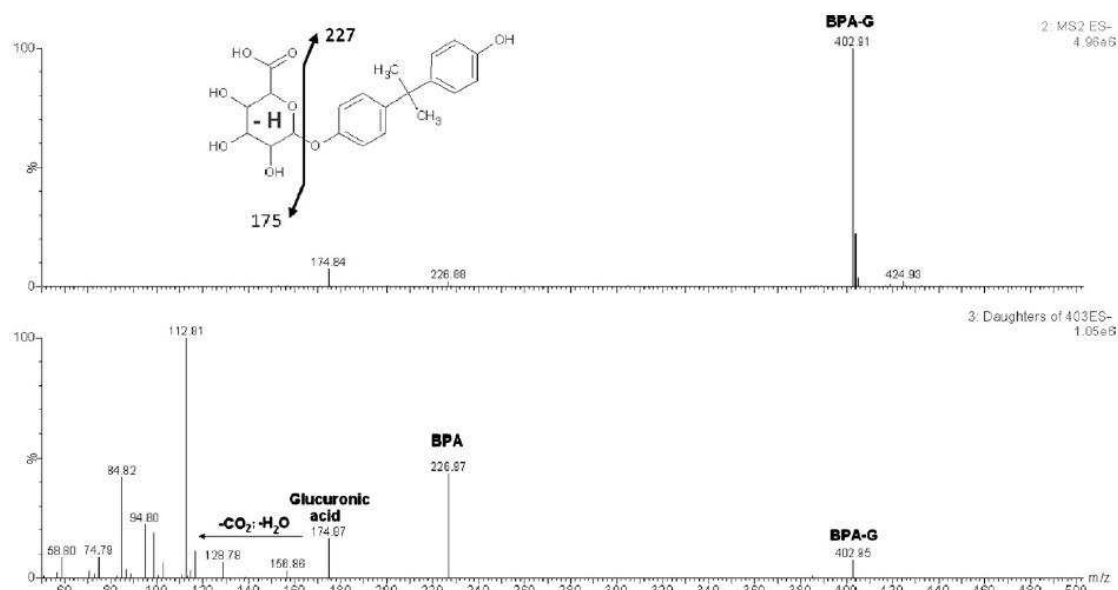


Fig. 1. MS and MS/MS spectra obtained for the collected BPA-G fractions after flash chromatography purification (MS/MS: $m/z = 403$; Ecoll = 20 eV).

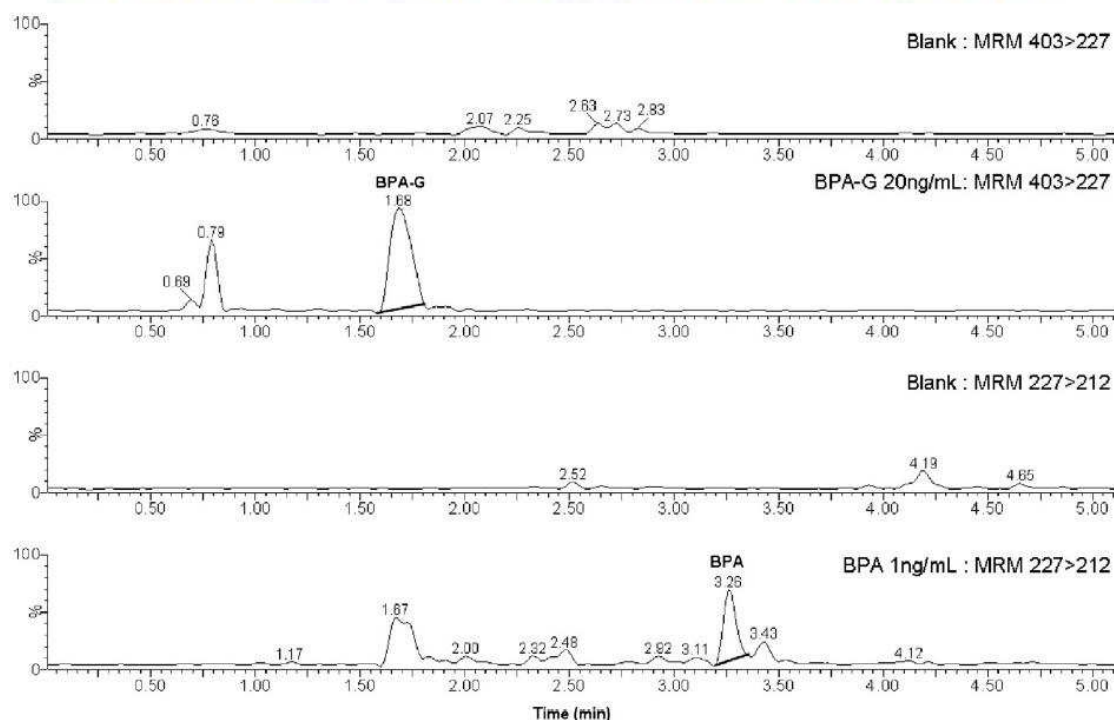


Fig. 2. MRM chromatograms of blank and spiked sheep plasma (1 ng/mL of BPA and 20 ng/mL of BPA-G). The retention times of BPA and BPA-G were 1.68 min and 3.26 min, respectively.

mize potential sources of contamination by BPA. No interference in blank matrices was detected at the transition of BPA and BPA-G with this extraction procedure (Fig. 2). The elution conditions were optimized to separate BPA from BPA-G and BPA-G from the solvent front in the shortest run time (less than 5 min). The retention times of BPA and BPA-G were 1.68 min and 3.26 min, respectively (Fig. 2).

3.2.2. Validation of the methods

The ranges of the calibration curve and validation results are summarized in Table 1. Partial validation was successful for both matrices (plasma, urine) of piglets, dogs, rats and mice (data not shown), attesting to the robustness of the method and its suitability for different species. For BPA quantification, the accuracy

Table 1
Validation results of BPA and BPA-G in sheep plasma and urines.

Matrices	BPA Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy	Precision RSD%		BPA-G Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy	Precision RSD%	
				Intra-day	Inter-day				Intra-day	Inter-day
Calibration range										
Plasma	LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ($n=6$)	0.0006				LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ($n=6$)	0.002			
BPA 0.001–1 $\mu\text{g/mL}$ BPA-Gluc 0.02–20 $\mu\text{g/mL}$	0.001 QC ($n=18$)	0.00108	108%	12%		0.020 QC ($n=18$)	0.017	102%	6%	
	0.0025 0.025 0.250	0.0024 0.024 0.252	97% 95% 101%	12% 7% 6%	12% 11% 3%	0.050 0.750 7.50	0.051 0.825 8.11	103% 110% 108%	12% 8% 8%	12% 8% 8%
Urine	LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ^b ($n=6$)	0.002				LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ^b ($n=6$)	0.010			
BPA 0.025–10 $\mu\text{g/mL}$ BPA-Gluc 1–500 $\mu\text{g/mL}$	0.025 QC ($n=18$)	0.027	109%	10%		1 QC ($n=18$)	0.97	97%	15%	
	0.075 0.25 2.50	0.079 0.266 2.54	105% 106% 101%	10% 9% 11%	10% 9% 11%	2.50 25 250	2.47 23.9 227	99% 96% 91%	17% 18% 15%	17% 18% 15%

^a LOD estimated from 6 blanks and with signal to noise ratio $S/N=3$.

^b LOQ established in urine as the lowest calibration point necessary for toxicokinetic investigations.

ranged from 95% to 109% and the dispersion was lower than 12%. The accuracy range of BPA-G was 91–110% with precision lower than 15% for plasma and around 15–18% for urine samples.

The LOQ was set and validated for the lowest value of the calibration curve chosen for its relevance toward toxicokinetic investigation. For BPA-G in urine, this LOQ was 1000-fold higher than those reported in the literature after enzymatic hydrolysis [7,20]. We did not aim at determining the lowest concentration of BPA-G that could be measured with suitable precision and accuracy to fulfill FDA requirements [14]. LODs were 1 and 10 ng/mL in plasma and urine, respectively (Table 1) suggesting that it is possible to optimize the assay to obtain a LOQ within the ng/mL range.

Since the matrix effect observed for stable isotope-labeled internal standard is similar to those observed for the matching

analyte [18], matrix factor was calculated in both matrices only for BPA-G. In plasma samples, BPA-G matrix effects were negligible ($MF=1.04\pm0.14$). In contrast, BPA-G MF in urine samples was 0.57 ± 0.09 suggesting BPA-G ionization suppression. As for BPA, this matrix effect could be overcome by the use of internal standard of BPA-G labeled with a stable isotope. Purification of such an internal standard with our method has been envisaged but it would require large amounts of isotope-labeled BPA as BPA-G is extracted from sheep urine. It is noteworthy that this matrix effect appeared to be similar for three levels of BPA-G concentrations covering the calibration range limiting its potential impact on assay performance. As mentioned above and based on the LOD evaluation, our method could be improved to be suitable for BPA and BPA-G residue screening in human. Nevertheless, this method gave sensitivity and reproducibility suitable for TK investigations.

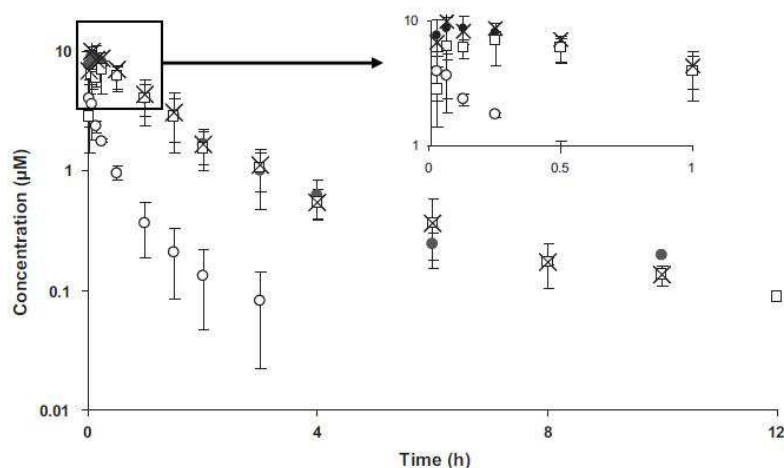


Fig. 3. Mean + SD plasma molar concentrations versus time of BPA (○), BPA-G (□) and BPA-G + BPA (x) after direct measurement, and BPA (●) obtained after an enzymatic hydrolysis, after an IV bolus administration of BPA (0.5 mg/kg (b.w.)) to sheep ($n=3$).

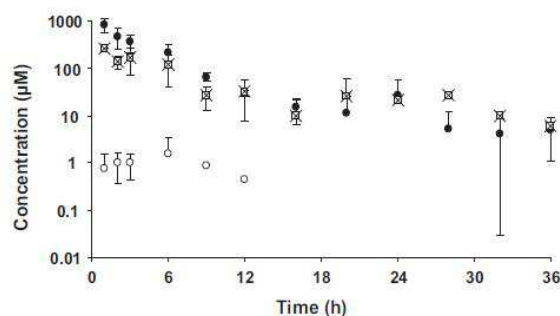


Fig. 4. Mean $\pm$ SD urine molar concentrations of BPA ($\circ$), BPA-G ($\square$) and BPA-G + BPA ($\times$) after direct measurement and BPA ($\bullet$) obtained after an enzymatic hydrolysis, versus time after an IV bolus administration of BPA (0.5 mg/kg (b.w.)) to sheep ($n=3$).

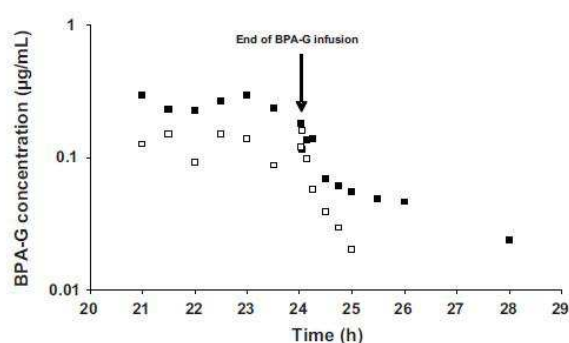


Fig. 5. Plasma concentrations of BPA-G versus time after an IV infusion of BPA-G (1 mg/(kg.d) (b.w.)) to sheep ($n=2$).

3.3. Applicability of the method for toxicokinetic studies of BPA and BPA-G

Two experiments were carried out to verify the suitability of the direct measurement of BPA-G for TK studies.

Firstly, as shown in Figs. 3 and 4, BPA and BPA-G were quantified up to 12 h in plasma and up to 36 h in urine after an IV bolus administration of BPA (0.5 mg/kg b.w.) in sheep. Our method appeared to be suitable to determine the time course of BPA and BPA-G concentrations in both urine and plasma in the same run without the use of enzymatic hydrolysis.

Secondly, BPA and BPA-G were assayed after an IV infusion of BPA-G (1 mg/(kg.d)). The mean steady-state BPA-G concentration ($C_{ss}[BPA-G]$) was $0.185 \pm 0.072 \mu\text{g/mL}$. The direct BPA-G quantification enabled the time-course of BPA-G concentrations to be monitored after the end of the infusion. BPA-G concentrations decreased rapidly and were below the limit of quantification (0.02 $\mu\text{g/mL}$) 4 h after the end of the infusion (Fig. 5). Interestingly, no BPA was detected, suggesting that BPA-G was neither significantly hydrolysed into BPA *in vivo*, nor during the sample extraction procedure.

3.4. Comparison between β -hydrolysis of BPA-G and direct BPA-G quantification

BPA-G concentrations in plasma samples after BPA-G infusion ($n=29$) were measured after enzymatic hydrolysis using either a hydrolysis BPA-G standard curve or enzyme-treated BPA curves. As shown in Fig. 6, the values obtained with the two calculations were perfectly correlated according to a linear curve equation with an R^2

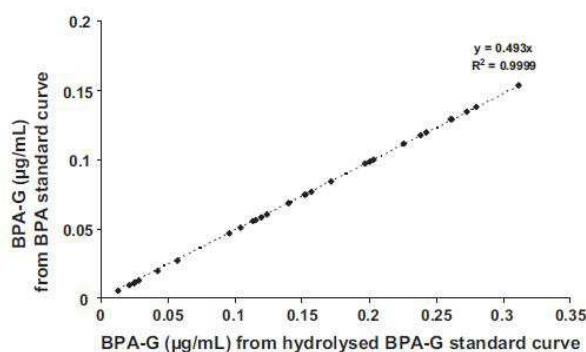


Fig. 6. Sheep BPA plasma concentrations ($n=29$) after BPA-G IV infusion (1 mg/(kg.d) (b.w.)) measured by using a hydrolysis BPA-G standard curve (X-axis) versus the same BPA-G plasma samples measured with an enzyme-treated BPA curve (Y-axis).

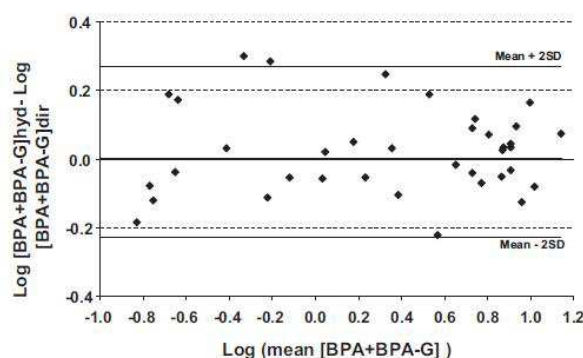


Fig. 7. Log-transformed Bland-Altman plots of BPA + BPA-G between the direct measurement method (dir) and the enzymatic hydrolysis method (hyd) for the corresponding BPA + BPA-G plasma concentration. The X-axis is the logarithmic mean of the BPA + BPA-G measured with the two methods and the Y-axis is the log-transformed difference between the two methods.

of 0.9999 and a slope of 0.493, close to the ratio of the molecular weights of BPA to BPA-G (0.564). Thus the difference between the two slopes accounted for less than 7% of the expected value.

BPA-G and BPA concentrations in sheep plasma and urines following an IV bolus of BPA were evaluated in the same samples with both the enzymatic hydrolysis method and the simultaneous direct measurement method (Figs. 7 and 8). Log-transformed Bland-Altman plots showed that the residuals were randomly distributed around the mean value of the two measurements for plasma samples (Fig. 7) attesting that the two methods were in good agreement [21]. Moreover, this good correlation between the two methods clearly suggests that the contribution of BPA-sulfate to total BPA concentration if any is negligible.

However in urine, the agreement between the two methods was biased particularly for the highest values (Fig. 8). Indeed, the values obtained after hydrolysis were systematically higher than those obtained by direct measurement. It can be assumed that metabolites other than BPA-G can be eliminated in urines [8] and that these metabolites are also sensitive to hydrolysis by β -glucuronidase. The contribution of these BPA metabolites formed by hydrolysis might be sufficient in high concentrations to lead to an overestimation of BPA-G.

Furthermore, Table 2 shows that when measuring the total amounts of BPA found in urines over 36 h following the IV bolus administration of BPA as a percentage of the administered

Table 2
Percentage of BPA dose found in urine with the two methods.

Sheep	% BPA dose			
	BPA	BPA-G	BPA hydrolyzed	Other Metabolites
1	<0.01%	24.7%	41.1%	16.4%
2	<0.01%	25.4%	82.0%	56.6%
3	<0.01%	18.2%	34.1%	15.9%
CV%		17%	49%	79%

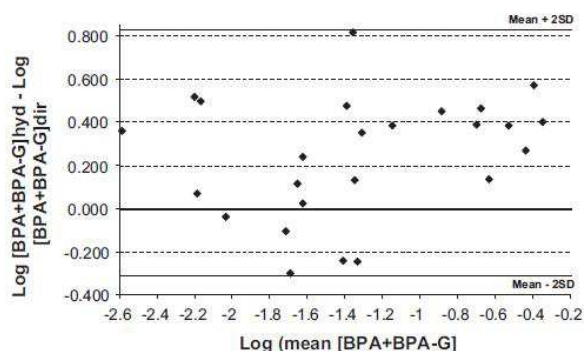


Fig. 8. Log-transformed Bland–Altman plots of BPA+BPA-G between the direct measurement method and the enzymatic hydrolysis method for the corresponding BPA+BPA-G urine concentration.

dose, the hydrolysis method led to an inter-individual coefficient of variation much higher than the direct method. This could be explained by modulation of the efficiency of the enzymatic hydrolysis by different factors such as contamination or infections [22,23]. From this standpoint, the direct measurement method can be considered as more reliable than the enzymatic hydrolysis one.

4. Conclusion

The present study describes a novel method of BPA-G purification from urine and a new UPLC/MS/MS method for the simultaneous quantification of BPA and BPA-G in urine and plasma. This new approach of purification by flash chromatography enabled the rapid purification of large amounts of BPA-G in the gram range with a purity compatible with standard grade norms [24]. The simultaneous quantification of BPA and BPA-G by UPLC/MS/MS has been validated according the criteria of the FDA guidelines. The particular advantage of this method is its ability to quantify both BPA and BPA-G rapidly, in less than 5 min and in a single run. This is a real benefit in terms of the time devoted to sample preparation and analysis. This method is all the more useful in that (1) it allows BPA-G to be specifically assayed independently of any other conjugated BPA metabolites and (2) it avoids the problems of factors likely to alter β -glucuronidase activity and thereby the accurate

measurement of BPA-G in complex matrices such as urine or tissue extracts.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Cécile Canlet for her contribution to the NMR analyses and Dr Olivier Puel for his advice on the flash chromatography.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.talanta.2011.07.040.

References

- [1] F.S. Vom Saal, C. Hughes, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 926.
- [2] G. Ginsberg, D.C. Rice, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1639.
- [3] W. Volkel, T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, W. Dekant, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 1281.
- [4] A.M. Calafat, X. Ye, L.Y. Wong, J.A. Reidy, L.L. Needham, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 39.
- [5] R.W. Snyder, S.C. Maness, K.W. Gaido, F. Welsch, S.C. Sumner, T.R. Fennell, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168 (2000) 225.
- [6] W. Dekant, W. Volkel, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228 (2008) 114.
- [7] J.L. Carwile, H.T. Luu, L.S. Bassett, D.A. Driscoll, C. Yuan, J.Y. Chang, X. Ye, A.M. Calafat, K.B. Michels, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1368.
- [8] D. Zalko, A.M. Soto, L. Dolo, C. Dorio, E. Rathahao, L. Debrauwer, R. Faure, J.P. Cravedi, *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 309.
- [9] H. Kurebayashi, H. Betsui, Y. Ohno, *Toxicol. Sci.* 73 (2003) 17.
- [10] J.P. Jaeg, E. Perdu, L. Dolo, L. Debrauwer, J.P. Cravedi, D. Zalko, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4935.
- [11] J.R. Kramer, T.J. Deming, *Biomacromolecules* 11 (2010) 3668.
- [12] P. Weber, M. Hamburger, N. Schafroth, O. Poterat, *Fitoterapia* 82 (2011) 155.
- [13] S.H. Collet, N. Picard-Hagen, C. Viguie, M.Z. Lacroix, P.L. Toutain, V. Gayraud, *Toxicol. Sci.* 117 (2010) 54.
- [14] Anonymous, <http://www.labcompliance.com/info/links/methods/guidelines.aspx>, 2001.
- [15] A.M. Almeida, M.M. Castel-Branco, A.C. Falcao, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 774 (2002) 215.
- [16] M. Feinberg, N. Raguénès, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 239.
- [17] J.M. Sonnergaard, *Int. J. Pharm.* 321 (2006) 12.
- [18] C.T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A.J. DeStefano, M.J. Rose, J. Sailstad, V.P. Shah, J.P. Skelly, P.G. Swann, R. Weiner, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1962.
- [19] W.C. Stevens Jr., D.C. Hill, *Mol. Divers.* 13 (2009) 247.
- [20] A.M. Calafat, Z. Kuklenyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J. Ekong, L.L. Needham, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 391.
- [21] J.M. Bland, D.G. Altman, *Lancet* 8 (1986) 307.
- [22] M.A. Abul-Fadl, *J. Clin. Pathol.* 10 (1957) 387.
- [23] E. Boyland, D.M. Wallace, D.C. Williams, *Biochem. J.* 56 (1954).
- [24] Anonymous, <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/h1813e/h1813e.pdf>, 1997.

Supplementary data

Flash chromatography data.

Preparative separations were carried out on a CombiFlash Companion[®] (Teledyne Isco, Wierde, Belgium) consisting of a binary pump, a photodiode array absorbance detector and a fraction collector. The system was monitored with PeakTrack[®] software. Flash chromatography was done on C18 pre-packed columns (Chromabond[®] Flash, 25g, Macherey Nagel, Hoerdlt, France) at a flow rate of 25 mL/min. Pre-concentrated urine samples (4 mL) were injected into the columns, and separated with an H₂O/MeOH gradient elution (CV (0 → 1): 10 % MeOH; CV (1 → 16) 90 % MeOH with CV = Column Volume). The UV detection and visualisation wavelengths were set at 225 and 275 nm respectively. An intense peak of BPA-G was collected at 9 CV. BPA was eluted at approximately 14-15 CV with this gradient elution.

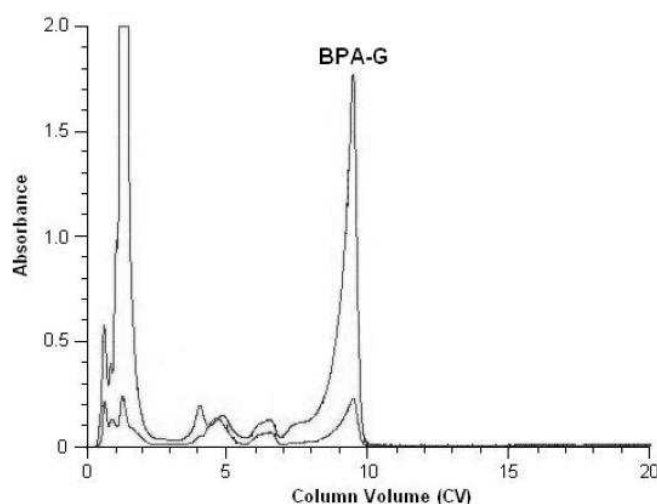


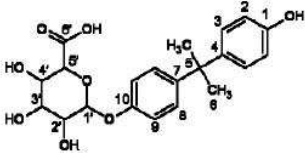
Figure 1: Flash chromatogram of pre-concentrated urine after an oral BPA bolus of 100 mg/kg (b.w.) administered to one ewe. The Y-axis is the absorbance at $\lambda = 225$ nm (the highest intensity) and $\lambda = 275$ nm (the lowest intensity). The X-axis is the number of column volumes eluted on the C18 cartridges. BPA-G was eluted at 9 CV.

NMR data.

Proton (^1H -NMR), carbon (^{13}C -NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600 MHz and 150 MHz, respectively in CD_3OD solution. All measurements were obtained using a Bruker cryoprobe TXI at 300 K with trimethylsilane as standard. To confirm the chemical structures, samples were analyzed using ^1H , ^{13}C and 2D-NMR including gradient selection (gs)-correlation spectroscopy (COSY), (gs)-heteronuclear single quantum coherence (HSQC) and (gs)-heteronuclear multiple bonding connectivity (HMBC).

Integration, chemical shifts and multiplicities of BPA and glucuronide moieties were similar to those described in the literature (table) [5,9], confirming the chemical structure of the metabolite BPA-G.

Table 1: ^1H and ^{13}C NMR results of BPA-G in CD_3OD .

 Structure of BPA-G		
Position carbon no.	δ (ppm) in CD_3OD	
	^1H	^{13}C
1		156.5
2	6.65 (d, 8.4) ^a	116.1
3	6.98 (d, 8.4)	129.2
4		143.5
5		43.1
6	1.56 (s)	32.1
7		147.1
8	7.09 (d, 8.4)	129.2
9	6.96 (d, 8.4)	117.8
10		157.2
1'	4.90 (d, 7.8)	102.8
2'	3.50 (m)	75.1
3'	3.55 (m)	78.1
4'	3.56 (m)	74.0
5'	3.84 (m)	76.8
6'		177.5

^a Multiplicities, J values (in Hz)

I5. Conclusion

Ce développement méthodologique important, dirigé par M. Lacroix, constitue une étape clé, indispensable à notre projet de thèse.

Cette technique a permis de purifier près de 10 grammes de BPA-G d'une pureté allant de 51 à 86%. Aucune des fractions ne présente de niveaux détectables de BPA. Les fractions les plus pures de BPA-G ont été utilisées pour l'étude expérimentale 2 (Caractérisation de l'exposition interne maternelle et fœtale au BPA et à ses métabolites) et l'étude expérimentale 3 (Transfert placentaire du BPA et de son principal métabolite, le BPA-G, chez l'homme).

La purification du BPA-G a également permis de développer au sein du laboratoire un dosage simultané du BPA et du BPA-G sans passer par une hydrolyse enzymatique des conjugués. Ainsi, pour l'ensemble des études expérimentales présentées par la suite (à l'exception de l'évaluation de la balance conjugaison-déconjugaison du BPA et de ses métabolites dans les tissus cibles fœtaux), le BPA et ses métabolites ont été dosés par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) de type triple quadripolaire (Xevo®, Waters, Milford, USA) après extraction à l'acétonitrile en utilisant le BPA- d_{16} et le BPA-G $^{13}C_{12}$ comme standards internes.

II. Caractérisation de l'exposition interne maternelle et fœtale au BPA et à ses métabolites chez l'ovin

II1. Introduction et objectifs

Les études de biosurveillance menées ces dernières années ont montré que l'exposition humaine au BPA est ubiquitaire et que le BPA peut être détecté dans un grand nombre de matrices biologiques liquides et tissulaires humaines (revue [61]).

En particulier, chez l'homme, des niveaux détectables de BPA ont été rapportés dans l'ensemble des tissus et fluides de l'unité fœto-placentaire : le sang de cordon ombilical, le liquide amniotique et le placenta [61], suggérant un transfert du BPA depuis la circulation maternelle vers le compartiment fœtal. En outre, des effets du BPA à des doses inférieures à la DJA observés sur des modèles rongeurs exposés *in utero* à ce PE [21] soulèvent la question du risque pour la santé humaine relative à une exposition fœtale au BPA.

Par ailleurs, des études de biosurveillance suggèrent que les concentrations plasmatiques de BPA pourraient être plus élevées chez les femmes enceintes que dans le reste de la population [77, 78]. Notre hypothèse est que des modifications physiologiques pendant la gestation pourraient entraîner une exposition maternelle accrue qui pourrait conduire à une surexposition fœtale au BPA.

Pour caractériser les expositions internes maternelles et fœtales au BPA et à ses métabolites inactifs, le BPA-G et le BPA-S, un modèle ovin physiologique et intégratif a été développé. Ce modèle prend en compte l'ensemble des facteurs déterminant l'exposition fœtale, à savoir l'exposition interne maternelle, le transfert placentaire, la liaison du BPA aux protéines plasmatiques, le métabolisme de l'unité fœto-placentaire et la recirculation du BPA et/ou de ses métabolites entre le liquide amniotique et la circulation fœtale.

Dans un premier temps, l'effet de la gestation sur la PK du BPA a été évalué grâce à une étude longitudinale (Figure 12).

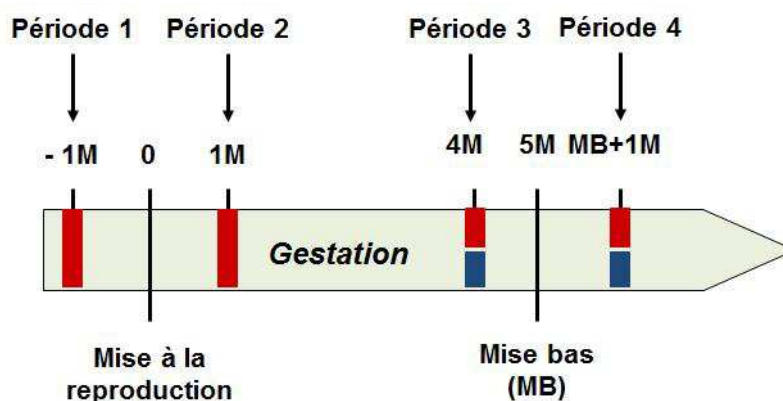


Figure 12. Représentation schématique de l'étude longitudinale.

Le BPA a été administré à quatre reprises (Période 1 à 4) sous forme de perfusion i.v.. à la dose de 2 mg/(kg.j) pendant 24 heures (encarts rouges). Le BPA-G a été administré à deux reprises (Période 3 et 4) sous forme de perfusion i.v.. à la dose de 3.54 mg/(kg.j) pendant 24 heures (encarts bleus). A la 3^{ème} et 4^{ème} période le BPA et le BPA-G ont été administrés selon un protocole en cross-over, *i.e.* la moitié des brebis reçoivent le BPA pendant que l'autre moitié reçoivent le BPA-G, puis les lots sont inversés la semaine suivante, chaque brebis reçoit donc les deux solutés à une semaine d'intervalle. (M : mois)

Dans une seconde partie, sur le modèle du fœtus ovin instrumenté qui autorise à la fois des prélèvements de sang mais aussi des administrations directement au fœtus, les échanges materno-fœtaux et la PK maternelle et fœtale du BPA et du BPA-G ont été caractérisés à 4 mois de gestation.

Cette étude expérimentale a été valorisée par la publication d'un article dans la revue *Biology of Reproduction* accepté en mai 2013. Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie "II2 Article 2".

Dans ce modèle, nous n'avons pas mis en évidence de passage fœto-maternel du BPA-G. Cependant, le volume plasmatique de la brebis est 20 fois supérieur à celui du fœtus et notre limite de quantification du BPA-G ($LOQ_{BPA-G}=50$ ng/mL) est élevée. Ainsi, un effet de dilution pourrait masquer un passage placentaire modéré du BPA-G. C'est pourquoi, nous avons complété cette étude en évaluant l'élimination du BPA-G du compartiment fœtal vers le compartiment maternel, dans les urines maternelles. En effet, les quantités de BPA-G retrouvées dans les urines maternelles intègrent l'ensemble du BPA et du BPA-G transféré du fœtus à la mère. Les résultats de cette étude complémentaire sont présentés dans la partie II3.

II2. Article 2

"Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure."

Corbel T, Gayrard V, Viguié C, Puel S, Lacroix M Z, Toutain P-L and Picard-Hagen N

Biology of Reproduction (2013), 89(1): 11, 1-9

BIOLOGY OF REPRODUCTION (2013) 89(1):11, 1–9
Published online before print 22 May 2013.
DOI 10.1095/biolreprod.112.106369

Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure¹

Tanguy Corbel,^{3,4} Véronique Gayrard,^{3,4} Catherine Viguié,^{3,4} Sylvie Puel,^{3,4} Marlène Z. Lacroix,^{3,4} Pierre-Louis Toutain,^{3,4} and Nicole Picard-Hagen^{2,3,4}

³Institut National de Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1331, Toxalim, Research Center in Food Toxicology, Toulouse, France

⁴Université de Toulouse III, Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Ecole d'Ingénieur de Purpan, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

ABSTRACT

The widespread human exposure to bisphenol A (BPA), a xenoestrogen interfering with developmental processes, raises the question of the mechanisms determining fetal exposure to BPA. A physiological model was developed in ewes to determine whether the pregnancy-associated physiological changes and the metabolic specificities of the fetal-placental unit can influence BPA toxicokinetics (TK) and fetal exposure to BPA. In a first longitudinal study, BPA was infused (2 mg/[kg·day] i.v. for 1 day) into ewes before breeding, at early and late stages of gestation, and after lambing. In a second study, BPA and BPA-glucuronide (BPA-G) were infused intravenously into pregnant ewes or into fetuses at 4 mo of gestation. BPA and its metabolites were assayed in maternal and fetal plasma and amniotic fluid sampled at steady state and after the end of the infusion. The pregnancy status did not modify the TK parameters of BPA and of BPA-G. Five percent of the BPA dose infused into the pregnant ewe was transferred across the placenta to the fetus. The fetal-placental unit was very efficient in metabolizing BPA into conjugated compounds; those metabolites remained trapped in the fetal-placental compartment, leading to a high fetal exposure to BPA conjugates. Taking into account a body weight adjustment, the ovine fetus in late pregnancy is exposed to a BPA dose similar to that of its mother. In contrast to its mother, the fetus exhibits much higher and sustained exposure to BPA metabolites without evidence of their hydrolysis.

bisphenol A, endocrine disruptors, fetal exposure, ovine, placental transfer, sheep, toxicokinetics

INTRODUCTION

Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen widely used as a monomer in the manufacture of epoxy resins and polycarbonate plastics, which could contribute to the almost ubiquitous human exposure to BPA [1]. In humans, BPA is converted

extensively in the liver to BPA-glucuronide (BPA-G) and to a lesser extent to BPA-sulfate (BPA-S), which are inactive metabolites in terms of estrogenicity [2]. Biomonitoring data have shown large individual variations in human plasma BPA concentrations, with values up to 66.50 ng/ml (291.28 nM) [1]. This large range in BPA plasma concentrations could reflect the physiological variability of BPA toxicokinetics (TK). For instance, the high levels of BPA detected in pregnant women compared with nonpregnant women [1] raise the possibility that the BPA TK might be different in pregnant versus nonpregnant women, which could contribute to higher fetal exposure to BPA.

Furthermore, high BPA levels have been reported in the fetal-placental compartment, in the blood of the umbilical cord, in the placenta, and in the amniotic fluid [1], suggesting a transfer of BPA from mother to fetus. In addition, the internal exposure of the fetus to BPA could be exacerbated by the reactivation of conjugates (BPA-G and BPA-S) to BPA by the fetal-placental tissue and the limited drug-metabolizing systems of the fetus [3–5].

The predominant concern in the risk assessment of BPA arises from several studies that found a variety of adverse effects in rodents exposed to low doses of BPA during gestation [6, 7]. However, to translate the findings from animal studies to estimate the health risk of environmental exposures to humans, it is essential to document the factors determining fetal internal exposure to BPA, including 1) the maternal internal BPA exposure, 2) the BPA placental transfer, 3) the binding of BPA to maternal and fetal plasma proteins, 4) the metabolism of BPA by the fetal-placental unit, and 5) the possible recirculation of BPA between the amniotic fluid and the fetal circulation. To evaluate these physiological factors simultaneously, we developed a pregnant sheep model that enables fetal vascular and amniotic sac cannulation and allows direct administration and monitoring of BPA and metabolite levels over time in both fetal and maternal blood, which is not possible in rodents. Sheep have long been used as an animal model for studying the interaction of the maternal-placental-fetal unit [8, 9] and for characterizing the disposition of drugs in the maternal-placental-fetal unit [10, 11]. Furthermore, despite the fact that the syndesmochorial placental structure does not match the hemochorial, multi-villous nature of the human placenta, important similarities in functional structure exist between human and ovine placentae, notably the contact of the trophoblastic layer with desquamated areas of the maternal epithelium in sheep [9].

The present study was intended to determine whether the pregnancy-associated physiological changes and the metabolic specificities of the fetal-placental unit could influence BPA TK, leading to higher exposure of the fetus to BPA. The goals

¹Supported by the French Région Midi-Pyrénées (APRTC 10051322). Presented in part at the 12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, July 8–12, 2012, Noordwijkerhout, The Netherlands, and at the Fourth Health Food Symposium, July 18–19, 2012, Toulouse, France.

²Correspondence: Nicole Picard-Hagen, Unité Mixte de Recherche 1331, Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, BP 87614, F-31076 Toulouse Cedex 3, France.
E-mail: n.hagen-picard@envt.fr

Received: 19 November 2012.

First decision: 21 December 2012.

Accepted: 16 May 2013.

© 2013 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

of our approach were to evaluate 1) the impact of pregnancy on BPA and BPA-G maternal TK, 2) the TK parameters of BPA and BPA-G in fetal compartments, and 3) the BPA and BPA-G placental transfers. The binding of BPA to plasma proteins was also determined in ewes and in fetuses.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Surgery

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of humane animal care under agreement 31-115545 from the French Ministry of Agriculture. Ewes were housed indoors in collective pens. Forty hours before the bleeding periods as well as after surgery and until lambing, the ewes were placed in individual pens. Contention stress was minimized by juxtaposing the pens so that the ewes could still see and smell each other. All animals received two daily meals of a 18% protein concentrate, and hay and water were given *ad libitum*.

Eleven 6-mo-old Lacaune ewes (body weight, 45.67 ± 4.49 kg [mean $\pm$ SD]) were synchronized for estrus by insertion of an intravaginal sponge containing 20 mg of flurogestone acetate (Chronogest CR; Intervet) for 14 days. At the time of sponge removal, the ewes were given an intramuscular administration of 280 IU of equine chorionic gonadotropin (Chronogest PMSG; Intervet) and then inseminated 48 h after the sponge removal. A Lacaune ram with a marking harness was introduced into the flock 14 days later to mate with the nonpregnant females, and the mating patterns were monitored. Pregnancy was diagnosed by the Pregnancy-Associated Glycoproteins test according radioimmunoassay validated method [12] 26 days after artificial insemination and confirmed by ultrasonography.

One fetus per ewe (eight females and three males) was chronically catheterized between 108 and 117 days of gestation with catheters placed in one carotid artery, in one jugular vein, and in the amniotic cavity. Following general anesthesia with thiopental sodium (15 mg/kg *i.v.*) and isoflurane (1% to 1.5%) and surgical preparation, the uterus was accessed through a side-long incision on the left flank of the ewe. The fetal head was identified by intra-abdominal palpation and externalized. The uterine wall was incised as well as fetal membranes that were fixed together by Collins forceps with special care to control any loss of fetal fluids. The fetal carotid artery was catheterized with a polyvinyl catheter (inner diameter, 0.81 mm; outer diameter, 1.69 mm; Medical Tubing). Similarly, a Tygon S-54-HL catheter (inner diameter, 1.02 mm; outer diameter, 1.78 mm; Saint-Gobain) was placed in the jugular vein as well as in the amniotic cavity. The catheters were then secured to the fetal skin, and 500 mg of ampicillin were injected in the amniotic cavity. The uterus was closed with continuous sutures including all fetal membranes and the uterine wall. The abdominal incision was closed using a two-layer suture standard procedure. Before the skin was sutured, all catheters were tunneled subcutaneously and exteriorized through a small flank incision in the sublumbar fossa. The catheters were filled with a heparin-saline solution (1000 IU/ml) and sealed. The exteriorized part of the catheter was wrapped in a compress soaked in povidone-iodine and was stored in a pouch attached to the ewe's abdominal flank. Ewes received tolfenamic acid (2 mg/kg *i.v.*) and long-acting amoxicillin (20 mg/kg *i.m.* twice, two days apart). After surgery, the animals were housed in individual, adjacent pens and had free access to food and water. Ewes were allowed to recover for 4–8 days before experimentation. The catheters were flushed with 2 ml of sterile heparin-saline solution (1000 IU heparin/ml) once daily until the end of the experiment (last infusion) and twice a week until parturition. Blood and amniotic fluid samples were taken from fetuses using strict aseptic procedures.

Ewes delivered spontaneously at 143.1 ± 2.1 days of gestation, corresponding to normal gestation length in sheep.

Solution Preparation and Animal Treatments

The BPA (purity, $\geq 99\%$) and all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. The BPA was extemporaneously dissolved in ethanol/propylene glycol (1/49 vol/vol) at concentrations ranging from 3.02 to 45.12 mM (0.69–10.30 mg/ml). The BPA-G was purified in our laboratory as previously described [13] and was extemporaneously dissolved in 0.9% NaCl buffer at concentrations ranging from 1.83 to 80.90 mM (0.74–18.47 mg/ml).

For maternal infusions, the concentrations of BPA and BPA-G solutions infused into each animal were adjusted to the body weight recorded within the two previous days. For fetal infusions, the body weight of fetuses at 120 days of gestation was arbitrarily chosen to be 2.5 kg [14]. Each compound was infused intravenously for 24 h into the jugular vein via an indwelling catheter connected to a portable syringe pump as previously described [15].

Experimental Design

Experiment 1. Effect of pregnancy on maternal exposure. Experiment 1 was designed to evaluate the impact of pregnancy on the maternal TK parameters of BPA and BPA-G. This longitudinal study was performed on ewes challenged with BPA infusions at four different periods: 1 mo before breeding (period 1, first control period, $n = 6$), 1 mo of pregnancy (period 2, corresponding to early pregnancy, $n = 6$), 4 mo of pregnancy (period 3, corresponding to late pregnancy, $n = 8$), and 1 mo after lambing (period 4, second control period, $n = 4$). During periods 1 and 2, ewes received infusions of BPA (2 mg/[kg-day] *i.v.* for 1 day). For periods 3 and 4, each ewe received both BPA and BPA-G intravenous infusions for 1 day at two different sessions 7 days apart according to a crossover design (BPA and BPA-G doses at the same molar dose: 2 and 3.54 mg/[kg-day], respectively). This dose was selected on the basis of a preliminary TK study in sheep [15] to reach maternal plasma levels close to the estimated maximal human internal exposure (87.60 nM [20 ng/ml] [16]) and to estimate TK parameters correctly.

Experiment 2. Placental transfer and fetal TK parameters. The objectives of experiment 2 were to evaluate the fetal BPA and BPA-G TK parameters and to examine the fetal-maternal and maternal-fetal placental clearances of BPA and BPA-G.

In the first group of animals (fetal administration), three fetuses at 4 mo of gestation received infusions of BPA (5 mg/[kg-day] *i.v.* for 1 day) and BPA-G (3.54 mg/[kg-day] *i.v.* for 1 day) at two different sessions 7 days apart according to a crossover design. The second group of animals (maternal administration) corresponded to the eight ewes at 4 mo of pregnancy that received infusions of BPA (2 mg/[kg-day] *i.v.* for 1 day) and BPA-G (3.54 mg/[kg-day] *i.v.* for 1 day) at two different sessions 7 days apart according to a crossover design during period 3 of experiment 1. For these two groups of animals, blood samples and amniotic fluid were simultaneously collected from the fetuses and their dams.

Sample Collection and Processing

All materials used for the preparation of solutions, sampling, processing, and analysis were in either glass or BPA-free plastic containers.

Maternal and fetal serial blood and amniotic fluid samples were collected before the infusion and during the last 3 h of the infusion to determine steady-state concentrations (Css). After the end of the infusion, the maternal blood samples were collected at 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min and at 4, 6, 8, 10, 22, 34, and 46 h. Fetal blood samples were collected at 15, 30, 60, and 120 min and at 4, 6, 8, 10, 22, 34, and 46 h, and amniotic fluid samples were collected at 22 and 46 h. For ewes, 2-ml blood samples were collected by direct puncture of the right jugular vein. For fetuses, 1-ml arterial blood and amniotic fluid samples were withdrawn through the catheters. Samples were collected in polypropylene tubes with (blood) or without (amniotic fluid) heparin. All samples were immediately chilled in ice and centrifuged for 10 min at $3000 \times g$ and 4°C , after which the plasma was decanted. All samples were stored at -20°C until assayed.

BPA and Metabolite Assays

The BPA, BPA-G, and BPA-S in plasma and amniotic fluid samples were assayed simultaneously as previously described [13].

The calibration curves ranged from 4.4 to 2190 nM (1–500 ng/ml), 124 to 24 752 nM (50–10 000 ng/ml), and 6.8 to 1364 nM (2.1–420 ng/ml) for BPA, BPA-G, and BPA-S, respectively. The mean intra- and interday coefficients of variation for three concentration levels and for BPA, BPA-G, and BPA-S were lower than 15%, and the limits of quantification (LOQs) were validated at 4.4 nM (1 ng/ml), 124 nM (50 ng/ml), and 6.8 nM (2.1 ng/ml), respectively.

BPA-Protein Binding

The percentage of free BPA (i.e., BPA unbound to plasma proteins) in maternal and fetal plasma was determined from three plasma samples obtained at steady state for each ewe and each period and from the plasma of three fetuses collected at steady state.

In vitro protein binding of BPA was evaluated by equilibrium dialysis with a cellulose membrane with a molecular weight cutoff of 5 kDa using [^3H]BPA solution (5 Ci/mmol; Moravek Biochemicals and Radiochemicals) as a tracer (20 000 dpm/ml) according a previously described procedure [17]. The free fraction of BPA was determined as the ratio of the radioactivity measured in the buffer compartment to the radioactivity measured in dialyzed plasma compartment. For each animal and each period, mean free BPA concentrations at steady state were calculated by multiplying the mean total BPA (free plus plasma protein-bound BPA) concentration by the corresponding mean free BPA fraction.

MATERNAL-FETAL EXPOSURE TO BPA AND ITS METABOLITES

TK Analysis

All TK analyses were performed using WinNonlin software (Version 5.3; Pharsight Corporation). Individual plasma concentration-time profiles of BPA and BPA-G were analyzed according to a noncompartmental approach. For the second session of the crossover, when fetuses showed residual detectable levels of BPA-G from the first session, BPA-G concentrations were corrected by the mean of those residual concentrations determined just before the administration. For BPA-G infusions, the sparse data option of WinNonlin was used, allowing computation of the different standard errors associated with the calculated parameters. The area under the plasma concentration-time curve from $t = 0$ to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was obtained by dividing the last observed quantifiable plasma concentration by the slope of the terminal phase as estimated by linear regression by using the best fit option of WinNonlin.

The BPA (or BPA-G) clearance (Cl) was obtained using the following equation:

$$Cl = \frac{\text{Dose}}{AUC_{0-\infty}} \quad (1)$$

The mean residence time (MRT), the steady-state volume of distribution (V_{ss}) and the terminal half-life ($t_{1/2}$) were computed in accordance with classical TK equations [18] described in the Supplemental Data (available online at www.biolreprod.org).

The fraction of BPA metabolized in BPA-G ($F_{BPA-BPA-G}$) in ewes was calculated as the ratio between the AUC_{0-24h} of BPA-G obtained after an intravenous administration of BPA ($AUC_{BPA-BPA-G}$) and corresponding value obtained after an intravenous administration of BPA-G at the equivalent molar dose of 8.8 $\mu\text{mol/kg/day}$ for the two substances using the following equation:

$$F_{BPA-BPA-G} = \frac{AUC_{BPA-BPA-G}}{AUC_{BPA-G}} \quad (2)$$

The BPA maternal-fetal transfer was estimated for each fetus as the input rate of BPA from dam to fetus during maternal exposure with the following equation:

$$\text{BPA Input Rate}_{\text{Mother} \rightarrow \text{Fetus}} = \text{BPA Clearance}_{\text{Fetus}} \times \text{Css BPA}_{\text{Fetal Plasma}} \quad (3)$$

where Css BPA is the mean fetal BPA plasma concentration reached at steady state during the BPA infusion to its mother and $\text{BPA Clearance}_{\text{Fetus}}$ is the mean fetal BPA clearance determined in the first part of experiment 2 (i.e., after fetal BPA administration).

This input rate was then expressed as the percentage of the total maternal dose (μmol) transferred to fetal compartment.

The placental and nonplacental clearance parameters of BPA in the ewe and fetus were calculated with the mean BPA fetal and maternal Css obtained after the maternal and fetal administrations using the two-compartment open TK model of the maternal-fetal unit described by Szeto [19]. This model assumes steady-state plasma concentrations and BPA elimination from both the maternal and fetal compartments. Placental and nonplacental clearances were expressed as percentages of total BPA plasma clearance. For additional information on the TK model, see the Supplemental Data.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Systat 12.0 (SPSS, Inc.). The effect of the physiological status on the maternal BPA and BPA-G plasma Css , on the BPA free fraction, and on the BPA and BPA-G TK maternal parameters was assessed using ANOVA with period as a fixed-effect factor followed by pairwise post hoc comparison. To evaluate the time course of the decline of BPA-G and BPA-S concentrations in fetal plasma after maternal BPA administration or after BPA and BPA-G fetal administrations, the ratio between BPA-G or BPA-S concentrations and the corresponding mean steady-state levels at each sampling time after the arrest of infusion were analyzed using a one-way ANOVA with sampling time as a fixed factor followed by Dunnett post hoc comparisons.

After maternal and fetal BPA administration, mean BPA-G fetal blood concentrations were compared to mean amniotic fluid concentrations using a paired t -test. Ratios between the concentrations of metabolites and the concentrations of BPA in fetal plasma at steady state were compared with the corresponding ratios in maternal plasma using a paired t -test.

RESULTS

Experiment 1. Effect of Pregnancy on Maternal Exposure

Figure 1 shows the time courses of the mean plasma concentrations (nM) of BPA, BPA-G, and BPA-S during and after a 24-h intravenous infusion of BPA at the dose of 2 mg/(kg·day) for the four periods. The BPA TK parameters determined for each period are summarized in Table 1. For each period, BPA concentrations decreased rapidly below the LOQ of the assay in less than 2 h after the end of the infusion. By contrast, high plasma levels of BPA-G were observed during and after BPA infusion. For a BPA external exposure of 2 mg/(kg·day), the overall mean plasma Css were 198 ± 42 nM (45.22 ± 9.63 ng/ml), 1918 ± 407 nM (775 ± 164 ng/ml), and 21.43 ± 9.67 nM (6.60 ± 2.98 ng/ml) for BPA, BPA-G, and BPA-S, respectively. The mean plasma BPA Css obtained at the early stage of pregnancy were slightly higher than those obtained at the first control nonpregnant stage ($P < 0.05$) but did not differ from those obtained during the second control nonpregnant stage (Table 1), suggesting that this difference cannot be attributed to the pregnancy status. The overall mean steady-state ratios of BPA-G to BPA and of BPA-S to BPA were 10.05 ± 2.98 and 0.12 ± 0.06 , respectively. The overall mean free plasma BPA (unconjugated BPA not bound to plasma protein) fraction was $6.21\% \pm 0.70\%$ and was not modified by the physiological status. Consequently, for the mean total BPA concentration of 45.2 ng/ml (198 nM), the internal exposure of ewes to free bioactive BPA was 2.81 ng/ml (12.3 nM).

The mean BPA plasma clearances ranged between 42.9 and 55.9 ml/(kg·min) for the four periods and were not affected by the physiological status ($P > 0.05$). The BPA MRT at the late stage of pregnancy was slightly higher than that obtained at the first nonpregnant stage ($P < 0.05$), but this difference cannot be attributed to the pregnancy status. In ewes at a late pregnancy stage, BPA was extensively conjugated into BPA-G after BPA intravenous administration, with a biotransformation rate of $96\% \pm 22\%$.

The BPA-G TK parameters were evaluated in late pregnancy and after lambing, after a 24-h intravenous infusion of BPA-G at a dose of 3.54 mg/(kg·day) (Table 2). The mean plasma BPA-G clearances were 5.89 and 5.08 ml/(kg·min) in late pregnancy and after lambing, respectively. The pregnancy status did not modify the maternal internal exposure to BPA-G.

Experiment 2. Maternal-Fetal Exposure and Fetal TK Parameters

Maternal-fetal exposure after fetal infusion. Figure 2 depicts the time courses of concentrations of BPA and its metabolites in maternal and fetal plasmas for a representative pregnant ewe during and after fetal 24-h intravenous infusions of BPA and BPA-G.

During the fetal BPA infusion at a dose of 5 mg/(kg·day), the mean fetal BPA Css was 109.1 ± 19.8 nM (24.92 ± 4.53 ng/ml) (Table 3) and decreased rapidly after the end of the infusion, with a $t_{1/2}$ of 0.89 ± 0.83 h. By contrast, the fetal plasma BPA-G and BPA-S levels were very high (8653 ± 2492 and 369 ± 124 nM, respectively) until 10 h after the end of the BPA infusion, then decreased slowly and were significant lower than steady-state values 118 h afterward ($P < 0.05$). The BPA plasma clearance by the fetal-placental unit was 250 ± 78 ml/(kg·min). The MRT and V_{ss} were 9.58 ± 0.10 h and 144 ± 45 L/kg, respectively.

The mean BPA and BPA-G maternal Css were 19.36 ± 7.06 nM (4.42 ± 1.61 ng/ml) and 202 ± 90 nM (82 ± 36 ng/

CORBEL ET AL.

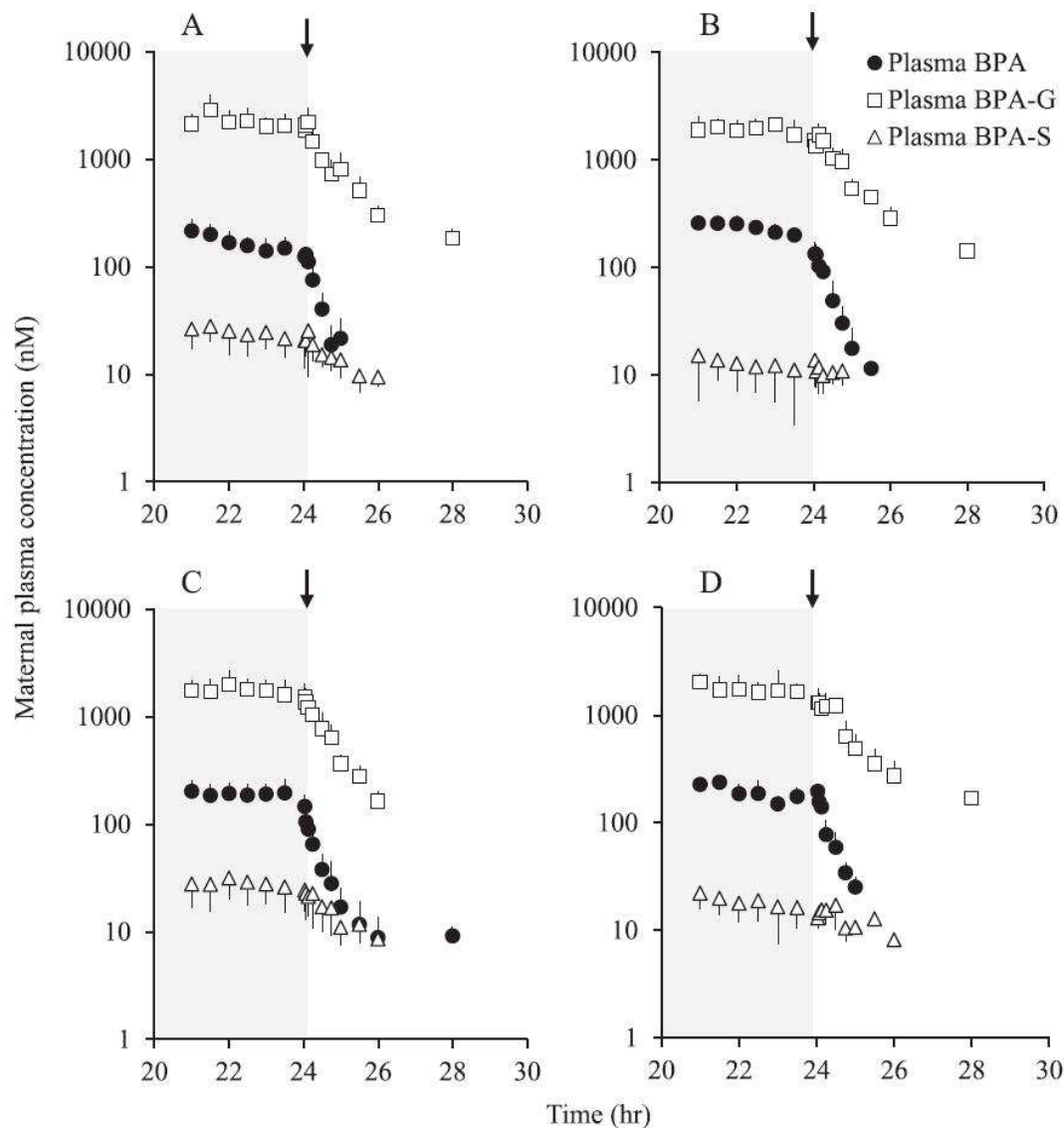


FIG. 1. Semilogarithmic plot of plasma BPA, BPA-G, and BPA-S concentrations (nM; mean $\pm$ SD) versus time during and after the BPA intravenous infusion over 24 h at a dose of 2 mg/(kg-day) for four periods. A) One month before breeding-period (period 1, $n = 6$). B) One month of pregnancy (period 2, $n = 6$). C) Four months of pregnancy (period 3, late pregnancy, $n = 8$). D) One month after lambing-period (period 4, $n = 4$). Blood samples were collected in each ewe during the last 3 h of and after the end of the infusion at 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min and 4, 6, 8, 10, 22, 34, and 46 h. Gray areas represent the last hours of infusion (steady state), and black arrows indicate the end of the BPA infusion.

TABLE 1. BPA TK parameters (mean $\pm$ SD) after an intravenous infusion of BPA (2 mg/[kg-day]) to ewes at four periods.

Parameter	Before breeding ($n = 6$)	Early pregnancy ($n = 6$)	Late pregnancy ($n = 8$)	After lambing ($n = 4$)
Clearance (ml/[kg·min])	54.39 $\pm$ 12.03	42.93 $\pm$ 7.17	55.92 $\pm$ 13.88	48.33 $\pm$ 4.16
AUC (μ M/h)	2.82 $\pm$ 0.78	3.47 $\pm$ 0.54	2.76 $\pm$ 0.72	3.04 $\pm$ 0.24
Vss (L/kg)	30.42 $\pm$ 6.78	24.10 $\pm$ 4.11	32.06 $\pm$ 7.85	27.16 $\pm$ 2.41
$t_{1/2}$ (h)	0.32 $\pm$ 0.18	0.33 $\pm$ 0.14	0.76 $\pm$ 0.66	0.41 $\pm$ 0.19
MRT (h)	9.32 $\pm$ 0.03 ^a	9.35 $\pm$ 0.05 ^{ab}	9.56 $\pm$ 0.25 ^b	9.36 $\pm$ 0.05 ^{ab}
Css BPA (nM)	172 $\pm$ 40 ^a	236 $\pm$ 26 ^b	192 $\pm$ 46 ^{ab}	193 $\pm$ 24 ^{ab}
Css BPA-G (nM)	2252 $\pm$ 310	1933 $\pm$ 243	1742 $\pm$ 446	1743 $\pm$ 445
Css BPA-S (nM)	24.80 $\pm$ 7.75	12.39 $\pm$ 6.37	27.16 $\pm$ 9.90	18.50 $\pm$ 5.95

^{a,b} For each line, means that have no superscript in common are significantly different from each other (Tukey test, $P < 0.05$).

MATERNAL-FETAL EXPOSURE TO BPA AND ITS METABOLITES

TABLE 2. BPA-G TK parameters (mean $\pm$ SD) after an intravenous infusion of BPA-G (3.54 mg/[kg-day]) to ewes at two physiological stages.

Parameter	Late pregnancy (n = 8)	After lambing (n = 6)
Clearance (ml/[kg-day])	5.89	5.08
AUC (μ M/h)	24.76	28.72
V _{ss} (L/kg)	3.67	3.24
t _{1/2} (h)	3.59	7.26
MRT (h)	10.39	10.64
C _{ss} BPA-G (nM)	2185 $\pm$ 836	1570 $\pm$ 570

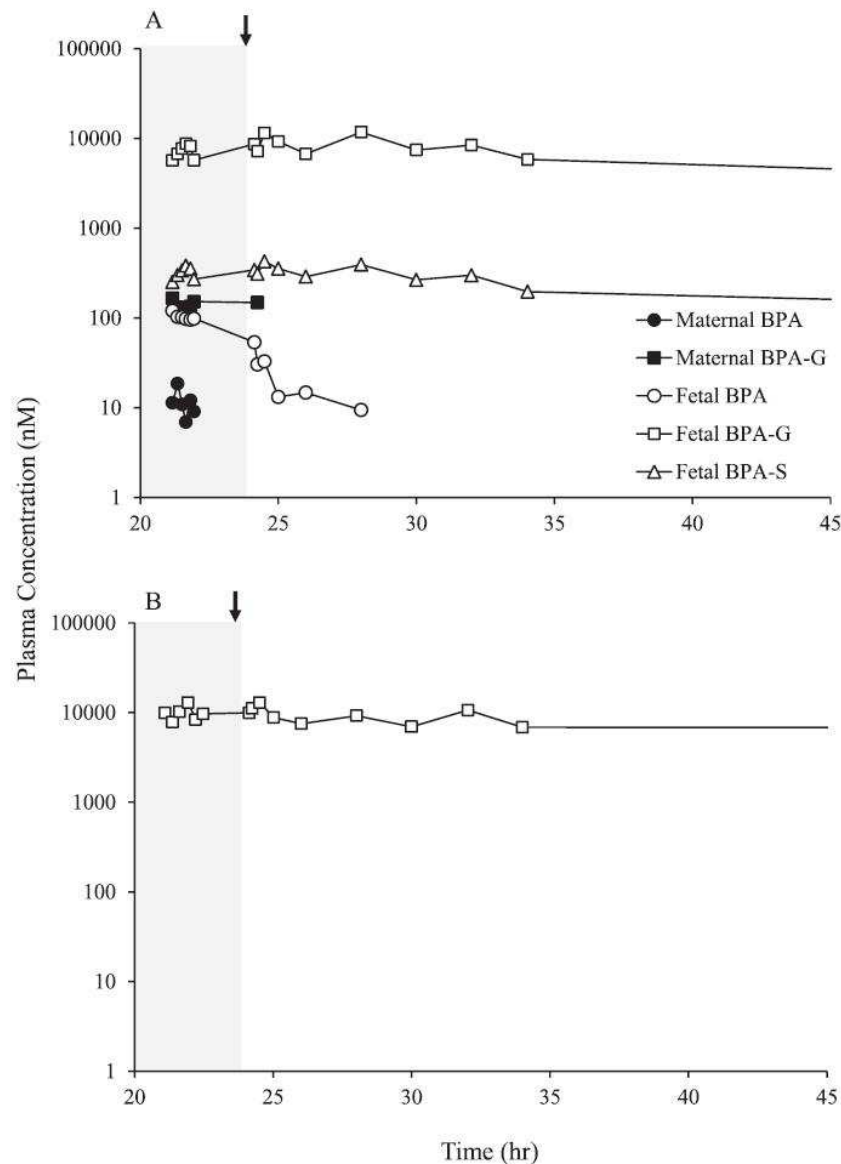


FIG. 2. Semilogarithmic plot of BPA and its metabolites (BPA-G and BPA-S) concentrations (nM) in maternal and fetal plasma versus time during and after a 24-h fetal intravenous infusion (A) of BPA at a dose of 5 mg/(kg-day) or (B) of BPA-G at a dose of 3.54 mg/(kg-day) in one representative, chronically catheterized fetus at 4 mo of gestation. Blood samples were collected in each mother-fetus pair during the last 3 h and after the end of the infusion at 15, 30, 60, and 120 min and 4, 6, 8, 10, 22, 34, and 46 h in fetal plasma and at 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min and 4, 6, 8, 10, 22, 34, 46 h in maternal plasma. Gray areas represent the last hours of infusion (steady state), and black arrows indicate the end of the BPA or BPA-G infusion. After fetal BPA-G infusion, BPA-G was not detected in maternal plasma, and BPA was detected neither in fetal plasma nor in maternal plasma.

TABLE 3. C_{ss} (mean ± SD) in maternal and in fetal plasmas and in amniotic fluid after an intravenous infusion of BPA (5 mg/[kg-day]) in three fetuses at 4 mo of gestation or after an intravenous infusion of BPA (2 mg/[kg-day]) in eight pregnant ewes at 4 mo of pregnancy.

Parameter	Fetal BPA administration (n = 3)			Maternal BPA administration (n = 8)		
	Maternal plasma	Fetal plasma	Amniotic fluid*	Maternal plasma	Fetal plasma	Amniotic fluid*
BPA (nM)	19.36 ± 7.06	109.1 ± 19.8	ND	191.91 ± 45.76	25.23 ± 12.60	ND
BPA-G (nM)	202 ± 90	8653 ± 2492	1389 ± 1075	1742 ± 446	6092 ± 4659	1450 ± 1766
BPA-S (nM)	18.01 ^a	369 ± 124	21.67 ^a	27.16 ± 9.90	221 ± 135	26.36 ± 11.50

* ND, not detectable.

^a n = 1.

ml), respectively (Table 3), and became lower than the LOQ after the end of the fetal BPA infusion (Fig. 2A). The mean BPA-S maternal C_{ss} was 18 nM in one ewe and lower than the LOQ in two ewes. The mean ratio of fetal to maternal BPA concentration at steady state was 6.17 ± 2.45 . The mean BPA-G:BPA ratios were higher in fetuses than in mothers (78 vs. 11). In amniotic fluid, BPA-G steady-state levels (1389 ± 1075 nM [561 ± 434 ng/ml]), while high and variable, remained lower than plasma levels (*t*-test, $P < 0.05$). After the BPA fetal infusion, the fractions of BPA, BPA-G, and BPA-S at steady state in fetal plasma were $1.22\% \pm 0.14\%$, $94.8\% \pm 0.4\%$, and $4.02\% \pm 0.32\%$, respectively.

The overall mean free plasma BPA fraction measured during BPA infusions in three fetuses was $10.06\% \pm 0.40\%$, which means that for the mean total BPA concentration of 24.9 ng/ml (109 nM), the calculated internal exposure of the fetuses to free bioactive BPA was 2.50 ng/ml (11 nM).

After the BPA-G fetal infusion at a dose of 3.54 mg/(kg-day) (Fig. 2B), the mean fetal BPA-G C_{ss} was 11207 ± 4711 nM (4528 ± 1903 ng/ml), and it remained very high until 48 h after the end of the infusion, then decreased slowly and was significantly lower than steady-state values 21 h afterward ($P < 0.05$). In amniotic fluid collected from one fetus, high BPA-G levels were detected (162 nM [65.53 ng/ml] at steady state) and remained relatively constant (233 nM [94.13 ng/ml]) 5 days after the end of the infusion. After the BPA-G fetal infusion, no BPA was detected in fetal plasma, and taking into account the BPA LOQ of 4.4 nM, it can be estimated that less than 0.04% of BPA-G could have been converted back to BPA in the fetus.

Neither BPA nor its metabolites were detected in the maternal plasma after a fetal infusion of BPA-G.

Maternal-fetal exposure after maternal infusion. Figure 3 illustrates the time courses of concentrations of BPA and its metabolites in maternal and fetal plasma for one representative pregnant ewe during and after a 24-h maternal intravenous infusion of BPA and of BPA-G.

After a BPA maternal infusion at a dose of 2 mg/(kg-day), the mean maternal plasma BPA C_{ss} was 192 ± 46 nM (44 ± 10 ng/ml) (Fig. 3A and Table 3) and then decreased rapidly, with a $t_{1/2}$ of 0.76 ± 0.66 h. The mean BPA plasma clearance was 55.9 ± 13.9 ml/(kg-min) (Table 1). The mean fetal BPA C_{ss} was 25.2 ± 12.6 nM (5.76 ± 2.88 ng/ml), resulting in a mean ratio of total aglycone BPA levels between the mother and fetus of 7.61 ± 2.39 . The calculated maternal and fetal BPA free concentrations were 2.73 and 0.58 ng/ml, respectively, resulting in a mean ratio of free BPA levels between the mother and fetus of 4.7. The BPA placental transfer from maternal to fetal compartment calculated using Equation 3 was $4.53 \pm 2.55\%$ of the maternal dose.

The fetal plasma BPA-G and BPA-S levels were very high (6092 ± 4659 and 221 ± 135 nM, respectively), resulting in a mean ratio of BPA conjugates between the mother and fetus of 0.30 ± 0.07 for BPA-G and 0.14 ± 0.04 for BPA-S. The fetal

plasma concentrations at steady state were close in two males and in six females: 20.92 ± 5.91 versus 26.67 ± 14.34 nM for BPA, 5108 ± 2674 versus 6419 ± 5333 nM for BPA-G, and 166 ± 92 versus 240 ± 148 nM for BPA-S. The mean BPA-conjugates:BPA ratios were much higher in fetuses compared to mothers (251 vs. 9.4 for BPA-G and 8.75 vs. 0.15 for BPA-S; *t*-test, $P < 0.001$). They remained relatively constant after the end of the BPA infusion, decreased slowly, and were significantly lower than steady-state values 10 and 4 hours later ($P < 0.05$).

In amniotic fluid, BPA was not detected, but steady-state BPA-G levels, while high and variable (1450 ± 1766 nM), remained lower than plasma levels (*t*-test, $P < 0.05$).

After the BPA maternal infusion, the fractions of BPA, BPA-G, and BPA-S at steady state were $10.14\% \pm 2.71\%$, $88.50\% \pm 2.52\%$, and $1.36\% \pm 0.23\%$, respectively, of total BPA in maternal plasma and $0.49\% \pm 0.25\%$, $95.42\% \pm 2.41\%$, and $4.09\% \pm 2.20\%$, respectively, of total BPA in fetal plasma.

After the BPA-G maternal infusion at a dose of 3.54 mg/(kg-day) (Fig. 3B), the maternal plasma BPA-G concentrations decreased rapidly, with a $t_{1/2}$ of 3.59 h (Table 2). BPA was not detected in plasma of the ewe.

Neither BPA nor its metabolites were detected in the fetal plasma or in the amniotic fluid after a maternal infusion of BPA-G.

Placental Clearances

The total fetal clearance (515 ml/min), calculated using the two-compartment open TK model [19], was relatively low compared with the total maternal clearance (2698 ml/min). However, when normalized to the respective body weight, the total fetal clearance (206 ml/[kg-min]) was fourfold higher than the total maternal clearance (46.7 ml/[kg-min]). These total maternal and fetal BPA clearances are in very close agreement with those resulting from the noncompartmental TK analysis. The transplacental clearance from fetus to mother (470 ml/min) was approximately sevenfold higher than that from mother to fetus (67 ml/min). Maternal nonplacental clearance (2631 ml/min) accounted for 98% of the maternal total clearance, whereas fetal nonplacental clearance (44.3 ml/min) accounted for only 8.6% of the fetal total clearance.

DISCUSSION

Pregnancy represents a critical window of exposure for the fetus during which developmental processes are extremely sensitive to estrogenic interferences. BPA is one of the xenobiotics of major concern for fetal development. The degree of human exposure to BPA, particularly during pregnancy and fetal development, is not clear. This highlights the urgent need for a better understanding and characterization of the dynamics of maternal-fetal-placental exchanges of BPA

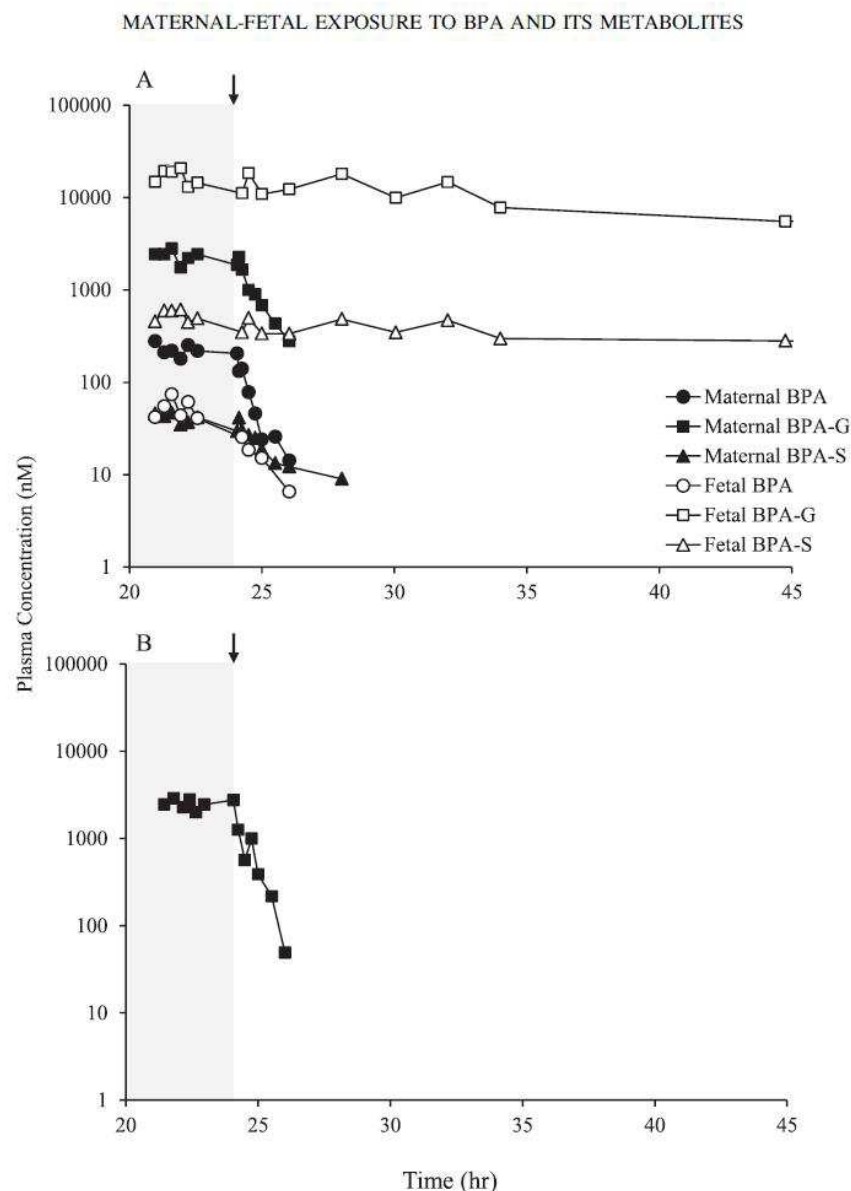


FIG. 3. Semilogarithmic plot of BPA and its metabolites (BPA-G and BPA-S) concentrations (nM) in maternal and fetal plasma versus time during and after a maternal 24-h intravenous infusion (A) of BPA at a dose of 2 mg/(kg·day) or (B) of BPA-G at a dose of 3.54 mg/(kg·day) in one representative ewe at 4 mo of pregnancy. Blood samples were collected in each mother-fetus pair during the last 3 h and after the end of the infusion at 15, 30, 60, and 120 min and 4, 6, 8, 10, 22, 34, and 46 h in fetal plasma and at 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min and 4, 6, 8, 10, 22, 34, and 46 h in maternal plasma. Gray areas represent the last hours of infusion (steady state), and black arrows indicate the end of the BPA or BPA-G infusion. After maternal BPA-G infusion, BPA-G was not detected in fetal plasma, and BPA was detected neither in maternal plasma nor in fetal plasma.

based on data obtained in a model relevant for studying the interaction of the maternal-placental-fetal unit in humans.

The main result obtained in the present physiological model of pregnant ewe is that 4.5% of a BPA dose intravenously infused into pregnant ewes was transferred across the placenta to the fetus, where it was rapidly conjugated into BPA-G and BPA-S. These metabolites then remained trapped in the fetal compartment. In agreement with this result, approximately 4% of a radiolabeled BPA dose was recovered in the fetal compartment (whole litter, placenta and amniotic fluid) in CD-1 pregnant mice 24 h after BPA administration [20]. Considering the body weight ratio of 25 between the dam and

its fetus, it can be estimated that the fetus was exposed to a similar external BPA dose as its mother (i.e., 2.08 mg/[kg·day], for a maternal BPA dose of 2 mg/[kg·day]).

The main objective of the present study was to determine if maternal exposure to BPA during the pregnancy led to a higher fetal BPA exposure during the critical window of development. From our ovine model, we have shown that the pregnancy modified neither the maternal internal exposure to total or free BPA and its metabolites, nor the TK parameters of BPA and BPA-G. Furthermore, the plasma unbound BPA fraction of 6% remained similar in nonpregnant and in pregnant ewes, whatever the pregnancy stage. This value is similar to the

unbound fraction of BPA in humans, which ranges from 5% to 8% [21].

Our *in vivo* sheep model has the advantage of being an integrated physiological system to evaluate the BPA fetal exposure resulting from maternal exposure. We have demonstrated that maternal exposure to BPA did not lead to overexposure of the fetus to the unconjugated form of BPA: The total and free (unbound) bioactive BPA fetal plasma levels were approximately 7.6- and 4.7-fold lower, respectively, than the maternal ones. The difference between the two ratios could be explained at least in part by the twofold lower plasma albumin concentration in the late gestation fetus compared to ewes [22]. However, we cannot exclude that fetal albumin could have a lower affinity for BPA than maternal albumin. In contrast, the fetuses were three- and eightfold more exposed to glucurono- and sulfoconjugates, respectively, than their mothers after a BPA maternal exposure. The unbalanced sex ratio did not enable us to provide definitive assessments on potential sex differences in fetal BPA, BPA-G, and BPA-S internal exposure, but our data suggest that gender might not influence fetal BPA disposition. This internal exposure scheme characterized in the ovine conceptus is in agreement with a previous study using an ovine model to characterize neonatal exposure [23], with some human biomonitoring data [1, 24, 25], and with a recent study performed in rhesus monkeys [26] indicating that maternal plasma unconjugated BPA concentrations are greater than those in cord blood.

Indeed, after maternal BPA administration, the BPA internal exposure of mother and fetus reached approximately 40 and 6 ng/ml, respectively, which are values close to the highest previously reported for human maternal and fetal internal exposures [16, 27]. These concentrations corresponded to a maternal:fetal ratio of unconjugated BPA of approximately seven, a value close to the ratio between maternal blood and umbilical cord blood reported in some human biomonitoring studies [27], indicating that the fetus was not more exposed to BPA than its mother. Different factors such as the BPA and BPA-G physicochemical properties, plasma protein binding, placental blood flows, efficiency of maternal and fetal drug elimination, and gestational age of the fetus have been postulated to affect the degree of placenta BPA and BPA-G transfer and thus fetal BPA exposure [28]. The computation of placental and nonplacental clearances has shown that the maternal nonplacental clearance appears to be the major determinant of maternal exposure. In contrast to the mother, the fetal-placental pathway, including BPA placental transfer from fetal to maternal compartment and BPA placental metabolism, is the major determinant of fetal exposure.

In the maternal compartment, 98% of the BPA infused into the mother was eliminated via maternal nonplacental routes. This result is consistent with a high maternal BPA plasma clearance, which was of the same order of magnitude as the hepatic blood flow (S.H. Collet, personal communication) and not influenced by the pregnancy status. The limited BPA maternal placental clearance is of the same order of magnitude as the calculated 4.5% rate of BPA maternal transfer into the fetus.

The high fetal-maternal and maternal-fetal placental permeability of lipid-soluble BPA could be explained by the physicochemical properties, which point toward a possibility of placental transfer of BPA by passive diffusion in both maternal-to-fetal and fetal-to-maternal directions. Nevertheless, considering the species differences in placental structure, with only three layers separating maternal and fetal blood in human hemochorial placenta and five to six layers in ovine syndesmochorial placenta, we can speculate that the BPA fetal placental transfer could be higher in humans than the 4%

observed in our ovine model. To further investigate this placental effect, a cannulated nonhuman primate model could be used to assess the relevance of the ovine model for evaluating BPA placental transfer.

The fetal-maternal placental clearance was sevenfold higher than the maternal-fetal one. Different reasons could explain this higher value of fetal placental clearance. First, the difference in the placental contribution to BPA maternal or fetal total clearance could be explained by the ratio between the placental blood flow and the total cardiac output, which is 60% in the fetus and only 5% in the mother [29]. Second, the maternal placental clearance could be underestimated by a fetal hepatic first-pass uptake of a portion of the BPA transferred to the fetus across the placenta, as demonstrated by Kumar [10]. Indeed, BPA infused into the mother reaches the fetal circulation via the umbilical vein, and in late gestation, 45% of the umbilical venous blood flow passes through the fetal liver before reaching the fetal circulation [30]. In addition, BPA is a substrate of the P-glycoprotein efflux pump [31], an efflux mechanism that plays a role in the protection of fetus against toxic xenobiotics [32] and that could reduce the maternal BPA placental transfer into the fetus.

In the fetus, the average placental clearance of BPA was approximately 94% of the umbilical blood flow estimated in sheep at this stage of pregnancy (200 ml/[kg·min] [30]), suggesting a high rate of BPA placental transfer. Only 9% of the BPA infused into the fetus was eliminated via fetal nonplacental routes. The low weight-corrected BPA nonplacental clearance of 17.7 ml/(kg·min), corresponding to approximately 14% of the reported liver blood flow in lamb fetuses [30], could be due to a limited activity of uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase in fetal liver, as demonstrated *in vitro* in several species, including sheep [3] and humans [4, 33]. The high total fetal BPA clearance (206 ml/[kg·min]) and the exposure pattern of BPA metabolites in the conceptus (ratio between unconjugated BPA and total BPA fetal plasma concentrations < 1.5%) indicates that the fetal-placental unit, at least toward the end of pregnancy, was able to detoxify BPA through phase II metabolism. Furthermore, our results suggest that the ovine fetal-placental unit presents a higher activity of sulfation in comparison with adults. In mammals, sulfotransferases are expressed early in the fetus, and in humans, sulfotransferase activities are detected in the fetus at levels equivalent to or higher than those in the adult [34].

In our dynamic equilibrium conditions allowing quantification of the conjugation/deconjugation balance of BPA, no BPA was detected in either the maternal or the fetal compartment after BPA-G administration in the corresponding compartment, suggesting that conjugation is highly predominant compared to hydrolysis, even in the fetus with vulnerable drug-metabolizing systems. Even if BPA-S is a minor BPA metabolite compared to BPA-G, its conjugation/deconjugation balance could be different from that of BPA-G due to the known capacity of the placenta and other tissues to deconjugate sulfated steroids. This requires further investigation.

In the fetus, the production of BPA conjugates increases fetal exposure to these water-soluble metabolites, because they are less able to cross the placenta [35–37] and, once excreted in urine, are trapped in the amniotic fluid and can be swallowed and recirculated in the fetus. Thus, in our model, more than 180 µg/day of BPA-G in amniotic fluid could be swallowed daily by the late gestation ovine fetus [38].

In conclusion, our *in vivo* integrated approach enabled us to identify the placental transfer of BPA and its metabolism in the fetal-placental compartment as the major determining factors of fetal exposure to BPA. At the late stage of pregnancy, the BPA

MATERNAL-FETAL EXPOSURE TO BPA AND ITS METABOLITES

dose received by the fetus following the administration to the mother is close to the initial dose given to its mother. The fetal-placental unit shows high and sustained internal exposure to BPA metabolites without evidence of reactivation and recirculation of native BPA. Nevertheless, this result raises the question of the potential local reactivation of the conjugates into native (biologically active) BPA within the fetal target tissues (gonad and brain).

The high placental permeability of lipid-soluble BPA suggests that the BPA placental transfer determined in sheep could be considered relevant for humans despite the interspecies difference in placental structure. However, placental and fetal BPA metabolic differences during pregnancy and between species will have to be investigated to establish the full relevance of animal models in evaluating the danger of fetal exposure to BPA in humans.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank J.F. Beckers, N.M. De Sousa, R. Méreaux, and E. Jeunesse for help with the development of the surgical procedures and the staff of the sheep experimental unit of Toxalim for animal care.

REFERENCES

- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2010; 118:1055–1070.
- Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:149–157.
- Pretheeban M, Hammond G, Bandiera S, Riggs W, Rurak D. Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2011; 159:159–166.
- Coughtrie MW, Burchell B, Leakey JE, Hume R. The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol Pharmacol* 1988; 34:729–735.
- Collier AC, Ganley NA, Tingle MD, Blumenstein M, Marvin KW, Paxton JW, Mitchell MD, Keelan JA. UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:409–419.
- Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127:27–34.
- von Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 2005; 113:926–933.
- Magnusson U. Can farm animals help to study endocrine disruption? *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29:430–435.
- Barry JS, Anthony RV. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology* 2008; 69:55–67.
- Kumar S, Tonn GR, Kwan E, Hall C, Riggs KW, Axelsson JE, Rurak DW. Estimation of transplacental and nonplacental diphenhydramine clearances in the fetal lamb: the impact of fetal first-pass hepatic drug uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282:617–632.
- Yoo SD, Rurak DW, Taylor SM, Axelsson JE. Transplacental and nonplacental clearances of diphenhydramine in the chronically instrumented pregnant sheep. *J Pharm Sci* 1993; 82:145–149.
- Karen A, Beckers JF, Sulon J, de Sousa NM, Szabados K, Reczigel J, Szenci O. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology* 2003; 59:1941–1948.
- Lacroix MZ, Puel S, Collet SH, Corbel T, Picard-Hagen N, Toutain P, Vigüe C, Gayard V. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 2011; 85:2053–2059.
- Bazer FW, Spencer TE, Thatcher WW. Growth and development of the ovine conceptus. *J Anim Sci* 2011; 90:159–170.
- Collet SH, Picard-Hagen N, Vigüe C, Lacroix MZ, Toutain PL, Gayard V. Estrogenicity of bisphenol A: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicol Sci* 2010; 117:54–62.
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 2008; 28:258–263.
- Gayard V, Picard-Hagen N, Vigüe C, Toutain PL. Competitive binding to plasma thyroid hormone transport proteins and thyroid disruption by phenylbutazone used as a probe. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 174:225–231.
- Perrier D, Gibaldi M. General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state. *J Pharm Sci* 1982; 71:474–475.
- Szeto HH. Pharmacokinetics in the ovine maternal-fetal unit. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22:221–243.
- Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, Faure R, Cravedi JP. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 2003; 111:309–319.
- Csanady GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 2002; 76:299–305.
- Dziegielewska KM, Evans CA, Fossan G, Lorscheider FL, Malinowska DH, Mollgard K, Reynolds ML, Saunders NR, Wilkinson S. Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal sheep during development. *J Physiol* 1980; 300:441–455.
- Vigüe C, Collet SH, Gayard V, Picard-Hagen N, Puel S, Roques BB, Toutain PL, Lacroix MZ. Maternal and fetal exposure to bisphenol A is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 2013; 154:521–528.
- Wan Y, Choi K, Kim S, Ji K, Chang H, Wiseman S, Jones PD, Kim JS, Park S, Park J, Lam MH, Giesy JP. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks. *Environ Sci Technol* 2010; 44:5233–5239.
- Schoenfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002; 110:A703–A707.
- Patterson TA, Twaddle NC, Roegge CS, Callicott RJ, Fisher JW, Doerge DR. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 267:41–48.
- Lee YJ, Ryu HY, Kim HK, Min CS, Lee JH, Kim E, Nam BH, Park JH, Jung JY, Jang DD, Park EY, Lee KH, et al. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 2008; 25:413–419.
- Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE. The human placenta—an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro* 2007; 21:1332–1340.
- Dawes GS. The fetal circulation. In: *Fetal and Neonatal Physiology*. Year Book Medical Publishers: Chicago; 1968:91–105.
- Rudolph AM. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ Res* 1985; 57:811–821.
- Jin H, Audus KL. Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. *Placenta* 2005; 26(suppl A):S96–S103.
- Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol* 2006; 22:400–410.
- Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther* 1999; 84:429–445.
- Stanley EL, Hume R, Coughtrie MW. Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 240:32–42.
- Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect* 2010; 118:1196–1203.
- Hengstler JG, Foth H, Gebel T, Kramer PJ, Lilienblum W, Schweinfurth H, Volkel W, Wollin KM, Gundert-Remy U. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41:263–291.
- Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 247:158–165.
- Nijland MJ, Day L, Ross MG. Ovine fetal swallowing: expression of preterm neurobehavioral rhythms. *J Matern Fetal Med* 2001; 10:251–257.

Supplemental Data

TK analysis

The mean residence time (MRT), the steady-state volume of distribution (V_{ss}) and the terminal half-life ($t_{1/2}$) were computed in accordance with classical toxicokinetic equations [1] described below:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad \text{Equation 1}$$

$$V_{ss} = \frac{MRT}{Cl} \quad \text{Equation 2}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e} \quad \text{Equation 3}$$

where AUC was the area under the curve, AUMC was the area under the first moment curve, Cl was the plasma clearance and k_e was the rate constant of elimination.

The placental and non-placental clearance parameters of BPA in the ewe and fetus were calculated with the mean BPA fetal and maternal steady state concentrations obtained after the maternal and the fetal administrations using the two-compartment open TK model of the materno-fetal unit described by Szeto [2]. This model assumes steady state plasma concentrations and BPA elimination from both the maternal and fetal compartments. Placental and non-placental clearances were expressed as percentages of total BPA plasma clearance determined with following equations:

$$\text{Total maternal clearance} = \frac{K_0}{\left[C_{ss \text{ maternal}} - \left(C_{ss \text{ fetal}} \times \left(\frac{C_{ss' \text{ maternal}}}{C_{ss' \text{ fetal}}} \right) \right) \right]} \quad \text{Equation 4}$$

$$\text{Total fetal clearance} = \frac{K'_0}{\left[C_{ss' \text{ fetal}} - \left(C_{ss' \text{ maternal}} \times \left(\frac{C_{ss \text{ fetal}}}{C_{ss \text{ maternal}}} \right) \right) \right]} \quad \text{Equation 5}$$

$$\text{Maternal placental clearance} = \frac{\text{Total fetal clearance}}{\left(\frac{C_{ss \text{ fetal}}}{C_{ss \text{ maternal}}} \right)} \quad \text{Equation 6}$$

$$\text{Maternal non – placental clearance} = \text{Total maternal clearance} - \text{Maternal placental clearance} \quad \text{Equation 7}$$

$$\text{Fetal placental clearance} = \frac{\text{Total maternal clearance}}{\left(\frac{C_{ss' \text{ maternal}}}{C_{ss' \text{ fetal}}} \right)} \quad \text{Equation 8}$$

$$\text{Fetal non – placental clearance} = \text{Total fetal clearance} - \text{Fetal placental clearance} \quad \text{Equation 9}$$

where K_0 and K'_0 were the BPA infusion rate to mother and to fetus respectively, $C_{ss \text{ maternal}}$ and $C_{ss \text{ fetal}}$ were the overall BPA steady state concentrations in maternal and fetal plasma respectively after BPA maternal administration and $C_{ss' \text{ maternal}}$ and $C_{ss' \text{ fetal}}$ were the overall BPA steady state concentrations in maternal and fetal plasma respectively after BPA fetal administration.

References

1. Perrier D, Gibaldi M. General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state. J Pharm Sci 1982; 71: 474-475
2. Szeto HH. Pharmacokinetics in the ovine maternal-fetal unit. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1982; 22: 221-243

II3. Etude complémentaire 1 : Elimination urinaire maternelle du BPA-G après une administration intra-amniotique de BPA-G chez le fœtus ovin

II31. Introduction et objectifs

Les données obtenues sur le modèle du fœtus ovin instrumenté ont montré que le transfert placentaire du BPA-G est extrêmement limité, contrairement au transfert du BPA. Le BPA-G n'est pas détectable dans le plasma maternel après une perfusion i.v. de BPA-G au fœtus ovin en fin de gestation.

Cependant, l'observation du décours temporel des concentrations de BPA-G dans le plasma fœtal suite à cette administration montre une décroissance des niveaux plasmatiques de BPA-G avec des concentrations plasmatiques en BPA-G significativement plus faibles que les concentrations à l'équilibre dès 21 heures après l'arrêt de la perfusion (t_{45hr}) (Figure 13).

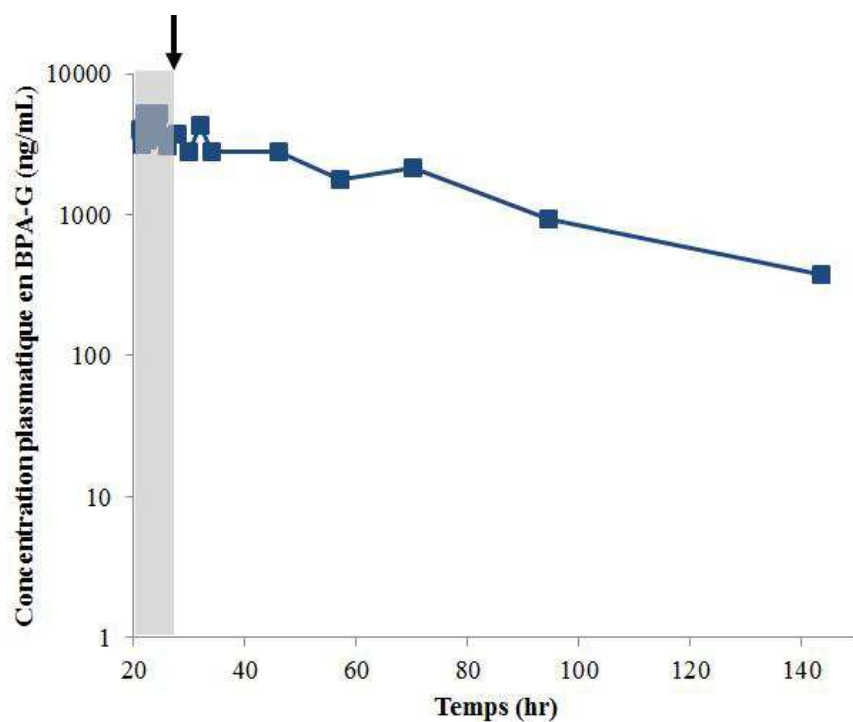


Figure 13. Décours temporel des concentrations plasmatiques de BPA-G pendant et après une perfusion i.v. de BPA-G à la dose de 3.54 mg/(kg.j) pendant 24 heures chez un fœtus ovin représentatif à 4 mois de gestation.

L'encart gris à gauche représente les dernières heures de perfusion (état d'équilibre) et la flèche noire représente l'arrêt de la perfusion au bout de 24 heures.

Cette décroissance lente des concentrations plasmatiques de BPA-G chez le fœtus est caractérisée par une clairance fœtale du BPA-G très faible. Avec des niveaux de BPA-G à l'équilibre (C_{ss}) de l'ordre de 4500 ng/mL atteints lors d'une perfusion i.v. de BPA-G à la dose de 3.54 mg/(kg.j) pendant 24 heures, la clairance fœtale du BPA-G a été estimée à 0.55 mL/(kg.min), soit environ 10 fois inférieure à la clairance maternelle déterminée *in vivo* (cf §II2), grâce à l'équation 4 ci-dessous

$$Clairance = \frac{Dose}{C_{ss}} \quad \text{Équation 4}$$

Ce résultat suggère donc une élimination du BPA-G du compartiment fœtal. La détermination des quantités de BPA-G dans les urines maternelles représente une alternative pour évaluer le transfert du BPA-G depuis le compartiment fœtal vers le compartiment maternel.

De plus, les niveaux élevés de BPA-G dans le compartiment fœtal soulèvent la question d'une possible réactivation du BPA dans certains tissus cibles, qui pourrait induire une exposition locale au BPA aglycone dans certains tissus sensibles aux interférences œstrogéniques.

Pour mettre à l'épreuve ces hypothèses, cette étude complémentaire a pour objectifs :

- d'évaluer les quantités de BPA-G retrouvées dans les urines d'une brebis gravide au cours des 72h suivant une administration intra-amniotique de BPA-G.
- d'évaluer les quantités de BPA et de BPA-G dans différents fluides de l'unité fœto-placentaire : le sang fœtal, le liquide amniotique et les urines fœtales.
- d'évaluer l'hydrolyse du BPA-G au niveau du placenta et des gonades fœtales.

II32. Méthodologie expérimentale

Préparation des solutions

Une solution de BPA-G à la concentration de 10 mg/mL dans du NaCl 0.9% a été préparée sous hotte de manière stérile le jour même de l'administration.

Administration du BPA-G

50 mg *in toto* de BPA-G ont été administrés par voie intra-amniotique chez une brebis gravide de race Lacaune à 4.5 mois de gestation. L'administration de BPA-G dans le compartiment amniotique a été réalisée sous forme d'un bolus.

Sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane 1-1.5%), une laparotomie de 8-10 cm a été effectuée afin de repérer l'utérus et de déterminer la zone d'injection (absence de gros vaisseaux sanguins au niveau du point d'injection, administration à proximité de la tête du fœtus). Au niveau du point d'injection, un point simple a été effectué sur la séreuse utérine afin de repérer le conceptus administré dans le cas de gestation multiple.

Prélèvements

Des prélèvements sanguins et urinaires maternels ont été effectués pendant 72 heures après l'administration de BPA-G. Afin de prélever les urines maternelles, une sonde urinaire de Foley (Vygon, Ecoen , France) a été placée dans l'urètre avant l'administration de BPA-G. La vessie a été vidée juste avant l'administration de BPA-G.

Les prélèvements sanguins et urinaires ont été effectués simultanément toutes les 3 ou 4 heures pendant 72 heures.

A t_{72hr} , la brebis a été euthanasiée par une overdose de barbiturique (thiopental sodique (15 mg/kg i.v.)) et césarisée afin de réaliser des prélèvements de liquides biologiques et de tissus fœtaux. L'utérus a été ouvert délicatement en veillant à ne pas percer les annexes fœtales. Un prélèvement de liquide amniotique a été réalisé, puis les fœtus ont été extériorisés de leurs membranes. Les fœtus ont été pesés puis des prélèvements de sang ombilical artériel et/ou veineux, de sang jugulaire et/ou cardiaque ont été réalisés. Des prélèvements d'urine fœtale et du contenu stomacal ont été également réalisés. Enfin un cotylédon placentaire et les gonades des fœtus ont été prélevés.

Pour l'ensemble des prélèvements sanguins (maternels et fœtaux), le sang a été recueilli dans des tubes en polypropylène contenant de l'héparine de lithium, placé immédiatement dans la glace puis centrifugé 10 minutes à 3000g à 4°C. Pour les urines maternelles, la totalité du contenu de la vessie a été prélevée, le volume a été noté puis quelques millilitres ont été conservés immédiatement dans la glace avant d'être

centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C. Les liquides biologiques fœtaux (liquide amniotique, urine et contenu stomacal) ont été recueillis dans des tubes en polypropylène, immédiatement placés dans la glace puis centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C.

Les organes fœtaux prélevés ont été placés dans la glace dans des tubes en polypropylène avant d'être broyés à l'ultra turrax®.

Homogénat tissulaire

Avant homogénéisation, les tissus ont été pesés puis découpés en fragments de quelques millimètres. L'homogénéisation a été réalisée à l'aide d'un ultra turrax® sur de la glace en ajoutant à chaque tissu une quantité d'eau ultra pure équivalente au poids de tissu (50:50). Les homogénats réalisés ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'au dosage du BPA et du BPA-G.

Dosage de BPA/BPA-G

Les concentrations en BPA et BPA-G dans les liquides biologiques et les tissus ont été déterminées par UPLC-MS/MS après extraction de 100 µL de liquide biologique ou d'homogénat tissulaire à l'acétonitrile avec une gamme de concentrations de BPA et de BPA-G allant respectivement de 1 à 100 ng/mL et 20 à 1000 ng/mL.

II33. Résultats

Le BPA-G n'a pas été détecté dans le plasma maternel. De même, aucun niveau détectable de BPA n'a été observé dans les urines ou le plasma maternel.

La Figure 14 présente la quantité cumulée de BPA-G, exprimée en pourcentage de la dose initiale, éliminée dans les urines maternelles au cours des 72 heures suivant l'administration intra-amniotique de 50 mg de BPA-G.

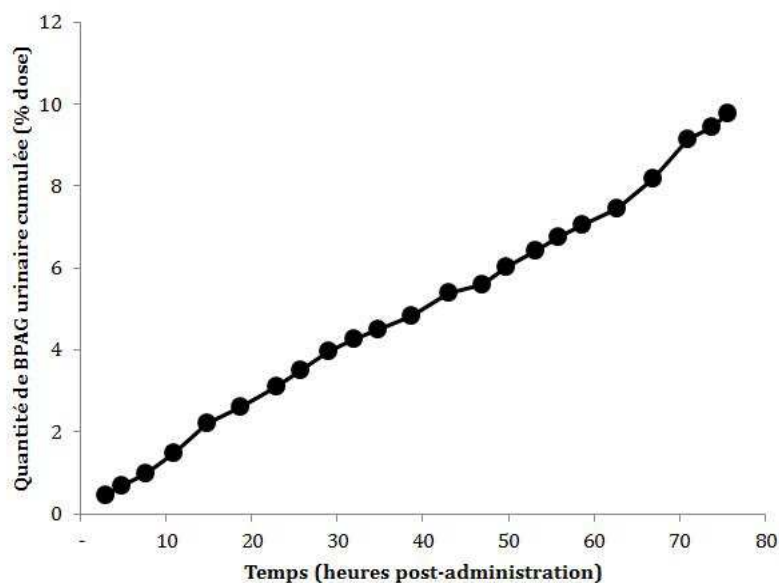


Figure 14. Quantité cumulée de BPA-G éliminée dans les urines maternelles au cours du temps chez une brebis dont un des conceptus a reçu par voie intra-amniotique 50 mg de BPA-G

Ainsi, 9,8% de la dose initiale a été retrouvée dans les urines de la brebis. L'élimination urinaire du BPA-G semble constante au cours du temps. Ainsi, 0,12% du BPA-G administré au fœtus est éliminé en moyenne par heure, soit environ 1 µg/hr (17 ng/min).

Le Tableau 11 présente les concentrations en BPA-G dans les différents fluides de l'unité fœto-placentaire pour les deux fœtus de la brebis, 72 heures après l'administration (le fœtus 1 correspond au conceptus ayant reçu l'administration de BPA-G) :

	Concentration BPA-G (µg/mL)	
	Fœtus 1	Fœtus 2
Plasma	18	2.54
Urine	17	2.41
Liquide amniotique	11	7.10
Contenu stomacal	11	0.50

Tableau 11. Concentration en BPA-G (µg/mL) des différents fluides biologiques de l'unité foeto-placentaire.

Les prélèvements ont été effectués 72 heures après l'administration de 50 mg de BPA-G dans le compartiment amniotique du fœtus 1.

Le BPA-G est détectable dans les deux fœtus de la brebis. Cependant, le fœtus 2, qui n'a pas reçu l'administration, présente des concentrations 2 à 20 fois inférieures à celle de son jumeau. L'exposition au BPA-G de ce deuxième fœtus peut être due soit à

des échanges materno-fœtaux après que du BPA-G soit passé du fœtus 1 à la brebis, soit à des échanges entre les fœtus eux-mêmes. Cette deuxième hypothèse semble néanmoins peu probable étant donné le faible pourcentage d'anastomose placentaire dans les gestations multiples chez les ovins.

Le Tableau 12 présente les quantités de BPA-G retrouvées dans les liquides biologiques et le pourcentage de la dose retrouvée au total dans l'ensemble de ces liquides :

	Quantité BPA-G (µg)	
	Fœtus 1	Fœtus 2
Sang fœtal^a	5913.9	836.2
Liquide Amniotique^b	6086.4	3995.2
Urines maternelles (0-72h)	4887.0	
TOTAL	21658.7	
(% de la dose)	43.3	

Tableau 12. Répartition de la dose de BPA-G dans les liquides biologiques fœtaux et maternels.

^a les quantités ont été calculées avec un volume de sang fœtal à 130 jours de gestation de 328 mL [147]

^b les quantités ont été calculées avec un volume de liquide amniotique à 130 jours de gestation de 554 mL [98]

Ainsi, au total 43.3% de la dose initiale de BPA-G est retrouvée dans les liquides biologiques maternels et fœtaux 72 heures après l'administration.

La détermination des concentrations tissulaires en BPA et BPA-G dans les cotylédons et les gonades fœtales des deux fœtus a montré que le BPA représentait environ 2.5% du BPA total. Ainsi, une hydrolyse du BPA-G semble possible localement mais reste néanmoins relativement modérée. Ces résultats sont préliminaires et doivent être interprétés avec précaution du fait de l'absence de validation du dosage du BPA et du BPA-G pour les homogénats tissulaires et de l'absence d'un standard interne au moment de l'homogénéisation permettant de s'assurer que la procédure n'entraîne pas une hydrolyse du BPA-G.

II4. Conclusion

Cette première partie a permis de caractériser l'exposition interne maternelle et fœtale au BPA et à ses métabolites et les échanges materno-fœtaux chez le fœtus ovin en fin de gestation.

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la gestation sur les paramètres PK du BPA et du BPA-G. Cette étude longitudinale nous a permis de montrer

que la gestation ne modifie ni l'exposition interne maternelle au BPA et à ses métabolites, ni les paramètres PK du BPA et du BPA-G.

4.5% de la dose de BPA administrée à une brebis gravide en fin de gestation a été transférée au fœtus. En tenant compte de la différence de poids entre le fœtus et sa mère, ce dernier est donc exposé à une dose de BPA similaire à celle de sa mère, *i.e.* 2.08 mg/(kg.j). En fin de gestation, le fœtus ovin n'est donc pas surexposé au BPA aglycone par rapport à sa mère.

La détermination des paramètres PK du BPA chez le fœtus ovin a montré que la clairance fœtale du BPA était très élevée, de l'ordre de 250 mL/(kg.min), soit 5 fois supérieure à la clairance maternelle. Le modèle bicompartimental ouvert décrit par Szeto [148] a permis de déterminer la part de la clairance placentaire dans la clairance totale. Ainsi, la clairance placentaire maternelle ne représente que 2% de la clairance totale maternelle du BPA, qui est de l'ordre de 50 mL/(kg.min) chez la brebis. Cette valeur est cohérente avec le pourcentage estimé de la dose transférée de la mère au fœtus et avec l'absence d'effet de la gestation sur les paramètres PK du BPA. A l'inverse chez le fœtus, cette clairance placentaire représente environ 90% de la clairance totale du BPA, suggérant une forte participation du placenta dans les processus d'élimination du BPA du compartiment fœtal.

Nous avons également observé des niveaux élevés de métabolites dans l'unité fœtale (plasma et liquide amniotique), suggérant des processus métaboliques fonctionnels et efficaces au sein de l'unité fœto-placentaire en fin de gestation. Le fœtus ovin est 3 et 8 fois plus exposé respectivement au BPA-G et au BPA-S que sa mère suite à une administration maternelle de BPA. Ces métabolites sont piégés dans le compartiment fœtal et ne sont évacués vers le compartiment maternel que très lentement. L'étude complémentaire a ainsi permis de montrer que 10 à 15% de la dose de BPA-G administré dans le compartiment amniotique était éliminé via les urines maternelles dans les 72 heures suivant l'administration.

La capacité du fœtus à métaboliser le BPA en métabolites inactifs en termes d'œstrogénicité à ce stade tardif de gestation ne présume pas de ce qui pourrait se passer à un stade plus précoce de la gestation alors les activités enzymatiques du conceptus ne sont pas encore totalement fonctionnelles. De plus, les niveaux élevés de

métabolites détectés dans le compartiment fœtal soulèvent la question d'une possible réactivation de ces conjugués dans certains tissus cibles qui pourraient conduire à une exposition locale au BPA aglycone actif.

En conclusion, le transfert placentaire et le métabolisme fœto-placentaire constituent les déterminants majeurs de l'exposition fœtale au BPA. Ainsi, ces deux mécanismes impliqués dans l'exposition fœtale au BPA ont fait l'objet des travaux dont les résultats sont présentés dans la partie III et la partie IV.

Dans la partie III, le modèle du cotylédon humain perfusé a été utilisé pour étudier le transfert placentaire du BPA et du BPA-G à la fois dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel. Ce modèle nous a permis de prendre en compte les différences interspécifiques de placentation entre la brebis et la femme afin de répondre à la question du risque pour la santé humaine relative à une exposition fœtale au BPA.

III. Transfert placentaire du BPA et de son principal métabolite, le BPA-G chez l'homme

III1. Introduction et objectifs

Les données de biosurveillance ont montré que l'ensemble des tissus et des fluides de l'unité fœto-placentaire humaine présentaient des niveaux détectables de BPA (revue [61]), suggérant un transfert du BPA depuis la circulation maternelle vers le compartiment fœtal.

Le transfert placentaire du BPA, identifié comme un déterminant majeur de l'exposition fœtale, a été évalué chez l'homme en utilisant le modèle du placenta humain perfusé avec une configuration fermée, *i.e.* avec une recirculation des milieux de perfusion [37, 92]. Ces deux études ont mis en évidence un transfert placentaire materno-fœtal du BPA de 19 et 27%. Néanmoins, aucune de ces deux études ne s'est intéressée ni aux échanges fœto-maternels du BPA, ni aux échanges placentaires du BPA-G.

Dans notre étude, nous avons donc caractérisé le transfert placentaire du BPA et du BPA-G à la fois dans le sens materno-fœtal mais également dans le sens fœto-maternel. Cette étude a été réalisée en utilisant le modèle du placenta isolé humain perfusé mais avec une configuration en double circuit ouvert, *i.e.* sans recirculation des milieux de perfusion. Cette configuration a été choisie pour évaluer les clairances transplacentaires maternelles et fœtales du BPA et du BPA-G, ce qui n'est pas possible avec une configuration fermée.

Le modèle du placenta isolé perfusé permet de recréer *ex vivo* une circulation sanguine artério-veineuse au niveau de la face fœtale du placenta et une irrigation maternelle de l'espace intervilloux. Un système de pompes péristaltiques associées à des débitmètres permet de contrôler les débits des deux circulations artificielles (Figure 15).

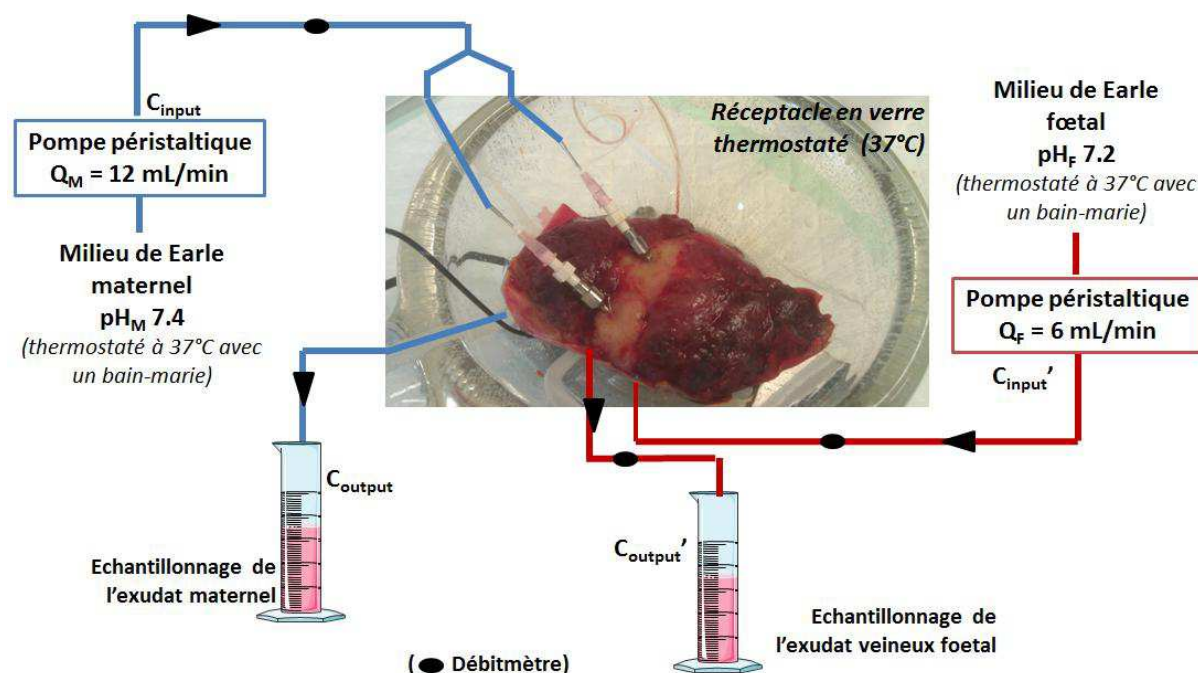


Figure 15. Schéma du système de perfusion du placenta isolé humain.

La circulation fœtale et l'irrigation maternelle sont recréées expérimentalement en faisant circuler du milieu de Earle grâce à un système de pompes péristaltiques.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le service de Gynécologie Obstétrique de l'Hôpital Paule de Viguié, Toulouse et avec l'UMR Inserm S 767 « Grossesse normale et pathologique », Paris.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie "III2 Article 3" sous forme d'article, qui est en cours de soumission dans une revue de reproduction.

III2. Article 3

"Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta."

Corbel T, Gayrard V, Puel S, Lacroix M Z, Berrebi A, Gil S, Viguié C, Toutain P-L and Picard-Hagen N

Article title: Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta

Running title: Placental transfer of BPA and BPA-Glucuronide

Authors: T. Corbel^{1,2}, V. Gayrard^{1,2}, S. Puel^{1,2}, M. Z. Lacroix^{1,2}, A. Berrebi³, S. Gil⁴, C. Viguié^{1,2}, P-L Toutain^{1,2} and N. Picard-Hagen^{1,2*}

¹INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Center in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

²Université de Toulouse, INPT, ENVT, EIP, UPS, F-31076 Toulouse, France

³Hôpital Paule de Viguier, Service de Gynécologie Obstétrique, CHU Toulouse, F-31059 Toulouse, France

⁴INSERM, UMR-S 767 “Grossesse normale et pathologique”, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France

*** Corresponding author :**

Nicole Picard-Hagen

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

23, chemin des capelles

31076 Toulouse cedex 3

+33 (0) 561193861

n.hagen-picard@envt.fr

Abstract

Study question: Does human placenta limit fetal exposure to Bisphenol A (BPA) and to its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide (BPA-G)?

Summary answer: The high bidirectional placental permeability to BPA strongly suggests a transport by passive diffusion in both materno-to-fetal and feto-to-maternal direction, whereas BPA-G, the hydrophilic metabolite, presents limited placental transfer.

What is known already: In humans highly variable BPA concentrations have been reported in the feto-placental compartment. However the human fetal exposure to BPA remains still unclear.

Study design, size, duration: This study uses the isolated perfused human placenta to characterize placental exchanges of BPA and its main metabolite, BPA-G in humans.

Participants/materials, setting, methods: 22 term placentae were perfused with BPA (45 and 250 ng/mL) or BPA-G (1000 ng/mL) solutions and the freely diffusing marker antipyrine (20 µg/mL) either in the materno-to-fetal (n=11) or the feto-to-maternal direction (n=11) for 90 minutes in an open dual perfusion system.

Main results and the role of chance: BPA can cross the placenta rapidly in bidirectional way, with a mean BPA transfer rate of $29\pm 10\%$ in the materno-to-fetal direction, and $15\pm 2\%$ in the feto-to-maternal one, leading to a clearance rate very similar to the antipyrine one. In contrast, the BPA-G has limited placental permeability in particular in materno-to fetal direction, The mean BPA-G transfer rates were $3.8\pm 1.4\%$ and $7.8\pm 2.4\%$ for the materno-to-fetal and feto-to-maternal exchanges, respectively.

Limitations, reasons for caution: This single pass system does not allow evaluating BPA placental metabolism and the placental transfer of BPA and its main metabolite was only determined at term.

Wider implications of the findings: The human placenta has little capacity to restrict fetal exposure to BPA associated to environmental exposure of its mother. Nevertheless it is unlikely that the human fetus was overexposed to BPA compared to its mother. The

fetal exposure to BPA conjugates could be explained mainly by the contribution of fetal metabolism and by its limited capacity to extrude BPA-G

Study funding/competing interest(s): This study was supported by the French Région Midi-Pyrénées (APRTCEN 10051322).

Trial registration number: Not applicable.

Keywords: Bisphenol A, bisphenol A glucuronide, endocrine disruptor, human placenta, fetal exposure

Introduction

Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen widely used as a monomer in the manufacture of epoxy resins and polycarbonate plastics which could contribute to the almost ubiquitous human exposure to BPA across lifespan (Vandenberg *et al.*, 2010). Much of the concern regarding BPA safety arises from reported adverse effects of BPA which can interfere with normal development of reproductive organs and mammary glands but also with energy metabolism and cognitive performance when tested, even at low doses, in experimental species during the perinatal period (Vandenberg *et al.*, 2010).

In humans, highly variable BPA concentrations have been reported in the fetoplacental compartment, in umbilical cord blood, in placental tissue and in amniotic fluid (Vandenberg *et al.*, 2010), indicating a transfer of BPA from mother to the fetus. However, these limited biomonitoring data need to be considered with caution. Indeed high BPA levels observed when biomonitoring at delivery could be due to the contamination of the samples occurring from the sampling devices or to a recent maternal exposure to BPA at delivery in particular with medical devices used in caesarean section (Vandentorren *et al.*, 2011). Thus, the human fetal exposure to BPA remains still unclear and these biomonitoring data did not allow establishing a relationship between maternal and fetal exposure.

BPA toxicokinetic investigations using the pregnant sheep physiological model (Corbel *et al.*, 2013) have shown that the fetus received about 4.5 % of the BPA dose administered to the mother and that the ovine fetoplacental unit at a late stage of pregnancy was very efficient in metabolizing BPA into conjugated compounds that remained trapped within the fetal compartment, leading to a high fetal exposure to BPA conjugates (Viguie *et al.*, 2013, Corbel *et al.*, 2013). Thus, BPA placental transfer from fetus to mother appears as one of the key parameters determining the fetal exposure to the unconjugated (active) form of BPA and to its conjugates.

This highlights the urgent need for developing relevant model to predict human fetal exposure allowing freeing of extrapolation biases from such as interspecies differences in fetoplacental physiology. From this standpoint, the perfusion of an isolated human cotyledon appears as a method of choice for studying the placental transport and pharmacokinetic of BPA. Materno-to-fetal placental transfer of BPA of 19

to 27 % was already determined in a placenta model in closed (recirculating) configuration (Balakrishnan *et al.*, 2010, Morck *et al.*, 2010). However, this closed system did not allow evaluating *ex vivo* the fetal and maternal placental clearances. In addition, the preponderance of the glucuronoconjugated form of BPA in plasma of the fetal monkey (Patterson *et al.*, 2013) and ovine fetus (Corbel *et al.*, 2013) after the maternal administration raises the question of its maternal or fetal origin. The goal of our study was to evaluate in an open (non-recirculating) cotyledon from human placenta system, the placental transfer of BPA and BPA-G both in materno-to-fetal direction and in feto-to-maternal one in order to estimate the fetal exposure from a known maternal internal exposures.

Materials and Methods

Chemicals

BPA and antipyrine were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and were dissolved in ethanol at a concentration of 1 mg/mL and water at a concentration of 100 mg/mL respectively. BPA-G was purified in our laboratory as previously described (Lacroix *et al.*, 2011) and was dissolved in ethanol at a concentration of 10 mg/mL. All solutions were stocked at -20°C until use. Albumin from bovine serum (BSA Fraction V) was purchased from PAA Laboratories (Vélizy-Villacoublay, France) and was added extemporaneously in perfusion media.

Placentae

22 term placentae (582.2 ± 96.5 g) from uneventful pregnancy were obtained from HIV-seronegative women delivered in the CHU Paule de Viguer, Toulouse, France after caesarian sections (n=5) or normal vaginal delivery (n=17). Each patient gave informed consent to participate in the study.

Perfusion technique

Collected placentae were perfused within 30 minutes of the delivery in an open double circuit according to the method initially described by Schneider *et al.* (Schneider *et al.*, 1972) and modified as follows (Giroux *et al.*, 1990, Gavard *et al.*, 2009). Briefly, after a visual examination to check placenta integrity, a truncal branch of the chorionic artery and its associated vein supplying a peripheral cotyledon were catheterized (Microtube Tygon S54HL, 1.02 mm i.d.; 1.78 mm o.d. Saint Gobain, Courbevoie, France).

The fetal circulation was established at a flow rate of 6 mL/min to ensure a balance between arterial and venous fetal flows. The absence of vascular leakage was checked. On the maternal side, the perfused area progressively whitened, which allowed visualization of the selected cotyledon. The irrigated cotyledon was isolated by cutting it and placed into a thermostated glass receptacle maintained at 37°C with the maternal villi facing upwards. The maternal perfusion was established at a flow rate of 12 mL/min through 2 inox hypodermic cannulas inserted into the intervillous space.

The maternal and fetal media were Earle medium (Euromedex, Souffel Weyersheim, France) supplemented with BSA fraction V. The pH were adjusted

continuously throughout the experiment to 7.42 ± 0.01 for the maternal and 7.22 ± 0.01 for the fetal perfusion media.

Experimental design

The study was designed to evaluate the placental transfer of BPA and BPA-G, both in materno-to-fetal and in feto-to-maternal directions.

Antipyrine (20 µg/mL), a reference control for passive diffusion and integrity of the barrier, and the test substances, BPA or its main metabolite BPA-G, were added in the maternal or fetal reservoir to study maternal-to-fetal or fetal-to-maternal transfer, respectively. The nominal BPA concentrations infused into the fetal or the maternal compartments were 45 ng/mL (0.2 µM), corresponding to the maximum plasma concentrations described in pregnant women (Lee *et al.*, 2008, Padmanabhan *et al.*, 2008) and 250 ng/mL (1 µM), this second concentration level was selected to test the proportionality of BPA transfer rate. As BPA binds to albumin (Csanady *et al.*, 2002), this experiment used perfusion medium containing 30 g/L of BSA to reflect the physiological protein plasma concentration at late pregnancy (Larsson *et al.*, 2008). BPA-G was added at a concentration of 1000 ng/mL (2.5 µM) in fetal or maternal media supplemented with 2 g/L of BSA. Because the permeability across membrane of hydrophilic substances is generally low, this high concentration of BPA-G was chosen for effective detection in the opposite compartment after its placental transfer.

Each perfusion experiment was performed for 90 minutes. Maternal and fetal exsudates were collected every 5 minutes after addition of test substances and the volume was measured.

For determining maternal-to-fetal transfer, the two analytes (antipyrine and BPA or BPA-G) were added in maternal medium. Samples (1 mL) were collected from the maternal inflow reservoir before (time 0) and after addition of the test molecules and at the end of the perfusion, from the maternal outflow perfusate at 0, 30, 60 and 90 minutes, and from the fetal outflow perfusate at time 0 and every 5 minutes up to 90 minutes.

Fetal-to-maternal transfer was assessed after addition of the two analytes to the fetal reservoir at the same concentrations as for the materno-to-fetal transfer while the

maternal inflow perfusate was drug free. Samples (1 mL) were collected from the fetal inflow reservoir before (time 0) and after addition of the test molecules and at the end of the perfusion, from the fetal outflow perfusate at 0, 30, 60 and 90 minutes, and from the maternal outflow perfusate at time 0 and every 5 minutes up to 90 minutes.

At the end of the perfusion, the isolated cotyledon was perfused with Phosphate-buffered saline at 4°C for 10 minutes and this washing solution was collected.

All samples were immediately chilled in iced and centrifuged for 10 minutes at 3000 g and 4°C and the supernatant was collected and stored at -20°C until assayed.

Tissue samples (about 1 g) were taken from the placenta before the perfusion and after the washing perfusion from an area within the cotyledon (clearly perfused white area) to determine tissue concentrations of BPA and BPA-G.

Placental tissue homogenization

Homogenization method was validated in order to check that samples preparation did not lead to hydrolysis of BPA-G. Briefly, standards solutions of *d16*-BPA and *d6*-BPA-G were prepared by dissolving each compound in acetonitrile/H₂O (50/50 vol/vol). These two internal standards were added in placenta tissue (placental samples) or in water (control samples) at the final concentration of 200 ng/mL for *d16*-BPA and 400 ng/mL for *d6*-BPA-G in glass tube at 0°C. Placental and control samples were homogenized in 1mL methanol/g tissue (or mL water) for 1 minute on ice using Ultra-Turrax®. Efficiency of extraction was monitored by calculating the ratio between areas of internal standard in control samples and areas of internal standard in placenta samples. Lack of hydrolysis which may occur during homogenization and extraction method was checked by monitoring the absence of *d6*-BPA in samples.

Analytical procedure

Antipyrine concentrations in perfusion medium were determined by HPLC coupled with UV detection from an adapted method previously described (Leghait *et al.*, 2009). The calibration curve ranged from 0.5 to 20 µg/mL. The mean intra- and inter-day coefficients of variation for three concentration levels were lower than 15% and the limit of quantification (LOQ) was validated at 0.5 µg/mL.

BPA and metabolites concentrations in perfusion media and in placental tissue were determined by an UPLC/MS/MS after acetonitrile extraction as previously described (Lacroix *et al.*, 2011). The calibration curves ranged from 1 to 1000 ng/mL and 10 to 5000 ng/mL for BPA and BPA-G, respectively. The mean intra- and inter-day coefficients of variation for three concentration levels and for BPA and BPA-G were lower than 15% and the limits of quantification (LOQ) were validated at 1 ng/mL and 10 ng/mL, respectively.

Data analysis

Only concentrations at steady state, reached after 15 min both for antipyrine and BPA or BPA-G, were used for calculations of standard parameters: transfer rate, extraction rate and transplacental clearance. These standard parameters were calculated according to the Challier formulas (Challier, 1985, Challier *et al.*, 1977).

The open-configuration double circuit placental perfusion could be represented as a two-compartment model (Figure 1). In this configuration, the transfer rate (TR) was calculated for each steady state time point during perfusion as the ratio between the concentrations in the receiving compartment to the nominal concentration in the entrance compartment according to the following equations:

$$TR_{MF} = \frac{C_{output}'}{C_{input}} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

$$TR_{FM} = \frac{C_{output}}{C_{input}'} \times 100 \quad \text{Equation 2}$$

where TR_{MF} and TR_{FM} were the materno-to-fetal and the feto-to-maternal transfer rates, respectively; C_{input} and C_{input}' were the maternal and the fetal inflow concentration, respectively; C_{output}' and C_{output} were the fetal and maternal outflow concentrations, respectively.

In materno-to-fetal directions, perfusions were validated if the transfer rate of antipyrine was above the generally accepted threshold of 20% (Gavard *et al.*, 2009), whereas feto-to-maternal perfusions were arbitrarily validated with an antipyrine

transfer rate above the mean reported value of 15% (Challier *et al.*, 1977, Sudhakaran *et al.*, 2005).

The clearance index in the materno-to-fetal direction and vice versa was the ratio of the transfer rate of BPA or BPA-G to that of antipyrine calculated for the same every 5 min interval.

To determine the extraction rate (ER), corresponding to the fraction of the dose transferred from entrance compartment to receiving one, it is necessary to take into account the mean flow rate in maternal (Q_M) and fetal (Q_F) circulations determined each 5 minutes throughout perfusion. The extraction rate (ER) was calculated according to the following equations:

$$ER_{MF} = \frac{Q_F \times C_{output}'}{Q_M \times C_{input}} \times 100 \quad \text{Equation 3}$$

$$ER_{FM} = \frac{Q_M \times C_{output}}{Q_F \times C_{input}'} \times 100 \quad \text{Equation 4}$$

The materno-to-fetal transplacental clearance (Cl_{MF}) and the feto-to-maternal transplacental clearance (Cl_{FM}), corresponding to the volume of perfusate cleared of the substance per unit time, were calculated with the following equations:

$$Cl_{MF} = \frac{Q_M \times (C_{input} - C_{output})}{C_{input}} = \frac{Q_F \times C_{output}'}{C_{input}} \quad \text{Equation 5}$$

$$Cl_{FM} = \frac{Q_F \times (C_{input}' - C_{output}')}{C_{input}'} = \frac{Q_M \times C_{output}}{C_{input}'} \quad \text{Equation 6}$$

where Q_F and Q_M were the fetal and maternal perfusate flow rates, respectively and $Q_M \times (C_{input} - C_{output}) = Q_F \times C_{output}'$ and $Q_F \times (C_{input}' - C_{output}') = Q_M \times C_{output}$ due to exchange between the two compartments and to the principle of mass conservation.

The mass balance of the added substance (BPA or BPA-G) was checked by calculation of the sum of substrate quantity in perfusion media, tissue and washing PBS in relation to the measured amount of the substrate in maternal or fetal reservoir from the beginning of perfusion

The modified equation of Henderson-Hasselbach described below (Garland *et al.*,

1998, Syme *et al.*, 2004) was used to determine a relationship allowing to predict ratio between fetal and maternal steady-state concentrations (F:M) of free BPA in vivo:

$$F : M = \frac{\%unbound_M}{\%unbound_F} \times \frac{1 + 10^{pKa - pH_F}}{1 + 10^{pKa - pH_M}} \times \frac{Cl_{MF}}{Cl_{FM} + Cl_F} \quad \text{Equation 7}$$

where % unbound_M and % unbound_F were the fraction of free BPA (not bound to plasma proteins) equal to 0.07 in maternal plasma (Csanady *et al.*, 2002) and estimated from maternal value to 0.06 in fetal plasma (Hutson *et al.*, 2011), pKa was the pKa of BPA of 10.2 (Staples *et al.*, 1998); pH_F and pH_M were the pH of fetal and maternal blood respectively; Cl_{MF}, Cl_{FM} and Cl_F were the materno-to-fetal clearance, the feto-to-maternal clearance and the fetal non-placental clearance, respectively. The mean materno-to-fetal and feto-to-maternal BPA clearances were determined in the perfusion model. The fetal BPA non-placental clearance (Cl_F) was considered negligible, in accordance with previous data obtained in ovine model (Corbel *et al.*, 2003).

Statistical analysis

Descriptive statistics were used and data are expressed as mean (±SD). All statistical analyses were done using general linear models on Systat 12.0 (SPSS, Inc.).

For both the feto-to-maternal and materno-to-fetal BPA transfer, the mean of placental transfer of BPA and of antipyrine during time points along the experiment were compared by a three-way ANOVA with substrate, concentration and perfusion time and double and triple interactions between substrate, concentration, perfusion time as fixed-effect and placenta nested within the BPA concentration as a random-effect factor.

The time course transfer rate of BPA-G and antipyrine were compared by a two-way ANOVA with substrate and perfusion time and their interaction as a fixed factor.

The time course of BPA clearance index was analyzed by a three-way ANOVA with direction (maternal-to-fetal and fetal-to-maternal), concentration and perfusion time and their interactions as fixed-effect factors and placenta nested within the interaction between BPA concentration and direction as a random-effect factor.

The time course of clearance index of BPA-G was analyzed by a two-way ANOVA with direction and perfusion time, their interaction as fixed effect factors and placenta nested within the direction as a random effect factor.

For both for materno-to-fetal and feto-to-maternal direction, the clearance index of BPA and BPA-G were compared using a two-way ANOVA with substrates (BPA or BPA-G) and perfusion time, their interaction as fixed effect factors and placenta nested within the substrates as a random effect factor.

The materno-to-fetal and feto-to-maternal extraction rates were compared using an one-way ANOVA with direction as fixed effect.

Results

The mean clearance of antipyrine was 1.66 ± 0.63 mL/min and 2.44 ± 0.34 mL/min in the materno-to-fetal and feto-to-maternal directions, respectively. The wet weight of the perfused cotyledon was 36.6 ± 13.6 g. The average flow rate was 5.27 ± 0.36 mL/min in fetal circulation and 12.64 ± 0.67 mL/min in maternal circulation and remained stable throughout perfusion.

Before perfusion, BPA was detected in 19 placentae (86%) at the mean concentration of 1.63 ± 0.49 ng/g, whereas no BPA-G was detected in any placenta.

For the 22 placentae, at the end of the perfusion, the overall mean recovery ($\pm$ SD) of infused molecules in fetal and maternal perfusates and in cotyledon were 105 ± 17 % (range 80 to 131 %) and 83 ± 11 % (range 69 to 99 %) for BPA perfusions and 105 ± 18 % (range 81 to 126 %) and 92 ± 5 % (range 86 to 97 %) for BPA-G perfusions in the feto-to-maternal and in the materno-to-fetal directions, respectively.

BPA-G was never detected in any perfusates or in cotyledon following BPA placental perfusions no matter the direction of the transfer. In the same way, BPA was never detected in perfusates or in cotyledon following BPA-G perfusion in both feto-to-maternal and materno-to-fetal direction.

Placental transfer of BPA

Figure 2 depicts the mean ($\pm$ SD) time courses of materno-to-fetal placental transfer of BPA at the concentration of 45 ng/mL (n=3) and 250 ng/mL (n=4) and of antipyrine. The placental transfer rate of antipyrine and BPA (Fig.2) increased rapidly during perfusion and the plateau was reached from 15 min to the end of the perfusion. The materno-to-fetal transfer rates (mean $\pm$ SD; range) of BPA at concentrations of 45 ng/ml (36.0 ± 8.3 %; 26.8-43.0 %, n=3) and 250 ng/mL (24.2 ± 8.7 %; 15.3-34.3 %, n=4) were equivalent but systematically slightly lower than that of antipyrine (34.6 ± 10.6 %, 20.9-48.7 %, n=7, $p < 0.0001$) (Table I).

The materno-to-fetal transplacental clearances of BPA were 1.94 ± 0.55 mL/min and 1.22 ± 0.43 mL/min for the BPA perfusates concentrations of 45 and 250 ng/mL, respectively (Table I). In materno-to-fetal experiments, 15.4 ± 3.7 % and 10.0 ± 3.3 % of the BPA added in the maternal perfusate at the concentration of 45 ng/mL and 250

ng/mL respectively were transferred across the barrier during the perfusion. Only 0.51 ± 0.33 % and 0.59 ± 0.09 % of the BPA dose perfused at the concentration of 45 or 250 ng/mL remained in the perfused cotyledon.

Figure 3 shows the time courses (mean $\pm$ SD) of feto-to-maternal placental transfer of BPA at the concentration of 45 ng/mL (n=3) and 250 ng/mL (n=4) and of antipyrine. The feto-to-maternal placental transfer rate of antipyrine and BPA (Fig.3) increased rapidly during perfusion and reached a plateau from 15 minutes until the end of the perfusion. The feto-to-maternal transfer rate (mean $\pm$ SD; range) of BPA at the fetal concentration of 45 ng/mL (16.1 ± 2.3 %; 13.5-17.8 %, n=3) and of 250 ng/mL (14.2 ± 1.5 %; 12.4-15.9 %, n=4) were systematically slightly lower than that of antipyrine (19.3 ± 2.3 %; 16.3-23.1 %, n=7, $p < 0.0001$) (Table I).

The feto-to-maternal transplacental clearances of BPA were 1.95 ± 0.25 mL/min and 1.87 ± 0.24 mL/min for the BPA perfusates concentrations of 45 and 250 ng/mL, respectively (Table I). 35.7 ± 4.3 % and 36.9 ± 5.9 % of BPA added in the fetal perfusate at the concentration of 45 ng/mL and 250 ng/mL, respectively were transferred across the placenta barrier. After 90 min of placenta perfusion, only 2.99 ± 3.61 % and 2.54 ± 1.63 % of the BPA perfused at the concentration of 45 or 250 ng/mL remained in the cotyledon.

The overall mean clearances index of BPA (and range) were 0.84 (0.66-0.93) in the materno-to-fetal direction and 0.81 (0.61-1.13) in the feto to-maternal direction and were not affected neither by the placental direction nor by the BPA dose ($p > 0.05$) (Table I).

By adjusting these materno-to-fetal and feto-to-maternal transplacental clearances using the equation 7, the free BPA feto-to-maternal ratio at term could be estimated to 1.06.

Placental transfer of BPA-G

The time courses of the mean ($\pm$ SD) materno-to-fetal (n=4) and feto-to-maternal placental transfers (n=4) of BPA-G (1000 ng/ml) and antipyrine throughout the perfusion were represented in figure 4. The materno-to-fetal and feto-to-maternal

placental transfer rates of BPA-G and of antipyrine increased rapidly during perfusion and reached a plateau from 15 minutes until the end of perfusion.

The materno-to-fetal transfer rate (mean $\pm$ SD; range) of BPA-G (3.81 ± 1.41 %; 2.02-5.28 %, n=4) was significantly lower than those of antipyrine (25.8 ± 1.4 %; 24.0-27.1 %, $p < 0.0001$) (Table II). The feto-to-maternal transfer rate (mean $\pm$ SD; range) of BPA-G (7.77 ± 2.39 %; 4.80-9.86 %, n=4) was two-times lower than that of antipyrine (18.2 ± 2.2 %; 16.1-21.3 %, $p < 0.0001$) (Table II).

The clearance index of BPA-G (mean $\pm$ SD; range) in materno-to-fetal direction (0.15 ± 0.05 %; 0.09-0.21 %) was significantly lower than in reverse direction (0.44 ± 0.17 %; 0.27-0.61 %). The extraction rate of BPA-G in the materno-to-fetal direction (1.71 ± 0.73 %) was much lower than those in the feto-to-maternal one (20.5 ± 8.7 %, $p < 0.05$). The percentage of the BPA-G dose recovered in the perfused cotyledon was 0.32 ± 0.17 % in the materno-to-fetal direction and 0.44 ± 0.27 % in the reverse direction.

The transplacental clearance of BPA-G in materno-to-fetal direction was 0.21 ± 0.08 mL/min whereas it was 1.04 ± 0.37 mL/min in the reverse direction.

Discussion

Pregnancy represents a critical window of exposure for the fetus during which developmental processes are extremely sensitive to estrogenic interferences. BPA is one of the xenobiotics of major concern for fetal development. The degree of human exposure to BPA, particularly during pregnancy and fetal development is not clear. This highlights the urgent need for a better understanding and characterization of the dynamics of maternal-fetal-placental exchanges of BPA. The present study uses the isolated perfused human placenta to examine the placental transport of BPA and its main metabolite, BPA-G in humans. Antipyrine, a reference marker for transcellular passive diffusion, was used as a useful reference substance by which the transfer rate of lipid-soluble xenobiotics may be characterized (Challier *et al.*, 1983, Schneider *et al.*, 1979). The antipyrine clearance observed in this study (1.14 to 3.18) conforms closely to values reported previously (Challier *et al.*, 1977, Dancis *et al.*, 1985, Schneider *et al.*, 1979).

The main result obtained in this human perfused placental cotyledon model is that BPA can cross the placenta rapidly in bidirectional way. By reporting the clearances of BPA and BPA-G as a fraction of antipyrine (clearance index), several variable hemodynamic factors in the perfusion system are corrected allowing comparisons between different conditions. The materno-to-fetal clearance index of BPA of 0.86 determined in this *ex vivo* perfusion of human cotyledon in open system is in agreement with the transfer index reported in a closed perfusion system of 1.1 (Balakrishnan *et al.*, 2010). Moreover, the clearance index of BPA was similar in materno-to-fetal and feto-to-maternal directions and was unaffected by the BPA concentration, suggesting that the phenomenon was not saturable. All together, these observations suggest that placental exchange of BPA through the term placenta involves mainly passive diffusion

However BPA has been shown to be a substrate of the P-glycoprotein efflux pump (Jin and Audus, 2005) and in a BeWo cell-line, a part of BPA is actively effluxed by the P-gp protein (Morck *et al.*, 2010), suggesting a role of P-gp in the protection of the fetus against toxic xenobiotics (Ceckova-Novotna *et al.*, 2006). Further investigation is required to determine the role of membrane transporters in the maternal and fetal BPA placental transfer.

From extraction ratio determined in our model (Equation 3 and 4) and taking into account placental blood flow described in the literature (Ferrazzi *et al.*, 2001, Syme *et al.*, 2004), maternal and fetal BPA placental clearances were estimated to 74 mL/min and 113 mL/min, respectively. The fetal placental clearance of BPA thus represents approximately 36 % of the umbilical blood flow estimated at term (Ferrazzi *et al.*, 2001). Taken into account a BPA maternal total clearance of 2400 mL/min in human estimated by an allometric approach (Collet *et al.* personal communication), it means that only 3.1% of the BPA was eliminated via maternal placental route. This result is consistent with previous data obtained in the pregnant ovine model showing that 2% of BPA was eliminated by placental route (Corbel *et al.*, 2013).

In this present study, using the modified equation of Henderson-Hasselbach (Equation 7) (Garland *et al.*, 1998), we estimated a ratio between maternal and fetal concentrations of free (unbound to plasma proteins) BPA of 1.06, corresponding to a total (unbound+bound) BPA ratio of 0.9, suggesting that the internal exposition of the fetus at term is similar to that of its mother. This F:M ratio is rather high compared to the ratio between umbilical cord and maternal plasma concentrations reported in biomonitoring studies at birth (0.66 and 0.125 (Schonfelder *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2008)). Our F:M ratio may likely be overestimated because of the assumption that fetal clearance rate is negligible compared to placental feto-to-maternal clearance. Indeed, the phase II metabolism activities develop in human fetal placental unit, at least toward the end of pregnancy (Coughtrie *et al.*, 1988). Moreover, this F:M ratio determined at term could be considered as the maximal ratio for further reasons. First, there is a gradual rise in the feto-maternal serum albumin concentration ratio from about 30 % at 12 weeks to about 120 % at term, leading to an increase of the ratio of the free BPA between the maternal and fetal circulation (Hamar and Levy, 1980, Krauer *et al.*, 1984). So the determination of BPA protein binding in maternal and fetal plasma in early and late stage of pregnancy is necessary to evaluate the change in free maternal to fetal BPA plasma concentrations ratios throughout pregnancy. Secondly, for lipid-soluble molecule such as BPA, the limiting factors in the rate of placental clearance are the blood flow perfusing the placenta, the surface area available for exchange (from 3.4 to 12.6m² between the seventh month of pregnancy and the term) and membrane thickness (from 50-100 μ m at the second month to 4-5 μ m at term) (Syme *et al.*, 2004). The uterine flow

increases from 50 mL/min at 10 weeks of gestation to 600 mL/min at term, whereas the umbilical blood flow showed a reduction with gestational age, from 130 mL/(min.kg) at 20 weeks to 104 mL/(min.kg) at 38 weeks (Ferrazzi *et al.*, 2001). All together these physiological changes throughout pregnancy could contribute to a maximal fetal internal exposure related to that of its mother in late pregnancy. Thus, we can assume that the fetus is never overexposed to free BPA in comparison to its mother and that the maximal internal fetal exposure observed at term corresponds to those of its mother.

Contrary to BPA, the BPA-G maternal-to-fetal clearance normalized to the respective antipyrine clearance was approximately 30 % of the feto-to-maternal clearance (0.15 vs 0.44). These low clearances, both materno-to-fetal and feto-to-maternal, compared to those of the highly diffusible reference substance antipyrine could be explained by the hydrophilic properties of BPA-G which prevents its efficient transfer across biological interfaces. The differential transfer of BPA-G across the placenta suggests that a transport system may be involved in restricting the maternal transfer of BPA-G. Several ATP-dependent transporters including the multi-drug resistance protein 1 and 2 (MRP-1, MRP-2) and OATP transporters, predominantly expressed in the syncytiotrophoblast are known to transport glucuronide conjugates (Nagashige *et al.*, 2003, Nishikawa *et al.*, 2010, Sato *et al.*, 2003). Further investigations using specific inhibitors of placental drug transporters will be necessary to elucidate the process of BPA-G transfer across the placenta.

The low BPA-G materno-fetal extraction rate of 2% in the human placenta system is in accordance with the small amount of the BPA-G maternal dose (0.13 %), which is transferred into the fetal compartment after infusion of its mother in a rat model (Nishikawa *et al.*, 2010). All together these results suggest that BPA-G passage across the placenta is extremely limited in materno-to-fetal direction and that the high fetal exposure to BPA conjugates observed in primates after BPA maternal exposure (Patterson *et al.*, 2013) could be of feto-placental origin.

The data provided by this human placental cotyledon model should be evaluated within the further limitations. First, this single pass system involves a metabolically static system in contrast to the dynamic state of pregnancy, that's why we have been unable to find evidence for metabolism of BPA by our placental lobules at term.

However, even in a closed perfusion system, only 3.2 % of BPA was detected in conjugated form after the fetal placental transfer (Balakrishnan *et al.*, 2010). Moreover, it seems that for most drugs placental metabolism is relatively minor compared to those of the maternal or fetal liver and is not a significant factor in limiting the extent of their passage across the placenta (Pasanen, 1999). Secondly, the results from the perfused cotyledon model at term cannot be extrapolated to earlier periods during pregnancy for the reasons explained above (physiological changes throughout pregnancy).

In conclusion, we showed that BPA cross the placenta in bidirectional way at level similar to antipyrine suggesting a passive diffusion of this xenobiotic. It would appear therefore, that the human placenta has little capacity to restrict fetal exposure to BPA associated to environmental exposure of its mother. Nevertheless, it is unlikely that the fetus was overexposed to BPA compared to its mother. In contrast, BPA-G has extremely limited maternal placental permeability suggesting that from total circulating BPA (aglycone + conjugates), only aglycone fraction of BPA could be transferred to fetal compartment. Thus, the fetal exposure to BPA conjugates could be explained mainly by the contribution of the fetal metabolism at least at the end of pregnancy. Once in the fetal compartment, it is likely that the feto-placental compartment is able even slowly to extrude BPA-G, since BPA-G feto-to-maternal clearance index exceeded greatly the materno-to-fetal one. The limited feto-to-maternal BPA-G clearance could lead to a temporary glucuronoconjugates accumulation in fetal compartment, particularly in amniotic fluid. Although BPA-G is not estrogenic (Matthews *et al.*, 2001), it could be not ruled-out interference of this metabolite with other developmental processes.

Thus, the major factors determining the relationship between fetal and maternal internal exposures are the relative maternal and fetal BPA protein binding, the placental blood flows and the ontogeny of fetal metabolic process converting BPA into BPA-G. These physiological process determining fetal exposure will have to be investigated to evaluate the risk of fetal exposure to BPA in humans.

Authors's roles

T. Corbel, V. Gayrard and N. Picard-Hagen have participated to the conception and the design of the study, to the collection of the samples, to the interpretation of the data and to the draft of the article.

V. Gayrard and N. Picard-Hagen have participated to the revision of the manuscript for important intellectual content.

C. Viguié, P-L. Toutain and S. Gil have participated to the interpretation of the data and the revision of the manuscript for important intellectual content.

S. Puel, M. Z. Lacroix have participated to the development of the analytical assays and the acquisition of data.

A. Berrebi have participated to the conception and the design of the study and to the collection of the samples.

All authors have participated to critical revision of the manuscript and have approved the final version for submission and take overall responsibility for the published work.

Acknowledgements

The authors thank all the staff of the Gynecology-Obstetric Unit of Paule de Viguier Hospital, Toulouse, France particularly all the midwives and nursing auxiliaries, M. Giroux for its technical help, J. Martinel and S. Capblanc for their experiment participation.

Funding

This study was supported by the French Région Midi-Pyrénées (APRTCN 100551322).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E. B., Ponnampalam, A. P. and Mitchell, M. D. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202, 393 e391-397.
- Ceckova-Novotna, M., Pavek, P. and Staud, F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol* 2006; 22, 400-410.
- Challier, J. C. Criteria for evaluating perfusion experiments and presentation of results. *Contrib Gynecol Obstet* 1985; 13, 32-39.
- Challier, J. C., D'Athis, P., Guerre-Millo, M. and Nandakumaran, M. Flow-dependent transfer of antipyrine in the human placenta in vitro. *Reprod Nutr Dev* 1983; 23, 41-50.
- Challier, J. C., Guerremillo, M., Richard, M. O., Schneider, H., Panigel, M. and Olive, G. Antipyrine Transfer and Exchange in Human Placenta Lobule during Invitro Perfusion. *Annales De Biologie Animale Biochimie Biophysique* 1977; 17, 1107-1115.
- Corbel, T., Gayrard, V., Viguie, C., Puel, S., Lacroix, M. Z., Toutain, P. L. and Picard-Hagen, N. Bisphenol a disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol Reprod* 2013; 89, 11.
- Coughtrie, M. W., Burchell, B., Leahey, J. E. and Hume, R. The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol Pharmacol* 1988; 34, 729-735.
- Csanady, G. A., Oberste-Frielinghaus, H. R., Semder, B., Baur, C., Schneider, K. T. and Filser, J. G. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 2002; 76, 299-305.
- Dancis, J., Lehanka, J. and Levitz, M. Transfer of Riboflavin by the Perfused Human-Placenta. *Pediatric Research* 1985; 19, 1143-1146.
- Ferrazzi, E., Bellotti, M., Galan, H., Pennati, G., Bozzo, M., Rigano, S. and Battaglia, F. C. Doppler investigation in intrauterine growth restriction--from qualitative indices

- to flow measurements: a review of the experience of a collaborative group. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943, 316-325.
- Garland, M. Pharmacology of drug transfer across the placenta. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1998; 25, 21-42.
- Gavard, L., Beghin, D., Forestier, F., Cayre, Y., Peytavin, G., Mandelbrot, L., Farinotti, R. and Gil, S. Contribution and limit of the model of perfused cotyledon to the study of placental transfer of drugs. Example of a protease inhibitor of HIV: Nelfinavir. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2009; 147, 157-160.
- Giroux, M., Campistron, G., Faure, F., Dumas, J. C., Coulais, Y., Desprats, R., Grandjean, H., Houin, G. and Pontonnier, G. Effects of Ph on Antipyrine Transfer across the Human Placenta Exvivo. *Developmental Pharmacology and Therapeutics* 1990; 14, 153-160.
- Hamar, C. and Levy, G. Serum protein binding of drugs and bilirubin in newborn infants and their mothers. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28, 58-63.
- Hutson, J. R., Garcia-Bournissen, F., Davis, A. and Koren, G. The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90, 67-76.
- Jin, H. and Audus, K. L. Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. *Placenta* 2005; 26 Suppl A, S96-S103.
- Krauer, B., Dayer, P. and Anner, R. Changes in serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein concentrations during pregnancy: an analysis of fetal-maternal pairs. *Br J Obstet Gynaecol* 1984; 91, 875-881.
- Lacroix, M. Z., Puel, S., Collet, S. H., Corbel, T., Picard-Hagen, N., Toutain, P., Viguié, C. and Gayrard, V. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 2011; 85, 2053-2059.
- Larsson, A., Palm, M., Hansson, L. O. and Axelsson, O. Reference values for clinical chemistry tests during normal pregnancy. *BJOG* 2008; 115, 874-881.

- Lee, Y. J., Ryu, H. Y., Kim, H. K., Min, C. S., Lee, J. H., Kim, E., Nam, B. H., Park, J. H., Jung, J. Y., Jang, D. D. et al. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 2008; 25, 413-419.
- Leghait, J., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Camp, M., Perdu, E., Toutain, P. L. and Viguié, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* 2009; 255, 38-44.
- Matthews, J. B., Twomey, K. and Zacharewski, T. R. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* 2001; 14, 149-157.
- Morck, T. J., Sorda, G., Bechi, N., Rasmussen, B. S., Nielsen, J. B., Ietta, F., Rytting, E., Mathiesen, L., Paulesu, L. and Knudsen, L. E. Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2010; 30, 131-137.
- Nagashige, M., Ushigome, F., Koyabu, N., Hirata, K., Kawabuchi, M., Hirakawa, T., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T. et al. Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta* 2003; 24, 951-958.
- Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H. and Yokota, H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect* 2010; 118, 1196-1203.
- Padmanabhan, V., Siefert, K., Ransom, S., Johnson, T., Pinkerton, J., Anderson, L., Tao, L. and Kannan, K. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 2008; 28, 258-263.
- Pasanen, M. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 38, 81-97.
- Patterson, T. A., Twaddle, N. C., Roegge, C. S., Callicott, R. J., Fisher, J. W. and Doerge, D. R. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 267, 41-48.

- Sato, K., Sugawara, J., Sato, T., Mizutamari, H., Suzuki, T., Ito, A., Mikkaichi, T., Onogawa, T., Tanemoto, M., Unno, M. et al. Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta* 2003; 24, 144-148.
- Schneider, H., Mohlen, K. H. and Dancis, J. Transfer of Amino-Acids across the Invitro Perfused Human-Placenta. *Pediatric Research* 1979; 13, 236-240.
- Schneider, H., Panigel, M. and Dancis, J. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 114, 822-828.
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M. and Chahoud, I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002; 110, A703-707.
- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T. and Harris, L. R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998; 36, 2149-2173.
- Sudhakaran, S., Ghabrial, H., Nation, R. L., Kong, D. C., Gude, N. M., Angus, P. W. and Rayner, C. R. Differential bidirectional transfer of indinavir in the isolated perfused human placenta. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49, 1023-1028.
- Syme, M. R., Paxton, J. W. and Keelan, J. A. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clinical Pharmacokinetics* 2004; 43, 487-514.
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F. J. and Schoenfelder, G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2010; 118, 1055-1070.
- Vandentorren, S., Zeman, F., Morin, L., Sarter, H., Bidondo, M. L., Oleko, A. and Leridon, H. Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study: implications for large-scale biomonitoring studies. *Environ Res* 2011; 111, 761-764.
- Viguie, C., Collet, S. H., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Puel, S., Roques, B. B., Toutain, P. L. and Lacroix, M. Z. Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with

alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs.
Endocrinology 2013; 154, 521-528.

Tables

Table I. Materno-to-fetal and feto-to-maternal BPA perfusion parameters.

Direction	Dose	Placenta	TR Ant (%)	TR BPA (%)	CI	CI Ant (mL/min)	CI BPA (mL/min)
Materno-to-fetal	45 ng/mL	1	29.77	26.75	0.90	1.47	1.33
		2	46.23	38.18	0.83	2.54	2.10
		3	48.65	42.99	0.86	2.72	2.39
		Mean	41.55	35.97	0.86	2.24	1.94
		<i>SD</i>	<i>10.27</i>	<i>8.34</i>	<i>0.04</i>	<i>0.68</i>	<i>0.55</i>
	250 ng/mL	4	20.91	18.88	0.93	1.14	1.03
		5	35.22	28.45	0.81	1.64	1.32
		6	37.57	34.33	0.92	1.93	1.76
		7	23.75	15.25	0.66	1.17	0.75
		Mean	29.36	24.23	0.83	1.47	1.22
		<i>SD</i>	<i>8.26</i>	<i>8.74</i>	<i>0.13</i>	<i>0.38</i>	<i>0.43</i>
	Overall Mean		34.59	29.26	0.84	1.80	1.53
	<i>SD</i>		<i>10.57</i>	<i>10.04</i>	<i>0.09</i>	<i>0.63</i>	<i>0.59</i>
Feto-to-maternal	45 ng/mL	8	16.30	16.92	1.13	1.95	2.02
		9	17.99	13.46	0.78	2.24	1.67
		10	18.44	17.77	0.95	2.23	2.15
		Mean	17.58	16.05	0.95	2.14	1.95
		<i>SD</i>	<i>1.13</i>	<i>2.28</i>	<i>0.18</i>	<i>0.16</i>	<i>0.25</i>
	250 ng/mL	11	20.66	14.82	0.72	2.60	1.87
		12	17.93	13.67	0.82	2.30	1.76
		13	23.09	15.94	0.69	3.18	2.20
		14	20.78	12.39	0.61	2.72	1.63
		Mean	20.62	14.21	0.71	2.70	1.87
		<i>SD</i>	<i>2.11</i>	<i>1.52</i>	<i>0.09</i>	<i>0.37</i>	<i>0.24</i>
	Overall Mean		19.31	15.00	0.81	2.46	1.90
	<i>SD</i>		<i>2.30</i>	<i>1.97</i>	<i>0.18</i>	<i>0.41</i>	<i>0.23</i>

Ant, Antipyrine ;TR, Transfer Rate ;CI, Clearance Index ;Cl, placental clearance

Table II. Materno-to-fetal and feto-to-maternal BPA-G perfusion parameters.

Direction	Placenta	TR Ant (%)	TR BPA-G (%)	CI	CI Ant (mL/min)	CI BPA-G (mL/min)
Materno-to-fetal	8	27.11	4.48	0.16	1.49	0.25
	9	26.50	3.47	0.13	1.46	0.19
	10	25.57	5.28	0.21	1.43	0.30
	11	23.99	2.02	0.09	1.28	0.11
	Mean	25.79	3.81	0.15	1.42	0.21
	<i>SD</i>	<i>1.36</i>	<i>1.41</i>	<i>0.05</i>	<i>0.09</i>	<i>0.08</i>
Feto-to-maternal	19	17.18	9.55	0.56	2.37	1.32
	20	18.06	4.80	0.27	2.24	0.60
	21	16.13	9.86	0.61	2.23	1.36
	22	21.26	6.85	0.31	2.73	0.88
	Mean	18.16	7.77	0.44	2.39	1.04
	<i>SD</i>	<i>2.21</i>	<i>2.39</i>	<i>0.17</i>	<i>0.23</i>	<i>0.37</i>

Ant, Antipyrine ;TR, Transfer Rate ;CI, Clearance Index ;Cl, placental clearance

Figures Legends

Figure 1. Two-compartment model of the open-configuration double circuit placental perfusion. TRMF and TRFM were the materno-to-fetal and the fetal-to-maternal transfer rate, respectively. Cinput and Cinput' were the maternal and fetal inflow concentration, respectively. Coutput and Coutput' were the maternal and fetal inflow concentration, respectively. QM and QF were maternal and fetal system flow rate, respectively.

$C_{input}' \times Q_F = 0$ in materno-to-fetal experiment and $C_{input} \times Q_M = 0$ in feto-to-maternal experiment.

Figure 2. Time courses of the mean ($\pm$ SD) materno-to-fetal transfer rate of antipyrine and BPA at the concentration of 45 ng/mL (A, n=3) and of 250 ng/ml (B, n=4) during the perfusion.

Figure 3. Time courses of the mean ($\pm$ SD) feto-to-maternal transfer rate of antipyrine and BPA at the concentration of 45 ng/mL (A, n=3) and of 250 ng/ml (B, n=4) during the perfusion.

Figure 4. Time courses of the mean ($\pm$ SD) transfer rate of antipyrine and BPA-G during the materno-to-fetal perfusion (A, n=4) and during the feto-to-maternal perfusion (B, n=4).

Figures

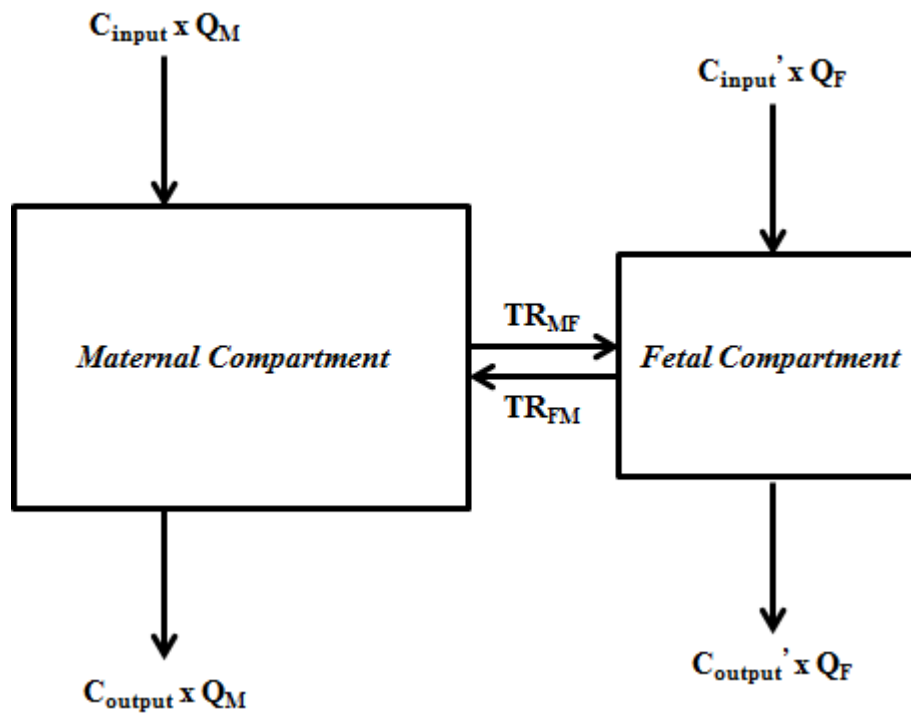


Figure 1. Two-compartment model of the open-configuration double circuit placental perfusion. TR_{MF} and TR_{FM} were the materno-to-fetal and the fetal-to-maternal transfer rate, respectively. C_{input} and C_{input}' were the maternal and fetal inflow concentration, respectively. C_{output} and C_{output}' were the maternal and fetal inflow concentration, respectively. Q_M and Q_F were maternal and fetal system flow rate, respectively.

$C_{input}' \times Q_F = 0$ in materno-to-fetal experiment and $C_{input} \times Q_M = 0$ in feto-to-maternal experiment.

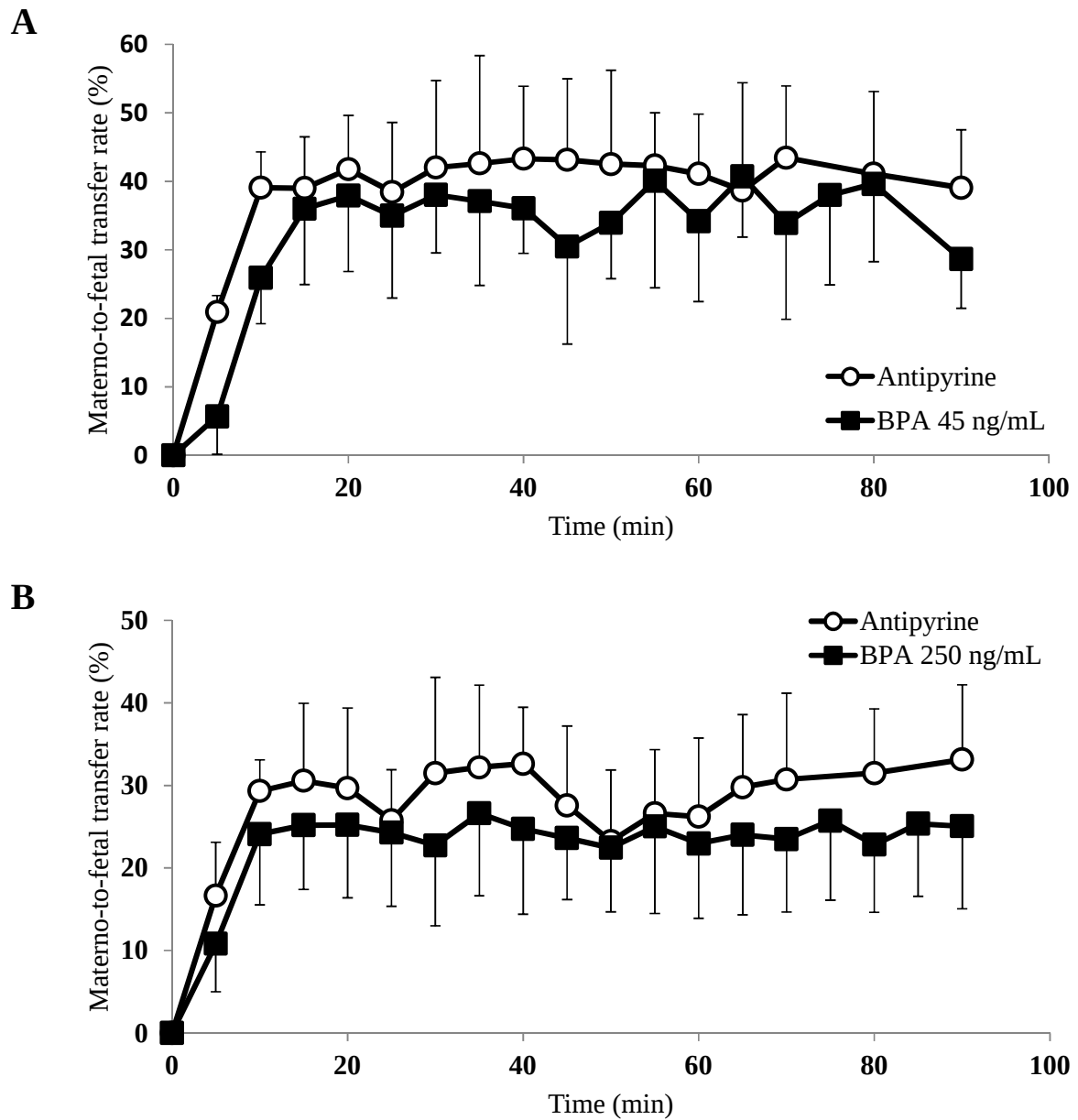


Figure 2. Time courses of the mean ($\pm$ SD) materno-to-fetal transfer rate of antipyrine and BPA at the concentration of 45 ng/mL (A, $n=3$) and of 250 ng/mL (B, $n=4$) during the perfusion.

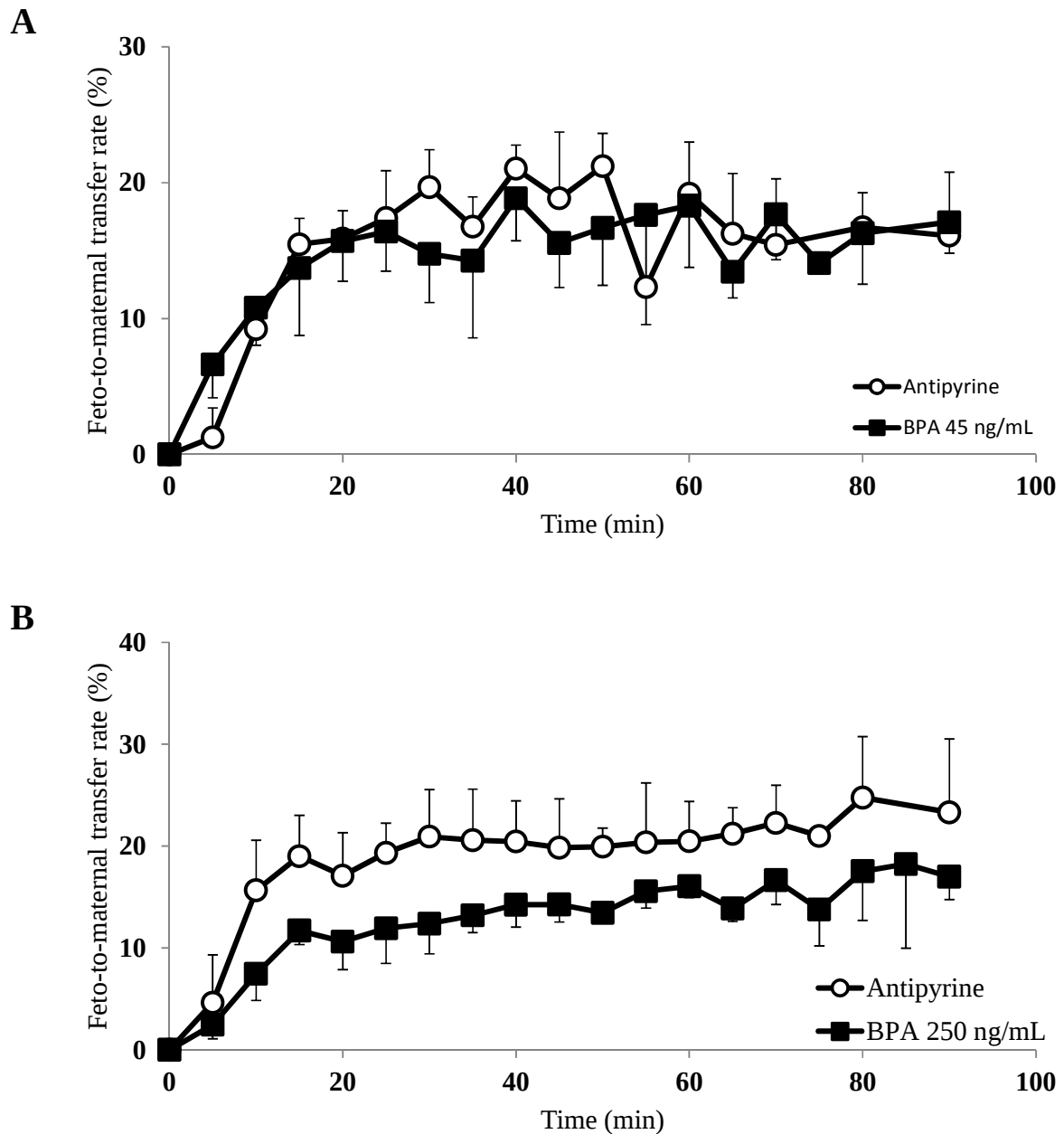


Figure 3. Time courses of the mean ($\pm$ SD) fetot-to-maternal transfer rate of antipyrine and BPA at the concentration of 45 ng/mL (A, $n=3$) and of 250 ng/mL (B, $n=4$) during the perfusion.

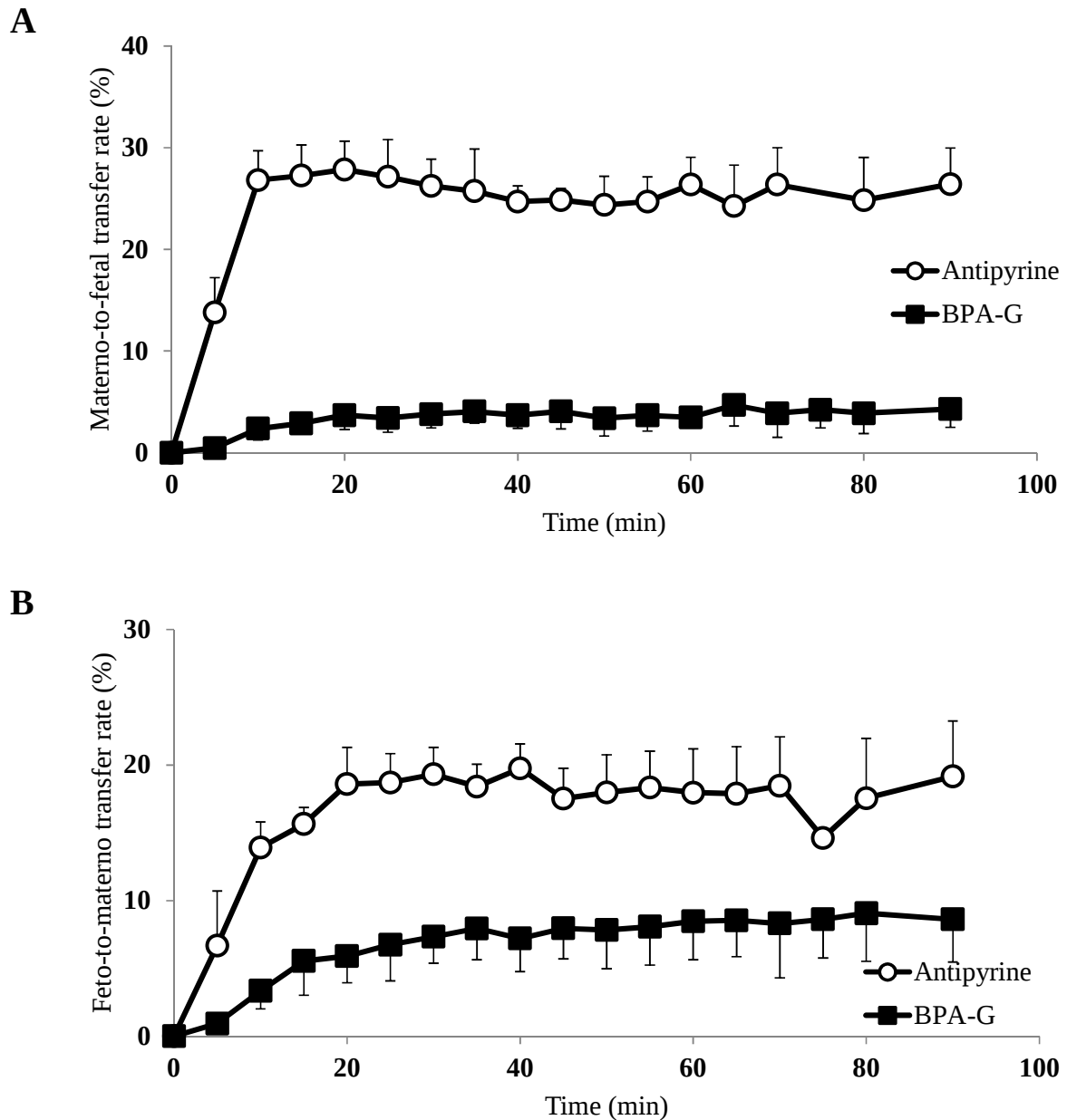


Figure 4. Time courses of the mean ($\pm$ SD) transfer rate of antipyrine and BPA-G during the materno-to-fetal perfusion (A, $n=4$) and during the feto-to-maternal perfusion (B, $n=4$).

III3. Conclusion

Sur le modèle de placenta isolé humain, nous avons montré que le BPA passait rapidement la barrière placentaire aussi bien dans le sens materno-fœtal que dans le sens fœto-maternel. L'utilisation de l'antipyrine comme marqueur de diffusion passive a permis dans un premier temps de valider nos expérimentations puis de normaliser chaque perfusion pour comparer les différentes conditions. L'index de clairance du BPA n'est pas différent dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel quelle que soit la concentration de BPA utilisée, suggérant un mécanisme de diffusion passive.

Cette étude a été réalisée avec des milieux de perfusion (maternel et fœtal) supplémentés avec 30 g/L d'albumine sérique bovine (BSA), concentrations proches des valeurs physiologiques chez la femme enceinte et le fœtus à la fin de la grossesse. Néanmoins, dans une étude préliminaire, l'index de clairance materno-fœtal du BPA a été évalué à partir de perfusions de placenta pour lesquelles les milieux de perfusion avaient été supplémentés avec 2 g/L de BSA. L'index de clairance materno-fœtal du BPA n'a pas été modifié par la concentration en albumine (Tableau 13).

	Index de clairance (moyenne±ET)
BSA 2 g/L (n=3)	0.73±0.29
BSA 30 g/L (n=7)	0.84±0.09

Tableau 13. Index de clairance materno-fœtal moyen (±ET) du BPA selon la concentration d'albumine utilisée dans les milieux de perfusion maternel et fœtal.

Pour se rapprocher encore plus des conditions physiologiques, l'utilisation d'albumine sérique humaine (HSA) pourrait être envisagée. Mais avec des séquences en acides aminés identiques à 76.5% entre la séquence de la BSA et de la HSA et des capacités de liaison similaires [149], il est peu probable que l'utilisation de l'une ou l'autre de ces albumines modifie le taux de transfert du BPA.

La détermination du rapport fœto-maternel entre les concentrations de BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) grâce à l'équation modifiée de Henderson-Hasselbach [150] a montré que l'exposition du fœtus au terme de la grossesse est similaire à l'exposition de sa mère. Les modifications de la structure du placenta au cours de la grossesse (augmentation de la surface d'échange, diminution de l'épaisseur du placenta, augmentation du débit sanguin utérin) conduisent à une exposition fœtale

maximale en fin de grossesse. Ainsi, avec un rapport proche de 1 en fin de grossesse, il est peu probable qu'il y ait une surexposition du fœtus au BPA au cours de la grossesse.

A l'inverse, le transfert placentaire du BPA-G semble relativement limité, en particulier dans le sens materno-fœtal. Ainsi la clairance transplacentaire du BPA-G est respectivement 7 et 2 fois plus faible que la clairance transplacentaire materno-fœtale et fœto-maternelle du BPA (Figure 16).

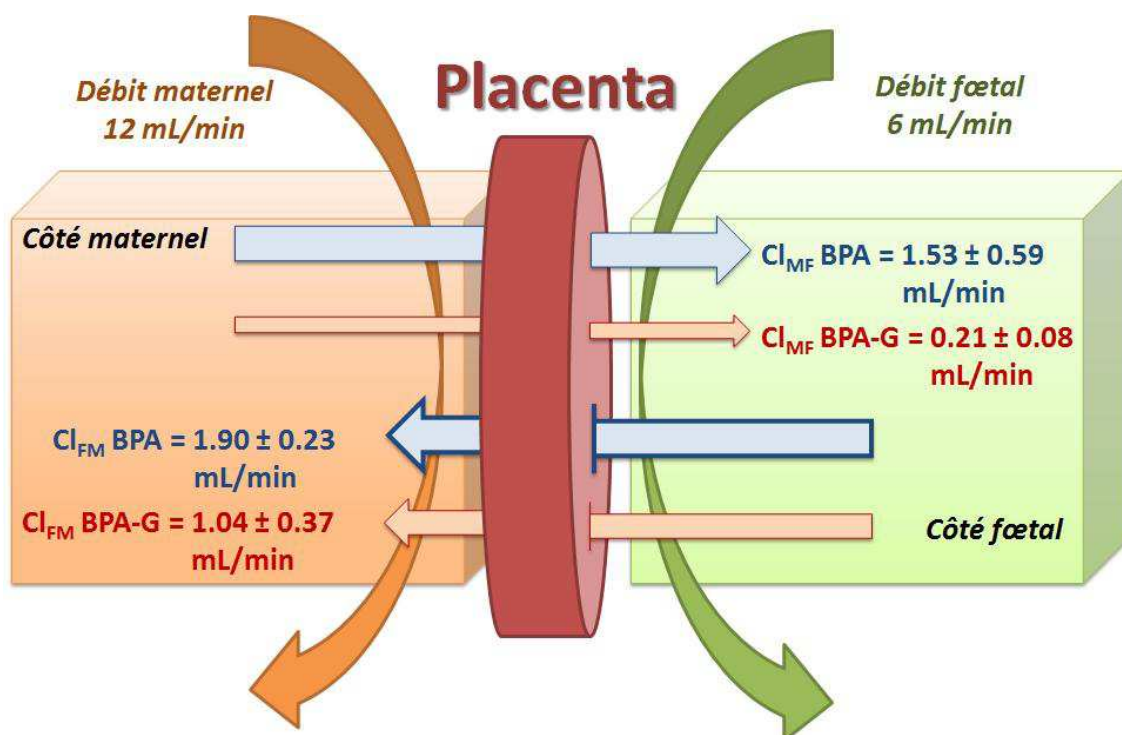


Figure 16. Clairances transplacentaires materno-fœtales et fœto-maternelles du BPA et du BPA-G, évaluées *ex vivo* sur le placenta isolé humain

La différence de transfert placentaire du BPA-G dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel suggère la participation de transporteurs spécifiques tels que les MRP ou les OATP présents majoritairement au niveau du syncytiotrophoblaste et qui participeraient à l'évacuation de toxiques depuis le compartiment fœtal vers le compartiment maternel.

En conclusion, le BPA traverse la barrière placentaire par diffusion passive à la fois dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel. Ce transfert rapide n'entraîne pas de surexposition du fœtus au BPA. Les concentrations maternelles de BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) sont similaires aux concentrations fœtales en fin de gestation. Le très faible transfert placentaire materno-fœtal du BPA-G de l'ordre de 4% suggère que le BPA-G détecté dans le compartiment fœtal *in vivo* chez le mouton [91] et chez les primates [90] est d'origine placentaire ou fœtale. Le transfert placentaire fœto-maternel limité du BPA-G (8%) pourrait conduire à une accumulation du métabolite dans le compartiment fœtal. Bien que le BPA-G ne présente pas de pouvoir œstrogénique, on ne peut exclure une réactivation de ce dernier dans certains tissus cibles conduisant à une exposition locale au BPA aglycone actif.

Dans la partie IV, nous avons déterminé la balance conjugaison-déconjugaison du BPA et de ses métabolites dans le placenta et les gonades fœtales sur le modèle ovin. Le développement des activités hépatiques de conjugaison (glucurono- et sulfoconjugaison) a été évalué sur des fractions subcellulaires hépatiques chez le fœtus ovin à deux stades de gestation et chez la brebis adulte et les activités enzymatiques ont été comparées à celles de pools de microsomes humains.

IV. Balance conjugaison/déconjugaison du BPA et de ses métabolites dans l'unité fœto-placentaire ovine

IV1. Introduction et objectifs

Notre étude menée *in vivo* sur un modèle intégratif ovin a montré que l'unité fœto-placentaire était capable de conjuguer le BPA en métabolites inactifs qui s'accumulent dans le compartiment fœtal. Ainsi, après une administration maternelle de BPA, le fœtus ovin présente des niveaux de concentrations plasmatiques de BPA-G et BPA-S respectivement 3 et 8 fois plus élevés que les concentrations maternelles. L'étude du passage transplacentaire du BPA et du BPA-G a conforté l'hypothèse d'un passage limité du BPA-G avec une clairance transplacentaire fœto-maternelle 2 fois plus faible que celle du BPA. Toutefois, ces résultats ont été obtenus en fin de gestation et soulèvent des questions relatives :

- à la capacité du fœtus à métaboliser le BPA en métabolites inactifs à un stade précoce de la vie fœtale
- à la conséquence des niveaux importants de métabolites accumulés dans le compartiment fœtal et de leur possible toxicité qui pourrait résulter de la réactivation du BPA-G en BPA actif au sein de tissus cibles fœtaux.

Ainsi, la compréhension des facteurs toxicocinétiques contrôlant l'exposition interne du complexe fœto-materno-placentaire, en particulier la balance conjugaison/déconjugaison du BPA, est un élément-clé pour évaluer les conséquences biologiques de l'exposition maternelle au BPA pendant une phase critique du développement.

Les objectifs de cette étude étaient donc d'évaluer la balance conjugaison/déconjugaison du BPA et de ses métabolites dans l'unité fœto-placentaire sur le modèle ovin. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'ontogenèse des systèmes enzymatiques de conjugaison du BPA au niveau du foie fœtal au cours de la gestation avec une approche *in vitro*. Dans un second temps, la balance conjugaison-déconjugaison au sein de tissus cibles (le placenta et les gonades fœtales) sensibles aux interférences œstrogéniques a été déterminée *ex vivo*.

Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe Métabolisme des Xénobiotiques, UMR 1331 Toxalim, Toulouse. Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie "IV2 Article 4" et feront l'objet d'une publication prochainement soumise dans une revue de pharmacologie.

Dans cette étude, la balance conjugaison du BPA/déconjugaison du BPA-G dans le testicule foetal ovin est en faveur de l'hydrolyse du conjugué, ce qui pose la question d'une réactivation du BPA-G en BPA dans les gonades. Cependant, ce résultat a été obtenu *ex vivo* dans un système statique qui ne reproduit pas les conditions qui président *in vivo*, où le BPA et le BPA-G peuvent être distribués et métabolisés par le fœtus. Afin de vérifier la capacité du testicule à réactiver le BPA *in vivo*, une étude complémentaire a été menée sur un agneau âgé de 5 mois afin d'évaluer si le testicule ovin peut hydrolyser le BPA-G. Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie IV3.

IV2. Article 4

"The free/conjugated Bisphenol A ratio in feto-placental compartment: a key parameter determining Bisphenol A prenatal exposure."

Corbel T, Perdu E, Puel S, Lacroix M Z, Gayrard V, Viguié C, Toutain P-L, Zalko D and Picard-Hagen N.

Article title: The free/conjugated Bisphenol A ratio in feto-placental compartment: a key parameter determining Bisphenol A prenatal exposure

Running title: Feto-placental BPA metabolism

Keywords: Bisphenol A, endocrine disruptor, hepatic metabolism, fetus, sheep

Authors: Tanguy Corbel^{1,2}, Elisabeth Perdu¹, Véronique Gayrard^{1,2}, Sylvie Puel^{1,2}, Marlène Z. Lacroix^{1,2}, Catherine Viguié^{1,2}, Pierre-Louis Toutain^{1,2}, Daniel Zalko¹, Nicole Picard-Hagen^{1,2}

¹Institut National de Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1331, Toxalim, Research Center in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

²Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Ecole d'Ingénieur de Purpan, Université Paul Sabatier, F-31076 Toulouse, France

Corresponding author :

Nicole Picard-Hagen

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

23, chemin des Capelles

31076 Toulouse cedex 3

+33(0)561193861

n.hagen-picard@envt.fr

Abstract

The widespread human exposure to Bisphenol A (BPA), an endocrine disruptor targeting developmental processes, raises questions related to the consequences of fetal exposure. Using the model of the ovine fetus, we have showed that BPA is efficiently conjugated by the feto-placental unit into BPA-Glucuronide (BPAG) and BPA-Sulfate (BPAS). Both metabolites remain trapped within the feto-placental unit. Facing possible deconjugation activity in fetal organs, such a high BPAG exposure might contribute within sensitive tissues to high *in situ* exposure to bioactive BPA.

The objective of our work was to characterize, throughout the gestation, the dynamic of the balance between BPA conjugation and back deconjugation in fetal sheep tissue explants and human and ovine subcellular liver fractions.

Firstly, hepatic subcellular fractions were incubated with BPA to measure glucurono- and sulfo-conjugation activities. Secondly, ovine tissues (adult and fetal gonads, and placenta) were incubated with radiolabelled BPA or its metabolites to evaluate the balance between conjugation/deconjugation activities. BPA glucuronoconjugation was very low in 55 days-old ovine fetuses and, although it increased rapidly throughout pregnancy, it remained lower than in adults until birth. Glucuronoconjugation activities in hepatic fractions from adult sheep were quite similar than in human one. Hepatic sulfoconjugation activities of BPA remained stable throughout gestation.

In placenta, BPA conjugation and BPAG deconjugation activities were balanced. In gonads at all stages, BPAG deconjugation activities were systematically higher.

Ovine fetuses at an early stage of pregnancy expressed limited activities of BPA glucuronoconjugation, reflecting very low detoxification capabilities. High deconjugation rates of BPAG, evidenced within fetal organs, jointly to the high accumulation rate of conjugated metabolites in the fetal compartment suggest that target tissues might have to face a possible BPAG reactivation into bioactive BPA. How functionally relevant such a reactivation might be remains to be determined.

Introduction

Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen widely used as a monomer in the manufacture of epoxy resins and polycarbonate plastics, which could contribute to the almost ubiquitous human exposure to BPA across lifespan [1]. The highly prevalent and widespread exposure to BPA is of special concern due to its estrogen-like properties *in vivo* [2]. Much of the concern regarding BPA safety arises from reported adverse effects of BPA which can interfere with normal development of reproductive organs and mammary glands but also with energy metabolism and cognitive performance when tested, even at low doses, in experimental species during the perinatal period [3].

In humans, highly variable BPA levels have been reported in the fetoplacental compartment, in the blood of the umbilical cord, in the placenta and in the amniotic fluid [1], indicating a transfer of BPA from mother to fetus. Nevertheless, these biomonitoring data remained limited at birth and did not reflect the fetal exposure throughout pregnancy. Ethically, access to fetal tissues or fluids samples during pregnancy is evidently not possible. This reveals the need to develop animal model relevant for human to characterize fetal exposure and determine toxicokinetic mechanisms involved in fetal exposure during pregnancy.

Current uncertainty about the true level of human internal exposure to BPA, especially during the critical period of fetal development, prevents a full evaluation of the potential human health implications from animal study.

Previous BPA toxicokinetic investigations using the model of the chronically-catheterized ovine fetus have enabled to thoroughly identify the BPA placental transport and the specific metabolism of the fetoplacental unit as the major determinants of the fetal internal exposure to the unconjugated (e.g. active) form of BPA and its conjugates [4].

This highlights the urgent need for developing relevant model to evaluate the ontogeny of the metabolic systems converting BPA into BPA-G and vice-versa.

Several studies on the biotransformation of BPA have been performed *in vivo* [5-9] and *in vitro* [10-15]. In adult humans, BPA-Glucuronide (BPA-G) was characterized as the major metabolite of BPA. Other metabolites such as BPA-Sulfate (BPA-S) were

identified. These conjugates are assumed to be devoid of estrogen activity [16] and rapidly excreted in urine. Conversely, high levels of BPA metabolites are reported in fetal compartment with evidence of their trapping in feto-placental unit [4, 17]. A fetal origin of these metabolites is ensured due to extremely limited placental permeability of BPA-G preventing transfer from mother to fetus, as described in human perfused placenta model (Corbel *et al.*, personal communication). This suggests a capacity of the feto-placental unit to metabolize BPA, at least at the end of the pregnancy. Nevertheless, the susceptibility of the developing fetus at an earlier stage of pregnancy to estrogenic effects of BPA could be exacerbated by limited capacity of metabolism. Alternatively, the high levels of BPA metabolites in fetal blood raises the question of the possible reemergence of the parent compound by deconjugation reactions at the level of target tissues, a process well studied for several drugs [18].

The present study was intended to characterize in vitro the BPA glucurono- and sulfoconjugation activities of fetal liver subcellular fractions at 55 days and 120 days of pregnancy in sheep corresponding to an early and a late of pregnancy, respectively. Adult ovine hepatic conjugation activities were also evaluated and compared to human one. Because of the high levels of BPA and metabolites in target organs susceptible to estrogenic interferences, the balance between conjugation of BPA and the deconjugation of BPA-G and BPA-S into bioactive BPA in ovine gonads and placental tissues and in adult ovaries was determined with an *ex vivo* approach.

Materials and Methods

1. Animals and tissues collection

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of humane animal care under agreement number 31-1155545 from the French Ministry of Agriculture and were approved by Midi-Pyrénées ethic committee under number MP/01/15/03/12.

Seven pregnant ewes at 55 days and 120 days of gestation and 3 non-pregnant ewes were anesthetized by electrical stunning and then immediately euthanized by exsanguination. Fetuses were extracted from maternal uterus at 55 days of gestation (9 males and 9 females) and 120 days of gestation (3 males and 3 females). Fetal gonads and placental cotyledons were immediately collected and chilled in saline solution at 4°C until they were incubated within a period not exceeding one hour after collection. Ovaries were also collected in 3 ewes at 120 days of pregnancy and in 3 non-pregnant ewes.

At 55 days of gestation, fetal livers were collected, immediately chilled in liquid nitrogen and stored at -80°C. At 120 days of gestation, fetal livers were perfused immediately after their collection using saline solution at 4°C for 5 minutes. A fragment of about 10 grams of the right lobe was chilled in liquid nitrogen and stored at -80°C. Liver was also collected on 3 non-pregnant ewes and perfused as described above.

2. BPA hepatic metabolism

Unless otherwise specified, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.1 Hepatic subcellular fractions preparation

Livers from three 55 days-old fetuses were pooled leading to three pools of male and three pools of female hepatic subcellular fractions, whereas the liver of 120 days-old fetuses and of non-pregnant ewes were prepared individually (n=3). Hepatic subcellular fractions were separated by differential centrifugation in order to obtain microsomal and cytosolic fractions as previously described [19] within a period not exceeding one month after collection. All fractions were then stored at -80°C until incubations.

In order to compare ovine adult hepatic metabolism with human metabolism, human subcellular fractions were purchased from three different suppliers. Each microsomal fractions were obtained from pools of 10 female donors and purchased from TEBU (Le Perray-en-Yvelines, France), BD Gentest™ (Erembodegem, Belgium) and Life technologies™ (Saint-Aubin, France). Cytosolic fractions were purchased from TEBU (Le Perray-en-Yvelines, France) (pools of 10 female donors), and from Life technologies™ (Saint-Aubin, France) and Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) (pools of 10 mixed gender donors).

2.2 *In vitro* incubations

All assays were optimized with respect to substrate concentrations and incubation time. The protein contents of subcellular fractions were determined by the method of Bradford et al. (1976) with bovine serum albumin (BSA) as a standard [20]. All incubations and pre-incubations were done in 0.5 M Tris-Maleate buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂ in glass vials at 37°C under shaking.

Glucuronoconjugation assays: in vitro glucuronoconjugation of BPA was evaluated by incubating 0.5 mg of hepatic microsomal proteins of ewes and humans and of ovine fetuses for 20 minutes BPA at different concentrations (2.5 to 200 µM) in a final volume of 0.5 mL buffer containing 1 mM UDPGA. Reaction was stopped by adding 1 mL iced acetonitrile and samples were stored at -20°C until assayed.

Blank samples without UDP glucuronic acid or without microsomal proteins were used as controls.

Sulfoconjugation assays: in vitro sulfoconjugation activity was evaluated on cytosolic fractions from ovine and human adult and ovine fetal liver. 0.2 mg of cytosolic proteins was pre-incubated during 30 minutes with 5 mM ATP and 2 mM Na₂SO₄. BPA at different concentrations (2.5 to 200 µM) was then added to the mixture in a final volume of 0.5 mL of incubation buffer. Reaction was stopped after 20 minutes of incubation by adding 1 mL iced acetonitrile and samples were stored at -20°C until assayed.

Blank samples without ATP and Na₂SO₄ or without microsomal proteins were used as controls.

Deconjugation assays: hepatic deconjugation activity was evaluated on ovine microsomal liver fractions from one fetus of each stage of pregnancy and one adult. 0.5 mg of microsomal proteins was incubated during 20 minutes with BPA-G or BPA-S at three different concentrations (2.5, 50 and 100 µM) in a final volume of 0.5 mL of incubation buffer. Reaction was stopped by adding 1 mL iced acetonitrile and samples were stored at -20°C until assayed.

2.3 Analytical procedure

BPA and metabolites concentrations were determined after extraction by acetonitrile using a validated UPLC/MS/MS as previously described [21], adapted for the incubation media.

The calibration curves ranged from 4.4 to 219000 nM (1 to 50000 ng/ml), 24.7 to 247525 nM (10 to 100000 ng/ml) and 32.5 to 324675 nM (10 and 100000 ng/ml), for BPA, BPA-G and BPA-S, respectively. The mean intra- and inter-day coefficients of variation for three concentration levels and for BPA, BPA-G and BPA-S were lower than 15% and the limits of quantification (LOQ) were validated at 4.4 nM (1 ng/ml), 24.7 nM (10 ng/ml) and 32.5 nM (10 ng/ml), respectively.

2.4 Michaelis-Menten parameters determination

All data were computed using WinNonlin software (Version 5.3;Pharsight Corporation) and the Michaelis-Menten parameters, $V_{\max}$ and K_m , were determined using the following model:

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equation 1}$$

where $V_{\max}$ was the maximum velocity, K_m was the Michaelis constant and $[S]$ was the substrate concentration.

At 55 days of pregnancy, several concentrations of BPA-G were below the LOQ (25 nM), so the sparse data option of WinNonlin was used for each sex group allowing computation of the different standard errors (SE) associated with the estimated parameters.

2.5 Hepatic intrinsic clearance

From Michaelis-Menten parameters determined both for glucurono- and sulfoconjugation reaction, hepatic intrinsic clearance (Cl_{int}) was calculated with the following equation:

$$Cl_{int} = \frac{V_{max}}{K_m} \times A \times B \quad \text{Equation 2}$$

where A was the quantity of proteins (microsomal or cytosolic for glucuronoconjugaison and sulfoconjugation, respectively) per gram of liver and B the weight of liver per kilogram of body weight. In ovine, the quantities of proteins per gram of liver were determined by the Bradford method and the means ($\pm$ SD) quantities of microsomal proteins were 5.15 ± 1.24 , 6.80 ± 1.95 and 12.65 ± 2.12 mg/g in 55 and 120 days-old fetal liver and in adult liver, respectively while the mean ($\pm$ SD) quantities of cytosolic proteins were 10.78 ± 1.49 , 12.45 ± 4.37 and 16.28 ± 1.65 mg/g in 55 and 120 days-old fetal liver and in adult liver, respectively. For human sub-cellular fractions, the amounts of microsomal proteins and cytosolic proteins per gram of liver were 32 mg [14] and 80.7 mg [22], respectively. The mass of the liver per kilogram of body weight was 66.7 g and 22.0 g for ovine fetus at an early and late stage of pregnancy, respectively, [23] and 13.7 g and 25.3 g for ovine and human adults [24].

Glucuronidation intrinsic clearance was corrected by the free fraction of BPA in the microsomal incubation medium (fu_{inc}) determined with the following equation [25]:

$$Cl_{int,u} = \frac{Cl_{int}}{fu_{inc}} \quad \text{Equation 3}$$

where $Cl_{int,u}$ was the unbound intrinsic clearance and fu_{inc} was calculated with the following equation [25]:

$$fu_{inc} = \frac{1}{C \times 10^{0.56 \times \log P / D - 1.41} + 1} \quad \text{Equation 4}$$

where C was the microsomal protein concentration in the incubation medium and $\log P/D$ of BPA was 3.4 [14, 25].

3. BPA metabolism in target tissues

3.1 In vitro synthesis of radiolabelled BPA-G and BPA-S

Tritiated metabolites of BPA, not available commercially, were synthesized from [^3H]-BPA (Moravek Biochemicals, CA, USA; radio-purity: >97%, specific activity: 185-555 GBq/mmol) as previously described [26].

Briefly, 20 nmoles [^3H]-BPA-Glucuronide ([^3H]-BPA-G) were produced by incubating 2 mg of guinea pig liver microsomal protein with 20 nmoles [^3H]-BPA (740 KBq) and 2.5 mM UDP glucuronic acid in 1 mL 0.5 M Tris-maleate buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl_2 for 2 hours at 37°C. Supernatant was collected and [^3H]-BPA-G radio-purity was checked by HPLC coupled to on-line radioactivity detection and [^3H]-BPA-G structure was confirmed by mass spectrometry.

20 nmoles [^3H]-BPA-Sulfate ([^3H]-BPA-S) were produced by incubating 2 mg of guinea pig liver cytosolic protein with 20 nmoles [^3H]-BPA (740 KBq) and 5 mM ATP and 2 mM Na_2SO_4 in a final volume of 1 mL 0.5 M Tris-Maleate buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl_2 for 2 hours at 37°C. Supernatant was collected and [^3H]-BPA-S radio-purity was checked by HPLC coupled to on-line radioactivity detection and [^3H]-BPA-S structure was confirmed by mass spectrometry.

3.2 Ex vivo incubations

About 100 mg of fetal gonads, cotyledons or maternal ovaries (n=3) were incubated with 0.1 nmole [^3H]-BPA in 1 mL DMEM, or 0.1 nmole [^3H]-BPA-G in 1 mL saline solution or 1 mL sodium acetate buffer pH 4.5, or 0.1 nmole [^3H]-BPA-S in 1 mL saline solution.

All incubations were performed for 8 hours at 37°C under shaking with O_2/CO_2 95%/5%. At the end of the incubation, media and tissues were collected in glass vials. 1 mL of ethanol was added with the tissue sample. All samples were conserved at -20°C until analytical assays.

3.3 Analytical procedure

The radioactivity recovery and the BPA and metabolites quantification were performed with analytical procedure previously described [26].

The radioactivity of each incubation medium and tissue was measured from aliquots (10 μL) by liquid scintillation counting in a Packard Tricarb 4430 counter with Ultima Gold (Packard Instruments Co., Meriden, CT) as the scintillation cocktail. HPLC

coupled to online radioactivity detection (HP 1100 coupled to Flo-One A500 detector, with Flo-scint II as scintillation cocktail, Packard Instruments Co., Meriden, CT) was used for metabolite profiling.

To analyze metabolism products of BPA, the HPLC system consisted of a Zorbax C18 column (250 x 4 mm, 5 μ m) coupled to a Kromasil C18 guard precolumn (18 x 4.6 mm, 5 μ m). Mobile phases consisted of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 3.5) and acetonitrile 95:5 v/v in A and 10:90 v/v in B, respectively. Flow rate was 1 mL/min at 35°C. The gradient used was 0–4 min 100% A; 4–6 min linear gradient from 100% A to A:B 85:15 v/v; 6–16 min A:B 85:15 v/v; 16–18 min linear gradient from 15% B to 25% B; 18–28 min A:B 75:25 v/v; 28–30 min linear gradient from 25% B to 30% B; 30–37 min A:B 70:30 v/v; 37–39 min linear gradient from 30% B to 70% B; 39–45 min A:B 30:70 v/v.

Metabolites were identified by comparison of radio-HPLC R_T with those of authentic standards before and after enzymatic hydrolysis. Metabolites were quantified by integrating the area under the radioactivity detected peaks.

4. Statistical analysis

Descriptive statistics were used and data expressed as mean ($\pm$ SD). Statistical analyses were performed using Systat 12.0 software (SPSS, Inc.). The formation rate of BPA metabolites by subcellular hepatic fractions was analyzed by a two-way ANOVA with substrate concentration and group as fixed-effect factors and individual nested within the group as a random-effect factor. Two analyses were performed : the sex effect was evaluated on the 120 days-old fetuses and the effect of species (human versus ovine) on adult subcellular fractions.

The liver metabolic parameters ($V_{\max}$, K_m and intrinsic clearance) were compared by student t-test to evaluate the sex effect on the 120 days-old fetuses and the effect of species (human versus ovine) on adult subcellular fractions.

In ex vivo incubation, BPA conjugation and BPA-G hydrolysis percentage were compared by a paired *t*-test for each tissue.

Results

1. BPA Hepatic Metabolism

Glucuronoconjugation of BPA

Figure 1 depicts the mean ($\pm$ SD) formation rates of BPA-G in function of BPA concentrations by hepatic microsomal fractions of adult ovine and human and of 55 and 120 days-old ovine fetuses. As no sex-related difference was observed for the 55 and 120 days-old ovine fetuses, the mean values of rates of BPA glucuronidation obtained for each gestational stage were represented on the figure. The curves followed Michaelis-Menten kinetics and a saturation of the glucuronosyltransferase activity was achieved from BPA concentrations of 5 μ M and 50 μ M for ovine fetus at 55 days and 120 days of pregnancy, respectively and of 100 μ M for adult ewes and human pools.

Table 1 presented mean ($\pm$ SD) values of Michaelis-Menten parameters ($V_{\max}$ and K_m) and of the intrinsic clearance of the BPA glucuronoconjugation in ovine and adult human and in 55 and 120 days-old ovine fetuses. The overall mean $V_{\max}$ of glucuronidation rate determined in the 55 days-old fetus was 40-fold lower than that determined in 120 days-old fetus (11.9 ± 4.78 versus 483 ± 51.6 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ of microsomal proteins). The mean $V_{\max}$ of glucuronidation rate of BPA in adult ovine hepatic microsomal fractions was close but systematically lower than that of human pool (6086 ± 862 versus 2770 ± 250 pmol.min⁻¹.mg⁻¹, *t*-test, $p < 0.005$)

The Michaelis constant, K_m (concentration of BPA at half $V_{\max}$) of BPA glucuronidation rate was two-fold higher at a late stage of pregnancy than at an early one (9.59 ± 1.70 versus 4.06 ± 0.92 μ M). In adult, the K_m of the glucuronoconjugation reaction were not significantly different (*t*-test, $p > 0.05$) in adult ewes and human pool (82.0 ± 18.1 and 59.6 ± 15.6 μ M).

In ovine, the hepatic intrinsic clearance of BPA glucuronidation at an early stage of pregnancy was low, 13.5-fold lower than the adult one (4.02 ± 1.50 versus 54.3 ± 11.8 mL.kg⁻¹.min⁻¹), whereas at a late stage of pregnancy, this intrinsic clearance (38.5 ± 24.3 mL.kg⁻¹.min⁻¹) was not significant different than adult one (*t*-test, $p > 0.05$). Human intrinsic clearance (164 ± 45 mL.kg⁻¹.min⁻¹) was 3-fold higher than adult ewes one (*t*-test, $p < 0.05$).

Sulfoconjugation of BPA

The mean ($\pm$ SD) formation rates of BPA-S as a function of BPA concentrations by hepatic cytosolic fractions of ovine and adult human and of 55 days and 120 days-old ovine fetuses followed Michaelis-Menten kinetics as shown in Figure 2 and. As no sex-related difference was observed at 55 days and 120 days of pregnancy, the mean values of BPA sulfation rate for each stage of development were represented on the figure 2. The curves of the BPA-S formation rate as a function of BPA concentration showed enzymatic saturation from a BPA concentration around 50 μ M for ovine fetus whatever the stage of pregnancy and from 200 μ M for human pools. In adult ewes, enzymatic saturation was reached for a higher BPA concentration of 500 μ M which was not represented on the figure 2. The visual inspection of the ovine profiles of hepatic sulfation rate in function of BPA concentration showed that the sulfation activities were relatively similar whatever the stage of pregnancy and also in adult. By contrast, the sulfation rate in three human cytosolic fractions pools showed a great variation and was lower than that in ovine adult ($p < 0.05$).

Table 2 presented mean ($\pm$ SD) values of Michaelis-Menten parameters ($V_{\max}$ and K_m) and of the intrinsic clearance of the BPA sulfoconjugation in ovine and adult human and in 55 and 120 days-old ovine fetuses. The overall mean $V_{\max}$ of hepatic sulfation rate determined for the 55 days-old fetus was not different than that of the 120 days-old fetus (78.3 ± 1.32 versus 104 ± 16.2 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ of microsomal proteins; t -test, $p > 0.05$). The mean human sulfation $V_{\max}$ was extremely low, 75-fold lower than the adult ovine one (7.03 ± 4.37 versus 525 ± 108 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ of microsomal proteins, $p < 0.001$). The human sulfation K_m was also 11-fold lower than that of the adult ewes one (40.2 ± 6.16 versus 457 ± 257 μ M, $p < 0.05$). In ovine fetus, overall mean sulfation K_m was two-fold lower at a late stage of pregnancy than at early one (15.67 ± 9.11 versus 7.51 ± 1.48 μ M, $p < 0.05$).

Intrinsic clearance of sulfation did not vary whatever the stage of pregnancy (t -test, $p > 0.05$) and was 13-fold higher in fetus than in adult (16.05 ± 4.32 , 15.13 ± 5.29 and 1.22 ± 0.54 mL.kg⁻¹.min⁻¹, in 55 days-, 120 days-old fetus and in adult, respectively). In adult, the human intrinsic clearance of sulfation was not significantly different than the ovine one (0.39 ± 0.30 versus 1.22 ± 0.54 mL.kg⁻¹.min⁻¹, t -test, $p > 0.05$).

In ovine, the ratio between BPA glucuronidation and sulfation intrinsic clearance increased with the stage of pregnancy, from 0.25 at an early stage of pregnancy, 2.5 at a late stage of pregnancy, to reach 4 in adult ewes. In adult human, the BPA hepatic glucuronidation was even more preponderant with a ratio of 420.

The deconjugation assays performed on ovine hepatic microsomal fractions, in the same conditions of incubation than those of the conjugation assays, showed a very low percentage of hydrolysis of BPA-G and BPA-S into BPA, below 2.5% whatever the concentration of the substrate.

3. BPA Metabolism in Target Tissues

The overall mean total radioactivity recovered in medium and in tissue after the 8 hours of incubation was $102 \pm 19\%$.

The overall mean hydrolysis percentage of radiolabelled BPA-G in sodium acetate buffer was about $91 \pm 15\%$. This positive control demonstrates the integrity of the ovine tissues incubated in conditions promoting the hydrolysis activity.

Figure 3 presented the mean ($\pm$ SD) total percentage of conjugated radiolabelled BPA in tissue and DMEM medium and the mean ($\pm$ SD) total percentage of hydrolyzed radiolabelled BPA-G in tissue and NaCl 0.9% medium after 8 hours of incubation of ovine fetal gonads and placenta at 55 and 120 days of pregnancy and of adult ovaries. Whatever the tissue, the major metabolite ($>95\%$) formed after incubation of tissues with [^3H]-BPA was the BPA-glucuronide. In the placenta and in the gonads, the percentage of [^3H]-BPA-S hydrolysis (data not shown) was less than 10 %, with the highest hydrolysis rate of $8.66 \pm 5.32\%$ observed in placenta at late stage of pregnancy.

In placenta, BPA conjugation rate and BPA-G hydrolysis rate were balanced: no significant difference was observed between both rates (paired *t*-test, $p>0.05$). In addition, there is no effect of gestation stage on conjugation or hydrolysis rates (*t*-test, $p>0.05$). Conjugation rate ranged between 3.58 and 47.66 %, whereas hydrolysis rate ranged between 0 and 28.59 %. In the fetal gonads and in the adult ovaries, the hydrolysis rate was significantly higher than conjugation rate (*t*-test, $p<0.05$). Conjugation rate in fetal gonads ranged between 0 and 8.48 % whatever the stage of pregnancy. The highest [^3H]-BPA-G hydrolysis rate of $46 \pm 17\%$ was observed in fetal

testis at 55 days of gestation. Hydrolysis rate was significantly higher in fetal testis than in fetal ovaries (t -test, $p < 0.05$).

Discussion

Pregnancy represents a critical window of exposure for the fetus during which developmental processes are extremely sensitive to estrogenic interferences. BPA is one of the xenobiotics of major concern for fetal development. The degree of human exposure to BPA, particularly during pregnancy and fetal development is not clear. Several processes are involved in fetal exposure to BPA, but the two principal are the placental transfer both from mother to its fetus and from fetus to its mother, and the feto-placental metabolism. Metabolism of BPA by the feto-placental unit is dependent of the development of enzymatic activities, mostly phase II reaction concerning BPA.

In order to clarify BPA fetal exposure, this study intended to evaluate the ontogenesis of hepatic enzymatic systems involved in conjugation of BPA, both glucuronidation and sulfation, which represents detoxification processes by the loss of estrogenic properties.

As several studies showed high levels of metabolites in feto-placental unit, at least at the end of the pregnancy [4, 17, 27], the balance conjugation/deconjugation of BPA and its main metabolites (BPA-G and BPA-S) have been determined, because of the reactivation of conjugates in target tissues could exacerbate locally fetal exposure to this xenobiotic.

The main result obtained in the present study is the characterization of the ontogeny of hepatic conjugation systems towards BPA throughout pregnancy. Conjugation of BPA into BPA-G has shown major evolution during the two studied stages of pregnancy (early stage versus late stage). At 55 days of pregnancy, ovine fetus presented very poor capacity to form BPA-G with an intrinsic clearance 4-fold lower than that determined at 120 days of pregnancy. At a late stage of pregnancy, this intrinsic clearance tended to be lower than adult despite of significant difference. These results are consistent with that of Pretheeban et al. (2011) that reported a lesser expression of several isoforms of UGT-glucuronosyltransferase (UGT), enzyme responsible of glucuronoconjugaison, in ovine fetus at a late stage of pregnancy than in adults [28]. However activities differed between adult sheep and humans, similar scheme of UGT ontogenesis could be considered in humans. Indeed, some studies reported limited activity of UGT in the human fetal liver, with activities varying between

1 to 30% of adult activities [29, 30]. The difference observed between intrinsic clearance determined using hepatic microsomes from adult sheep and humans could be explained in part by the higher quantity of microsomal proteins per gram of liver in humans than in sheep (32 mg/g versus 12.7 mg/g) and the higher proportion of the liver in the body weight in humans than in sheep (25.3 g/kg bw versus 13.7 g/kg bw [14]).

From intrinsic clearance (Cl_{int}), hepatic clearance (Cl_H), which represents the total capacity of the liver to metabolize BPA, could be extrapolated according to the following equation [14]:

$$Cl_H = \frac{Q_H \times fu \times Cl_{int}}{Q_H + fu \times Cl_{int}} \quad \text{Equation 5}$$

where Q_H was the liver blood flow (50 and 30 mL/(kg.min) in sheep and human, respectively [24]) and fu was the free fraction of BPA (7% in sheep [4] and 5% in human [31]). The hepatic clearances is predicted to be 2-fold higher in human than in sheep (6.40 versus 3.53 mL/(kg.min), respectively). This estimated value of hepatic clearance for human is 1.5-fold lower than values reported in two previous studies ((9.09 [12] and 10.71 mL/(kg.min) [15]) after correction by fu_{inc} (equation 4). Our estimated hepatic clearance represents about 21 % of the liver blood flow, whereas the study of Mazur et al. (2010) reported a BPA hepatic clearance representing about 80 % of the liver blood flow [14]. Being aware of the high hepatic first-pass effect for BPA, this value does not appear aberrant. In this case, the hepatic clearance estimated here might be underestimated.

In contrast, BPA sulfation was evidenced at an early stage of pregnancy, and the capacity of fetal liver did not change throughout pregnancy. But after birth, BPA sulfation activities seemed to decrease and adult sheep presented low sulfation activities compared to fetus. It has been reported in the literature that sulfation activities developed more precociously than glucuronidation one. Pacifici (2004) and Stanley et al. (2005) reported activity of isoforms of sulfotransferases from liver of 14-18 weeks-old human fetus, and some of them presented activity at levels similar and even higher than in adults [32, 33]. Unlike the interspecies difference of conjugation activities, sulfation activity appears very low compared to glucuronidation one both in sheep and human adults. This is consistent with studies which reported that BPA-S represented only 9% of

total metabolites formed in vitro using adult human subcellular fractions [15] and only 1.4% of total BPA at steady state in ovine plasma after BPA infusion (2 mg/(kg.day) for 24 hours) [4].

Thus, the developing fetus is clearly different from the adult in respect of its capacity for detoxification, especially at an early stage of pregnancy. Sulfation activities which developed before glucuronidation one could represent the first route of elimination of xenobiotics by the fetus. However, the total hepatic intrinsic clearance (glucuronidation + sulfation) remains about 3-fold lower at 55 days than at 120 days of pregnancy.

While the liver appears as the conjugation organ, even in fetus (the highest deconjugation rate remain less than 2.5%), gonads seemed to possess enzymatic equipment in favour of BPA-G deconjugation. In fetal gonads, both in male and female, hydrolysis of BPA-G were higher than BPA conjugation, even at an early stage of pregnancy. This capacity of gonads to hydrolyse this metabolite could have important consequence on fetal exposure to BPA by a reactivation of BPA-G into bioactive form in target tissues. For the placenta, the results tended to show a certain balance between BPA conjugation and BPA-G hydrolysis activities. Nevertheless, conjugation activity appeared slightly higher than hydrolysis one at an early stage of pregnancy, but not at a level as high as that described by Collier et al. (2002) reporting that in human placenta β -glucuronidase activity has been observed in the first trimester placenta but at a rate about 10000-fold lower than UGT activity [34].

In conclusion, ovine fetus presented poor capacity to metabolize BPA into BPA-G at an early stage of pregnancy, but it seemed to be able to form sulfoconjugates. At a late stage of pregnancy, although its conjugation capacities remain slightly lower than adults, the fetus efficient to eliminate BPA. Nevertheless, while it was able to conjugate BPA at the hepatic level, it also expressed hydrolysis activities in gonads leading potentially to a local exposure to bioactive BPA. As expected, the precocious stage of development represents a critical window of exposure for fetus which presents limited capacity of conjugation and so limited capacity to detoxification. At a late stage, hepatic conjugation activities are efficient and lead to formation mainly of glucuronoconjugates which are eliminated in amniotic fluid by fetal urinary way. High levels of BPA metabolites in fet-

placental unit have been already described [4, 17], and taking into account the hydrolysis capacity of fetal gonads showed in this study, the functional consequence of fetal overexposure to inactive conjugated forms have to be considered in risk assessment for human health related to fetal BPA exposure.

Acknowledgment

The authors thank the staff of the sheep experimental unit of Toxalim for animal care.

References

1. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1055-1070.
2. Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM. The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 55-60.
3. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 926-933.
4. Corbel T, Gayrard V, Viguié C, Puel S, Lacroix MZ, Toutain PL, Picard-Hagen N. Bisphenol a disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol Reprod* 2013; 89: 11.
5. Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM, Jr. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 2000; 54: 3-18.
6. Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SC, Fennell TR. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 168: 225-234.
7. Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno Y. Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2002; 68: 32-42.
8. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1281-1287.
9. Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, Faure R, Cravedi JP. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 309-319.

10. Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 1999; 340 (Pt 2): 405-409.
11. Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 2000; 74: 99-105.
12. Elsbey R, Maggs JL, Ashby J, Park BK. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 103-113.
13. Pritchett JJ, Kuester RK, Sipes IG. Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 1180-1185.
14. Mazur CS, Kenneke JF, Hess-Wilson JK, Lipscomb JC. Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 2232-2238.
15. Kurebayashi H, Okudaira K, Ohno Y. Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett* 2010; 198: 210-215.
16. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 149-157.
17. Patterson TA, Twaddle NC, Roegge CS, Callicott RJ, Fisher JW, Doerge DR. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 267: 41-48.
18. Meffin PJ, Zilm DM, Veenendaal JR. Reduced clofibric acid clearance in renal dysfunction is due to a futile cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 227: 732-738.
19. Zalko D, Prouillac C, Riu A, Perdu E, Dolo L, Jouanin I, Canlet C, Debrauwer L, Cravedi JP. Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions. *Chemosphere* 2006; 64: 318-327.

20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
21. Lacroix MZ, Puel S, Collet SH, Corbel T, Picard-Hagen N, Toutain P, Viguié C, Gayrard V. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 2011; 85: 2053-2059.
22. Cubitt HE, Houston JB, Galetin A. Prediction of human drug clearance by multiple metabolic pathways: integration of hepatic and intestinal microsomal and cytosolic data. *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 864-873.
23. Bazer FW, Spencer TE, Thatcher WW. Growth and development of the ovine conceptus. *J Anim Sci* 2012; 90: 159-170.
24. Boxenbaum H. Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *J Pharmacokinet Biopharm* 1980; 8: 165-176.
25. Austin RP, Barton P, Cockcroft SL, Wenlock MC, Riley RJ. The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 1497-1503.
26. Bursztyka J, Perdu E, Pettersson K, Pongratz I, Fernandez-Cabrera M, Olea N, Debrauwer L, Zalko D, Cravedi JP. Biotransformation of genistein and bisphenol A in cell lines used for screening endocrine disruptors. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 1595-1604.
27. Viguié C, Collet SH, Gayrard V, Picard-Hagen N, Puel S, Roques BB, Toutain PL, Lacroix MZ. Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 2013; 154: 521-528.
28. Pretheeban M, Hammond G, Bandiera S, Riggs W, Rurak D. Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2011; 159: 159-166.

-
29. Coughtrie MW, Burchell B, Leakey JE, Hume R. The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 729-735.
 30. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther* 1999; 84: 429-445.
 31. Csanady GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 2002; 76: 299-305.
 32. Pacifici GM. Sulfation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev* 2005; 81: 573-581.
 33. Stanley EL, Hume R, Coughtrie MW. Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 240: 32-42.
 34. Collier AC, Tingle MD, Paxton JW, Mitchell MD, Keelan JA. Metabolizing enzyme localization and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption. *Hum Reprod* 2002; 17: 2564-2572.

Figures Legends

Figure 1. BPA-G formation rate ($\text{pmol.mg micr prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$) as a function of BPA concentrations by liver microsomes from ovine fetus at 55- and 120-days of pregnancy and from adult ewes and humans. Open symbols indicate mean ($\pm\text{SD}$) values ($\diamond$, 55 days-old fetus (6 pools of 3 livers); $\square$, 120 days-old fetus (3 males and 3 females); Δ , 3 human pools; $\circ$, 3 adult ewes) and black lines indicate fitted values of BPA-G formation.

Figure 2. BPA-S formation rate ($\text{pmol.mg cyt prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$) as a function of BPA concentrations by liver microsomes from ovine fetus at 55- and 120-days of pregnancy and from adult ewes and humans. Open symbols indicate mean ($\pm\text{SD}$) values ($\diamond$, 55 days-old fetus (6 pools of 3 livers); $\square$, 120 days-old fetus (3 males and 3 females); Δ , 3 human pools; $\circ$, 3 adult ewes) and black lines indicate fitted values of BPA-S formation.

Figure 3. BPA conjugation and BPA-G hydrolysis percentages in placenta, fetal and adult gonads incubated during 8-hours ex vivo. White bars represent the mean ($\pm\text{SD}$) percentage of BPA conjugation after incubation of tissues 8 hours at 37°C under shaking with O_2/CO_2 95%/5% with 0.1 nmole of $[\text{}^3\text{H}]\text{-BPA}$ in DMEM. Black bars represent the mean ($\pm\text{SD}$) percentage of BPA-G hydrolysis after tissues incubation with 0.1 nmole of $[\text{}^3\text{H}]\text{-BPA-G}$ in NaCl 0.9%.

Tables

Table 1. Mean ($\pm$ SD) Michaelis-Menten parameter ($V_{\max}$ and K_m) and hepatic intrinsic clearance (Cl_{int}) for glucuronidation reaction from fetal and adult ovine liver and from human liver.

		$V_{\max}$ <i>pmol.mg micr prot⁻¹.min⁻¹</i>	K_m μM	Cl_{int} <i>mL/kg.min</i>
55 days-old^a	Female (n=3) ^b	15.3	4.71	5.08
	Male (n=3) ^b	8.50	3.41	2.95
120 days-old	Female (n=3)	519 $\pm$ 258	10.8 $\pm$ 5.94	34.0 $\pm$ 25.9
	Male (n=3)	446 $\pm$ 316	8.38 $\pm$ 7.05	43.0 $\pm$ 27.0
Adult ewes (n=3)		6086 $\pm$ 862	82.0 $\pm$ 18.1	54.3 $\pm$ 11.8
Adult human pools (n=3)		2770 $\pm$ 250	59.6 $\pm$ 15.6	164 $\pm$ 45.1

^a At 55 days of pregnancy, several concentrations of BPA-G were below the LOQ (25 nM), so data were computed together for each sex, not individually for each pool.

^b 3 pools of three females or males.

Table 2. Mean ($\pm$ SD) Michaelis-Menten parameter ($V_{\max}$ and K_m) and hepatic intrinsic clearance (Cl_{int}) for sulfation reaction from fetal and adult ovine liver and from human liver.

		$V_{\max}$ <i>pmol.mg micr prot⁻¹.min⁻¹</i>	K_m <i>μM</i>	Cl_{int} <i>mL/kg.min</i>
55 days-old	Female (n=3) ^a	79.2 $\pm$ 5.74	12.3 $\pm$ 0.84	18.6 $\pm$ 1.36
	Male (n=3) ^a	77.3 $\pm$ 18.3	19.0 $\pm$ 11.4	13.5 $\pm$ 5.05
120 days-old	Female (n=3)	116 $\pm$ 27	7.96 $\pm$ 0.44	14.5 $\pm$ 8.15
	Male (n=3)	93.0 $\pm$ 24.0	7.05 $\pm$ 2.16	15.7 $\pm$ 1.55
Adult ewes (n=3)		525 $\pm$ 108	457 $\pm$ 267	1.22 $\pm$ 0.54
Adult human pools (n=3)		7.03 $\pm$ 4.37	40.2 $\pm$ 6.16	0.39 $\pm$ 0.30

^a 3 pools of three females or males.

Figures

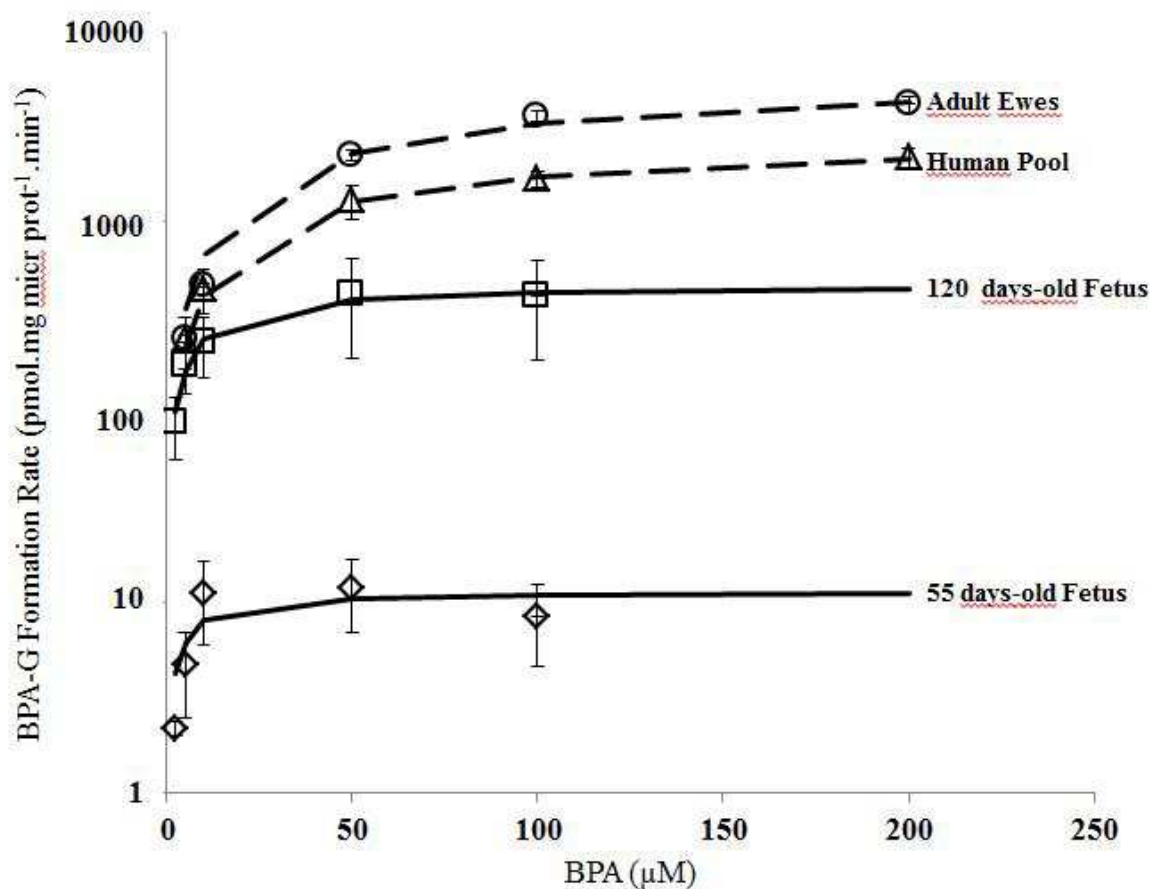


Figure 1. BPA-G formation rate ($\text{pmol.mg micr prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$) as a function of BPA concentrations by liver microsomes from ovine fetus at 55- and 120-days of pregnancy and from adult ewes and humans. Open symbols indicate mean ($\pm$ SD) values ($\diamond$, 55 days-old fetus (6 pools of 3 livers); $\square$, 120 days-old fetus (3 males and 3 females); Δ , 3 human pools; $\circ$, 3 adult ewes) and black lines indicate fitted values of BPA-G formation.

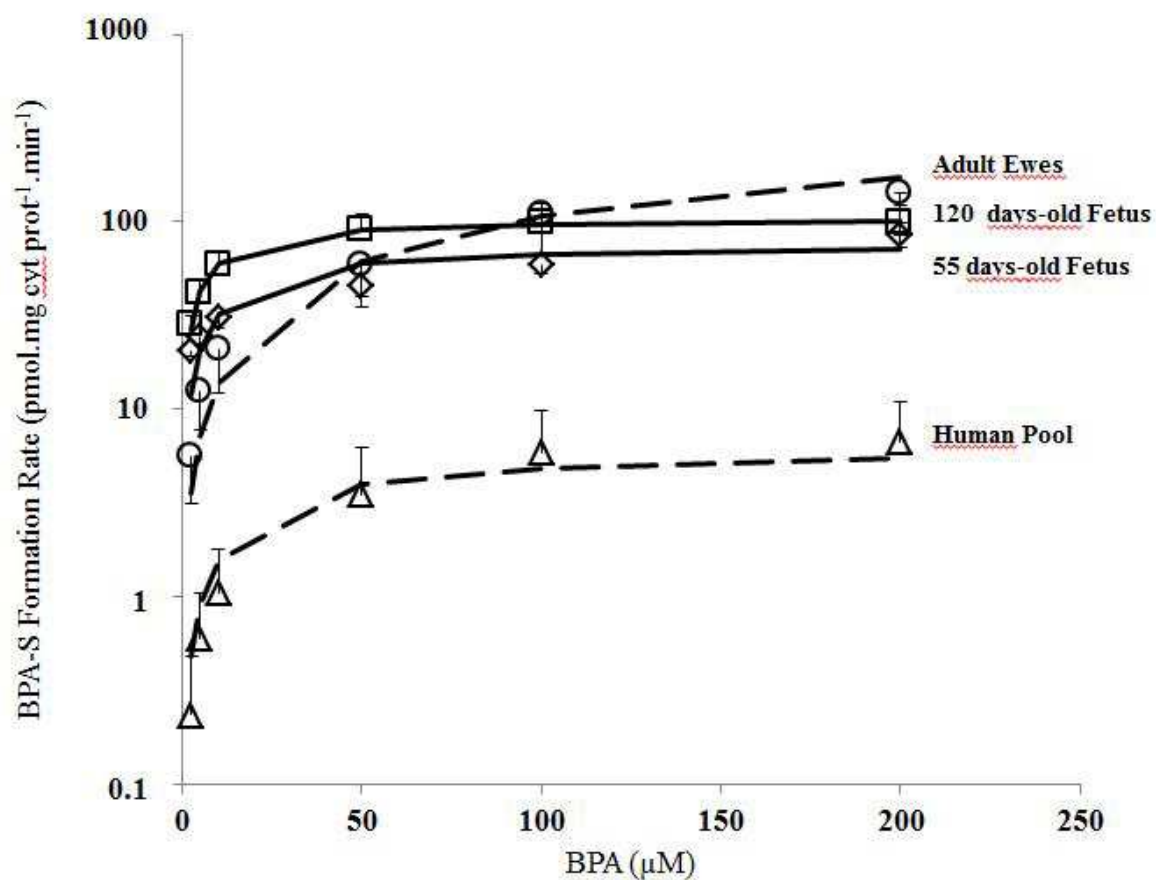


Figure 2. BPA-S formation rate ($\text{pmol.mg cyt prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$) as a function of BPA concentrations by liver microsomes from ovine fetus at 55- and 120-days of pregnancy and from adult ewes and humans. Open symbols indicate mean ($\pm$ SD) values ($\diamond$, 55 days-old fetus (6 pools of 3 livers); $\square$, 120 days-old fetus (3 males and 3 females); Δ , 3 human pools; $\circ$, 3 adult ewes) and black lines indicate fitted values of BPA-S formation.

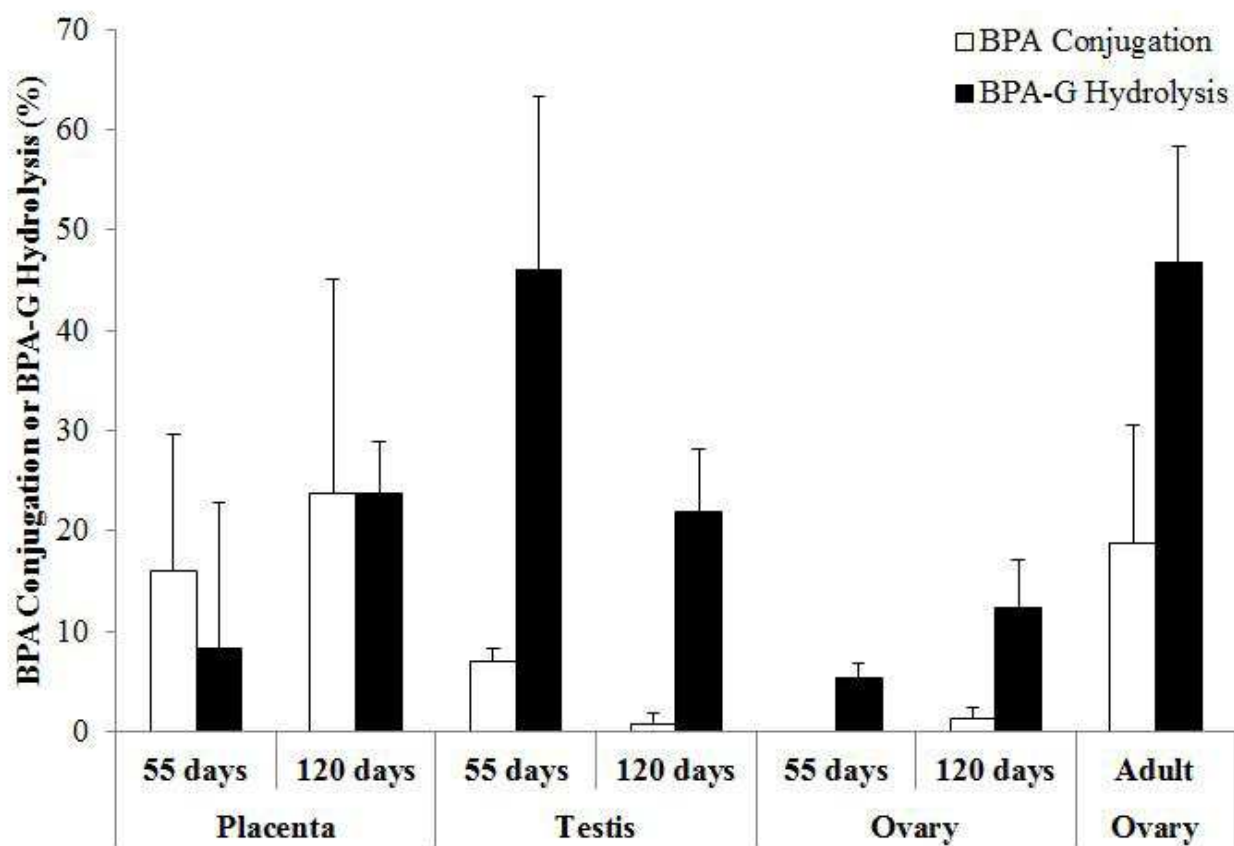


Figure 3. BPA conjugation and BPA-G hydrolysis percentages in placenta, fetal and adult gonads incubated during 8-hours ex vivo. White bars represent the mean ($\pm$ SD) percentage of BPA conjugation after incubation of tissues 8 hours at 37°C under shaking with O₂/CO₂ 95%/5% with 0.1 nmole of [³H]-BPA in DMEM. Black bars represent the mean ($\pm$ SD) percentage of BPA-G hydrolysis after tissues incubation with 0.1 nmole of [³H]-BPA-G in NaCl 0.9%.

IV3. Etude complémentaire 2 : Hydrolyse du BPA-G par le testicule ovin par une approche *in vivo* de cathétérisation de la veine testiculaire.

IV31. Introduction et objectifs

Ex vivo, il a été montré que la balance conjugaison-déconjugaison du testicule fœtal ovin est nettement en faveur de l'hydrolyse du BPA-G avec un pourcentage de déconjugaison à un stade précoce et tardif de gestation respectivement de $46 \pm 17\%$ et $22 \pm 6\%$, contre $7 \pm 1.3\%$ et $0.7 \pm 1.2\%$ pour la conjugaison du BPA.

Néanmoins, ces données ont été obtenues après une incubation des tissus pendant 8 heures dans un système statique qui ne prend pas en compte les phénomènes de distribution ou d'élimination du compartiment testiculaire. L'objectif de cette étude est donc de vérifier la capacité du testicule ovin à hydrolyser le BPA-G *in vivo*. Ainsi, du BPA-G a été administré sous forme de perfusion i.v. directement dans la veine jugulaire gauche d'un agneau et des prélèvements sanguins ont été effectués dans la veine jugulaire droite et la veine testiculaire afin de comparer les concentrations de BPA-G dans la circulation générale et directement en sortie du testicule et d'évaluer ainsi une hydrolyse du conjugué localement au niveau de la gonade. Juste avant la fin de la perfusion, un prélèvement de sang a été effectué au niveau de l'artère testiculaire afin d'évaluer le taux d'entrée de BPA-G au niveau du testicule.

Afin de permettre les prélèvements sanguins au niveau de la veine testiculaire, une procédure chirurgicale a été développée pour placer un cathéter dans la veine testiculaire.

IV32. Méthodologie expérimentale

Procédure chirurgicale

Cet essai a été réalisé sur un agneau de 5 mois d'environ 40 kg.

Sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane 1-1.5%), la peau du pédoncule gauche du scrotum a été incisée sur environ 6-8 cm. La tunique vaginale viscérale a ensuite été ouverte permettant d'identifier le canal déférent et les vaisseaux testiculaires. Des ligatures ont été placées en amont et en aval du plexus vasculaire testiculaire. Une des veines situées superficiellement a été cathétérisée en utilisant la

méthode de l'aiguille recourbée (aiguille verte 21G) qui permet de soulever la paroi du vaisseau facilitant l'introduction du cathéter. Un cathéter en polyuréthane a été ainsi introduit sur une dizaine de centimètres puis maintenu en position avec un point de colle chirurgicale au niveau du point d'entrée, recouvert par un carré de compresse hémostatique. Le muscle crémaster a été sectionné transversalement pour éviter une remontée des testicules et la peau du scrotum a été refermée avec un surjet simple. Le cathéter a ensuite été tunnelisé en direction dorsale sur le flanc sur environ 6-8 cm et la peau a été suturée. A l'extrémité du cathéter, un prolongateur de 50 cm a été relié au cathéter grâce à un raccord biconique, pour permettre les prélèvements de sang testiculaire.

Administration

Le BPA-G a été administré sous forme de perfusion intraveineuse durant 8 heures à la dose de 500 µg/(kg.j). Du fait de la demi-vie d'élimination plasmatique relativement longue du BPA-G (4 hr, cf II2) et afin d'atteindre l'état d'équilibre rapidement, une dose de charge (10.42 µg/kg) a été administrée par voie intraveineuse juste au début de la perfusion. La dose de charge a été déterminée selon l'équation suivante :

$$Dose\ de\ charge = \frac{Taux\ de\ perfusion}{K_0} \quad \text{Équation 5}$$

avec K_0 égal à 2 hr⁻¹ (déterminé en analysant le décours temporel des concentrations plasmatiques en BPA-G après une perfusion i.v. de BPA-G à la dose de 1 mg/(kg.j) chez une brebis avec une approche compartimentale avec le logiciel WinNonlin ® (Pharsight Corporation, USA)).

Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins (1 mL) ont été réalisés avant le lancement de la perfusion puis toutes les 15 min après le début de la perfusion dans la veine testiculaire (cathéter) et la veine jugulaire droite (ponction) pendant les 2 premières heures puis toutes les heures pendant 6 heures. Après chaque prélèvement sanguin *via* le cathéter, ce dernier était rincé avec du NaCl 0.9% hépariné (100 UI/mL). Un prélèvement de sang dans l'artère testiculaire a été effectué juste avant l'arrêt de la perfusion par ponction directe de l'artère sous l'albuginée.

Les prélèvements sanguins ont été placés immédiatement dans la glace puis centrifugés 10 minutes à 3000 *g* et à 4°C et conservés à -20°C.

Dosage de BPA/BPA-G

Les concentrations en BPA et BPA-G ont été déterminées par UPLC-MS/MS après extraction à l'acétonitrile avec une gamme de concentrations de BPA et de BPA-G allant respectivement de 1 à 500 ng/mL et 10 à 5000 ng/mL.

IV33. Résultats

La Figure 17 représente les concentrations plasmatiques en BPA-G en ng/mL dans la veine jugulaire et dans la veine testiculaire au cours de la perfusion :

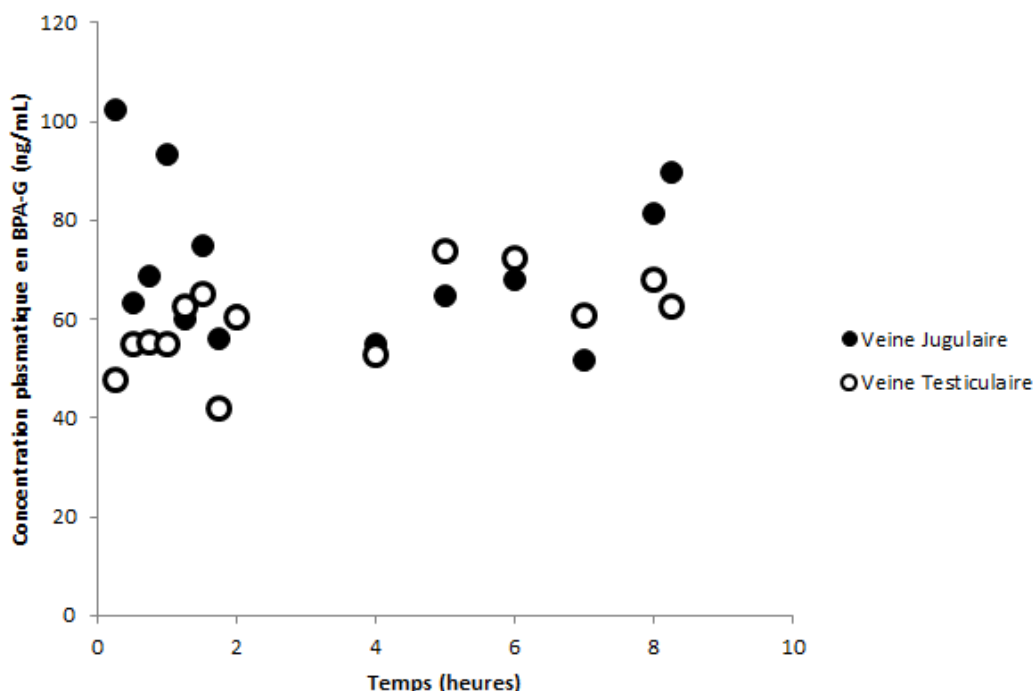


Figure 17. Concentrations plasmatiques de BPA-G (ng/mL) dans la veine jugulaire et la veine testiculaire au cours de la perfusion de BPA-G

Hormis le premier prélèvement jugulaire présentant une concentration élevée en BPA-G (102.33 ng/mL à t15 min), les concentrations en BPA-G semblent relativement stables et du même ordre de grandeur dans la veine jugulaire et testiculaire au cours de la perfusion. Les concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) de BPA-G entre 30 minutes et 8 heures de perfusion sont de 68 ± 13 et 60 ± 9 ng/mL respectivement dans la veine jugulaire et la veine testiculaire. Aucun échantillon plasmatique n'a présenté de

niveau détectable de BPA. Ainsi, aucune hydrolyse du BPA n'a pu être mise en évidence *in vivo* dans le testicule ovin, contrairement à ce qui a été observé *ex vivo* sur le testicule ovin fœtal.

Cette divergence pourrait être liée aux conditions *ex vivo* (contact des tissus pendant 8 heures à 37°C sous O₂/CO₂ 95%/5% avec du BPA ou du BPA-G) qui pourraient favoriser l'hydrolyse du BPA-G. Pour compléter cette étude, nous pourrions évaluer l'évolution temporelle des activités de conjugaison du BPA et d'hydrolyse du BPA-G au cours de l'incubation (8 heures) pour déterminer si l'hydrolyse du BPA-G observée est constante au cours du temps ou si elle se produit rapidement dès le début de l'incubation. Néanmoins, sur des essais préliminaires avec des temps d'incubation des tissus de 6 et 8 heures, le taux d'hydrolyse du BPA-G semblait proportionnel au temps d'incubation sur cet intervalle.

Une autre hypothèse pour expliquer la divergence entre nos données *ex vivo* et *in vivo* serait que l'hydrolyse soit une activité enzymatique qui prédomine dans les testicules fœtaux et ne soit plus observée chez des agneaux âgés de 5 mois. Dans les conditions *ex vivo*, il n'y a pas de différence entre les taux d'hydrolyse du BPA-G entre les ovaires fœtaux et ceux de brebis adultes. Cela mériterait d'être vérifié pour les testicules.

IV4. Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons mis évidence une ontogénèse des systèmes enzymatiques hépatiques chez le fœtus ovin. Ainsi, ce dernier ne présente qu'une très faible capacité de glucuronidation au début de la gestation, qui augmente au cours de la gestation, et continue à se développer après la naissance. A l'inverse, les activités fœtales hépatiques de sulfoconjugaison n'évoluent pas au cours de la gestation. De plus, le fœtus ovin présente une capacité de sulfoconjugaison supérieure à celle des individus adultes.

Dans les tissus cibles fœtaux, nous avons montré qu'il existait une balance entre les activités de conjugaison du BPA et de déconjugaison du glucurono-conjugué. Cette balance est équilibrée dans le placenta au cours de la gestation, alors qu'elle est en faveur de l'hydrolyse du conjugué dans les gonades fœtales. Une hydrolyse importante, proche de 50%, a ainsi été observée dans les testicules fœtaux après une incubation des tissus 8 heures en présence de BPA-G. Néanmoins, ces résultats n'ont pu être confirmés chez l'agneau mâle dans un modèle dynamique *in vivo*.

Une étude préliminaire a également été menée sur des testicules (n=2) et ovaires (n=2) fœtaux humains âgés de 13 à 15 semaines de grossesse afin d'évaluer leur capacité à hydrolyser le BPA-G. Cet essai a été mené en collaboration avec l'UMR Inserm U967 « Cellules Souches et Radiations », CEA, Fontenay aux Roses. Les résultats ne sont cependant pas exploitables du fait de problème méthodologique (contamination en BPA des milieux d'incubation, activité d'hydrolyse similaire dans le tampon acétate de sodium (témoin positif) et le tampon NaCl 0.9%). Dans ces conditions, les gonades fœtales humaines présentent une capacité limitée de déconjugaison du BPA-G avec un taux d'hydrolyse inférieur à 10%. Cette faible capacité pourrait être liée à une survie insuffisante des gonades du fait de la procédure médicale d'interruption volontaire de grossesse. Ces résultats mériteront d'être confirmés sur un effectif plus important et avec des conditions expérimentales contrôlées.

Ainsi, au travers de cette étude, il apparaît que le période précoce de la gestation semble être une fenêtre critique d'exposition au BPA. En effet, le fœtus présente des capacités de métabolisation du BPA relativement limitées. Cette période est d'autant plus critique qu'une perturbation de l'environnement hormonal à ce stade pourrait avoir des conséquences néfastes sur le développement de certains organes et sur la régulation des fonctions endocrines. En fin de gestation, le fœtus ovin présente des capacités de métabolisation efficace lui permettant d'éliminer les toxiques. Néanmoins, le transfert limité du BPA-G du compartiment fœtal vers le compartiment maternel conduit à un piégeage du BPA-G dans l'unité fœto-placentaire.

L'hydrolyse des composés glucurono-conjugués mise en évidence au sein de certains tissus cibles pose la question du risque des niveaux élevés de métabolites détectés dans le compartiment fœtal. En effet, bien qu'inactifs en terme d'œstrogénicité, leur réactivation dans ces tissus pourrait conduire à une exposition locale au BPA aglycone actif.

DISCUSSION GENERALE

&

PERSPECTIVES

Discussion générale et Perspectives

En raison de l'exposition ubiquitaire de la population humaine, le BPA est un des PE les plus étudiés depuis ces dernières années. Une des principales sources d'inquiétude est le risque d'une exposition humaine au BPA périnatale et les conséquences que cela peut avoir sur les fonctions endocrines et le métabolisme. Une partie de la controverse actuelle concernant l'évaluation réglementaire du BPA est liée à la difficulté d'extrapoler les données expérimentales obtenus sur des modèles animaux à l'homme en raison des données limitées concernant l'exposition fœtale au BPA associée aux expositions maternelles. Pour répondre à cette problématique, il est nécessaire de caractériser l'exposition fœtale au BPA et les mécanismes impliqués dans cette exposition.

Ainsi, dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'exposition interne maternelle et fœtale au BPA et à ses métabolites sur le modèle physiologique de la brebis gravide. Nous avons ainsi montré que la gestation chez la brebis ne modifie pas la PK du BPA, ni celle du BPA-G, principal métabolite du BPA. En fin de gestation, 5% de la dose de BPA administrée à la brebis gravide est transféré au fœtus. En prenant en compte le rapport de poids entre la brebis (60 kg) et son fœtus (2.5 kg), cela signifie que le fœtus ovin est exposé à une dose de BPA similaire à la dose administrée à sa mère (Figure 18). Dans notre modèle ovin, les concentrations plasmatiques maternelle et fœtale après une administration maternelle de BPA sont du même ordre de grandeur que les concentrations plasmatiques les plus élevées décrites chez la femme enceinte et dans le sang de cordon [78, 81]. L'administration de BPA à la dose de 2 mg/(kg.j) chez la brebis en fin de gestation induit une exposition interne fœtale d'environ 6 ng/mL, soit un rapport de 7 entre les concentrations plasmatiques à l'équilibre maternelles et fœtales (Figure 18). En outre, la concentration en albumine étant plus faible chez le fœtus ovin, pour une concentration de BPA total donnée, le fœtus est plus exposé au BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) que sa mère. A l'équilibre, le rapport materno-fœtal des concentrations plasmatiques de BPA libre qui en résulte est de 4.

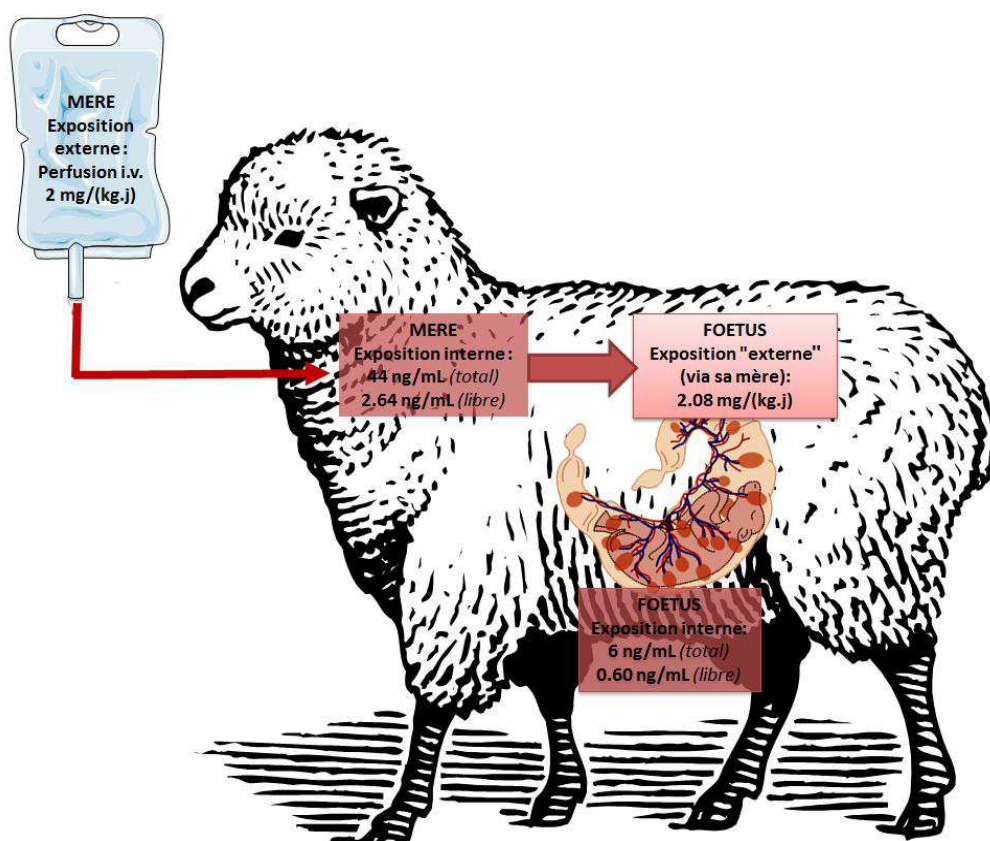


Figure 18. Exposition interne maternelle et fœtale suite à une administration maternelle de BPA à la dose de 2 mg/(kg.j) (perfusion i.v. pendant 24 heures).

L'administration maternelle de BPA à la dose de 2 mg/(kg.j) chez la brebis gravide induit une exposition interne fœtale au BPA de 6 ng/mL, soit 7 fois inférieure à l'exposition interne maternelle.

La clairance du BPA a été évaluée à 2700 mL/min chez la brebis (gravide ou non). Cette clairance est proche de la clairance estimée chez l'homme par des approches allométriques [47, 151]. Chez le fœtus ovin, la clairance du BPA a été évaluée à 515 mL/min. En tenant compte des poids respectifs de la brebis et de son fœtus, le fœtus ovin présente une clairance du BPA 5 fois plus élevée que la clairance maternelle (250 vs 50 mL/(kg.min)). Grâce au modèle bicompartimental ouvert décrit par Szeto *et al.* [148] (cf §II2 Article 2 – Supplemental Material), nous avons montré que la clairance totale fœtale du BPA s'expliquait à plus de 90% par des processus placentaires (Figure 19).

La part non-placentaire de la clairance totale fœtale serait liée quant à elle au métabolisme hépatique, notamment la conjugaison du BPA en BPA-G et BPA-S. A l'inverse chez la mère, la clairance placentaire du BPA ne représente que 2% de la clairance totale, signifiant que chez la brebis, le placenta ne participerait que très peu à l'élimination du BPA.

Le rapport entre les concentrations plasmatiques à l'équilibre fœtales et maternelles est respectivement de 0.13 et 3.5 pour le BPA et de BPA-G. L'administration de BPA à une brebis en fin de gestation n'entraîne pas de surexposition plasmatique du fœtus au BPA aglycone, mais une surexposition à son glucuronoconjugué. Du fait des échanges limités en BPA-G entre le compartiment fœtal et maternel (Figure 20), le BPA-G reste piégé dans le compartiment fœtal. Il est éliminé par les reins fœtaux dans le liquide allantoïdien ou le liquide amniotique d'où il peut être réingurgité par le fœtus. Le transfert limité du BPA-G dans le sens materno-fœtal, indétectable dans le modèle ovin, suggère que les métabolites du BPA détectés dans le compartiment fœtal sont d'origine foeto-placentaire.

Ainsi, cette première partie a permis de mettre en évidence que le transfert placentaire et le métabolisme de l'unité foeto-placentaire représentent les déterminants majeurs de l'exposition fœtale au BPA.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons montré à travers le modèle de cotelédon humain perfusé que le BPA franchit rapidement la barrière placentaire par diffusion passive aussi bien dans le sens materno-fœtal que dans le sens fœto-maternel. Ce mécanisme de transfert du BPA ne conduit pas à une surexposition du fœtus par rapport à sa mère, le rapport entre l'exposition interne fœtale et maternelle au BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) est de 1. A l'inverse le transfert placentaire du BPA-G est limité, en particulier dans le sens materno-fœtal. La nature hydrophile du métabolite limite sans doute son transfert placentaire. Le transfert du BPA-G dans le sens foeto-maternel suggère la participation de transporteurs spécifiques prenant en charge les glucuronoconjugués, tels que les MRP et BCRP qui interviennent dans le transport des composés glucuronides, notamment des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes [114, 152]. A l'instar des résultats obtenus *in vivo* sur le modèle ovin, la faible clairance transplacentaire materno-fœtale du BPA-G dans ce modèle de placenta humain suggère que les métabolites détectés dans le compartiment fœtal proviennent du métabolisme foeto-placentaire du BPA et peu de la circulation maternelle [90, 91].

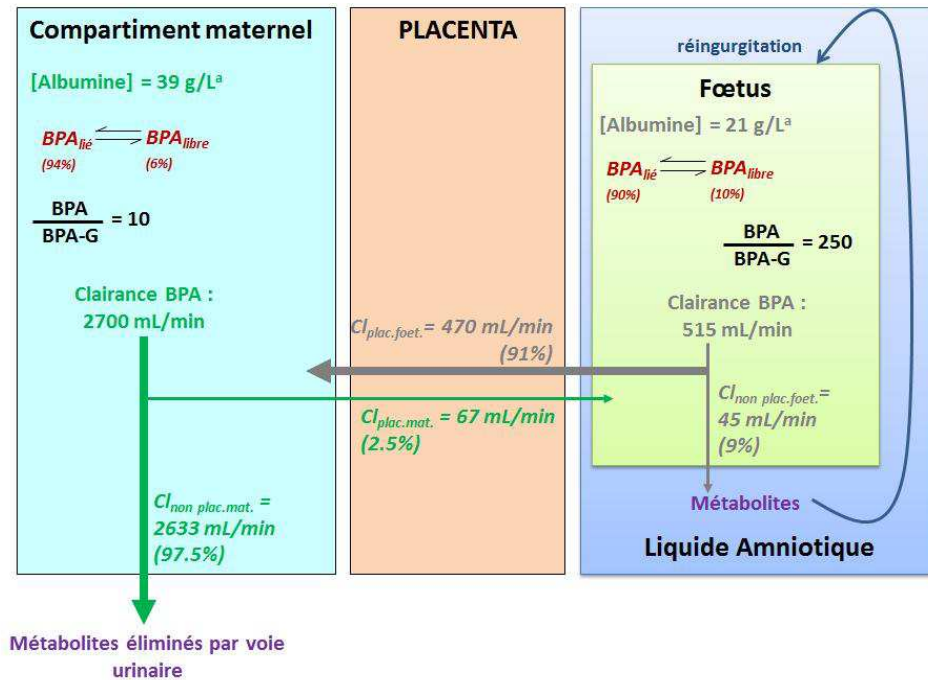


Figure 19. Echanges materno-fœtaux du BPA dans le modèle ovin à 4 mois de gestation.

Les paramètres PK du BPA ont été obtenus après une perfusion de BPA i.v. pendant 24 heures, soit à la dose de 2 mg/(kg.j) à des brebis à 4 mois de gestation, soit à la dose de 5 mg/(kg.j) au fœtus.

^a Concentrations plasmatiques maternelle et fœtale en albumine en fin de gestation [153].

Cl_{plac.foet.} : clairance placentaire fœtale ; Cl_{plac.mat.} : clairance placentaire maternelle ; Cl_{non plac.foet.} : clairance non-placentaire fœtale ; Cl_{non plac.mat.} : clairance non-placentaire maternelle

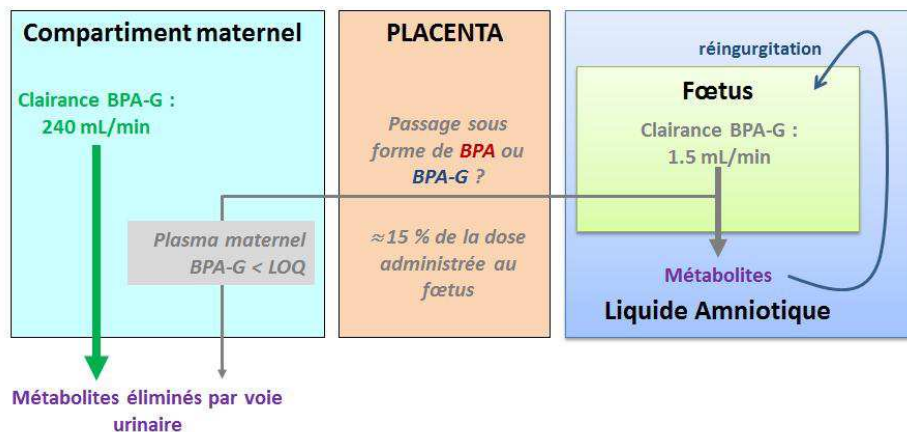


Figure 20. Echanges materno-fœtaux du BPA-G dans le modèle ovin à 4 mois de gestation.

Aucun transfert materno-fœtal de BPA-G n'a été mis en évidence quand on mesure le BPA et BPA-G dans le plasma après une perfusion i.v. pendant 24 heures de BPA-G à des brebis à 4 mois de gestation à la dose de 3.54 mg/(kg.j). Le transfert du BPA-G depuis le compartiment fœtal vers le compartiment maternel a été mis en évidence par la détection de BPA-G dans les urines de brebis gravides après une administration intra-amniotique de 50 mg de BPA-G. (LOQ_{BPA-G} = 50 ng/mL).

A partir du modèle de cotylédon humain perfusé, nous avons déterminé les clairances placentaires à partir des taux d'extraction évalués *ex vivo* et des débits sanguins placentaires maternel et fœtal. L'ensemble des facteurs physiologiques qui déterminent le passage transplacentaire du BPA et l'exposition interne au BPA des compartiments maternel et fœtal chez l'homme ont été comparés à nos données obtenues *in vivo* sur le modèle ovin (Tableau 14).

Chez la brebis et la femme, la part de la clairance placentaire maternelle dans la clairance totale du BPA est du même ordre de grandeur. Chez le fœtus humain, cette part ne peut pas être estimée puisque la clairance totale fœtale du BPA n'est pas connue. Chez le fœtus ovin, la clairance totale s'explique à 91% par des processus placentaires et le coefficient d'extraction placentaire est égal à 0.85. Chez le fœtus humain, ce coefficient d'extraction placentaire n'est que de 0.36, signifiant que 36% du BPA présent dans le sang fœtal est épuré au niveau du placenta. Le transfert placentaire du BPA semble donc plus faible chez le fœtus humain comparativement au fœtus ovin. Cela pourrait s'expliquer en partie par des concentrations plasmatiques en albumine 2 fois plus élevées chez le fœtus humain par rapport au fœtus ovin limitant la concentration de BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques).

Le rapport fœto-maternel (F:M) des concentrations de BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) chez l'Homme estimé avec l'équation modifiée de Henderson-Hasselbach (équation 9) est de l'ordre de 1 (Tableau 15). Cette valeur a été déterminée en faisant l'hypothèse que la clairance non-placentaire fœtale (Cl_F) est négligeable devant la clairance placentaire fœto-maternelle (Cl_{FM}). Cette hypothèse a été vérifiée *in vivo* chez le fœtus ovin, où Cl_F ne représente que 9% de la clairance fœtale totale, mais mériterait d'être vérifiée chez l'homme.

		Brebis		Femme		
		Littérature	<i>in vivo</i>	Littérature	<i>ex vivo</i>	estimé
MERE	Débit utérin (mL/min)	1000 ^[99]		600 ^[116]		
	Clairance totale BPA (mL/min)		2700	2400 ^[47, 151]		
	Clairance placentaire BPA (mL/min) [% de la clairance totale]		67 [2.5%]		74 [3%]	
	Extraction placentaire ^a		0.067		0.12	
	Albumine (g/L)	39 ^[153]		32 ^[154]		
	Fraction libre BPA (%)		6.2			6.7 ^c
FOETUS	Débit ombilical (mL/min)	550 ^[115]		312 ^[116]		
	Clairance totale BPA (mL/min)		515	NR ^b		
	Clairance placentaire BPA (mL/min) [% de la clairance totale]		470 [91%]		113 [NA]	
	Extraction placentaire ^a		0.85		0.36	
	Albumine (g/L)	21 ^[153]		40 ^[154]		
	Fraction libre BPA (%)		10.1			5.7 ^c

Tableau 14. Comparaison des clairances placentaires maternelle et fœtale du BPA chez la brebis et la femme.

Ce tableau reprend les données de la littérature pour les paramètres physiologiques (premières colonnes brebis et femme) nécessaires pour la détermination des clairances placentaires et les données obtenues sur nos modèles *in vivo* ovin et *ex vivo* humain (deuxièmes colonnes brebis et femme) et les données estimées (équations 6 à 8).

^a Calculé comme le rapport de la clairance placentaire sur le débit sanguin placentaire :

^b NR : non renseigné, la clairance fœtale du BPA n'a jamais été déterminée chez l'homme. NA : non applicable

^c déterminée selon les équations de Hill et Abramson [155] :

$$Fraction\ libre\ (\%) = 100 - \frac{100 \times \left(\frac{B}{F}\right)}{\left(\frac{B}{F}\right) + 1} \quad \text{Équation 6}$$

$$\left(\frac{B}{F}\right)_{maternel} = \left(\frac{B}{F}\right)_{adulte} \times \frac{[Albumine]_{maternel}}{[Albumine]_{adulte}} \quad \text{Équation 7}$$

$$\left(\frac{B}{F}\right)_{foetal} = \left(\frac{B}{F}\right)_{maternel} \times \frac{[Albumine]_{foetal}}{[Albumine]_{maternel}} \quad \text{Équation 8}$$

avec un rapport des concentrations en albumine entre le plasma maternel (femmes enceintes) et le plasma adulte (femmes non enceintes) égal à 0.73 et un rapport des concentrations en albumine entre le plasma maternel et le plasma foetal égal à 1.2 [155].

Rapport fœto-maternel (F :M) des concentrations de BPA	Brebis		Femme	
	<i>in vivo</i>	estimé	<i>in vivo</i>	estimé
F :M BPA total (lié+libre)	0.13		0.66 ^[81]	
F :M BPA libre	0.22	0.09^a	0.56 ^b	1.06^a

Tableau 15. Rapport des concentrations fœto-maternel en BPA chez la brebis et la femme.

^a Le rapport fœto-maternel (F :M) des concentrations de BPA libre a été estimé selon l'équation modifiée de Henderson-Hasselbach [150] :

$$F : M = \frac{\% \text{ unbound}_M}{\% \text{ unbound}_F} \times \frac{1 + 10^{pK_a - pH_F}}{1 + 10^{pK_a - pH_M}} \times \frac{Cl_{MF}}{Cl_{FM} + Cl_F} \quad \text{Équation 9}$$

avec % unbound_{M,F} est le pourcentage de BPA libre dans le plasma maternel et fœtal (tableau 14), pK_a est le pK_a du BPA, égal à 10.2 [156], pH_F et pH_M sont respectivement le pH sanguin maternel (7.40) et fœtal (7.35), Cl_{MF} et Cl_{FM} sont respectivement la clairance placentaire materno-fœtale et fœto-maternelle et Cl_F est la clairance fœtale non-placentaire (cf Tableau 14). Cl_F a été considérée comme négligeable par rapport à Cl_{FM}.

^b Le rapport F :M des concentrations de BPA libre a été calculé en multipliant les concentrations plasmatiques moyennes maternelles et fœtales décrites par Schönfelder *et al.* par le pourcentage de BPA libre dans le plasma maternel et fœtal (Tableau 14).

Ce rapport F :M de 1.06 est du même ordre de grandeur que la valeur calculée à partir de l'étude de biosurveillance de Schönfelder *et al* (0.56) [81] rapportant des concentrations moyennes de BPA aglycone respectivement de 4.4 ng/mL et 2.9 ng/mL dans le plasma maternel et le plasma fœtal (correspondant à des concentrations de BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) respectivement de 0.29 ng/mL et 0.17 ng/mL) pour 37 couples mère-enfant [81]. Dans notre modèle ovin, le rapport fœto-maternel des concentrations de BPA libre estimé avec l'équation modifiée de Henderson-Hasselbach est du même ordre de grandeur que le rapport fœto-maternel déterminé *in vivo* (0.22 vs 0.09) (Tableau 15).

Ainsi, nos deux modèles, *in vivo* ovin ou *ex vivo* humain, montrent qu'il n'y a pas de surexposition fœtale au BPA, au moins en fin de gestation. Ainsi, l'exposition interne maximale du fœtus humain au BPA libre, non-lié aux protéines plasmatiques est du même ordre de grandeur que l'exposition interne de sa mère. Pour une exposition interne maternelle similaire, le fœtus humain serait 5 fois plus exposé que le fœtus ovin. Cette différence s'explique par la différence de taux d'extraction placentaire du BPA entre la femme et la brebis : chez la femme, les taux d'extraction placentaires materno-fœtal et fœto-maternel du BPA sont respectivement 2 fois plus élevée et 2.5 fois plus faible comparativement à la brebis (Figure 21). Ces différences d'extraction placentaire

s'expliquent par des différences physiologiques entre les deux espèces : les débits sanguins utérins et ombilicaux et les concentrations en albumine dans le plasma maternel et fœtal (Tableau 14). Par ailleurs, les différences interspécifiques de placentation, hémochoriale chez la femme et syndesmochoriale chez la brebis, pourraient également expliquer les différences de passage placentaire du BPA.

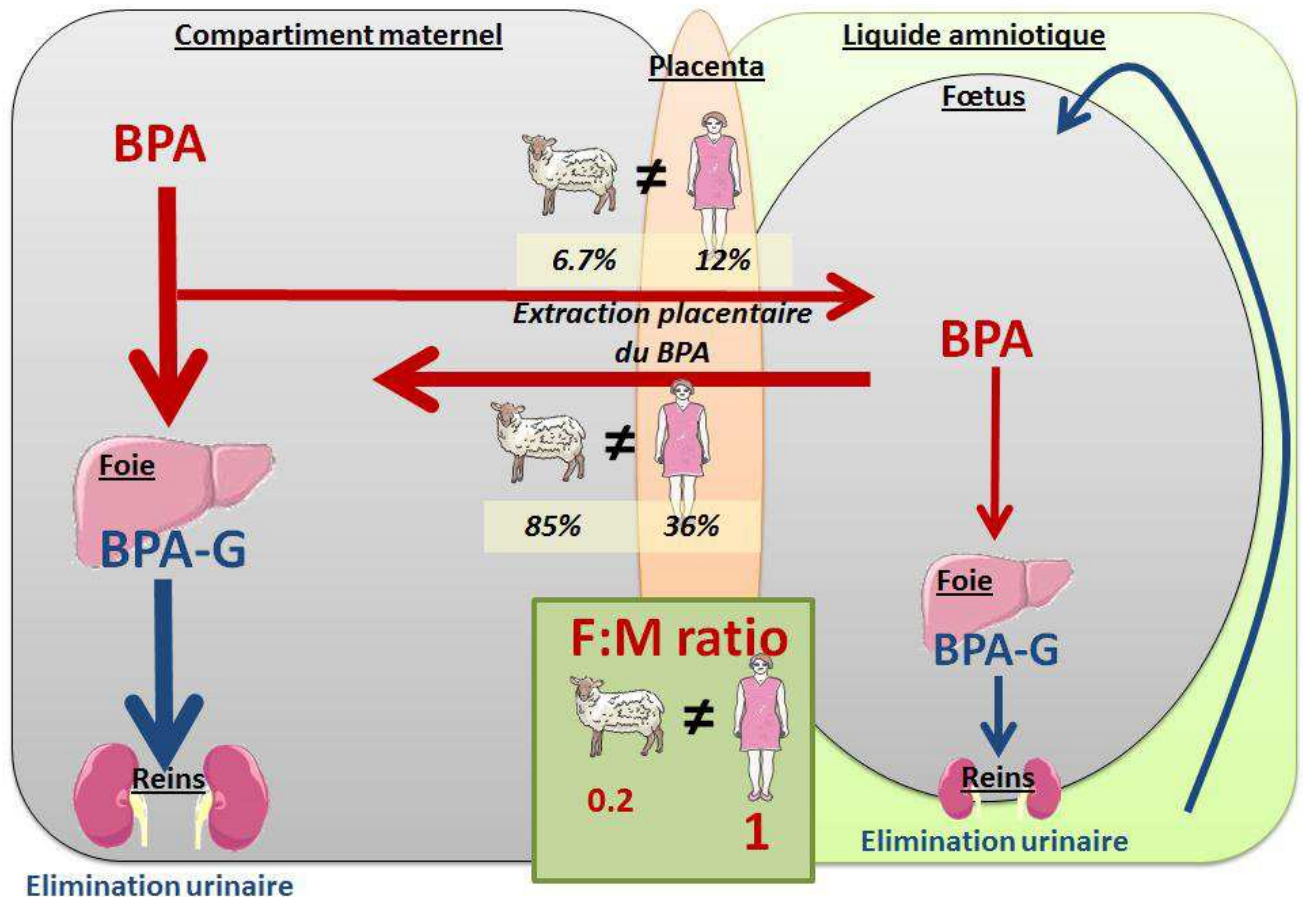


Figure 21. Extraction placentaire materno-fœtale et fœto-maternelle du BPA chez la femme à terme et la brebis en fin de gestation.

L'extraction placentaire materno-fœtale du BPA est 2 fois plus élevée chez la femme comparativement à la brebis alors que l'extraction placentaire fœto-maternelle est 2.5 fois plus faible chez la femme comparativement à la brebis. Ces différences de taux d'extraction placentaires conduisent à un rapport fœto-maternel (F :M) des concentrations de BPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) 5 fois plus élevé chez l'Homme comparativement à l'ovin (1 vs 0.2) pour une même exposition interne maternelle.

L'extraction limitée du BPA-G depuis le compartiment fœtal vers le compartiment maternel observée *ex vivo* sur le modèle de placenta humain perfusé (20%) est cohérente avec le passage placentaire limité du BPA-G observé *in vivo* chez la brebis gravide où seulement 15% de la dose de BPA-G administrée dans le compartiment amniotique a été retrouvée dans les urines maternelles dans les 72 heures suivant l'administration. Ce résultat suggère que le BPA-G peut franchir la barrière placentaire sans pour autant présumer des mécanismes de ce transport. Etant donné la nature hydrophile du conjugué peu compatible avec une diffusion passive, le BPA-G pourrait passer le placenta sous forme de BPA après son hydrolyse par des β -glucuronidases placentaires. Dans ce cas, le BPA-G pourrait d'abord pénétrer le syncytiotrophoblaste par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques tels que les MRP exprimés au niveau de l'endothélium vasculaire fœtal avant d'être hydrolysé pour rejoindre le compartiment maternel. Ainsi, les étapes limitantes du transfert placentaire du BPA-G seraient l'activité β -glucuronidase placentaire et l'expression des transporteurs placentaires. Cette hypothèse pourrait être mise à l'épreuve :

- soit par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MRP (probenecid, cyclosporine [110]) dans notre modèle de placenta humain perfusé, permettant d'évaluer l'implication des MRP dans le transfert du BPA-G
- soit par l'évaluation des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G dans la veine utérine après une administration de BPA-G dans le compartiment fœtal. La détermination de ces concentrations de BPA et/ou BPA-G à la sortie de l'utérus avant leur dilution dans la circulation générale maternelle permettrait de caractériser sous quelle forme le BPA-G rejoint le compartiment plasmatique maternel.

Enfin, dans la troisième partie de notre projet, nous avons caractérisé l'ontogenèse des activités métaboliques hépatiques du BPA chez le fœtus ovin (Figure 22) et la balance conjugaison-déconjugaison du BPA et du BPA-G dans les gonades fœtales et le placenta. Nous avons montré que la période précoce de la gestation pourrait constituer une fenêtre critique d'exposition au BPA en raison des faibles capacités du fœtus ovin à métaboliser le BPA.

Bien qu'à l'heure actuelle, aucune donnée ne soit disponible quant à la capacité du foie fœtal humain à métaboliser ou non le BPA, les résultats obtenus chez le fœtus ovin en termes d'ontogenèse hépatique des réactions de phase II présentent des similarités avec l'ontogenèse des activités hépatiques chez le fœtus humain vis-à-vis de molécules de référence (Figure 22).

Clairance intrinsèque hépatique mL/(kg.min)

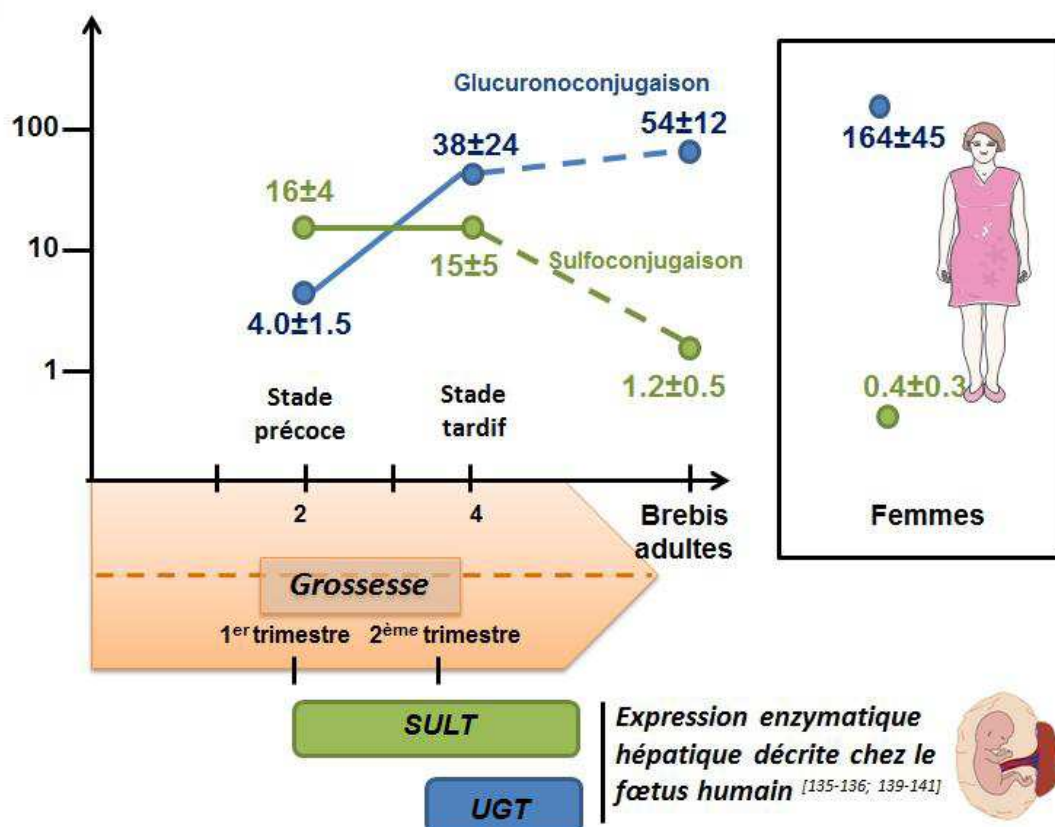


Figure 22. Evolution de la clairance intrinsèque hépatique de glucuroconjugaison et sulfoconjugaison du BPA au cours de la gestation chez le fœtus ovin.

Les activités enzymatiques hépatiques de glucuroconjugaison et sulfoconjugaison ont été déterminées à partir de fractions subcellulaires (microsomes et cytosols) préparées à partir de foie de fœtus ovin à 55 jours et 120 jours de gestation, de foie de brebis adulte et comparées avec celles déterminées à partir de fractions subcellulaires de pools de foies humains.

Le développement précoce des capacités de sulfoconjugaison du BPA représenterait une voie de détoxification modérée du compartiment fœtal à un stade où les activités de glucuronoconjugaison ne sont pas encore fonctionnelles. L'évolution des activités de glucuronoconjugaison du BPA au cours de la gestation et après la naissance chez le fœtus ovin est cohérente avec les données décrites chez le mouton [157] et chez l'homme. Avant 20 semaines de grossesse, aucune activité UGT n'est détectée dans le foie fœtal humain [136], et les activités caractérisées après ce stade restent inférieures à l'activité du foie adulte [135, 158]. Au cours de son développement, le fœtus ovin acquiert donc une capacité à métaboliser efficacement le BPA en métabolites inactifs (en termes d'œstrogénicité). Cependant, l'hydrolyse du BPA-G dans des organes fœtaux sensibles aux interférences hormonales tels que les gonades pourrait conduire à la réactivation du BPA et à une exposition locale au BPA aglycone actif.

L'ensemble de ces travaux ont permis de mettre en évidence les mécanismes majeurs impliqués dans l'exposition fœtale au BPA, *i.e.* le transfert placentaire et le métabolisme fœto-placentaire du BPA. Le passage du BPA dans le sens materno-fœtal entraîne une exposition fœtale au BPA. Toutefois, le métabolisme de l'unité fœto-placentaire pourrait permettre, du moins en fin de gestation, l'élimination du BPA du compartiment fœtal, notamment chez la brebis.

Par ailleurs, le devenir du BPA-G dans le compartiment fœtal constitue également un élément important de l'exposition du fœtus, car il peut potentiellement s'hydrolyser en BPA, et participer indirectement à l'exposition fœtale au BPA actif. Concernant ce dernier point, il reste encore des éléments à apporter pour comprendre et quantifier son implication dans l'exposition fœtale.

Nous avons ainsi montré que le fœtus du moins en fin de gestation n'est pas surexposé au BPA libre comparativement à sa mère. Le fœtus humain serait 5 fois plus exposé que le fœtus ovin. Cette différence s'explique par des différences physiologiques propre à chaque espèce telles que les débits utérins et ombilicaux, la capacité de liaison du BPA à l'albumine et la différence de placentation entre les deux espèces. Néanmoins malgré ces différences physiologiques entre les deux espèces, les principaux mécanismes impliqués dans l'exposition fœtale au BPA sont similaires pour les deux

espèces et le modèle ovin constitue un modèle robuste et pertinent vis-à-vis de l'homme pour déterminer l'exposition fœtale à ce xénobiotique.

La principale limite de nos modèles est qu'ils sont centrés sur la fin de la gestation, ce qui soulève un certain nombre d'interrogations sur l'importance des mécanismes qui contrôlent l'exposition au BPA en début de gestation. Ainsi, le placenta subit des modifications physiologiques pendant la gestation : une diminution de la distance fœto-maternelle, une augmentation de la surface d'échange, une augmentation du débit sanguin utérin. Ces facteurs pourraient entraîner un passage maximal du BPA en fin de grossesse. En ce qui concerne le métabolisme hépatique fœtal, l'ontogénèse que nous avons mis en évidence chez le fœtus ovin est similaire à l'ontogénèse des systèmes enzymatiques de conjugaison décrites dans la littérature pour des molécules de référence chez le fœtus humain. Néanmoins, il serait intéressant d'évaluer la part non-placentaire de la clairance fœtale du BPA chez le fœtus humain sur des fractions subcellulaires de foie fœtal humain après des interruptions de grossesse.

Par ailleurs, la question des niveaux élevés du BPA-G et de son devenir dans le compartiment fœtal nous semble cruciale en termes d'évaluation du risque. Le BPA-G est décrit comme étant non-œstrogénique, mais on ne peut exclure des effets propres de ce dernier sur d'autres fonctions, et notamment sa capacité à interférer avec les systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. De même, la capacité de certains tissus cibles à réactiver le BPA-G en BPA pose la question des conséquences d'une exposition locale au BPA dans des tissus sensibles aux interférences hormonales. Ces éléments seront évalués au laboratoire dans le cadre du projet ModelExpo financé par l'ANR CESA 2013.

En définitive, notre approche intégrative et mécanistique a permis de déterminer et de quantifier les mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition fœtale au BPA. Ces paramètres pourront être intégrés dans un modèle qui prendra en compte les facteurs physiologiques propres à chaque espèce. Ce modèle devrait permettre de prédire l'exposition fœtale au BPA relative à une exposition maternelle environnementale. Bien que certains paramètres restent encore à préciser, nos différentes approches ont apporté des éléments importants pour l'évaluation du risque lié à l'exposition humaine au BPA pendant la phase critique de la grossesse.

Références bibliographiques

Les références bibliographiques des quatre articles présentés dans ce manuscrit apparaissent à la fin de chaque article et ne sont pas incrémentés à la liste ci-dessous.

- [1]. AFSSET. Substances Chimiques. http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/383231914475058007588090344687/13_substances_chimiques.pdf. 2006.
- [2]. E.C, E.E.A, E.C.E.H WHO, O.C.D.E. European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings EUR 17549, Weybridge, United Kingdom, 2-4 December. 1996.
- [3]. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect 1996; 104 Suppl 4: 715-740.
- [4]. IPCS. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva, Switzerland, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. 2002.
- [5]. Crews D, Putz O, Thomas P, Hayes T, Howdeshell K. Wildlife as models for the study of how mixtures, low doses, and the embryonic environment modulate the action of endocrine-disrupting chemicals. Pure and Applied Chemistry 2003; 75: 2305-2320.
- [6]. Cravedi JP, Zalko D, Savouret JF, Menuet A, Jegou B. [The concept of endocrine disruption and human health]. Med Sci (Paris) 2007; 23: 198-204.
- [7]. Unuvar T, Buyukgebiz A. Fetal and neonatal endocrine disruptors. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2012; 4: 51-60.
- [8]. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocr Rev 2009; 30: 293-342.
- [9]. Myers JP, Zoeller RT, vom Saal FS. A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. Environ Health Perspect 2009; 117: 1652-1655.
- [10]. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. Reprod Toxicol 2007; 24: 131-138.
- [11]. INRS. Fiche Toxicologique : Bisphénol A. 2010.

- [12]. Dodds EC, Lawson W. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 1936; 137: 996.
- [13]. Dodds EC, Golberg L, Lawson W, Robinson R. Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* 1938; 141: 247-248.
- [14]. Anonymous. Bisphenol-A: a techno-commercial profile. *Chemical Weekly* 2009; http://www.chemicalweekly.com/Profiles/Bisphenol_A.pdf; 205-211.
- [15]. Anonymous. Règlement (CE) N° 1907/2006 du parlement européen et du conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission. *Journal officiel de l'Union Européenne* 2006.
- [16]. Anonymous. Applications of Bisphenol A. *PlasticsEurope* 2007; <http://www.bisphenol-a-europe.org/uploads/BPA%20applications.pdf>.
- [17]. ANSES. Evaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine. 2013.
- [18]. Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 298-305.
- [19]. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002; 68: 121-146.
- [20]. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, et al. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 2008; 104: 362-384.
- [21]. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 926-933.
- [22]. Bapt G. Rapport fait au nom de la commission des affaires sociales sur la proposition de loi, adoptée par le sénat, tendant à suspendre la commercialisation de biberons produits à base de Bisphenol A. *Assemblée Nationale* 2010; N°2616.
- [23]. Geens T, Apelbaum TZ, Goeyens L, Neels H, Covaci A. Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2010; 27: 1627-1637.
- [24]. Dupuis A, Migeot V, Cariot A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S. Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int* 2012; 19: 4193-4205.

- [25]. Biles JE, McNeal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of Bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45: 3541-3544.
- [26]. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett* 2008; 176: 149-156.
- [27]. Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2009; 26: 928-937.
- [28]. Lim DS, Kwack SJ, Kim KB, Kim HS, Lee BM. Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A* 2009; 72: 1285-1291.
- [29]. Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, et al. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 1368-1372.
- [30]. Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Foureman GL, et al. Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 101-104.
- [31]. Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol* 2003; 37: 4543-4553.
- [32]. Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK, Lordo RA, Sheldon LS. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res* 2007; 103: 9-20.
- [33]. Loganathan SN, Kannan K. Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol* 2011; 61: 68-73.
- [34]. Geens T, Roosens L, Neels H, Covaci A. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 2009; 76: 755-760.
- [35]. EHESP, CSTB. Exposition à des composés organiques semi-volatils présents dans l'air (phase gazeuse et particulaire) et dans les poussières sédimentées, potentiellement perturbateurs endocriniens et/ou reprotoxiques, à l'intérieur de 30 logements. Ecole des hautes études en santé publique, Centre scientifique et technique du bâtiment. 2011; Rapport non publié.
- [36]. Kaddar N, Harthe C, Dechaud H, Mappus E, Pugeat M. Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A* 2008; 71: 471-473.
- [37]. Morck TJ, Sorda G, Bechi N, Rasmussen BS, Nielsen JB, Ietta F, et al. Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2010; 30: 131-137.
- [38]. Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 2010; 82: 424-430.

- [39]. Demierre AL, Peter R, Oberli A, Bourqui-Pittet M. Dermal penetration of bisphenol A in human skin contributes marginally to total exposure. *Toxicol Lett* 2012; 213: 305-308.
- [40]. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 571-576.
- [41]. Marquet F, Payan JP, Beydon D, Wathier L, Grandclaude MC, Ferrari E. In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [¹⁴C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol* 2011; 85: 1035-1043.
- [42]. EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A). Question member EFSA-Q-2005-100, adopted on 29 november 2006. *The EFSA Journal* 2006; 428: 1-75.
- [43]. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Ntp Cerhr Mon* 2008; 22: 1-64.
- [44]. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1281-1287.
- [45]. Volkel W, Bittner N, Dekant W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 1748-1757.
- [46]. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 247: 158-165.
- [47]. Collet SH. Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A. Thèse de Doctorat d'Univeristé, Université de Toulouse. 2012.
- [48]. Cho CY, Shin BS, Jung JH, Kim DH, Lee KC, Han SY, et al. Pharmacokinetic scaling of bisphenol A by species-invariant time methods. *Xenobiotica* 2002; 32: 925-934.
- [49]. Shin BS, Kim CH, Jun YS, Kim DH, Lee BM, Yoon CH, et al. Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *J Toxicol Environ Health A* 2004; 67: 1971-1985.
- [50]. Csanady GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 2002; 76: 299-305.
- [51]. Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perriere AB, Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 1999; 64: 328-334.
- [52]. Doerge DR, Twaddle NC, Woodling KA, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 248: 1-11.

- [53]. Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, et al. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 1999; 340 (Pt 2): 405-409.
- [54]. Kurebayashi H, Okudaira K, Ohno Y. Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett* 2010; 198: 210-215.
- [55]. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 149-157.
- [56]. Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, et al. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 309-319.
- [57]. Jaeg JP, Perdu E, Dolo L, Debrauwer L, Cravedi JP, Zalko D. Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4935-4942.
- [58]. Mazur CS, Kenneke JF, Hess-Wilson JK, Lipscomb JC. Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 2232-2238.
- [59]. Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SC, Fennell TR. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 168: 225-234.
- [60]. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 39-44.
- [61]. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1055-1070.
- [62]. Mao LH, Sun CJ, Zhang H, Li YX, Wu DS. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. *Analytica Chimica Acta* 2004; 522: 241-246.
- [63]. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 391-395.
- [64]. Liu Z, Wolff MS, Moline J. Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 819: 155-159.

- [65]. Volkel W, Kiranoglu M, Fromme H. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicology Letters* 2008; 179: 155-162.
- [66]. Wolff MS, Engel SM, Berkowitz GS, Ye X, Silva MJ, Zhu C, et al. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 1092-1097.
- [67]. Becker K, Goen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Muller J, et al. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212: 685-692.
- [68]. Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, et al. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 639-644.
- [69]. Liao C, Kannan K. Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 5003-5009.
- [70]. Casas M, Valvi D, Luque N, Ballesteros-Gomez A, Carsin AE, Fernandez MF, et al. Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children. *Environ Int* 2013; 56: 10-18.
- [71]. Becker K, Goen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Muller J, et al. GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2009; 212: 685-692.
- [72]. Nicolucci C, Rossi S, Menale C, Del Giudice EM, Perrone L, Gallo P, et al. A high selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantization of BPA urinary levels in children. *Anal Bioanal Chem* 2013.
- [73]. Nachman RM, Fox SD, Golden WC, Sibinga E, Veenstra TD, Groopman JD, et al. Urinary free bisphenol A and bisphenol A-glucuronide concentrations in newborns. *J Pediatr* 2013; 162: 870-872.
- [74]. Harthe C, Rinaldi S, Achaintre D, de Ravel MR, Mappus E, Pugeat M, et al. Bisphenol A-glucuronide measurement in urine samples. *Talanta* 2013; 100: 410-413.
- [75]. Morgan MK, Jones PA, Calafat AM, Ye X, Croghan CW, Chuang JC, et al. Assessing the quantitative relationships between preschool children's exposures to bisphenol A by route and urinary biomonitoring. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 5309-5316.
- [76]. Cobellis L, Colacurci N, Trabucco E, Carpentiero C, Grumetto L. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomed Chromatogr* 2009; 23: 1186-1190.
- [77]. Lee YJ, Ryu HY, Kim HK, Min CS, Lee JH, Kim E, et al. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 2008; 25: 413-419.

- [78]. Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, et al. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 2008; 28: 258-263.
- [79]. Zhang T, Sun H, Kannan K. Blood and urinary bisphenol A concentrations in children, adults, and pregnant women from china: partitioning between blood and urine and maternal and fetal cord blood. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 4686-4694.
- [80]. Gayrard V, Lacroix MZ, Collet SH, Viguie C, Bousquet-Melou A, Toutain PL, et al. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect* 2013; 121: 951-956.
- [81]. Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002; 110: A703-707.
- [82]. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002; 17: 2839-2841.
- [83]. Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, et al. Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 30: 1743-1749.
- [84]. Gerona RR, Woodruff TJ, Dickenson CA, Pan J, Schwartz JM, Sen S, et al. BPA, BPA glucuronide, and BPA sulfate in mid-gestation umbilical cord serum in a northern California cohort. *Environ Sci Technol* 2013.
- [85]. Jimenez-Diaz I, Zafra-Gomez A, Ballesteros O, Navea N, Navalon A, Fernandez MF, et al. Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 3363-3369.
- [86]. Cao XL, Zhang J, Goodyer CG, Hayward S, Cooke GM, Curran IH. Bisphenol A in human placental and fetal liver tissues collected from Greater Montreal area (Quebec) during 1998-2008. *Chemosphere* 2012; 89: 505-511.
- [87]. Tan BL, Ali Mohd M. Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer. *Talanta* 2003; 61: 385-391.
- [88]. Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, et al. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod* 2012; 27: 983-990.
- [89]. Edlow AG, Chen M, Smith NA, Lu C, McElrath TF. Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod Toxicol* 2012; 34: 1-7.
- [90]. Patterson TA, Twaddle NC, Roegge CS, Callicott RJ, Fisher JW, Doerge DR. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 267: 41-48.

- [91]. Viguie C, Collet SH, Gayrard V, Picard-Hagen N, Puel S, Roques BB, et al. Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 2013; 154: 521-528.
- [92]. Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 393 e391-397.
- [93]. Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1196-1203.
- [94]. Shin BS, Yoo SD, Cho CY, Jung JH, Lee BM, Kim JH, et al. Maternal-fetal disposition of bisphenol a in pregnant Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65: 395-406.
- [95]. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Brown RP, Fisher JW. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 255: 261-270.
- [96]. Dawes GS. In: *Foetal and Neonatal Physiology*. Chicago: Year Book Medical Publishers, Inc; 1968: 91-105.
- [97]. Wooding FB. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 1992; 13: 101-113.
- [98]. Bazer FW, Spencer TE, Thatcher WW. Growth and development of the ovine conceptus. *J Anim Sci* 2012; 90: 159-170.
- [99]. Barry JS, Anthony RV. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology* 2008; 69: 55-67.
- [100]. Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D. The ovine placenta and placentitis-A review. *Vet Microbiol* 2009; 135: 90-97.
- [101]. Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE. The human placenta--an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 1332-1340.
- [102]. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 487-514.
- [103]. Thibault L, Levasseur MC. In: *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*: INRA Editions; 2001.
- [104]. Drost M, Cornwell D. http://www.drostproject.org/en_ovirep/guide.html. 2010.
- [105]. Abbara A. Placenta, Annexes embryo-foetales http://www.aly-abbara.com/livre_gyn_obs/termes/placenta.html#placenta. 2013.
- [106]. Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, et al. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 2005; 26: 689-708.
- [107]. Illsley NP. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 2000; 21: 14-22.
- [108]. Brown K, Heller DS, Zamudio S, Illsley NP. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta* 2011; 32: 1041-1049.

-
- [109]. Carter AM. Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol Rev* 2012; 92: 1543-1576.
 - [110]. Vahakangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 665-678.
 - [111]. St-Pierre MV, Ugele B, Gambling L, Shiverick KT. Mechanisms of drug transfer across the human placenta-a workshop report. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S159-64.; 2002.
 - [112]. Prouillac C, Lecoœur S. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 1623-1635.
 - [113]. Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 400-410.
 - [114]. Evseenko DA, Murthi P, Paxton JW, Reid G, Emerald BS, Mohankumar KM, et al. The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. *FASEB J* 2007; 21: 3592-3605.
 - [115]. Jouannic JM, Fermont L, Brodaty G, Bonnet D, Daffos F. [An update on the fetal circulation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2004; 33: 291-296.
 - [116]. Ferrazzi E, Bellotti M, Galan H, Pennati G, Bozzo M, Rigano S, et al. Doppler investigation in intrauterine growth restriction--from qualitative indices to flow measurements: a review of the experience of a collaborative group. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 316-325.
 - [117]. Pasanen M. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 38: 81-97.
 - [118]. Vanselow J, Furbass R, Zsolnai A, Kalbe C, Said HM, Schwerin M. Expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 79: 279-288.
 - [119]. Finnell RH, Buehler BA, Kerr BM, Ager PL, Levy RH. Clinical and experimental studies linking oxidative metabolism to phenytoin-induced teratogenesis. *Neurology* 1992; 42: 25-31.
 - [120]. Collier AC, Ganley NA, Tingle MD, Blumenstein M, Marvin KW, Paxton JW, et al. UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 409-419.
 - [121]. Contractor SF, Shane B. Purification and characterization of lysosomal -glucuronidase from human placenta. *Biochem J* 1972; 128: 11-18.
 - [122]. Collier AC, Tingle MD, Paxton JW, Mitchell MD, Keelan JA. Metabolizing enzyme localization and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption. *Hum Reprod* 2002; 17: 2564-2572.
 - [123]. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther* 1999; 84: 429-445.

-
- [124]. Yaffe SJ, Rane A, Sjoqvist F, Boreus LO, Orrenius S. The presence of a monooxygenase system in human fetal liver microsomes. *Life Sci* 1970; 9: 1189-1200.
 - [125]. Kitada M, Kamataki T, Itahashi K, Rikihisa T, Kanakubo Y. P-450 HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal livers, is the 16 alpha-hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate. *J Biol Chem* 1987; 262: 13534-13537.
 - [126]. Kitada M, Kamataki T, Itahashi K, Rikihisa T, Kanakubo Y. Significance of cytochrome P-450 (P-450 HFLa) of human fetal livers in the steroid and drug oxidations. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 453-456.
 - [127]. Murray GI, Foster CO, Barnes TS, Weaver RJ, Snyder CP, Ewen SW, et al. Cytochrome P4501A expression in adult and fetal human liver. *Carcinogenesis* 1992; 13: 165-169.
 - [128]. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Wakamiya N, Ueng YF, Guengerich FP, et al. Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 515-522.
 - [129]. Treluyer JM, Jacqz-Aigrain E, Alvarez F, Cresteil T. Expression of CYP2D6 in developing human liver. *Eur J Biochem* 1991; 202: 583-588.
 - [130]. Carpenter SP, Lasker JM, Raucy JL. Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 260-268.
 - [131]. Ladona MG, Lindstrom B, Thyr C, Dun-Ren P, Rane A. Differential foetal development of the O- and N-demethylation of codeine and dextromethorphan in man. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 32: 295-302.
 - [132]. Jones SM, Boobis AR, Moore GE, Stanier PM. Expression of CYP2E1 during human fetal development: methylation of the CYP2E1 gene in human fetal and adult liver samples. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1876-1879.
 - [133]. Vieira I, Sonnier M, Cresteil T. Developmental expression of CYP2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *Eur J Biochem* 1996; 238: 476-483.
 - [134]. Kaddouri M, Brassat N, Alvinerie M, Eeckhoutte C, Bonfils C, Derancourt J, et al. Ontogenic development of liver progesterone metabolism in female sheep. Contribution of cytochrome P4502B and P4503A subfamilies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42: 499-508.
 - [135]. Leakey JE, Hume R, Burchell B. Development of multiple activities of UDP-glucuronyltransferase in human liver. *Biochem J* 1987; 243: 859-861.
 - [136]. Strassburg CP, Strassburg A, Kneip S, Barut A, Tukey RH, Rodeck B, et al. Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut* 2002; 50: 259-265.
 - [137]. Wang LH, Zakim D, Rudolph AM, Benet LZ. Developmental alterations in hepatic UDP-glucuronosyltransferase. A comparison of the kinetic properties of enzymes from adult sheep and fetal lambs. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 3065-3070.

- [138]. Dvorchik BH, Woodward G, Sitar DS, Tweed WA. Hydroxylation and glucuronidation of various xenobiotics by hepatic microsomes from the fetal lamb, pregnant ewe and human fetus. *Dev Pharmacol Ther* 1986; 9: 282-289.
- [139]. Cappiello M, Giuliani L, Rane A, Pacifici GM. Dopamine sulphotransferase is better developed than p-nitrophenol sulphotransferase in the human fetus. *Dev Pharmacol Ther* 1991; 16: 83-88.
- [140]. Pacifici GM, Kubrich M, Giuliani L, de Vries M, Rane A. Sulphation and glucuronidation of ritodrine in human foetal and adult tissues. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 44: 259-264.
- [141]. Stanley EL, Hume R, Coughtrie MW. Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 240: 32-42.
- [142]. Loebstein R, Lalkin A, Koren G. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* 1997; 33: 328-343.
- [143]. Collet SH, Picard-Hagen N, Viguie C, Lacroix MZ, Toutain PL, Gayrard V. Estrogenicity of bisphenol a: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicol Sci* 2010; 117: 54-62.
- [144]. Ceccaldi PF, Mandelbrot L, Farinotti R, Forestier F, Gil S. [Contributions of the ex vivo human perfused placenta in the study of placental transfer of drugs]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2010; 39: 601-605.
- [145]. Hutson JR, Garcia-Bournissen F, Davis A, Koren G. The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90: 67-76.
- [146]. Perrier D, Gibaldi M. General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state. *J Pharm Sci* 1982; 71: 474-475.
- [147]. Creasy RK, Drost M, Green MV, Morris JA. Determination of fetal, placental and neonatal blood volumes in the sheep. *Circ Res* 1970; 27: 487-494.
- [148]. Szeto HH. Pharmacokinetics in the ovine maternal-fetal unit. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 221-243.
- [149]. Mathiesen L, Rytting E, Mose T, Knudsen LE. Transport of benzo[alpha]pyrene in the dually perfused human placenta perfusion model: effect of albumin in the perfusion medium. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 105: 181-187.
- [150]. Garland M. Pharmacology of drug transfer across the placenta. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1998; 25: 21-42.
- [151]. Mielke H, Gundert-Remy U. Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett* 2009; 190: 32-40.
- [152]. van der Heide SM, Joosten BJ, Dragt BS, Everts ME, Klaren PH. A physiological role for glucuronidated thyroid hormones: preferential uptake by H9c2(2-1) myotubes. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 264: 109-117.

-
- [153]. Dziegielewska KM, Evans CA, Fossan G, Lorscheider FL, Malinowska DH, Mollgard K, et al. Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal sheep during development. *J Physiol* 1980; 300: 441-455.
- [154]. Gitlin D, Boesman M. Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma-G-globulin in the human conceptus. *J Clin Invest* 1966; 45: 1826-1838.
- [155]. Hill MD, Abramson FP. The significance of plasma protein binding on the fetal/maternal distribution of drugs at steady-state. *Clin Pharmacokinet* 1988; 14: 156-170.
- [156]. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998; 36: 2149-2173.
- [157]. Pretheeban M, Hammond G, Bandiera S, Riggs W, Rurak D. Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2011; 159: 159-166.
- [158]. Ekstrom L, Johansson M, Rane A. Tissue distribution and relative gene expression of UDP-glucuronosyltransferases (2B7, 2B15, 2B17) in the human fetus. *Drug Metab Dispos* 2012; 41: 291-295.

TITLE : Toxicokinetic Mechanisms involved in Fetal Exposure to Bisphenol A

SUMMARY : Bisphenol A (BPA) an endocrine disruptor interfering with developmental processes in rodents, raises the question of risk for human health related to fetal exposure to BPA. The goal of this work was to determine the toxicokinetic mechanisms involved in fetal exposure to BPA. The disposition of BPA and its metabolites in the maternal-placental-fetal unit in an *in vivo* ovine model enabled us to identify the placental transfer and the fetal-placental metabolism as the major determining factors of fetal exposure to BPA. Bidirectional placental transfer of BPA occurs by passive diffusion leading to a ratio of free BPA between the fetal and maternal plasma concentrations of about 1. By contrast, the permeability of BPA-G is very limited, particularly in materno-to-fetal direction. The hepatic conjugation activities were very low in ovine fetus at an early stage of development and increased throughout pregnancy. Hydrolysis of BPA conjugates observed *ex vivo* into fetal ovine gonads could lead to local exposure to native BPA. Altogether, these results suggest that the early stage of pregnancy is a critical window of exposure for the developing fetus.

KEYWORDS : endocrine disruptor, Bisphenol A, fetal exposure, sheep, pregnancy, human placenta, hepatic metabolism

AUTEUR : Tanguy CORBEL

TITRE : Mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition fœtale au Bisphénol A

DIRECTEUR DE THESE : Madame le Professeur Nicole Picard-Hagen

CO-DIRECTEUR DE THESE : Madame le Professeur Véronique Gayrard

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : le 9 Décembre 2013

à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

RESUME : Le Bisphenol A (BPA) est un perturbateur endocrinien dont les effets développementaux observés chez les rongeurs soulèvent la question du risque pour la santé humaine relatif à une exposition fœtale au BPA. L'objectif de cette thèse est de déterminer les mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition fœtale au BPA. La caractérisation *in vivo* dans un modèle intégratif ovin des expositions maternelles et fœtales au BPA et à ses métabolites ont permis d'identifier le transfert placentaire et le métabolisme foeto-placentaire comme les déterminants majeurs de l'exposition fœtale au BPA. Le transfert bidirectionnel du BPA à travers le placenta humain se fait par diffusion passive conduisant à un rapport maximal des concentrations plasmatiques de BPA libre entre le fœtus et sa mère de 1. En revanche, la perméabilité placentaire du BPA-G est très limitée, en particulier dans le sens materno-fœtal. Les activités de conjugaison hépatique du BPA ont été faibles chez le fœtus ovin à un stade précoce de gestation et ont augmenté au cours du développement. Par ailleurs la réactivation des conjugués du BPA mise en évidence *ex vivo* dans les gonades fœtales ovines pourrait conduire à une exposition locale au BPA actif. L'ensemble de ces données suggère que le début de la gestation pourrait représenter une fenêtre critique d'exposition au BPA.

MOTS-CLES : perturbateur endocrinien, Bisphénol A, exposition fœtale, brebis, gestation, placenta humain, métabolisme hépatique

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR 1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA/INPT/UPS

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

23, Chemin des Capelles - BP 87614

31076 TOULOUSE Cedex 3
