

## Sommaire

# **Disposition du bisphénol A chez le cheval : établissement d'une relation allométrique chez les mammifères.**

ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	7
Introduction.....	8
<b>PARTIE 1 : Problématique de l'exposition humaine au bisphénol A.....</b>	<b>11</b>
I) Problématique du Bisphénol A et enjeux pour la santé humaine.....	11
a. Enjeux économiques majeurs liés à une production mondiale de masse du BPA.....	11
b. Contamination de la quasi-totalité de la population humaine par différentes sources.....	13
c. Mode d'action : affinité pour les récepteurs aux œstrogènes.....	18
d. Effets délétères démontrés, suspectés ou controversés chez l'homme et l'animal à faibles doses.....	19
II) Connaissances de l'exposition et de la pharmacocinétique chez l'homme : nécessité d'une approche allométrique.....	21
a. Exposition humaine au Bisphénol A : facteurs de variation.....	21
b. Evaluation de la pharmacocinétique du Bisphénol A chez l'Homme.....	25
c. L'approche allométrique.....	28

III) Exposition au Bisphénol A et connaissances toxicocinétiques actuelles chez les mammifères.....	31
a. Le métabolisme du Bisphénol A : caractéristiques communes aux différentes espèces de mammifères.....	31
b. Paramètre pharmacocinétiques du Bisphénol A chez les mammifères.....	35
i. Les rongeurs (le rat et la souris).....	36
ii. La Brebis.....	36
iii. Le Chien.....	36
iv. Le Porc.....	36
v. Le Singe.....	36

**PARTIE 2 : Approche expérimentale de la disposition du Bisphénol A chez le cheval et établissement d'une relation allométrique chez les mammifères.....41**

I) Matériels d'étude.....	41
a. Matériel test.....	41
i. Identification du matériel test : le Bisphénol A.....	41
ii. Préparation du matériel test pour administration intraveineuse.....	41
b. Système biologique.....	42
i. Description.....	42
ii. Origine des chevaux.....	42
iii. Conditions d'entretien et d'hébergement.....	42
iv. Devenir à la fin de l'étude.....	43

II) Méthodologie expérimentale.....	43
a. Modalités de traitements.....	43
b. Plan expérimental.....	43
c. Procédures expérimentales.....	44
i. Modalités de pesée des chevaux.....	44
ii. Modalités de collecte des échantillons sanguins et urinaires.....	44
iii. Modalités de traitement des échantillons.....	45
iv. Modalités d'analyse des échantillons.....	45
d. Analyse des données.....	46
i. Analyse des données plasmatiques.....	46
ii. Analyse des données urinaires.....	48
III) Résultats.....	50
IV) Discussion.....	54
Conclusion.....	58
Références bibliographiques.....	60

## ABREVIATIONS

**Anses** : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
**AUC** : *area under the curve*, aire sous la courbe  
**BPA** : bisphénol A  
**BPA-G** : bisphénol A-glucuronide  
**BPA-S** : bisphénol A-sulfate  
**BW** : poids corporel  
**Cl** : clairance plasmatique  
**C<sub>max</sub>** : concentration maximale  
**DJA** : Dose Journalière Admissible  
**EFSA** : *European Food Safety Authority*, Autorité européenne de sécurité des aliments  
**E<sub>h</sub>** : coefficient d'extraction hépatique  
**EPA** : *Environmental Protection Agency*, agence de protection de l'environnement  
**ER** : récepteur aux œstrogènes  
**E2** : œstradiol  
**F<sub>abs</sub>** : fraction absorbée  
**FDA** : Food and Drug Administration, Agence Fédérale Américaine des produits alimentaires et médicamenteux  
**F<sub>h</sub>** : fraction qui échappe à l'effet de premier passage hépatique  
**i.m.** : intramusculaire  
**INSERM** : institut national de la santé et de la recherche médicale  
**i.v.** : intraveineuse  
**LMS** : limite de migration spécifique  
**LOAEL** : *Lowest Observed Adverse Effect Level*, dose la plus faible pour laquelle un effet délétère est observé  
**LOD** : limite de détection  
**LOQ** : limite de quantification  
**N/D** : non détectable  
**N/E** : non estimable  
**NHANES** : National Health and Nutrition Examination Survey  
**NOAEL** : *No Observed Adverse Effect Level*, dose la plus élevée pour laquelle aucun effet délétère n'est observé  
**PB-PK** : modèle physiologique-pharmacocinétique  
**PD** : pharmacodynamie  
**PE** : perturbateur endocrinien  
**PK** : pharmacocinétique  
**Q<sub>h</sub>** : débit sanguin hépatique  
**REACH** : *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*, enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques  
**SD** : *standard deviation*, écart-type  
**SE** : *standard error*, erreur standard  
**t<sub>1/2</sub>** : temps de demi-vie plasmatique  
**TD** : toxicodynamie  
**TK** : toxicocinétique  
**UGT** : uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase

**UHPLC-MS/MS** : chromatographie en phase liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse  
**V<sub>max</sub>** : vitesse maximale d'élimination

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de l'œstradiol (E2) et du bisphénol A (BPA)

Figure 2 : Structure chimique du bisphénol A (BPA) et de ses dérivés chlorés

Figure 3 : Représentation graphique de la droite de régression illustrant la relation allométrique existant chez les mammifères domestiques entre le poids corporel et la pression artérielle moyenne au stade fœtal et chez l'adulte (d'après [29])

Figure 4 : Représentation graphique de la droite de régression linéaire illustrant la relation allométrique existant entre le poids corporel et les différents paramètres pharmacocinétiques de la gentamicine : clairance, temps de demi-vie, et volume de distribution, chez les mammifères domestiques (d'après [15])

Figure 5 : Réaction de glucurono-conjugaison du BPA en BPA-G par les UGTs

Figure 6 : Graphique représentant la relation allométrique ( $Cl_{BPA} = 0,0438 * P^{0,9414}$ ) reliant la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel de 5 espèces animales : la souris, le rat, le chien, le porc et le mouton (d'après [13])

Figure 7 : Représentation graphique des taux instantanés d'excrétion urinaire du BPA en fonction des concentrations plasmatiques de BPA : la clairance est estimée par la pente de cette relation

Figure 8 : Graphiques des cinétiques plasmatiques des quatre chevaux suite à l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5mg/kg

Figure 9 : Graphique des cinétiques plasmatiques moyennes +/- SD de BPA et de BPA-G, observées après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5mg/kg chez quatre chevaux

Figure 10 : Droite de régression représentant la relation allométrique [ $Cl_{BPA} = 0,044 * P^{0,8645}$ ] entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel d'un mammifère sur une gamme de poids s'étalant de 20g à 500kg

Figure 11 : Droites de régression représentant la relation allométrique établie chez les mammifères entre le volume de distribution du BPA et le poids corporel (A), et entre le temps de demi-vie du BPA et le poids corporel (B)

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Paramètres pharmacocinétiques du BPA (clairance, temps de demi-vie, volume de distribution) estimés après une administration intraveineuse de BPA à des doses comprises entre 0,01 et 10 mg/kg chez différentes espèces.

Tableau II : Limites de quantification (LOQs) de la méthode UHPLC-MS/MS développée pour chaque matrice (le plasma et l'urine) pour l'évaluation des concentrations en BPA et en BPA-G en  $\mu\text{g/mL}$  et en  $\mu\text{M}$ .

Tableau III : Tableau regroupant les valeurs de clairance plasmatique du BPA déterminées expérimentalement chez 6 espèces mammifères, par analyse non compartimentale des données plasmatiques et urinaires obtenues après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5 mg/kg [13].

Tableau IV : Tableau regroupant les Volumes de distribution et les Temps de demi-vie du BPA déterminés expérimentalement chez 6 espèces mammifères, par analyse non compartimentale des données plasmatiques et urinaires obtenues après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5 mg/kg [13].

## INTRODUCTION

Des études très récentes estiment entre 10 et 16% la prévalence de l'infertilité des couples dans les pays développés. En France, un couple sur sept consulte un spécialiste pour une infertilité. Les facteurs influençant ce phénomène de société sont multiples et non exhaustifs, l'âge avancé des partenaires (plus de 35 ans), le tabagisme, la diminution de la production et de la qualité des spermatozoïdes ainsi qu'une exposition répétée à des substances chimiques dont les perturbateurs endocriniens. Au cours de ces 20 dernières années, l'exposition récurrente de l'homme à des produits perturbateurs de la fonction endocrinienne, présents dans notre environnement, suscite les plus vives inquiétudes au sein de la communauté scientifique et dans la population, vis-à-vis des risques avérés ou potentiels sur la santé.

L'agence américaine de protection de l'environnement (US EPA) a défini en 1997, un perturbateur endocrinien comme « *une substance exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme* » [36]. Les perturbateurs endocriniens ont donc la capacité de perturber le système hormonal selon des modalités très différentes entraînant ainsi des effets délétères chez un individu et/ou sa descendance.

Actuellement, le bisphénol A (BPA) est particulièrement médiatisé et très surveillé par les agences mondiales de sécurité sanitaire des aliments. En effet, ce xénoestrogène de synthèse couramment utilisé depuis plus de 50 ans, est très présent dans notre environnement. Il sert principalement de monomère dans la production de plastiques polycarbonates et de résines époxy-phénoliques, utilisées dans les revêtements internes d'emballages alimentaires tels que les cannettes de boissons ou les boîtes de conserve. Il est l'un des produits chimiques le plus produit dans le monde. La libération de monomères de BPA à partir de contenants alimentaires est à l'origine de la contamination de la chaîne alimentaire et conduit à une exposition humaine ubiquitaire [72] comme en témoigne la présence de BPA dans les urines de 95% des citoyens des Etats-Unis d'Amérique [7].



Les nombreuses données expérimentales qui montrent des effets délétères de faibles doses de BPA, au cours du développement chez les rongeurs, génèrent aujourd'hui des inquiétudes vis-à-vis de l'exposition chronique de l'homme à de faibles doses, et suggèrent que la Dose Journalière Admissible (DJA) pourrait être sous-estimée. La DJA a été déterminée par les autorités réglementaires européennes et américaines (ESFA, European Food Safety Authority et FDA, Food and Drug Administration), en appliquant un facteur de sécurité de 1000 à la plus faible dose présentant des effets délétères observables (LOAEL) de 50 mg par kg et par jour, à partir d'études toxicologiques réalisées chez les rongeurs [18]. Le principal argument avancé par l'EFSA, dans son rapport de 2008, pour ne pas prendre en compte les effets des faibles doses observés chez les rongeurs est la différence de toxicocinétique du BPA entre l'homme et les rongeurs [19]. Chez l'homme, il est considéré que le BPA est très faiblement biodisponible à cause d'un effet de premier passage hépatique qui inactive le BPA absorbé par l'intestin en le transformant en BPA Glucuronide (BPA-G). Les études pharmacocinétiques menées chez l'homme sont quasiment inexistantes car pour des raisons éthiques, le BPA ne peut pas être administré à des doses suffisantes pour caractériser la disposition du BPA. Etant donné cette difficulté expérimentale, l'utilisation d'une approche méthodologique indirecte est nécessaire pour documenter la toxicocinétique du bisphénol A chez l'homme.

L'équipe « Pesticides et Perturbateurs endocriniens » de l'UMR 1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA-ENVT, a développé une méthode analytique sensible de quantification du BPA et du BPA-Gluc par LC-MS-MS [41] ainsi qu'une approche comparatiste de la distribution et de l'élimination du BPA chez différentes espèces de mammifères (porc, brebis, chien, rat, souris) [12,13]. Une des hypothèses de cette équipe est que la clairance plasmatique du BPA répond à une relation allométrique chez les mammifères. Afin d'estimer la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme à partir de cette approche, une relation allométrique doit être construite ; en pratique cela consiste à obtenir une équation de régression reliant le poids corporel de différentes espèces animales avec leur clairance plasmatique. Cette régression peut être assimilée à une courbe de calibration qui permettra d'estimer la clairance plasmatique du BPA chez l'homme à partir de son poids corporel. La valeur prédictive de la relation allométrique dépendra de multiples facteurs dont le nombre d'espèces animales utilisées pour l'obtenir. De plus, pour être robuste, l'estimation de la clairance chez l'homme doit se faire par une interpolation dans la droite de régression et non par une extrapolation en dehors de la gamme des poids utilisés pour l'obtenir. Cela

impose donc que le poids corporel des espèces servant à bâtir la régression encadre le poids corporel de l'homme. Il est donc nécessaire que la droite de régression soit obtenue avec des espèces de poids corporel respectivement inférieur et supérieur au poids corporel de l'homme. Les données obtenues précédemment au laboratoire à partir de cinq espèces animales étaient insuffisantes car l'espèce dont le poids corporel était le plus élevé, était la brebis avec un poids moyen d'environ 55 kg ; ce qui rendait obligatoire une extrapolation de la droite de régression pour estimer la clairance du BPA chez l'homme.

L'objectif de notre étude a donc été de déterminer la clairance plasmatique du BPA chez le cheval afin d'obtenir une relation allométrique robuste entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel sur une gamme étendue de poids (entre 20 g et 500 kg). Le but ultime de cette étude a été d'estimer par interpolation la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme à partir de cette relation allométrique pour contribuer ainsi à une évaluation plus précise du risque lié à une exposition répétée au BPA chez l'Homme.

Dans une première partie de notre travail de thèse, nous ferons un état des connaissances actuelles sur le BPA et des différentes sources d'exposition de la population. Nous analyserons ensuite les données de la littérature concernant le devenir du BPA dans l'organisme ainsi que les niveaux d'exposition de la population humaine au BPA, rapportés par les études de biosurveillance. Nous expliquerons ensuite comment l'approche allométrique permet d'estimer la pharmacocinétique du BPA chez l'homme, chez qui l'expérimentation est difficile voire impossible. Nous examinerons enfin les connaissances actuelles sur la pharmacocinétique du BPA chez les mammifères.

La seconde partie de cette thèse sera consacrée à la présentation, l'analyse et la discussion des résultats de l'étude expérimentale de la disposition du bisphénol A chez le cheval, qui avait pour objectif de compléter l'approche comparatiste d'espèces de la clairance du BPA et d'évaluer la clairance du BPA chez l'homme à partir d'une approche allométrique.

## **PARTIE 1 : Problématique de l'exposition humaine au bisphénol A**

### I) Problématique du Bisphénol A et enjeux pour la santé humaine

#### a. Enjeux économiques majeurs liés à une production mondiale de masse du BPA

La production mondiale annuelle de BPA est estimée actuellement à 3,8 millions de tonnes, et en 2006, elle avoisinait même les 4 millions de tonnes [9, 18, 19, 60]. C'est l'un des produits chimiques le plus synthétisé dans le monde. Deux tiers de cette production mondiale sont destinés à la fabrication du polycarbonate, le dernier tiers étant réservé à la fabrication de résines, dont les plus courantes sont les résines époxy. Le BPA est alors utilisé en tant que réactif dans la fabrication de ces résines. Ces dernières se retrouvent majoritairement dans les revêtements intérieurs de containers utilisés en milieu marin, ainsi que dans le revêtement intérieur des canettes de boissons, des boîtes de conserve, y compris les boîtes de lait en poudre pour bébés. Les polycarbonates, polymères très employés dans l'industrie du plastique sont la base de fabrication d'un très grand nombre d'objets de la vie courante tels que les CD et les DVD, les verres de lunettes, les lentilles ophtalmiques, les toitures, les pièces automobiles (phares de voitures,...), les équipements électriques (prises électriques, interrupteurs,...), les appareils médicaux, mais aussi les biberons, les bouilloires, les bombonnes et bouteilles d'eau, les assiettes, tasses et gobelets en plastiques, et la vaisselle pour four à micro-ondes.

Une petite fraction de la production de BPA sert à d'autres usages. Par exemple, il intervient en tant que révélateur dans les papiers thermiques (tickets de caisse,...). Il est également un constituant des amalgames dentaires [80] et de substances ignifugeantes capables de retarder la combustion de matières plastiques ou textiles, sous forme de tétrabromobisphénol A. La France ne produit pas directement le BPA qu'elle utilise, elle en est donc importatrice.

Le BPA est actuellement classé en tant que substance reprotoxique de catégorie 3, c'est-à-dire jugée "préoccupante pour la fertilité de l'espèce humaine" en raison "d'effets toxiques possibles" mais non démontrés sur la reproduction. Dans l'Union européenne, le BPA est autorisé dans les matériaux en contact avec des denrées alimentaires conformément au règlement (UE) No 10/2011 de la Commission européenne du 14 janvier 2011 qui fixe une

limite de migration spécifique de 0,6 mg/kg vers l'aliment [14]. Toutes les entreprises fabricantes, importatrices et/ou utilisatrices de substances chimiques, utilisant du BPA sont concernées par le règlement REACH (CE) n°1907/2006 qui vise à évaluer et à contrôler les substances chimiques fabriquées, importées et utilisées à raison de plus d'une tonne par an sur le marché européen, afin d'en réduire les risques pour la santé et l'environnement liés à leurs utilisations [56].

En raison de son potentiel toxique lié à sa capacité à se lier aux récepteurs aux œstrogènes, les autorités réglementaires européennes et américaines (EFSA et FDA) ont établi à 50 mg/kg de poids corporel/jour, la dose sans effet délétère observable chez le rat et la souris (NOEL No Observed Adverse Effect Level) [18]. Cette NOEL a été établie expérimentalement sur plusieurs générations de rats et de souris [11, 67, 70], pour des effets de toxicité systémique. A partir de cette valeur, la dose journalière admissible pour l'homme (DJA) a été calculée à 50 µg de BPA par kg de poids corporel et par jour, après application d'un facteur de sécurité de 1000 à la NOEL, ce qui correspond à une exposition équivalente à 3 mg par jour pour un adulte de 70 kg ou à 0,3 mg/j pour un enfant de 7 kg.

Compte tenu de l'importance du BPA et de l'exposition quotidienne de l'homme à ce perturbateur endocrinien, l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) se penche activement depuis trois ans sur son innocuité. Elle a d'ailleurs publié de nombreuses recommandations visant à réduire les expositions et elle a rappelé la nécessité d'un étiquetage systématique des denrées alimentaires [1].

Le 23 juin 2010, l'assemblée nationale a adopté la proposition de loi sur la restriction de l'utilisation du BPA, à la suite d'une initiative du sénat le 24 mars 2010. Cette loi suspend la commercialisation de biberons produits à base de Bisphénol A sur le territoire français : "La fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de biberons produits à base de Bisphénol A sont suspendues jusqu'à l'adoption, par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, d'un avis motivé autorisant à nouveau ces opérations." Pourtant cette même année, l'EFSA (European Food Safety Authority) a publié un rapport certifiant que le BPA n'était pas dangereux pour la santé humaine et que la Dose Journalière Admissible (DJA) fixée était suffisante [19].

En novembre 2010, l'OMS, Organisation mondiale de la santé, a considéré comme prématurée les mesures prises par la France pour se prévenir des risques du BPA.

Malgré la pression du lobby agro-alimentaire, le sénat suivi par l'Assemblée nationale a voté le mercredi 12 octobre 2011 une proposition de loi visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du BPA, à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2014, et dès 2013 pour le cas particulier des contenants alimentaires de produits destinés aux enfants de moins de 3 ans. Le mardi 9 octobre 2012, le Sénat a été encore plus loin en adoptant une mesure d'interdiction de tous les dispositifs médicaux destinés aux enfants de moins de 3 ans ou aux femmes enceintes, contenant non seulement du bisphénol mais aussi tout autre perturbateur endocrinien et/ou substance cancérigène, à partir du 1<sup>er</sup> juillet 2015.

C'est au Japon que l'on retrouve la réglementation la plus sévère concernant le BPA. La *Food Sanitation Law* impose une limite de migration de 2,5 ppm pour tous les plastiques de type polycarbonate en contact avec des aliments. De plus, face aux préoccupations et à la pression grandissante du grand public comme du gouvernement, les industriels japonais ont volontairement réduit l'usage du BPA entre 1998 et 2003.

b. Contamination de la quasi-totalité de la population humaine par différentes sources

Le BPA étant exclusivement produit par synthèse chimique, les sources d'exposition de la population humaine sont d'origine environnementale. On en distingue trois modalités principales : par ingestion d'aliments ayant été au contact de plastiques contenant du BPA, par l'inhalation de poussières et par contact cutané avec des matériaux fabriqués à base de BPA.

En 2009, en Corée du sud, les concentrations moyennes de BPA dans différents aliments en conserves ont été mesurées : elles avoisinaient 3,1 µg/kg (valeur Non Détectable ND - 21,5µg/kg) pour des légumes, 8,3 µg/kg (ND - 14,26) pour le thé, 8,6 µg/kg (ND - 54,56 µg/kg) pour les fruits, 24,49 µg/kg (ND - 98,30 µg/kg) pour des viandes, 39,78 µg/kg (ND - 125,25 µg/kg) pour le poisson, 43,7 µg/kg (ND - 116,88 µg/kg) pour le thon et 45,51 µg/kg (ND - 136,14 µg/kg) pour le café [45, 46]. Si l'on se base sur une consommation quotidienne moyenne de produits alimentaires en conserve, le niveau d'exposition journalier de l'homme

au BPA a été évalué à 1,509  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel, valeur très inférieure à la DJA de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [45, 46]. Des analyses similaires ont été réalisées dans une étude américaine, où les concentrations en BPA rapportées sont comprises entre 2,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les tomates en boîte et 730  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les haricots verts en boîte [69]. Plus récemment, en 2011, Gonzales-Castro au Mexique a mis en évidence des concentrations significatives de BPA dans des aliments, tel que les yaourts et les crèmes desserts et des légumes et viandes en conserves dans des conditions de stockage et d'utilisation conventionnelle [26]. Guart a mis en évidence la contamination de l'eau à partir de bouteilles plastique en polycarbonates [28]. Cependant, toutes ces études concluent que l'exposition quotidienne de l'homme BPA, ayant des pratiques alimentaires conventionnelles, reste sans risque puisque les doses journalières cumulatives sont très faibles en comparaison avec les valeurs réglementaires.

Il est à noter que la contamination des populations humaines peut être très aléatoire et dépendre non seulement de la présence de BPA dans les emballages mais aussi des pratiques culinaires des consommateurs. De plus, la migration de monomère de BPA à partir de l'emballage plastique vers la denrée alimentaire, peut dépendre de multiples facteurs. Ainsi, dans l'étude coréenne précédemment citée, pour les mêmes échantillons d'aliments, les concentrations en BPA pouvaient soit être inférieures à la limite de détection (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les aliments solides et 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les liquides), soit atteindre une centaine de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour certains aliments [45, 46]. La libération du monomère de BPA peut se faire de deux manières soit lorsque polymérisation est incomplète, soit à la suite d'une hydrolyse de la chaîne ester reliant les monomères de BPA [5, 35] dans des conditions de pH neutre ou alcalin ou au contact de liquides à haute température. Cela explique donc que cette libération est accrue lorsque l'aliment est chauffé au four à micro-ondes [26], avec un contenant plastique fabriqué à base de BPA ou si un liquide bouillant y est versé à l'intérieur [45]. La mesure de la migration du BPA à partir de bouteilles en polycarbonates remplies du riz cuit à la vapeur ou de porc cuisiné, tous deux chauffés dans un bain marie d'eau bouillante (à 100°C), a montré que la quantité de BPA détectée était inférieure à la limite de détection (LOD) de 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ . Au contraire, en chauffant ces produits au four à micro-onde à 100°C pendant 9 minutes, le niveau de libération du monomère augmentait de 6 à 18 $\mu\text{g}/\text{L}$  pour le riz cuit à la vapeur et de 5 à 15  $\mu\text{g}/\text{L}$  pour le porc cuisiné. De plus, trois types différents de bouteilles en polycarbonate ont été testés en les remplissant avec de l'eau chaude bouillante (à 100°C) [45]. Les niveaux

de BPA moyens libérés à partir des bouteilles après refroidissement progressif durant 3h à température ambiante, ont augmenté de façon linéaire au cours du temps, variant entre des valeurs inférieures à la limite de détection (Non Détectable ND) et 2,5 µg/L après 60 min. Aucune de ces mesures de libération du monomère n'excède donc la limite de migration spécifique (SML) fixée à 600 µg/L, par les agences mondiales de sécurité sanitaire dont celle de l'Union européenne et l'Organisme de certification des aliments et des médicaments de la Corée (KFDA). La contamination de l'eau stockée dans un contenant en polycarbonate par le BPA augmente également avec la température soit 0,12 ng/mL à 40°C et 1,77 ng/mL à 60°C [39].

D'autres facteurs interviennent dans la libération aléatoire du BPA à partir du plastique comme le vieillissement du polycarbonate, l'exposition aux UV ou encore le nettoyage avec des détergents puissants. En effet, l'utilisation de biberons usagés est associée à une augmentation des concentrations de BPA de 0,13 à 18,47 ng/mL d'eau en raison de l'hydrolyse du polymère, accentuée après environ 6 mois d'utilisation [52]. De la même façon, le passage des matériaux en polycarbonate au lave-vaisselle et au four micro-ondes augmenterait l'hydrolyse des polymères de BPA [45]. En Norvège, en 2003, Brede a évalué les concentrations de bisphénol A dans le lait pour bébé contenu dans des biberons neufs, à 0,23 µg/L. Cette valeur atteint 8,4 µg/L dans ces mêmes biberons après 51 cycles de nettoyage au lave-vaisselle et diminue ensuite pour être estimée en moyenne à 6,7 µg/L après 169 passages au lave-vaisselle [5]. Cependant, certains auteurs suggèrent au contraire que la contamination des aliments par le BPA se produirait plutôt au moment du conditionnement des aliments (mise en conserve, stérilisation) et que les variations de contamination observées entre les aliments seraient liées à des différences dans le processus de fabrication, les résines utilisées et le type d'aliment [6].

Une autre source d'exposition orale non liée à la consommation d'aliments a également été décrite à partir d'amalgames dentaires fabriqués à base de BPA, utilisés en dentisterie. Plusieurs études ont ainsi décrit la présence de BPA dans la salive des patients à des concentrations comprises entre 3 et 30 ng/mL (n = 18, 50 mg de résine) [54] et 0,06 à 0,1 ng/mL (n = 22, 38 mg de résine) [23] dans les heures suivant la pose de la résine. Cette libération semble cependant être de très courte durée après la pose. En effet, une dernière

étude plus récente datant de 2006, a mesuré les concentrations en BPA dans la salive et dans l'urine de 14 patients ayant reçu des scellements dentaires de différente nature [31]. Les concentrations urinaires maximales étaient observées seulement une heure après l'application et correspondaient à des valeurs s'échelonnant entre 7,26 et 27,3 µg/l, soit des valeurs 2 à 10 fois supérieures aux taux urinaires moyens habituellement observés. Les concentrations salivaires moyennes mesurées variaient entre 0,54 et 42,8 ng/mL en fonction du type d'amalgame utilisé [32].

### Absorption cutanée du BPA

En raison de la large utilisation des papiers thermiques dans la vie quotidienne (tickets de carte bancaire et ticket de caisse), l'éventualité d'une exposition au BPA par contact cutané n'a que récemment été envisagée. Cela était pourtant évoqué depuis plus d'une vingtaine d'année au travers de nombreux cas de dermatites allergiques de contact diagnostiquées chez une grande partie des travailleurs de l'industrie des résines époxy. Une étude récente a révélé la présence de BPA dans 11 types de papiers thermiques sur 13 testés à des taux variant de 8 à 17 mg/g. Une exposition comprise entre 0,2 et 6 µg *in toto*, soit 0,3 % de la DJA a également pu être mise en évidence après un contact de seulement 5 secondes avec un ticket contenant 15,2 mg de BPA par gramme de papier [3]. De plus, cette étude révèle que la pénétration se fait de manière relativement profonde dans le derme, et qu'un lavage précoce des mains après contact à l'aide d'une solution alcoolique (éthanol) ne suffit pas à se protéger de l'exposition. Elle révèle également qu'un travailleur dans l'industrie du plastique ou une hôtesse de caisse en contact pendant 10 h/jour avec ces produits, s'exposerait à un taux journalier de BPA de 71 µg/jour, ce qui reste cependant bien inférieur à la DJA. Le papier recyclé produit à partir de matières plastiques ou d'anciens contenants alimentaires serait également une source d'exposition cutanée au BPA selon une publication de la NHANES en 2009 [63]. Afin de mieux comprendre la perméabilité cutanée au BPA, l'utilisation du modèle de peau d'oreille de porc a permis de démontrer une faible biodisponibilité du BPA (~10 %) après une exposition dermique longue d'environ 10h [33, 80]. Ainsi, même si certains facteurs augmentent la perméabilité cutanée comme l'état hydratation des mains, l'exposition cutanée ne contribuerait que très minoritairement à l'exposition totale au BPA de la population [48].



## Exposition par inhalation

C'est en 2001, que des chercheurs révèlent pour la première fois la présence de BPA dans les poussières au sein des maisons ainsi que dans l'air ambiant intérieur comme extérieur [58]. Depuis cette date, de nombreuses études révèlent la présence de BPA dans plus de 50% des prélèvements de poussières [76] voire même jusqu'à 95% des prélèvements (n = 56) pour une étude très récente datant de 2011 menée aux Etats Unis [47]. Les concentrations de BPA dans les échantillons de poussières s'avèrent également très variables, s'étalant de la limite de détection : 0,5 ng/g à 15 000 ng/g. Plusieurs études s'accordent cependant, sur des taux de BPA dans les poussières d'intérieures similaires, toujours comprises entre 120 et 1500 ng/g [25,75]. La grande variabilité de la teneur en BPA dans les poussières se retrouve également dans les locaux de travail comme les bureaux où des concentrations 5 à 10 fois supérieures à celle retrouvées dans les maisons ont pu être détectées [25]. Malgré cela, l'exposition au BPA par inhalation de poussières reste limitée en raison de sa faible libération sous forme de vapeur à température ambiante et de par la taille importante des particules de BPA. En supposant que l'absorption à partir du tractus respiratoire soit complète, une exposition potentielle pour un adulte de 60 kg, liée à l'inhalation de 50 mg de poussières d'une concentration moyenne de BPA de 843 ng/g, a pu être calculée et avoisinerait 0,70 ng/(kg.j).

En bilan, toutes les études citées précédemment s'accordent à dire que 99% de l'exposition au BPA se fait par l'ingestion d'aliments ou de boissons contaminées. La contribution de la voie aérienne ne dépasserait pas quant à elle, 1% de l'exposition totale [47]. En effet, aux Etats-Unis, une étude a estimé que 99 % de l'exposition au BPA d'une population de 257 enfants âgés de 1,5 à 5 ans serait liée à l'ingestion de nourriture [76]. Une étude plus récente confirme cette forte contribution de la voie alimentaire dans l'exposition totale au BPA et estime à 0,25 %, la contribution de l'inhalation et à 0,05 % l'ingestion non liée aux aliments chez 81 enfants américains âgés de 2 à 5 ans [51]. L'exposition par voie cutanée est considérée comme anecdotique pour la population générale. Cependant, elle pourrait, au même titre que l'exposition par inhalation, être plus significative dans le cadre d'expositions professionnelles. En effet, les hôtesses de caisses ainsi que les ouvriers de l'industrie du plastique présentent des concentrations urinaires de BPA qui sont supérieures à celles de la population générale [30].

c. Mode d'action : affinité pour les récepteurs aux œstrogènes

Bien que rapidement éliminé dans les urines, le BPA serait présent à niveau constant dans l'organisme du fait de l'exposition continue à ce xœstrogène. Le BPA est en effet, capable d'interagir avec les récepteurs aux œstrogènes au sein de l'organisme. Il est considéré comme un agoniste faible des récepteurs aux œstrogènes. De par la présence de ses deux noyaux phénoliques (figure 1), le BPA est capable de se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  ( $ER\alpha$  et  $\beta$ ) et d'initier des réponses moléculaires au sein des cellules visées. Cependant, son affinité pour ces  $ER\alpha$  et  $\beta$  est 10 000 fois plus faible que celle de l'œstradiol. Elle est en outre, similaire pour les deux types de récepteurs

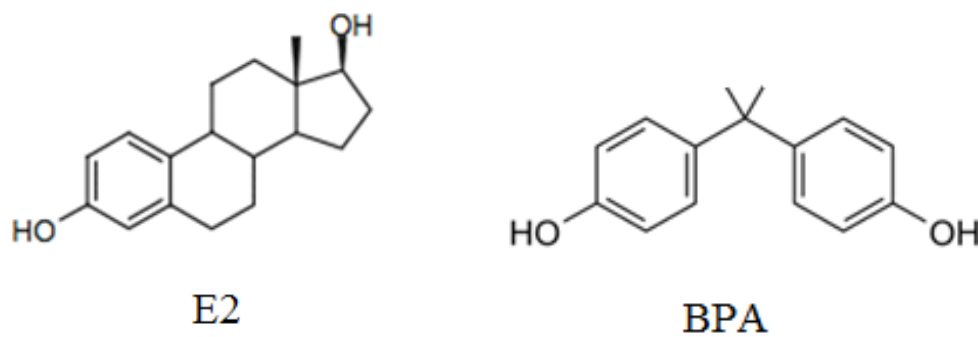


Figure 1 : Structure chimique de l'œstradiol (E2) et du bisphénol A (BPA)

Les récepteurs nucléaires des œstrogènes  $ER\alpha$  et  $ER\beta$  sont très présents dans notre organisme et participent à de nombreux processus physiologiques. Ils sont responsables de la mise en place et de la régulation de la fonction de reproduction aussi bien chez le mâle que chez la femelle. On les retrouve également à divers degrés d'importance au niveau du système nerveux central, du foie, des vaisseaux sanguins, du système immunitaire, des tissus adipeux et osseux. Après fixation du ligand activateur œstradiol ou BPA, les  $ER\alpha$  et  $\beta$  se lient à l'ADN soit directement, soit par le biais d'autres protéines facteurs de transcription. Ils sont ensuite responsables du recrutement de cofacteurs transcriptionnels et contribuent à la régulation de l'expression des gènes cibles des œstrogènes. Le bisphénol A agit seulement comme un agoniste partiel. Par exemple, certaines réponses *in vivo* de l'œstradiol sur l'utérus de souris ne sont pas observées avec le BPA comme l'augmentation du poids de l'utérus alors que d'autres sont maintenues comme l'activation de certaines enzymes à activité peroxydasique ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur de la progestérone [27]. Il semblerait également que le BPA ait la capacité de se lier à des récepteurs membranaires aux

œstrogènes. Ces derniers sont impliqués dans des réactions cellulaires, voire des activations génomiques par le bais de canaux calciques. Certaines études *in vitro* ont montré également que le BPA a la capacité de se lier au récepteur des androgènes (AR) et possède alors des effets anti-androgéniques [64].

Du fait de la faible affinité du BPA pour les récepteurs aux œstrogènes ER, les scientifiques ont des difficultés à expliquer l'observation de certains effets, en particulier ceux observés à de très faible dose chez l'animal. Classiquement, les effets des substances chimiques se liant à des récepteurs, sont décrits comme suivant une courbe monotone dose-réponse jusqu'à saturation du récepteur. Cependant, pour certains scientifiques, les substances chimiques environnementales dont le BPA ayant une activité hormonale ne répondraient pas à ce principe et pourraient provoquer à de faibles doses des effets opposés à ceux observés à fortes doses : certains récepteurs pouvant être stimulés à faibles doses et inhibés à fortes doses. L'interaction voire la synergie d'action de ces différents récepteurs (récepteurs ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR) pourrait également permettre d'expliquer les effets observés à faible dose.

#### d. Effets délétères avérés, suspectés ou controversés chez l'homme et l'animal

Le groupe d'experts, ayant rédigé le rapport d'étude sur les effets sanitaires du BPA, publié par l'ANSES en septembre 2011, a expertisé l'ensemble des publications sur le sujet. Il classe les effets potentiels du BPA en trois catégories : les effets avérés, les effets controversés et enfin ceux qui sont suspectés [1].

#### **Effets avérés**

Chez l'Homme, l'insuffisance de données scientifiques disponibles ne permet pas de conclure à un effet avéré. En outre, chez l'animal (rongeurs ou mouton), les effets suivants sont considérés comme avérés et entraînent les conséquences suivantes :

- Sur l'appareil reproducteur mâle, une diminution de la production spermatique après une exposition uniquement à l'âge adulte.

- Sur l'appareil reproducteur femelle, une augmentation de la survenue de kystes ovariens à l'âge adulte due à une exposition pré- et post-natale ; des modifications de l'endomètre (hyperplasie) à l'âge adulte dues à une exposition pré- et/ou post-natale ; des effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire entraînant des variations des taux d'hormones gonadotropes et les modifications de l'expression des récepteurs des stéroïdes sexuels dues à une exposition prénatale ; et un avancement de l'âge de la puberté lors d'exposition pré- et post-natales précoces.
- Sur le développement cérébral en lien avec une exposition pré- et/ou post-natale, des modifications du profil de neuro-différenciation en lien avec le dimorphisme sexuel, des altérations des systèmes aminergiques et glutamaminergiques, et des modifications de l'expression des récepteurs aux oestrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  et du nombre de neurones sensibles à l'ocytocine et à la sérotonine.
- Sur la glande mammaire, une accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire, le développement d'hyperplasies intracanales suite à une exposition pré- ou périnatale, et une augmentation de la susceptibilité des glandes mammaires à développer ultérieurement des tumeurs mammaires (lors de co-expositions avec un agent carcinogène) en lien avec une exposition fœtale ou périnatale ;
- Effets sur la lipogenèse, une hypertrophie des adipocytes, prédisposant à la surcharge pondérale, une augmentation de cholestérolémie et de la triglycéridémie, et une surexpression des gènes des protéines lipogènes suite à une exposition pré- et périnatale et chez l'adulte.

### **Effets suspectés**

Chez l'Homme, sur la base des données disponibles, les anomalies de la maturation ovocytaire dans un contexte de procréation médicalement assistée et les pathologies cardiovasculaires et diabète (une seule étude transversale) sont les deux effets considérés comme « suspectés ».

Chez l'animal, sont considérés comme suspectés les effets suivants :

- Effets sur le système reproducteur mâle (diminution des concentrations plasmatiques de testostérone, modification du comportement sexuel) dus à une exposition pendant la période pubertaire ;
- Modifications du comportement maternel (diminution du nursing et du comportement de nidification) en lien avec une exposition post-natale ;
- Effets sur la thyroïde avec des modifications variables de la Thyroxine 4 libre et totale selon le stade de développement post-natal, suite à une exposition prénatale ou néonatale ;
- Développement de lésions néoplasiques mammaires (carcinomes canauxaires *in situ*) après une exposition périnatale ;
- Effet sur l'intestin : augmentation de la réponse inflammatoire et diminution de la perméabilité intestinale à l'âge adulte chez des femelles exposées en période périnatale.

Chez l'homme sur la base des données disponibles, les effets du BPA sur le système reproducteur masculin sont considérés comme « controversés ». De plus, le groupe de travail a considéré que les données humaines disponibles étaient insuffisantes à ce jour pour conclure en ce qui concerne les effets sur l'endomètre (endométriase, hyperplasie), les ovaires polykystiques et les conséquence sur la fin de la grossesse (fausse-couches et prématurité), les troubles du comportement chez l'enfant, les effets sur la thyroïde et ceux sur le cancer du sein.

## II) Connaissances de l'exposition et de la pharmacocinétique chez l'homme : nécessité d'une approche allométrique

### a. Exposition humaine au Bisphénol A : facteurs de variation

Les données épidémiologiques obtenues à partir de prélèvements sanguins, d'urine, de lait maternel ou d'autres tissus indiquent que plus de 90 % des personnes vivant dans les pays occidentaux sont exposés au BPA.

Selon le rapport de l'EFSA publié en 2006, la classe de la population la moins exposée via une estimation de l'exposition totale au BPA basée sur l'analyse directe des valeurs de migration de BPA depuis les sources d'exposition identifiées (aliment, air, eau, poussière) et fonction des comportements de consommation, serait celle des adultes avec une exposition externe évaluée à 1,5 µg/(kg.j) [18]. Les nourrissons de 3 à 6 mois nourris au biberon constituent la classe d'âge la plus exposées avec 11 µg/(kg.j) pour les nourrissons de 3 mois et 13 µg/(kg.j) pour les nourrissons de 6 mois. D'autres auteurs confirment que les enfants de 0 à 6 mois nourris au biberon seraient les plus exposés et les adultes les moins exposés mais avec des valeurs très inférieures à celles de l'EFSA, respectivement 0,8 µg/(kg.j) et 0,03 µg/(kg.j) [25, 42]. Par contre dans ces études, l'exposition du nourrisson s'avère 25 fois plus élevées que celle des adultes, contre 10 fois plus pour le rapport de l'EFSA. De son côté, l'Anses considère, d'après les données de la littérature, que l'exposition des nourrissons résultant à la fois du biberon et de l'emballage du lait maternisé se situerait entre 0,2 et 2 µg de BPA/kg de poids corporel et par jour, soit 10 à 100 fois plus qu'un adulte. Une classe d'exposition moyenne a pu être définie à 0,07µg/(kg.j) et englobe les enfants de 6 à 11 ans [42].

En ce qui concerne l'exposition d'origine alimentaire, dans son rapport de 2010, l'INSERM estime qu'un adulte ingère en moyenne, uniquement par le biais de son alimentation, 0,03 µg de BPA/kg de poids corporel et par jour.

Toutes ces valeurs restent toutefois bien inférieures à la DJA fixée à 50 µg/kg de poids corporel et par jour en 2006 par l'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) [18]. Selon l'Anses, l'exposition du nourrisson au BPA, via le lait maternel ou le lait maternisé serait respectivement de l'ordre de 10 à 20 fois supérieure à celle résultant de la libération du monomère à partir du biberon lui-même. En effet, en 2009, sur la base d'une consommation journalière de lait de 174 mL/kg de poids corporel, les mesures actuelles de BPA dans le lait

(USA, Japon, Canada) montraient que les nourrissons étaient exposés entre 0,30 et 1,30  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{j})$  par le lait maternel, entre 0,20 et 2,10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  poids corporel/jour par le lait maternisé, et entre 0,02 et 0,12  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{j})$  par la migration à partir du biberon.

De nombreuses études, ont évalué à 1 ng/mL, la valeur médiane des concentrations plasmatiques en BPA non conjugué chez des adultes sains dans les conditions d'exposition environnementale. Dans un hôpital français, la présence de BPA a été démontrée dans 83 % des 207 échantillons plasmatiques humains testés. Par contre 12 % des échantillons présentaient des niveaux d'expositions supérieurs à 2 ng/mL [34]. Les femmes enceintes font partie d'une classe de la population très surveillée en raison de l'exposition du fœtus aux substances toxiques au cours de son développement. En effet, le fœtus est exposé à des concentrations significatives en BPA comme en témoigne la mise en évidence de ce composé dans le liquide amniotique, les tissus placentaires et le sang présent dans le cordon ombilical [42, 60]. Ces études suggèrent également que les femmes enceintes seraient jusqu'à 20 fois plus exposées que la population générale avec des niveaux d'exposition plasmatique compris entre 0,3 et 22 ng/mL et pouvant atteindre dans une étude de 2008 portant 300 femmes coréennes enceintes en bonne santé jusqu'à 66,48 ng/mL.

Cependant, tous les scientifiques soulignent l'incohérence entre ces valeurs de concentrations plasmatiques et les données d'exposition (en  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ ) actuellement disponibles. En effet, ces valeurs sont souvent très proches des limites de quantification des techniques analytiques et doivent donc être utilisées avec précautions. Il est donc préférable d'utiliser les quantités totales (BPA libre et conjugué) de bisphénol A éliminées dans l'urine comme biomarqueur de l'exposition humaine à ce contaminant.

Dans la plupart des études, les concentrations urinaires de BPA total, tout âge confondu, sont comprises entre 0,1 et 2,7 ng/mL et ce dans plus de 90% des échantillons testés, y compris ceux des femmes enceintes [8, 75, 78]. En ce qui concerne les individus les plus exposés, du BPA a été retrouvé dans 99% des prélèvements urinaires de 599 enfants allemands âgés de 3 à 14 ans [2], avec une moyenne géométrique de 2.66 ng/mL pour le BPA total, et chez 91% des nouveaux nés prématurés (n=41) [9] à un niveau d'exposition voisin de 30,3ng/mL, soit 11 fois l'exposition moyenne d'un adulte. Enfin des taux urinaires de BPA ont pu être calculés et sont respectivement de 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  chez l'adulte et de 3,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  chez les enfants.

Le BPA a également été retrouvé dans différents tissus chez l'homme, parmi lesquels le tissu adipeux, [55] à des concentrations moyennes de 17,46 +/- 14,82 ng/g de tissu adipeux chez l'enfant. Ces concentrations sont comparables à celles observées chez 20 femmes espagnoles qui s'étendaient sur une gamme de valeurs cependant très inférieure allant de 1,80 à 12,01 ng/g [21]. Auparavant, en 2001, une accumulation dans les graisses brunes des rongeurs avait d'ailleurs été démontrée expérimentalement après une exposition chronique, avec des concentrations 8 à 10 fois supérieures à celles observées dans le sérum des rongeurs [53]. Le BPA ne semble pas y être exclusivement stocké sous forme libre puisque du BPA libre n'a été détecté que dans 55% des prélèvements. La forme prédominante de stockage semble être un dérivé bi-chloré, le Cl<sub>2</sub>BPA, retrouvé dans 80 % des prélèvements de tissus adipeux humains et représentant 94,6 % de la totalité des dérivés chlorés (figure 2). Par chromatographie, du bisphénol F ainsi que d'autres dérivés chlorés (Cl-BPA et Cl<sub>3</sub>BPA) ont pu également être mis en évidence. Le Cl<sub>4</sub>BPA n'a par contre, jamais pu être détecté.

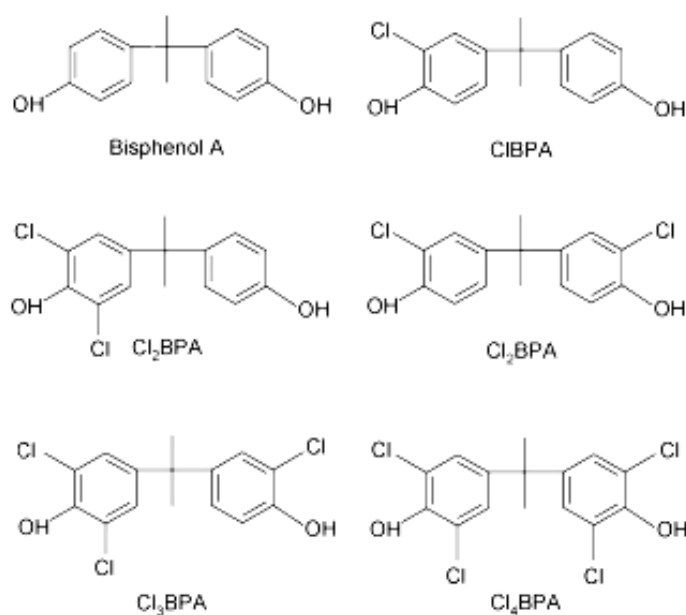


Figure 2 : Structure chimique du bisphénol A (BPA) et de ses dérivés chlorés

Ces constatations inquiètent la communauté scientifique, puisqu'il a été démontré en 2008, et ce à des concentrations beaucoup plus faibles que le BPA induisait une diminution de la production d'adinopectine dans le tissu adipeux via des explants de graisses humaines [31]. De plus, les faibles taux d'adinopectine sont corrélés avec une résistance des cellules à l'insuline et avec un état inflammatoire des tissus vasculaires (vascularites). Ces effets pourraient être impliqués dans l'incidence accrue de maladies cardiovasculaires et du diabète chez l'homme.



## b. Evaluation de la pharmacocinétique du Bisphénol A chez l'Homme

Il n'existe que trois études expérimentales menées sur la toxicocinétique du BPA chez l'homme adulte. Elles suggèrent toutefois que le BPA est totalement absorbé par la voie digestive, et qu'il est ensuite pris en charge par les enzymes intestinales et hépatiques de biotransformation, principalement celles responsables de la conjugaison des xénobiotiques. Lors de la première étude réalisée en 2002, 6 personnes (3 femmes et 3 hommes) ont ingéré 5mg de BPA marqué au deutérium sous forme de gélule en une prise unique [73]. Des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués à intervalles réguliers au cours des heures qui ont suivi l'administration. Les résultats obtenus indiquent que le pic des concentrations plasmatiques est atteint environ 80 minutes après l'ingestion. Le BPA circulant est ensuite retrouvé en totalité dans les urines 6 heures après administration, sous forme quasi exclusive de conjugué à l'acide glucuronique (BPA-G). Dans ce cas précis, une exposition aiguë et unique de 50 à 90 µg de BPA/kg de poids corporel conduit à des concentrations circulantes de BPAG pouvant atteindre 800 nmol/L soit 182,5 ng/mL (ou 182,5 µg/L) et à des concentrations urinaires d'environ 4 400 µg/L. En 2005, la même équipe [74] a répété l'expérimentation en décidant d'administrer une dose plus faible soit 25 µg de BPA via l'eau de boisson. Les niveaux urinaires ont été mesurés chez les 6 volontaires au cours des 7 h suivant l'ingestion. Le pic de concentrations urinaires a été observé entre une et trois heures post-administration et avoisinait les 9,6 µg/L. En moyenne, l'élimination urinaire totale semblait avoir lieu en 4h. Des travaux analogues menés par Tsukioka et coll., en 2004, chez un seul individu recevant par voie orale 100 µg de BPA deutéré indiquent une concentration urinaire maximale de 90 µg/L, 30 minutes après l'administration [68]. Une autre étude réalisée par la même équipe, la même année, sur 50 sujets recevant 50 µg de BPA par voie orale, révèle que 76% du BPA administré par voie orale a été retrouvé dans les urines au cours des 5h suivant son administration.

Afin de mieux comprendre l'exposition interne des adultes au BPA et la pharmacocinétique urinaire de BPA, une autre approche méthodologique, consistant en l'évaluation des concentrations urinaires et plasmatiques du BPA sur 48h (c'est à dire à partir de prélèvements répétés toutes les heures) chez 20 volontaires ayant une alimentation contrôlée, a été expérimentée en 2011 [66]. La consommation moyenne de BPA par les volontaires, a été évaluée à partir de l'excrétion urinaire totale du BPA à 0,27 µg/kg de poids corporel (0,03-0,86 µg/kg). Cette exposition correspond environ à 1,2 fois l'exposition

moyenne de la population générale. En revanche, les concentrations plasmatiques maximales, observées sur un court laps de temps, se sont avérées être 1,3 à 3,9 fois plus élevées que celle de la population générale. Cependant, il est important de noter que ces valeurs sont très disparates puisque dans 83% des 320 échantillons testés les concentrations plasmatiques en BPA total se sont révélées inférieures ou égales à la limite de détection. Les concentrations urinaires maximales de BPA ont été observées en moyenne 2,75 h après le début de la phase postprandiale (avec un intervalle de valeurs de 0,75 à 5,75 h) et environ 1h après l'apparition du pic plasmatique.

Chez l'enfant, une étude récente estime l'exposition de 81 enfants de l'Ohio âgés de 23 à 64 mois, à 109 ng/kg/j par le biais de l'ingestion d'aliments contaminés, à 0,27 ng/kg/j du fait de l'inhalation du monomère et à 0,06 ng/kg/j par le biais d'une autre source d'exposition. L'excrétion urinaire moyenne de ces enfants a été déterminée à 114ng/kg/j, ce qui confirme une élimination urinaire complète du xénoestrogène chez l'enfant comme chez l'adulte [51].

Ces travaux démontrent chez l'homme adulte une élimination rapide, en moins de 6h, et complète du BPA dans l'urine sous forme de BPA-glucuronide. Cependant, ils ne reflètent pas forcément les conditions d'exposition chronique au BPA de la population générale. De plus, en dépit des données nombreuses dont on dispose sur la toxicocinétique du BPA chez l'animal, plusieurs zones d'ombre subsistent. En premier lieu figure le fait qu'un jeûne de 24h ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'excrétion urinaire du BPA. En effet, la mise à jeun ne modifierait pas les concentrations urinaires de BPA total (libre et conjugué). Cependant, compte tenu de la demi-vie plasmatique du BPA de 4 à 6h et de l'exposition supposée quasi exclusivement alimentaire à cet agent chimique, une diminution progressive et substantielle des niveaux d'excrétion urinaire du BPA et/ou de ses métabolites devrait être observée au cours de ce jeun [63]. Le NHANES a réalisé, sur les années 2003 et 2004, des prélèvements urinaires sur une cohorte de 1469 adultes américains au long d'un jeun strict de 24h ayant uniquement accès à de l'eau. Il s'avère que les concentrations urinaires diminuent dans un premier temps entre 0 et 4,5 h de la mise à jeun, puis sont de nouveau observées à des taux similaires entre 8,5 et 24 h après le début du jeûne, voire même pour 7,5 % des participants à plus de 12 ng/mL ; ce qui est très nettement supérieur à la moyenne de concentration urinaire pour la population générale de 2,7 ng/mL [8]. Les enfants de moins de 18 ans ont été exclus de cet échantillonnage du fait selon les auteurs d'un temps d'élimination

plus court que celui des adultes en relation avec un index de masse corporelle plus variable et complexe chez les enfants et les adolescents. Les personnes de plus de 85 ans n'ont également pas été prises en compte, du fait d'un déficit probable de la fonction rénale pouvant affecter la clairance du BPA et son volume de distribution. Durant la mise à jeun, certains participants ont avoué avoir consommé du thé, du café, de l'alcool, des chewing-gums, des bonbons à sucer, des pastilles pour la gorge, des médicaments (laxatifs, anti-diarrhéiques, antiacides) ou des suppléments diététiques. Cependant cela ne semble pas avoir impacté l'excrétion urinaire du BPA chez ces individus. Ces données suggèrent donc aux auteurs que les cinétiques d'élimination observées pour une dose unique ne peuvent être extrapolables à une exposition continue, et qu'il pourrait exister une ou plusieurs autres sources d'exposition au BPA non négligeables telle que l'eau, et/ou que le BPA pourrait être stocké puis libéré à partir d'un compartiment physiologique tel que le tissu adipeux. Une source potentielle autre qu'alimentaire, pourrait être l'eau, puisqu'il a été démontré une migration sur 24h, à partir de tuyauterie en PVC de l'ordre de 329 ng de BPA chloré/mL d'eau de ville à température ambiante [77]. Ces canalisations sont couramment utilisées pour l'approvisionnement en eau courante des résidences de nombreuses villes. De plus, le cumul des différentes sources d'exposition dont le contact cutané ou l'inhalation, ne doit pas être négligé.

Enfin, les auteurs ont suggéré une accumulation possible du BPA dans le tissu adipeux en raison des propriétés lipophiles du monomère avec un coefficient de partage octanol-eau estimé entre 2,2 et 3,82. Cela pourrait ainsi conduire à une élimination prolongée du BPA suite à une libération progressive au fil du temps à partir d'un lieu de stockage endogène. Cette théorie ne semble pas irrationnelle en raison des taux de BPA retrouvés dans les tissus adipeux chez l'homme et les rongeurs, cités précédemment. Une étude récente réfute cette hypothèse [17]. En effet, après une administration intraveineuse à la dose de 100µg/kg à des souris adulte, il s'est avéré que les concentrations maximales de BPA au sein du tissu adipeux sont retrouvées 0,25h après l'administration i.v., et que le temps de demi-vie au sein de ce tissu a été estimé à 7h soit équivalent au temps de demi-vie plasmatique qui était de 6,6h. De plus, les concentrations de BPA retrouvées dans le tissu adipeux de ces souris, 24h après l'administration i.v., sont inférieures à 0,01% de la dose totale administrée ce qui montre bien que le tissu adipeux ne semble pas apparaître comme un compartiment physiologique de stockage du BPA.

Par ailleurs, toutes les études de pharmacocinétiques menées chez l'Homme et citées précédemment, sont contestées par une partie de la communauté scientifique qui considère qu'elles portent sur un nombre trop faible d'individus ou de prélèvements et utilisent des approches analytiques qui comportent des biais méthodologiques. Par exemple, dans la dernière étude citée, il n'avait été fait qu'un seul dosage par individu (n=129) pour modéliser l'élimination urinaire chez l'Homme.

### c. L'approche allométrique

Chez les espèces animales appartenant aux mêmes embranchements phylogénétiques, il existe une relation entre le poids corporel total, le poids des différents organes et les paramètres physiologiques qui caractérisent les fonctions de ces organes. Cette relation dite allométrique permet de prédire de façon plus ou moins exacte le poids ou le fonctionnement de divers organes chez ces espèces en fonction de leur poids ou de leur taille. En effet, la plupart des caractères biologiques suivent une fonction puissance de la taille ou du poids du corps de la forme (Equation 1).

$$Y = a * X^b \quad \text{Equation 1}$$

Avec  $Y$  le paramètre d'intérêt à prédire comme le poids d'un organe ou une caractéristique physiologique comme la fréquence cardiaque,  $a$  un terme qui est propre à chaque relation,  $X$  le poids corporel et  $b$ , le coefficient allométrique qui correspond à la pente de la droite de régression linéaire définie par l'équation 2, obtenue par transformation logarithmique de l'équation 1.

$$\text{Log } Y = \text{Log } a + b \text{ Log } X \quad \text{Equation 2}$$

L'équation 2 est utilisée pour estimer les deux paramètres de la relation allométrique, c'est à dire  $a$  et  $b$  par régression linéaire. L'intérêt de la transformation logarithmique est de compresser les données sur l'échelle des abscisses «  $X$  » ce qui permet de représenter des espèces animales de poids corporels très différents et surtout de linéariser la relation qui sera représentable graphiquement par une ligne droite dont l'ordonnée à l'origine est «  $\text{Log } a$  » et «  $b$  » la pente de cette droite.

A titre d'exemple, nous montrons sur la figure 3, la relation entre le poids corporel des mammifères domestiques et leur pression artérielle moyenne au stade foetal et chez l'adulte [29].

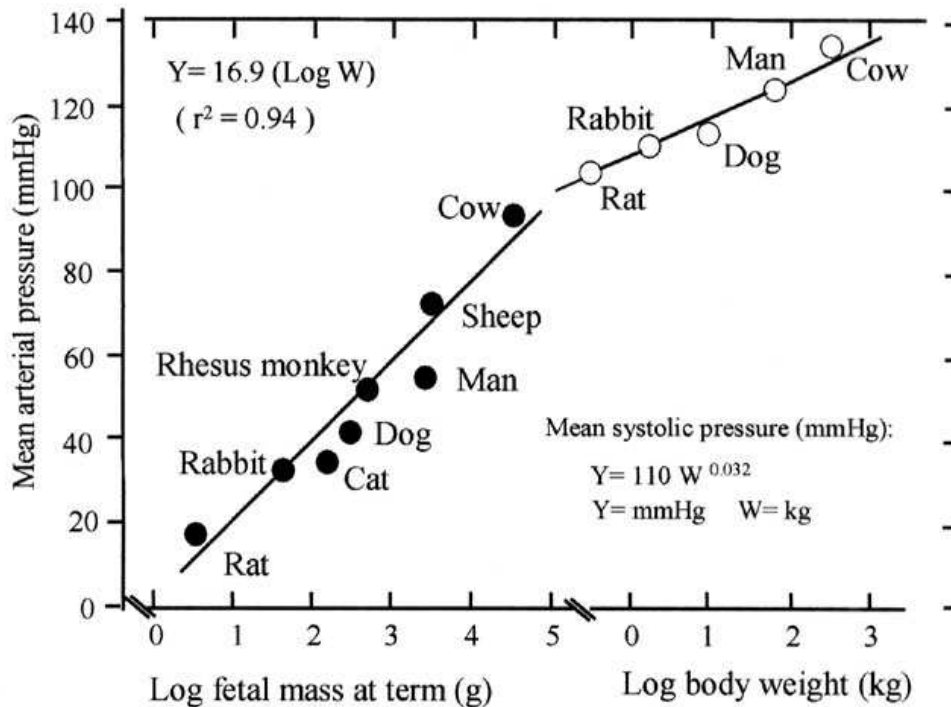


Figure 3 : Représentation graphique de la droite de régression illustrant la relation allométrique existant chez les mammifères domestiques entre le poids corporel et la pression artérielle moyenne au stade foetal et chez l'adulte (d'après [29]).

Un autre exemple, figure 4, venant de la pharmacologie vétérinaire est la relation allométrique entre le poids corporel et les différents paramètres pharmacocinétiques de la gentamicine : clairance, temps de demi-vie, et volume de distribution, chez les mammifères domestiques [15].

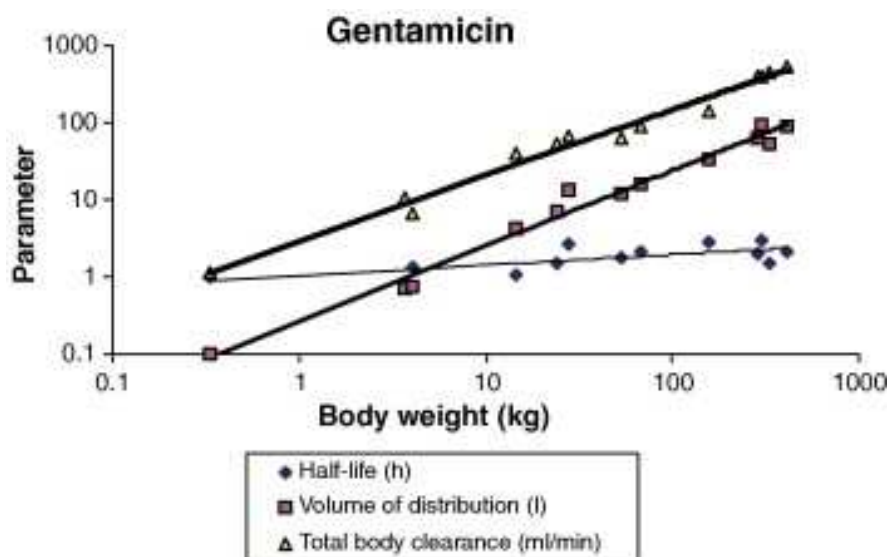


Figure 4 : Représentation graphique de la droite de régression linéaire illustrant la relation allométrique existant entre le poids corporel et les différents paramètres pharmacocinétiques de la gentamicine : clairance, temps de demi-vie, et volume de distribution, chez les mammifères domestiques (d'après [15])

A partir de ce type de relation allométrique, on peut estimer pour une nouvelle espèce la valeur d'un paramètre à partir de son poids corporel. En particulier, la détermination expérimentale de la clairance plasmatique du BPA chez l'homme à partir de celle des espèces animales. L'obtention de ce paramètre pharmacocinétique chez l'Homme permettrait ainsi de pouvoir mieux relier les mesures plasmatiques et urinaires à l'exposition environnementale de l'Homme au BPA et contribuerait fortement à l'estimation du risque que représente ce contaminant pour la population générale.

#### L'approche allométrique de la clairance du BPA

Il n'existe qu'une seule approche allométrique des paramètres pharmacocinétiques du BPA. Elle a été établie en 2002 pour 4 espèces mammifères : la souris, le rat, le lapin et le chien suite à une administration intraveineuse de 1 à 2 mg/kg de BPA [11]. Cependant, cette relation ayant été établie sur des espèces animales de poids corporel inférieur à celui de l'Homme. Elle oblige donc à extrapoler à l'Homme la droite de régression linéaire. Cette extrapolation a rendu très imprécise l'estimation de la clairance du BPA chez l'homme avec une large fourchette de valeur comprise entre 46 et 127,1 L.h<sup>-1</sup> pour un homme de 70 kg. Le temps de demi-vie et le volume de distribution déterminés de la même manière selon deux relations allométriques ont été estimés respectivement entre 43,6 et 196,2 min et entre 125,3 et 229,7 L.

### III) Exposition au bisphénol A et connaissances toxicocinétiques expérimentales chez les mammifères

#### a. Le métabolisme du Bisphénol A : caractéristiques communes aux différentes espèces de mammifères

Après une administration orale de BPA, la biodisponibilité du BPA par voie orale chez les mammifères étudiés (souris, rat, lapin, chien, porc, mouton et singe) est faible, de l'ordre de 1 à 2 % [16, 79].

Après administration par voie orale, les études chez différentes espèces (rats, souris, mouton, porc, chien, singe) ont montré que l'absorption gastro-intestinale du BPA semble rapide et complète. L'analyse des aires sous la courbe (AUC) des concentrations plasmatiques en fonction du temps, montre que l'absorption est supérieure à 85% chez le rat et le singe. Après une administration orale de BPA à la dose de 100mg/kg, la fraction de BPA absorbée dans la veine porte, via les veines mésentériques, est de 100%, chez le rat, la souris, le mouton, le porc et le chien (UMR 1331 – TOXALIM Physiologie ENVT) [12, 13]. Ce qui signifie que la totalité de la dose de BPA administrée est absorbée au niveau digestif pour rejoindre la circulation portale. Les expérimentations menées chez l'Homme adulte à des doses relativement faibles (0,025 à 5 mg total) montrent que le BPA est également totalement et rapidement absorbé par voie digestive [68, 73, 74]. Le BPA franchit donc la barrière intestinale pour rejoindre la circulation sanguine. Après une administration unique, le pic plasmatique est atteint environ 80 minutes après l'ingestion.

Cependant, selon divers études, une fraction de ce composé pourrait être avant même son absorption, glucurono-conjuguée par des UGT-glucuronosyltransférase au sein des entérocytes et cela en moindre proportion chez l'homme que chez le rat. Ensuite, une fois absorbé, le BPA subit un fort effet de premier passage hépatique et ce chez toutes les espèces étudiées. La métabolisation au cours de son premier passage dans le foie, via la circulation portale drainant la totalité du tube digestif, est catalysée par des enzymes de glucurono-conjugaison dites de phase II. Les enzymes UDP-glucuronosyltransférase (ou UGTs, uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase) fixent un cofacteur, l'acide UDP-glucuronique, composé hydrosoluble, sur le xénoestrogène afin de le rendre hydrosoluble et de pouvoir permettre son élimination (figure 5); c'est la glucurono-conjugaison du BPA. Les UGTs sont

présentent dans d'autres tissus que le foie, tel que l'intestin et le placenta. Le métabolisme de biotransformation du BPA en BPA-G est considéré comme un mécanisme de détoxification de l'organisme, puisque le BPA-G ne possède pas d'activité oestrogénique. En effet, il est incapable de se lier aux récepteurs aux oestrogènes (ER).

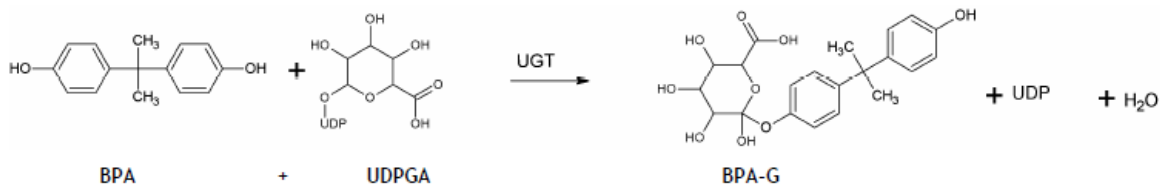


Figure 5 : Réaction de glucurono-conjugaison du BPA en BPA-G par les UGTs.

*UDP : uridine diphosphate ; UGT : UDP-glucuronosyltransférase ; UDPGA : acide UDP-glucuronique ; BPA-G : BPA-glucuronide*

Le BPA-Glucuronide (BPA-G) ainsi formé, est un composé  $\beta$ -glucurono-conjugué plus hydrophile que le BPA qui peut donc rejoindre la circulation générale, à partir de laquelle il sera éliminé dans les urines.

La métabolisation de toute substance ainsi que son action sur les cellules cibles dépend de sa capacité à pouvoir se lier aux récepteurs cibles ou aux divers enzymes de détoxifications. Il est donc important de connaître la fraction libre de ce composé dans le plasma, c'est-à-dire la fraction non liée aux protéines plasmatiques. En ce qui concerne le BPA, la forme libre ne représente environ que 5 à 10% de la quantité circulante. L'Homme et le singe semble disposer d'une fraction liée aux protéines plasmatiques légèrement plus importante que le rat.

Il a également été décrit des réactions de sulfo-conjugaison du BPA. Elles ont été observées *in vitro* sur des hépatocytes de rat, de souris, de singe, et d'homme [38]. Toutefois, les composés glucurono-conjugués restent de loin très majoritaires par rapport aux produits sulfo-conjugués. Les données recueillies chez l'Homme montrent que le BPA-glucuronide est le métabolite majoritaire puisqu'il représente plus de 90 % de la forme circulante du BPA total et des métabolites urinaires. Le BPA-sulfate a pu être identifié et quantifié de manière non systématique dans les urines de 30 sujets coréens masculins et féminins [36]. Chez les hommes, les concentrations urinaires de BPA-sulfate (BPA-S) et BPA-glucuronide (BPA-G) étaient respectivement de 0,49 +/- 0,27  $\mu\text{g/L}$  et 2,34 +/- 0,85  $\mu\text{g/L}$  alors que chez les femmes



ces concentrations étaient respectivement de 1,20 +/- 0,32 µg/L et 1,0 +/- 0,34 µg/L. Les données *in vitro* et *in vivo* chez le rat suggèrent que le BPA-S représente un métabolite mineur chez toutes ces espèces puisque le BPA-S présent *in vivo* dans les urines de rat ne représenterait que 3 à 7% de la dose administrée. [40, 57].

Les données précédemment obtenues lors d'une étude pharmacocinétique comparative au laboratoire ont montré que le BPA-G est le principal métabolite formé chez le mouton, le porc et le chien. En effet, la fraction de la dose totale de BPA métabolisée sous la forme de BPA-G est supérieure à 98 %. Le BPA-G est principalement éliminé dans les urines chez le mouton (89,7 +/- 9,1 %) et le porc (98,9 +/- 12,2 %), alors qu'il est essentiellement éliminé par une autre voie d'élimination chez le chien [12,13]. Le BPA qui échappe à l'effet de premier passage hépatique peut être directement éliminé dans les urines.

Chez les rongeurs, une autre voie d'élimination du BPA-G a été décrite via la bile par le biais d'un transport actif. Environ 65% du BPA-G produit lors du premier passage hépatique est sécrété dans la bile. Il est conduit par le canal cholédoque pour être déversé dans le duodénum. Une fois dans le tube digestif, le BPA-G peut alors être hydrolysé en BPA par des bactéries de type entérobactéries ou bactéries du genre *Clostridium*, commensales du tube digestif possédant une activité  $\beta$ -glucuronidase et être réabsorbé ou bien éliminé dans les fèces. Le BPA réabsorbé dans les parties distales du tube digestif, caecum ou colon, non drainées par le système porte pourrait ainsi échapper à l'effet de premier passage hépatique [71]. L'hypothèse de l'existence d'un cycle entérohépatique chez le rat a pour origine l'observation de fluctuations des concentrations en BPA au cours de la phase de métabolisation et a ensuite été confirmé *in vitro* via la perfusion de foie de rat *ex vivo*.

L'excrétion biliaire ne semble pas avoir lieu chez l'homme, ce qui a pour conséquence une élimination essentiellement rénale du BPA-G. En effet, les deux études de pharmacocinétique du BPA réalisées chez l'Homme ont estimé la demi-vie du BPA chez l'homme entre 4 et 6 heures [74, 75] et une élimination complète du BPA sous forme de BPA-G dans les urines en 24 heures, alors que les données chez le rat font état d'une demi-vie comprise entre 0,62 heures soit environ 37 minutes [11] et 38,5 heures [71]. La clairance du BPA-G a été estimée à une valeur équivalente au débit de filtration glomérulaire soit de l'ordre de 2,16 mL/(kg.min). Tsukokia et al. ont également montré que chez l'homme 75% du

BPA administré par voie orale est éliminé dans les urines au cours des 5h suivant son administration [68]. Cependant, ces études sont contestées par une partie de la communauté scientifique qui considère qu'elles portent sur un nombre d'individus trop faible (inférieur à 6) [68, 74], et qu'elles ont été réalisées avec des techniques analytiques insatisfaisantes.

Chez le rat, en raison de l'existence du cycle entéro-hépatique, entre 75 et 80% de la dose totale de BPA administrée est éliminé sous sa forme inchangée dans les fèces. Seulement 20 à 35% serait éliminé sous forme de BPA-G dans les urines comme chez les autres espèces. Cette variabilité dans le processus d'élimination du xénobiotique est expliquée par l'existence d'un poids moléculaire seuil pour une excrétion biliaire. Ce dernier étant plus faible chez le rat, le cobaye et chez le chien que chez l'Homme.

La principale source d'exposition au BPA est la voie alimentaire ; jusqu'à présent l'exposition interne au BPA, qui est mesurée par les concentrations plasmatiques et/ou sériques en BPA, a été quantifiée uniquement après une administration de BPA par voie orale sous la forme d'un bolus que ce soit chez l'Homme ou les rongeurs. Une étude a été réalisée avec pour objectif de comparer l'exposition interne au BPA selon les modalités d'administration chez la souris adulte [12, 13]. Les souris adultes ont soit reçu une administration unique de BPA *d-6* à la dose de 20 mg/kg par voie orale sous la forme d'un bolus, soit elles ont été nourries *ad libitum* avec un aliment contenant 100 mg/kg de BPA *d-6* pendant 7 jours. Les concentrations sériques en BPA *d-6* ont été analysées par une dilution isotopique en LC/MS/MS et comparées entre les 2 groupes pendant les 24 premières heures et après 1 et 7 jours chez les souris nourries avec l'aliment. Dans le cas de l'administration en bolus, la concentration maximale en BPA est obtenue une heure après ingestion. En revanche, après ingestion continue via la nourriture, la concentration sérique maximale de BPA a été atteinte 6 h après le début de la distribution de l'aliment contenant le BPA *d-6*. Il a alors été démontré que la biodisponibilité relative du *d-6* BPA est supérieure chez les souris exposées par la nourriture comparativement aux souris qui ont reçu une administration unique de BPA *d-6*, malgré une absorption relative plus faible. Ces résultats suggèrent un effet inhibiteur de la prise alimentaire sur l'effet de premier passage hépatique, également appelé « food-effect ». Enfin, lorsque les souris ont été exposées *via* la nourriture, les concentrations sériques en BPA ont été supérieures au bout de 7 jours, comparativement au premier jour ce qui suggère un discret effet cumulatif lié à l'exposition « chronique ». L'exposition interne de l'individu,

serait donc sous-estimée lors d'une administration unique par voie orale sous la forme d'un bolus par rapport à une exposition répétée *via* la nourriture chez la souris. Ce résultat suggère que l'exposition continue des animaux par la nourriture serait plus prédictive de l'exposition interne au BPA que l'administration sous la forme d'un bolus pour évaluer le risque pour la santé humaine lié à une exposition environnementale au BPA.

#### b. Paramètres pharmacocinétiques du bisphénol A chez les mammifères

Le principal argument avancé par l'EFSA pour ne pas prendre en compte les effets des faibles doses observés chez les rongeurs est la différence de toxicocinétique du BPA entre l'homme et les rongeurs, expliquée précédemment [19]. Afin d'essayer de trouver des réponses vis-à-vis des inquiétudes quant à l'exposition chronique de l'homme à de faibles taux de BPA, et à la sous-estimation de la dose journalière admissible (DJA) de 50 µg/(kg.j) la communauté scientifique tente de mieux comprendre et mesurer les différents paramètres pharmacocinétiques chez les mammifères dont l'Homme.

Le Tableau I regroupe les connaissances actuelles sur les différents paramètres pharmacocinétiques du BPA estimés suite à une administration intraveineuse (i.v.) à des doses comprises entre 0.01 et 10 mg/kg chez différentes espèces animales.

**Tableau I** : Paramètres pharmacocinétiques du BPA (clairance, temps de demi-vie, volume de distribution) estimés après une administration intraveineuse de BPA à des doses comprises entre 0.01 et 10 mg/kg chez différentes espèces.

<b>Espèce</b> Souches	<b>Dose</b> mg/kg	<b>Clairance plasmatique (Cl)</b> mL/(kg.min)	<b>Temps de demi- vie (t1/2)</b> H	<b>Volume de distribu- tion (Vd)</b> L	<b>Débit sanguin hépatique (Qh)</b> mL/(kg.min)	<b>Coefficient d'extraction hépatique (Eh)</b>	<b>Références</b>
<b>Souris</b> <i>CD-1</i>	2	208	0,67	0,1	107	1,94	11
<i>CD-1 (f)</i>	5	54	9,1	0,326	187,5	0,288	12 et 13
<i>CD-1</i>	0,1	167	6,6	0,51	204,8		17
<b>Rat</b>							
<i>Sprague-Dawley</i>	1	109	0,62	1,3	64a	1,7	11
<i>Sprague-Dawley</i>	0,1	75	0,66	1,1	64a	1,1	16
<i>DA/Han</i>	10	10	38,5	ND	64a	0,15	71
<i>Sprague-Dawley</i>	0,1	107	0,9	1,4	64a	1,6	79
<i>Wistar (m)</i>	5	64,2	3	2,727	95	0,676	12 et 13
<b>Lapin</b>	1	89	0,68	7,1	50a	1,78	11
<b>Chien</b>	1	43	0,72	20	43a	1	11
<i>Beagle (f)</i>	5	29,2	0,9	12,24	39,4	0,740	12 et 13
<b>Singe rhésus</b>	0,1	7,6	3,6	2,3	45a	0,16	16
<b>Porc</b>	5	56,4	1,9	69,44	32,4	1,74	12 et 13
<b>Mouton</b>	5	25	1,3	55,53	25,2	0,99	12 et 13
<b>Homme</b>		30 (b) 28 (c)	0,72 1,28	125,3 141,8	35a	0,85 0,8	11 62

Légende :

a : débit sanguin hépatique estimé à partir de l'équation allométrique de [Boxenbaum 1980], ( $Q_h = 0,0554 * P^{0.894}$  avec P en kg et Qh en L/min) [4] ;

b : clairance plasmatique estimée par une approche allométrique ;

c : clairance plasmatique estimée à l'aide d'un modèle physiologique-pharmacocinétique ;

Dans une étude menée à l'ENVT, il a été montré qu'après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5 mg/kg, la clairance du BPA varie de 25,0 mL/(kg.min) chez le mouton à 64,2 mL/(kg.min) chez le rat [12 et 13]. En regroupant toutes les données bibliographiques, on remarque que la clairance du BPA chez le rat et la souris sont très différentes d'une étude à l'autre, variant d'un facteur 10 chez le rat (10 *versus* 109 mL/(kg.min)) et d'un facteur 4 pour des souris d'une même souche (54 *versus* 208 mL/(kg.min)). Pour le rat, nous pouvons supposer que cette grande variabilité peut être imputable à la différence de souche puisque pour une même souche *Sprague-Dawley*, cette variabilité est moins importante quel que soit la quantité de BPA injecté. Pour le lapin et le singe, une seule étude a permis d'estimer la clairance plasmatique du BPA respectivement chez ces deux espèces à 89 mL/(kg.min) et 7,6 mL/(kg.min). La Clairance du BPA-G, quant à elle a été estimée au laboratoire comme étant 10 fois inférieure à celle du BPA (comprise entre 1,7 et 14,4 mL/(kg.min)), et son temps de demi-vie a été évalué à des valeurs de 2,5 (chez le mouton, le porc et la souris) et 10 fois supérieure à celui du BPA (chez le chien et le rat), 1,3 +/- 0,6 h *versus* 5,0 +/- 2,3 h chez le mouton.

Il n'existe que deux études qui ont estimé la clairance du BPA chez l'Homme. Toutes deux se basent sur l'utilisation de modèles animaux mais selon deux approches différentes : une approche allométrique [11] et une approche basée sur la réalisation d'un modèle physiologique-pharmacocinétique (PB-PK) chez le singe [62]. Ces deux méthodes ont donné des résultats équivalents avec une clairance plasmatique du BPA de 30 et 28 mL/(kg.min) respectivement pour la relation allométrique établie pour 4 espèces animales (la souris, le rat, le lapin, et le chien) et le modèle PB-PK.

En accord avec une valeur élevée de la clairance plasmatique du BPA, précédemment décrite, le temps de demi-vie d'élimination du BPA est généralement inférieur à 1 heure dans la majorité des études citées dans le Tableau I. En effet, le temps de demi-vie du BPA est court, de l'ordre de 1 à 2 heures chez le mouton, le porc et le chien. Alors que chez le rat et la souris, il atteint des valeurs bien supérieures, entre 0,6 et 3 h chez le rat et entre 0,7 et 9 h chez la souris. Une seule étude réalisée chez le rat a estimé la demi-vie du BPA à une valeur très supérieure, de l'ordre de 40 heures [71].

Le volume de distribution du BPA est proche de 1L chez le rat, avoisine les 300mL chez la souris alors qu'il est compris entre 7 et 20 L pour le chien et le lapin, et atteint même 55 à 70 L chez le porc et le mouton.

Enfin, d'un point de vue pharmacocinétique, l'étude comparatiste de l'UMR-1331 TOXALIM a pu démontrer que lorsque les concentrations plasmatiques en BPA sont faibles, comme lors de l'exposition environnementale quotidienne chez l'Homme, l'excrétion urinaire de BPA augmente de manière proportionnelle à la concentration plasmatique en BPA [12 et 13]. A l'inverse, lorsque les concentrations plasmatiques sont très élevées, l'élimination du BPA est non linéaire et tend vers une vitesse d'excrétion maximale dite  $V_{\max}$ .

Ainsi, les très rares études pharmacocinétiques du BPA réalisées chez l'homme adulte, suggèrent que le BPA est rapidement métabolisé et que son élimination est complète, 24h après son entrée dans l'organisme [73]. En effet, Tsukokia et al. ont montré en 2004 chez l'homme, que 75% du BPA administré par voie orale est éliminé dans les urines au cours des 5h suivant son administration [68]. Cependant, ces études sont contestées par une partie de la communauté scientifique qui considère qu'elles portent sur un nombre d'individus trop faible, et sont fondées sur des techniques analytiques qui comportent des biais méthodologiques. Etant donné les difficultés liées à l'administration du BPA chez l'Homme et à l'estimation de sa clairance chez l'Homme, l'utilisation d'une autre approche méthodologique est considérée comme une alternative indispensable, ayant la capacité de contribuer à l'évaluation du risque lié à une exposition environnementale au BPA.

L'UMR 1331 TOXALIM, INRA-ENVT a développé une méthode analytique sensible de quantification du BPA et du BPA-Gluc par LC-MS-MS [41] et a développé une approche comparatiste de l'étude de la distribution et de l'élimination du BPA chez différentes espèces de mammifères (porc, brebis, chien, rat, souris). Chez toutes les espèces étudiées, il apparaît que le BPA subit un fort effet de premier passage hépatique (coefficient d'extraction hépatique (Eh) supérieur à 0,7). Un coefficient d'extraction hépatique supérieur à 0,7 signifie que plus de 70% du BPA arrivant au foie via la circulation portale, y est instantanément glucurono-conjugué et ne repart pas dans la circulation générale. De ce fait une des hypothèses majeures de cette équipe est que la clairance plasmatique du BPA est limitée par le débit sanguin hépatique propre à chaque espèce.

Enfin, étant donné que le débit sanguin hépatique est lui-même défini par une relation allométrique [4] :  $Q_h = 0.0554 * P^{0.894}$  avec  $Q_h$ , le débit sanguin hépatique et  $P$ , le poids corporel (Boxenbaum, 1980), nous formulons l'hypothèse selon laquelle la clairance plasmatique du BPA répond elle aussi à une relation allométrique (Figure 4). Afin d'estimer

la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme à partir de cette approche comparatiste, il convient d'établir une relation allométrique robuste ; malheureusement les 5 espèces animales testées avaient toutes un poids corporel inférieur à celui de l'homme. Comme nous l'avons expliqué dans notre partie bibliographique, cela interdit donc d'interpoler les valeurs de l'homme et oblige à extrapoler la relation allométrique pour des poids non testés ce qui rend très imprécises voire incertaines les valeurs estimées.

L'approche modélisatrice, utilisée par l'UMR 1331 TOXALIM a montré que la très faible biodisponibilité du BPA après l'administration orale n'était pas liée à un défaut d'absorption, mais à un fort effet de premier passage hépatique ( $E_h > 0,7$ ). De plus, après l'administration orale, les concentrations plasmatiques de BPA-G diminuent parallèlement aux concentrations plasmatiques de BPA [12 et 13]. Ce résultat suggère donc que l'élimination du BPA-G est limitée par sa formation à partir du BPA, et que la vitesse d'élimination du BPA est limitée par sa vitesse d'absorption. Ce phénomène, appelé « flip-flop », a été observé chez toutes les espèces après l'administration orale de BPA. L'administration de BPA par voie intraveineuse représente donc la seule voie d'administration permettant d'évaluer les véritables paramètres pharmacocinétiques d'une substance (clairance, temps de demi-vie et volume de distribution) et donc d'analyser la variabilité interspécifique.

La Figure 6 représente la relation allométrique entre la Clairance plasmatique du BPA et le poids corporel (P) chez cinq espèces mammifères : la souris, le rat, le chien, le porc et le mouton [12 et 13].

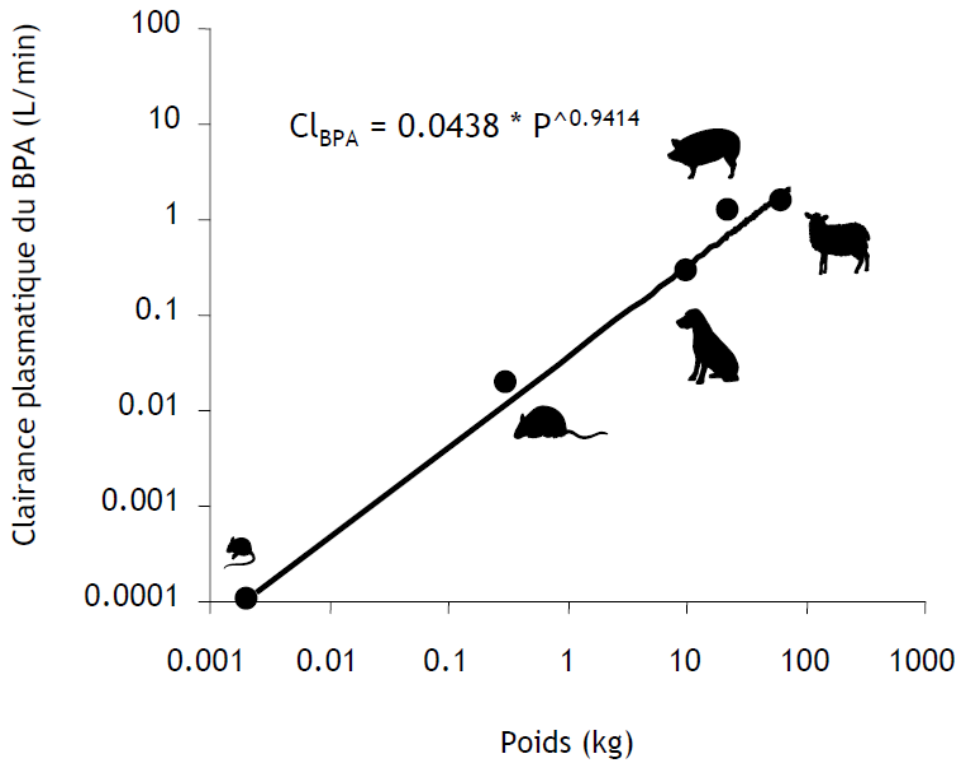


Figure 6 : Graphique représentant la relation allométrique ( $Cl_{BPA} = 0,0438 \times P^{0,9414}$ ) reliant la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel de 5 espèces animales : la souris, le rat, le chien, le porc et le mouton (d'après [13]).

La Figure 6 suggère que la clairance plasmatique du BPA augmente linéairement avec le poids corporel chez les cinq espèces étudiées. Cette relation a été ajustée par régression linéaire, après une double transformation logarithmique. Les paramètres de la relation allométrique ont alors été estimés à  $a = 0,0438$  et  $b = 0,9414$ . Cette droite de régression permet d'expliquer la quasi-totalité des variabilités inter espèces avec une variance expliquée supérieure à 99% ( $R^2 = 0,9924$ ).

L'objectif de notre étude a donc été de déterminer la clairance plasmatique du BPA chez le cheval afin de consolider la relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel précédemment établie sur cinq espèces mammifères ; l'apport d'une sixième espèce ayant un poids nettement plus élevé que celui de l'homme a non seulement pour effet d'apporter des données supplémentaires mais surtout de permettre d'utiliser la nouvelle régression en interpolant les valeurs de l'homme et non comme précédemment en extrapolant la droite en dehors du domaine des poids ayant été utilisés pour l'établir.



## **PARTIE 2 : Approche expérimentale de la disposition du Bisphénol A chez le cheval et établissement d'une relation allométrique chez les mammifères**

### I) Matériels d'étude

#### a. Matériel test

##### i. Identification du matériel test : le Bisphénol A

Le Bisphenol A, de formule chimique  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$  se présente sous la forme d'une poudre blanche. Son poids moléculaire est de 228.29 g/mol. La pureté de la formulation utilisée pour cette étude (Fournisseur : Sigma-Aldrich ; référence : 239658) est supérieure ou égale à 99 %.

##### ii. Préparation du matériel test pour administration intraveineuse

Pour chaque solution de BPA, une pesée a été réalisée la veille de l'administration et le BPA a été conservé dans un flacon ambré à l'abri de la lumière. La mise en solution a été réalisée le jour même avant le début de la cinétique. Afin d'éviter toute source de contamination ultérieure, l'ensemble de la préparation des solutions de BPA a été réalisée dans une pièce dédiée à la préparation des solutions à administrer. Le matériel utilisé a été nettoyé à l'alcool, solvant pour lequel le bisphénol A a une grande affinité, en plus du protocole de nettoyage classique.

Pour l'administration intraveineuse, le BPA a été préparé dans un mélange de solvant (éthanol : PEG, v:v, 1 :49) à la concentration de 50 mg/mL. Cette solution a été utilisée pour l'administration i.v. sous la forme d'un bolus de 2.5 minutes à la dose de 5mg/kg. Le volume de solution à administrer a été ajusté au poids corporel de chaque animal déterminé au cours des 24h à 72h précédant l'administration, soit un volume de l'ordre de 45mL (pour un poids corporel de l'ordre de 450 kg). Un volume minimum de 300 mL de cette solution d'administration a été préparé pour assurer la totalité des administrations du groupe de quatre chevaux. Une fraction aliquotes de 500 $\mu$ L de cette solution a été conservé à -20°C afin d'évaluer la concentration initiale de la solution administrée.

## b. Système biologique

### i. Description

L'étude a été réalisée avec 4 chevaux, 2 hongres et 2 femelles, d'un poids moyen de 460 kg.

#### Identification des chevaux :

- 1- Utopie, jument grise, de 21 ans, origine non constatée type selle, 470kg
- 2-Premier de Charlas dit « Premium », hongre alezan, de 8 ans, cheval de selle, 530kg
- 3-Caramel, hongre bai, de 21 ans, origine inconnue type poney, 435kg
- 4-Coquette, jument noire pangarée, de 9 ans, origine non constatée type selle, 415kg

### ii. Origine des chevaux

Les chevaux proviennent du Centre équestre de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), ou de la clinique vétérinaire équine de l'ENVT.

### iii. Conditions d'entretien et d'hébergement

Les chevaux 1 à 3 sont hébergés dans des prés au club hippique, toute l'année où ils reçoivent de la paille et de l'eau *ad libitum*, ainsi que du granulé (PURINA DP Energy ND) à raison de un à deux repas par jour en fonction de leurs besoins. Quant à la jument n°4, elle est hébergée soit dans un pré, à la belle saison, soit dans des boxes individuels à la clinique équine de l'ENVT, l'hiver. Elle reçoit du foin et de l'eau *ad libitum*.

Durant le temps de l'étude, tous les chevaux ont été placés dans des boxes individuels. Ils ont reçu de la paille à volonté, et du foin à raison de deux repas par jour et du concentré (DP Energy ND) une à deux fois par jour en fonction de leurs besoins. Le matin de l'administration, les chevaux ont été nourris au moins 3h avant le début de l'étude.

#### iv. Devenir à la fin de l'étude

Les chevaux appartenant au club hippique de l'ENVT ont de nouveau utilisés dans le cadre des exercices d'enseignement du centre équestre. La jument appartenant à la clinique vétérinaire équine de l'ENVT a de nouveau été utilisée dans le cadre des exercices d'enseignement de travaux dirigés de la clinique équine.

## II) Méthodologie expérimentale

### a. Modalités de traitements

Le BPA a été administré sous la forme d'un bolus d'au minimum 2,5 minutes, à la dose de 5mg/kg par voie IV via un cathéter (cathéter IV 14G à ailettes (VIGON 122.21)) mis en place au niveau de la veine jugulaire droite extemporanément. La pose des cathéters et l'administration a été réalisée par un opérateur, qui par ailleurs n'a pas réalisé de prélèvement sanguin ce qui garantit une absence de contamination par lors des prélèvements. Le cathéter a été rincé après administration avec 20 mL de sérum physiologique puis retiré immédiatement après l'administration.

### b. Plan expérimental

Trois prélèvements sanguins « contrôles » de 9 mL ont été réalisés dans la veine jugulaire gauche, la veille de la cinétique. Les chevaux ont tous été pesés la veille de l'administration.

Un sondage urinaire extemporané sur les juments, a permis de récolter un échantillon d'urine contrôle à  $t_0$ , et de vidanger la vessie juste avant l'administration du BPA. Pour les hongres, une entrée au box sur de la paille propre, a permis une miction spontanée. Nous avons ainsi pu récupérer un échantillon d'urine et vidanger la vessie juste avant l'administration du BPA.

Après l'administration intraveineuse de BPA, des prélèvements de sang ont été réalisés à la veine jugulaire gauche aux temps de 5, 10, 15, 30, 60, 90 min, puis 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 24h

après l'administration par voie intraveineuse, soit 16 prélèvements sanguins au total, en incluant les trois prélèvements contrôles réalisés la veille de l'administration.

Les prélèvements urinaires ont été réalisés par mictions spontanées grâce à un urinal pour les hongres et par le biais d'une sonde de Lévin (SON406/lg : 125cm ; d : 4.6mm ; prix unitaire : 1.13), placée extemporanément dans les voies urinaires des femelles à 2, 4, 6, 8, 10 et 12 heures après l'administration de BPA, soit 7 prélèvements urinaires au total pour les juments. Pour chaque prélèvement, le volume total des urines a été noté, et pour les hongres, l'heure d'émission a été enregistrée avec précision.

### c. Procédures expérimentales

#### i. Modalités de pesée des chevaux

Tous les chevaux ont été pesés, individuellement, le lundi 24 octobre, à LESPINASSE (31150) via un pont-basculé (Master K / mesure ARPEGE IDM2) appartenant à la SCA Arterris – coopérative agricole. La bascule a une précision de 20kg.

#### ii. Modalités de collecte des échantillons sanguins et urinaires

Les prélèvements sanguins de 9mL ont été réalisés par ponction directe de la veine jugulaire gauche avec une aiguille de 22G (aiguille pour prélèvements multiples / AIG049). Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés de 9mL (TUB451), via un porte-tube (POR078). Le sang a été mélangé par retournement et immédiatement placé dans la glace.

Pour les prélèvements urinaires, la totalité de la quantité d'urine émise par miction spontanée pour les hongre, ou prélevé via la sonde urinaire chez les juments a été recueillie. Le volume a été mesuré dans une éprouvette en plastique de 1 L spécifique à chaque cheval et enregistré. Pour les hongres, l'heure d'émission a également été enregistrée avec précision et un numéro de prélèvement urinaire a été attribué. Les urines ont ensuite été échantillonnées et stockées dans des tubes Falcon® de 50 mL et placées immédiatement dans la glace.

### iii. Modalités de traitement des échantillons

Les tubes de prélèvements sanguins ont été centrifugés à 1300 G pendant 10 minutes à + 4°C dans un délai n'excédant pas une heure après leur obtention. Le plasma a ensuite été réparti en 3 fractions aliquotes : 2 de 100 µL placées dans deux tubes Eppendorf<sup>®</sup>, et le reste de plasma a été conservé dans un tube en polypropylène de 5 mL.

Les urines ont également été réparties en 3 fractions aliquotes : 2 de 100 µL conservées dans deux tubes Eppendorf<sup>®</sup>, et le reste des urines a été stocké dans un tube en polypropylène de 5 mL.

Les échantillons de plasma et d'urine ainsi réalisés, ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'au dosage du BPA et du BPA-G.

### iv. Modalités d'analyse des échantillons

Les concentrations plasmatiques et urinaires de BPA et de BPA-G ont été déterminées par UHPLC-MS/MS après extraction à l'acétonitrile sur une gamme de concentrations de BPA allant de 1 à 250 ng/mL et de BPA-Gluc de 10 à 10000 ng/mL. Les échantillons très concentrés en BPA, de début de cinétique ont été dilués dans du plasma contrôle ou de l'urine contrôle. Les limites de quantification LOQs de la méthode UHPLC-MS/MS sont répertoriées en µg/mL et en µM dans le tableau II.

Tableau II : Limites de quantification (LOQs) de la méthode UHPLC-MS/MS développée pour chaque matrice (le plasma et l'urine) pour l'évaluation des concentrations en BPA et en BPA-G en µg/mL et en µM.

LOQs		µg/mL	µM
Urine	LOQ BPA	0,025	0,110
	LOQ BPA-G	1,000	2,474
Plasma	LOQ BPA	0,001	0,004
	LOQ BPA-G	0,02	0,049

#### d. Analyse des données

##### i. Analyse des données plasmatiques

L'analyse pharmacocinétique des données a été effectuée à l'aide du programme WinNonlin® en utilisant une approche non-compartmentale.

Les données des concentrations plasmatiques de BPA ont également été ajustées à l'équation poly-exponentielle 4.

$$C(t) = \sum_{i=1}^n Y_i \exp(-\lambda_i t)$$

Equation 3

Où  $C(t)$  représente la concentration plasmatique en BPA au temps  $t$  (en h),  $Y_i$  est le  $i^{\text{ème}}$  coefficient et  $\lambda_i$  le  $i^{\text{ème}}$  exposant.

L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G de  $t_0$  jusqu'au temps d'occurrence de la dernière concentration quantifiable ( $AUC_{0-T_{\text{last}}}$ ) a été calculée avec la méthode des trapèzes arithmétiques pour le BPA et le BPA-G, puis le rapport des AUCs a été calculé pour chaque voie d'administration.

La clairance du BPA ( $Cl_{\text{BPA}}$ ), la clairance apparente du BPA-G ( $Cl/F_{\text{BPA-G}}$ ), le temps moyen de résidence ( $MRT_{\text{BPA}}$ ) et la demi-vie terminale d'élimination du BPA et du BPA-G ( $t_{1/2}$  BPA et  $t_{1/2}$  BPA-G) ont été estimés après l'administration intraveineuse de BPA. La Clairance du BPA et la  $Cl/F_{\text{BPA-G}}$  ont été obtenues en divisant la dose de BPA administrée par l'AUC correspondante.

La clairance plasmatique ( $Cl$ , en mL/kg/h) a été calculée selon l'équation 4

$$Cl = \text{Dose} / AUC$$

Equation 4

Où AUC (en ng.h/mL) est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA en fonction du temps calculée en utilisant la méthode des trapèzes avec extrapolation à l'infini.

Le volume de distribution du compartiment central ( $V_c$ , en mL/kg) a été calculé à l'aide de l'équation 5.

$$V_c = \text{dose} / \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right)$$

Equation 5

Le volume de distribution à l'équilibre (VSS, en mL/kg) a été calculé à l'aide de l'équation 6.

$$V_{SS} = V_c \left( 1 + \sum_{i=1}^n K_{1n} / K_{n1} \right)$$

Equation 6

Où  $k_{1n}$  et  $k_{n1}$  sont les constantes de premier ordre traduisant les échanges entre les compartiments du modèle.

Le temps moyen de résidence (MRT, en h) a été calculé à l'aide de l'équation 7

$$MRT = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i / \lambda_i^2}{\sum_{i=1}^n Y_i / \lambda_i}$$

Equation 7

Où  $Y_i$  est le  $i^{\text{ème}}$  coefficient et  $\lambda_i$  le  $i^{\text{ème}}$  exposant.

Le temps de demi-vie du BPA ( $t_{1/2}$ , en h) a été calculé selon l'équation 8 :

$$t_{1/2} = \frac{\text{Log}2}{\lambda_n}$$

Equation 8

Où  $\lambda_n$  est la pente terminale

Le temps de demi-vie du BPA après l'administration intraveineuse a été calculé en divisant le logarithme népérien de 2 par  $\lambda_n$ , la pente de la phase terminale (Equation 8). L'option « données éparées » de WinNonlin® a été utilisée pour analyser les données individuelles obtenues permettant ainsi d'obtenir une erreur standard (SE) associée à chaque paramètre.

Les paramètres pharmacocinétiques ainsi obtenus ont ensuite été ajustés par une régression non linéaire utilisant la méthode des moindres carrés.

## ii. Analyses des données urinaires

La clairance urinaire du BPA ( $Cl$ , en mL/(kg.h)) a été évaluée selon deux approches différentes :

(1) Lorsque la totalité des urines a été récupérée : la clairance urinaire du BPA a été évaluée selon l'équation suivante.

$$Cl_R = X_u / AUC \text{ plasma} \quad \text{Equation 4}$$

$X_u$  est la quantité totale de BPA et de BPA glucuronide excrétée dans les urines. L'AUC (en ng.h/mL) est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA glucuronide en fonction du temps.

(2) Lorsque nous n'avons pu disposer que de quelques mictions sur des intervalles de temps déterminées  $dt$ , comme chez les mâles, la quantité excrétée par unité de temps ( $dX_u/dt$ ) a été représentée en fonction des concentrations plasmatiques de BPA. La clairance correspond à la constante de proportionnalité entre les quantités excrétées et les concentrations plasmatiques, soit la pente de cette droite (figure 7).

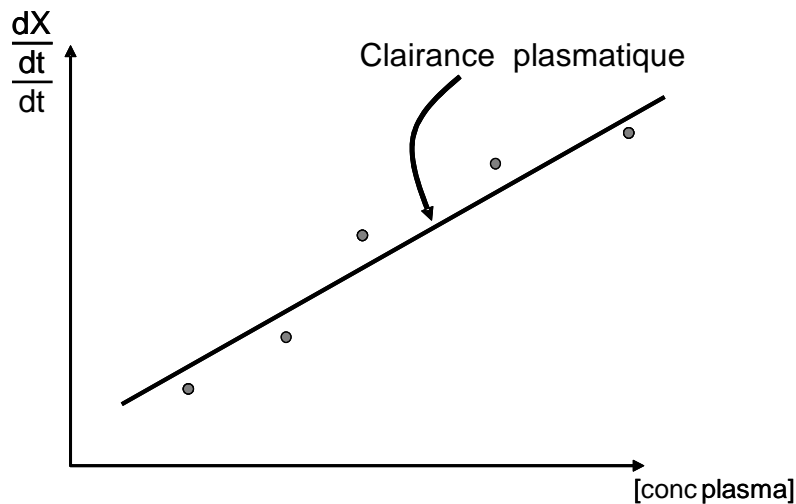


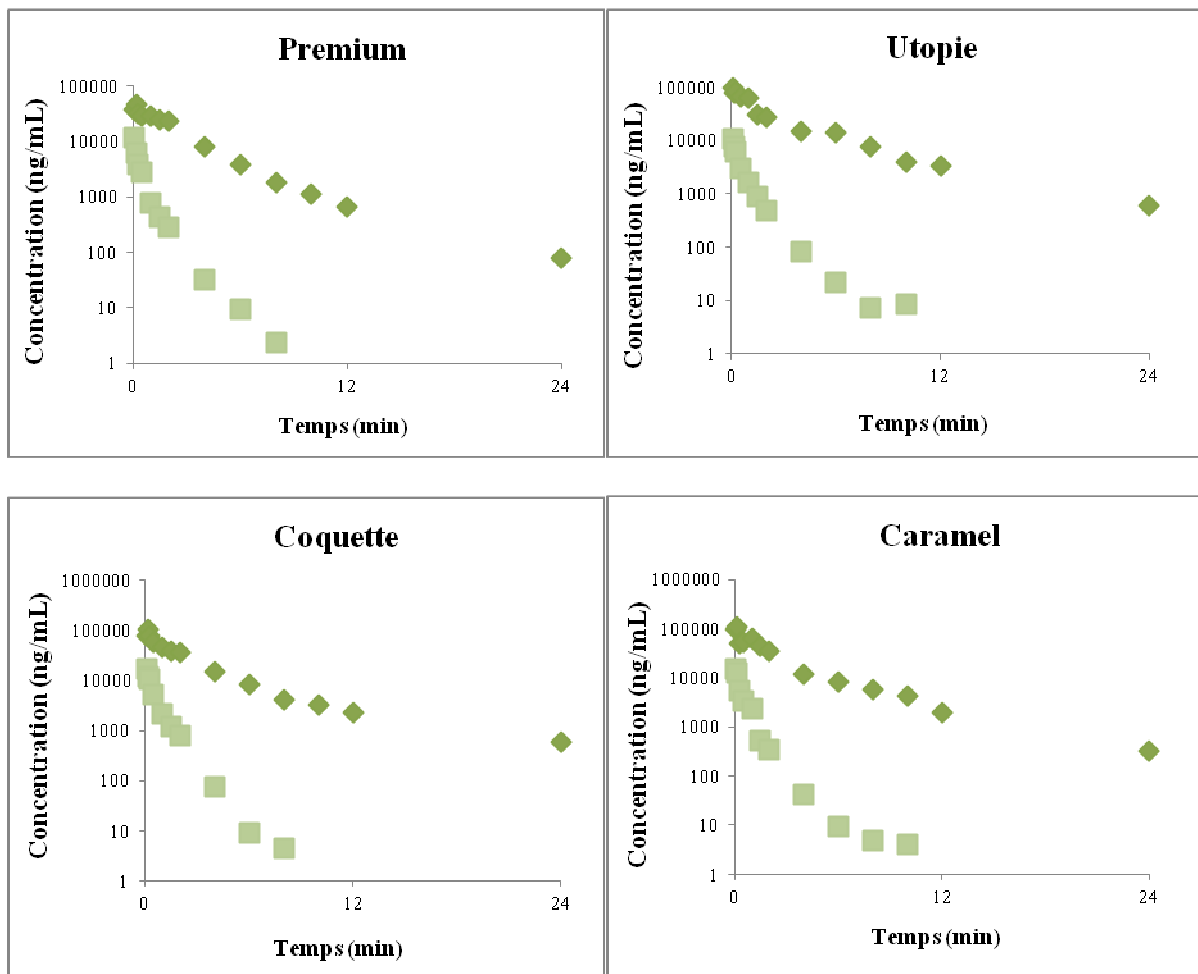
Figure 7 : Représentation graphique des taux instantanés d'excrétion urinaire du BPA en fonction des concentrations plasmatiques de BPA : la clairance est estimée par la pente de cette relation



### III) Résultats

Après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5 mg/kg, les concentrations plasmatiques de BPA ont rapidement diminué pour atteindre la limite de détection LOQ de la méthode analytique entre 8 h et 10 h après l'administration du BPA (figure 8).

Figure 8 : Graphiques des cinétiques plasmatiques des quatre chevaux suite à l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5mg/kg

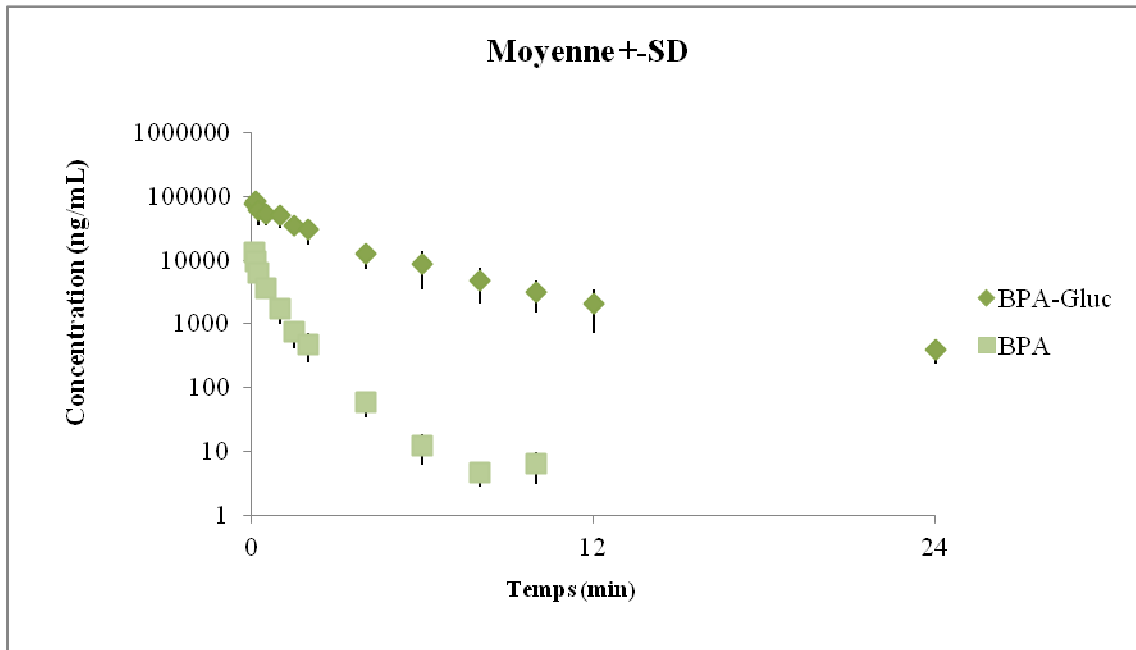


Légende : ■ Concentrations plasmatiques en BPA, ◆ Concentrations plasmatiques en BPA-Gluc

Les concentrations plasmatiques de BPA-G quant à elles, ont augmentées immédiatement après l'administration intraveineuse de BPA et la concentration plasmatique maximale en BPA-G ( $C_{max}$ , BPA-G), de 100 $\mu$ g/mL a été atteinte dans les 5 à 10 premières minutes qui ont suivies l'administration du BPA. A 24h post-administration les concentrations plasmatiques mesurables en BPA-G dans le plasma ont été relativement faibles, comprises

entre 80 et 600 ng/mL. De très faibles concentrations plasmatiques en BPA-G, comprises entre 33 à 81 ng/mL, ont encore été retrouvées 48 heures après l'administration chez trois des quatre chevaux.

Figure 9 : Graphique des cinétiques plasmatiques moyennes +/- SD de BPA et de BPA-G, observées après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5mg/kg chez quatre chevaux



La Figure 9 décrit l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes (+/- SD) de BPA et de BPA-G en fonction du temps après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg. Après une administration intraveineuse, le rapport  $AUC_{BPA-G} / AUC_{BPA}$  indique que les concentrations plasmatiques globales de BPA-G sont 5 à 7 fois supérieures à celles de BPA chez le cheval.

D'après notre modèle, l'excrétion urinaire de BPA se fait essentiellement sous la forme de BPA-G chez le cheval puisque seul 0.01 à 0.02% de la dose totale administrée a été retrouvée inchangée dans les urines et ; que le BPA-G urinaire a représenté entre 29 et 125% de la dose totale administrée, avec une valeur moyenne pour les quatre chevaux de 87,6%. Les profils des quantités cumulées de BPA et de BPA-G dans les urines au cours du temps montrent que 70 à 80 % de la dose retrouvée dans les urines est éliminée dès les premières heures. La quantité cumulée de BPA-G retrouvée dans les urines a été environ 1000 fois supérieure à celle de BPA.

Avec une analyse non-compartmentale des données, la clairance plasmatique du BPA chez le cheval a été évaluée à 12,4 +/- 3,38 mL/(kg.min). Le temps de demi-vie plasmatique a été estimé à 0,8 h soit 48 minutes. Enfin, le volume de distribution a été calculé à 3,4 L/kg soit 198 L pour un poids moyen par cheval de 495kg au sein de notre étude.

Tableau III : Tableau regroupant les valeurs de clairance plasmatique du BPA déterminées expérimentalement chez 6 espèces mammifères, par analyse non compartmentale des données plasmatiques et urinaires obtenues après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5mg/kg [13].

Espèce	Poids <i>Kg</i>	Débit cardiaque <i>mL/(kg.min)</i>	Débit sanguin hépatique <i>mL/(kg.min)</i>	CI BPA	
				<i>mL/kg/min</i>	<i>L/min</i>
Cheval	495	49,8	14,9	12	5,94
Mouton	61,7	83,8	25,2	25	1,5425
Porc	22,4	108,0	32,4	56,4	1,26336
Chien	10,2	131,5	39,4	29,2	0,29784
Rat	0,303	316,7	95,0	64,2	0,0194526
Souris	0,02	624,9	187,5	54	0,00108

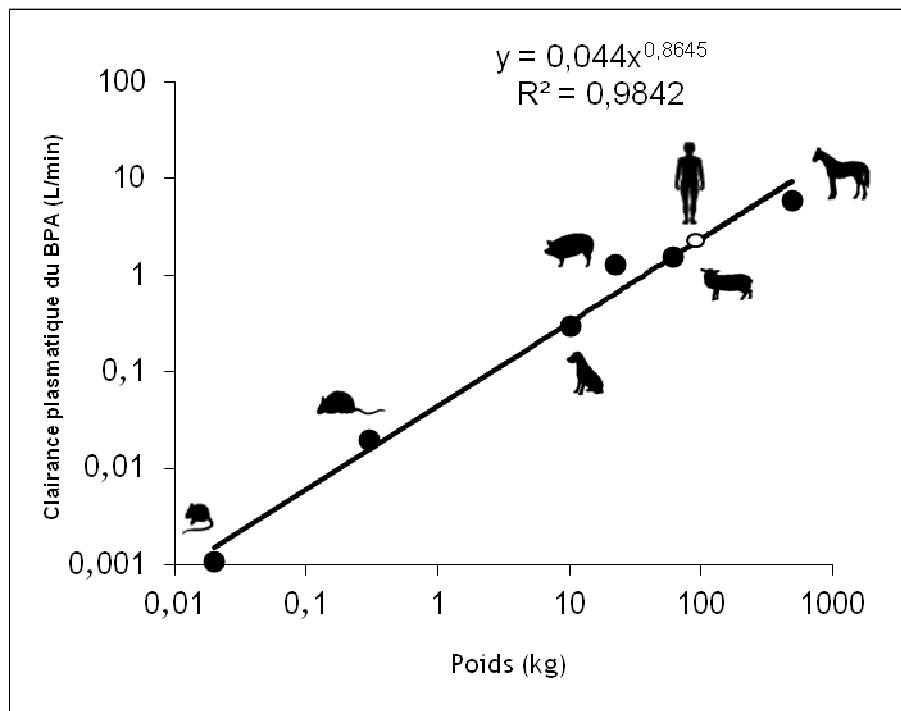


Figure 10 : Droite de régression représentant la relation allométrique [ $Cl_{BPA} = 0,044 \times P^{0,8645}$ ] entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel de six espèces mammifères sur une gamme de poids comprise entre 20g à 500kg. L'estimation de la clairance du BPA chez l'Homme est matérialisée par le rond vide.

La Figure 10 montre la relation entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel pour les 6 espèces étudiées (Tableau III) ; l'inspection visuelle de cette figure montre que le logarithme de la clairance plasmatique du BPA augmente linéairement avec le logarithme du poids corporel des six espèces étudiées. Cette relation a été ajustée par régression linéaire, après une double transformation logarithmique, et les paramètres de la relation allométrique ont été estimés à  $a = 0,0438$  et  $b = 0,8645$ . La droite de régression explique plus de 98 % de la variance interspécifique ( $R^2 = 0,984$ ) ou en d'autres termes 98 % de la variation de la  $Cl_{BPA}$  entre les espèces est expliquée par la variation interspécifique du poids corporel.

Tableau IV : Tableau regroupant les Volumes de distribution et les Temps de demi-vie du BPA déterminés expérimentalement chez 6 espèces mammifères, par analyse non compartimentale des données plasmatiques et urinaires obtenues après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5mg/kg [13].

Espèce	Poids Kg	Volume de distribution L/kg	Volume de distribution L	T ½ vie H
Cheval	495	0,4	198	0,8
Mouton	61,7	0,9	55,53	1,3
Porc	22,4	3,1	69,44	1,9
Chien	10,2	1,2	12,24	0,9
Rat	0,303	9	2,727	3
Souris	0,02	16,3	0,326	9,1

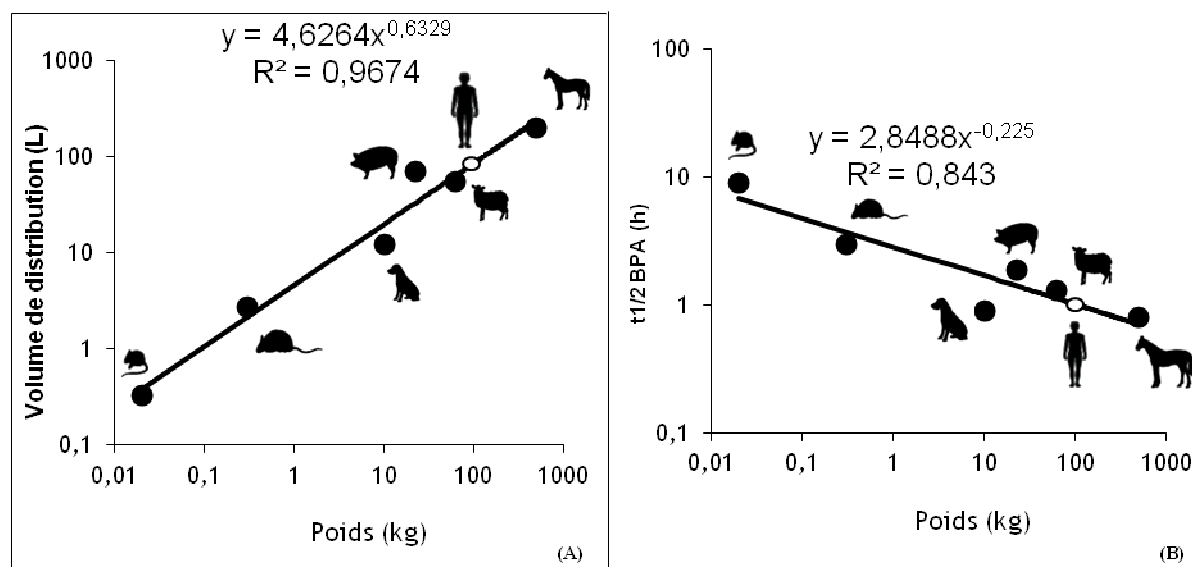


Figure 11 : Droites de régression représentant la relation allométrique établie chez les mammifères entre le volume de distribution du BPA et le poids corporel (A), et entre le temps de demi-vie du BPA et le poids corporel (B).

La Figure 11 suggère que le volume de distribution du BPA ainsi que son temps de demi-vie évoluent également linéairement avec le poids corporel chez les six espèces étudiées. Ces relations ont été ajustées par régression linéaire, après une double transformation logarithmique. Les paramètres des relations allométriques ont été estimés à  $a = 4,6264$  et  $b = 0,6329$  pour le volume de distribution et à  $a = 2,8488$  et  $b = - 0,225$  pour le temps de demi-vie. La droite de régression du volume de distribution du BPA explique environ 97 % de la variance interspécifique ( $R^2 = 0,9674$ ). Par contre, pour le temps de demi-vie du BPA, seul 84 % de la variation du temps de demi-vie du BPA entre les espèces est expliqué par la variation interspécifique du poids corporel.

#### IV) Discussion

Ce travail complète une étude comparative de la pharmacocinétique du BPA chez 5 espèces de mammifères (la souris, le rat, le chien, le porc, et la brebis) précédemment réalisée au laboratoire [12 et 13]. L'objectif de cette étude était de décrire les paramètres pharmacocinétiques du BPA chez le cheval, qui représente une espèce de poids corporel supérieur à celui de l'Homme, de façon à compléter l'approche allométrique de la clairance du BPA, et prédire à partir de cette approche, la clairance du BPA chez l'homme. Cette relation allométrique repose sur le fait qu'en raison du coefficient élevé d'extraction hépatique du BPA, sa clairance est dépendante du débit sanguin hépatique (Qh), lui-même défini par une équation allométrique.

Nous avons montré qu'après l'administration intraveineuse de BPA à la dose de 5 mg/kg chez le cheval, les concentrations plasmatiques de BPA ont diminuées rapidement pour atteindre la LOQ de la méthode analytique entre 8 h et 10 h après l'administration, tout comme chez le chien dans des conditions expérimentales identiques [12, 13].

Chez le cheval, la concentration plasmatique maximale en BPA-G a été comparable à celle qui avait été observée chez le chien, le porc, et la brebis, soit de l'ordre de 100µg/mL. Cette valeur a cependant été très supérieure à la concentration maximale en BPA-G observée chez le rat et la souris qui était de l'ordre de 5µg/mL. Vingt quatre heures après

l'administration, les concentrations mesurables en BPA-G dans le plasma ont été comprises entre 0,03 et 0,08 $\mu$ g/mL. De faibles concentrations en BPA-G étaient encore observées 48 heures après l'administration chez deux chevaux sur quatre.

Chez le cheval, nous avons montré que le BPA est éliminé dans les urines essentiellement sous la forme de BPA-G, tout comme chez les autres espèces citées précédemment dans les mêmes conditions expérimentales.

Chez l'Homme, Volkel *et al.* [73, 75] ont montré que la totalité de la dose de BPA administrée par voie orale était retrouvée dans les urines sous la forme de BPA-G. Chez le cheval, nous avons montré que les quantités cumulées de BPA-G retrouvées dans les urines représentaient en moyenne 87,6% de la dose de BPA totale administrée. Chez le cheval comme chez l'Homme, la quantité de BPA-G éliminée dans les urines représente donc un bon marqueur du niveau d'exposition expérimentale externe au BPA.

Le but principal de notre thèse était d'estimer la clairance plasmatique de l'homme à partir d'une relation allométrique qui permettrait une estimation par interpolation. Cela impliquait donc de construire une droite de calibration avec une espèce de poids corporel nettement supérieur à celui de l'homme. La clairance moyenne du BPA chez le cheval a été évaluée à 12,4 +/- 3,38 mL/(kg.min) pour un poids moyen par cheval de 495kg, soit 6,1 L/min. Cette valeur de clairance nous a permis d'estimer la clairance plasmatique de l'homme par interpolation de la relation allométrique qui lie la clairance du BPA au poids corporel de l'espèce, à 1,7 L/min, soit 24,74 mL/(kg.min), pour un Homme de 70 kg (Figure 10).

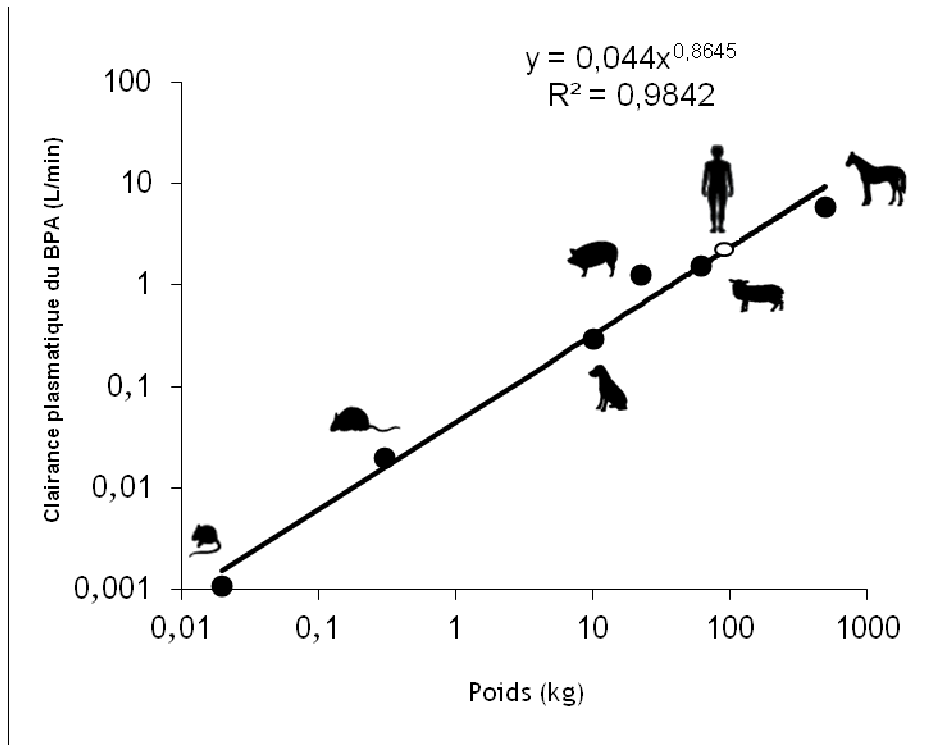


Figure 10 : Droite de régression représentant la relation allométrique  $[Cl_{BPA} = 0,044 \times P^{0,8645}]$  entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel de six espèces mammifères sur une gamme de poids comprise entre 20g à 500kg. L'estimation de la clairance du BPA chez l'Homme est matérialisée par le rond vide.

L'estimation de la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme grâce à cette approche allométrique, a donné des résultats comparables à ceux publiés par d'autres auteurs (entre 19 et 30 mL/(kg.min)) chez l'Homme [11, 62, 50]. Cette approche allométrique permet d'estimer la clairance du BPA chez l'Homme en s'affranchissant des difficultés liées à l'administration de cette substance potentiellement toxique.

La connaissance de la valeur de la clairance plasmatique du BPA chez l'homme, permet de prédire les concentrations plasmatiques du BPA-G pour différents scénarii d'expositions externes dont la DJA (50 µg/kg/j). Ce modèle est donc un outil essentiel puisque nous ne disposons d'aucune donnée expérimentale pour ces très faibles niveaux d'exposition.

La relation entre la dose « administrée » (exposition externe) et les concentrations plasmatiques (exposition interne) est donnée par la relation suivante (Equation 9) :

$$\text{Dose} = \text{Concentration plasmatique} \times \text{Clairance}$$

Equation 9

C'est ainsi que pour la DJA, la clairance que nous avons estimée (24.74mL/kg/min) permet de prédire une concentration plasmatique 1,4 ng/mL et en prenant en compte une biodisponibilité par voie orale de 5%, les concentrations plasmatiques ne devraient pas dépasser 70 pg/mL. Cette estimation est similaire à celle obtenue par Mielke et Gundert-Remy qui ont prédit des concentrations plasmatiques de BPA à l'équilibre chez l'homme de l'ordre de 2,6 pg/mL mais pour une dose ingérée de 1µg/kg/j [50]. Ces valeurs ne sont pas cohérentes avec celles qui sont rapportées dans les études d'épidémiologie-surveillance qui font état de concentrations plasmatiques qui peuvent atteindre de 2 à 4 ng/mL.

Quatre hypothèses peuvent alors être avancées :

- (i) la clairance plasmatique du BPA chez l'homme est surestimée,
- (ii) la biodisponibilité peut être nettement plus élevée que celle qui est prédite par un effet de premier passage hépatique important
- (iii) les concentrations plasmatiques mesurées chez l'homme sont surestimées
- (iv) l'exposition externe au BPA de l'homme dépasse très largement la DJA.

Actuellement l'hypothèse privilégiée est celle de l'existence de modalités d'exposition par voie orale qui permettraient d'échapper à l'effet de premier passage hépatique et seraient associées à une biodisponibilité très élevée [12,13].



## Conclusion

Nous avons montré que les profils des concentrations plasmatiques moyens de BPA et de BPA-G observés après une administration intraveineuse de BPA chez le cheval sont comparables à ceux observés chez d'autres espèces (souris, rat, chien, mouton et porc). Après avoir estimé les paramètres pharmacocinétiques du BPA chez le cheval, nous avons construit une relation allométrique qui a permis d'estimer par interpolation la clairance plasmatique du BPA chez l'homme à une valeur de l'ordre de 25 mL/kg/min. Cette estimation est cohérente avec celles qui ont été publiées et elle renforce l'idée qu'il existe une incohérence entre les données de l'épidémiologie qui fait état de concentrations plasmatiques relativement élevées ce que ne peut pas expliquer une DJA faible associée à une biodisponibilité très limitée.

Rapport-Gratuit.com

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

Je soussigné, **Pierre-Louis TOUTAIN**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *Virginie CHEVALLEREAU* intitulée « *Disposition du bisphénol A chez le cheval : Etablissement d'une relation allométrique chez les mammifères* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 15/11/2012  
Professeur **Pierre-louis TOUTAIN**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur **Alain MILON**


Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur **Jean PARINAUD**



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
**Paul Sabatier**  
Professeur **Bertrand MONTHUBERT**


Mlle **CHEVALLEREAU Virginie**  
a été admis(e) sur concours en : 2007  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 12/07/2011  
a validé son année d'approfondissement le : 13/07/2012  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

## Références bibliographiques

1. **Anses**, Effets sanitaires du bisphénol A : Rapport d'expertise collective, Connaissances relatives aux usages du bisphénol A : Rapport d'étude, septembre 2011
2. **Becker, K., T. Goen, M. Seiwert, A. Conrad, H. Pick-Fuss, J. Muller, et al.**, GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health*, 2009. 212(6): p.685-92.
3. **Biedermann, S., P. Tschudin, and K. Grob**, Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem*, 2010. 398(1): p.571-6.
4. **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(2): p.165-76.
5. **Brede, C., P. Fjeldal, I. Skjevrak, and H. Herikstad**, Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam*, 2003. 20(7): p.684-9.
6. **Brotons, J.A., M.F. Olea-Serrano, M. Villalobos, V. Pedraza, and N. Olea**, Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*, 1995. 103(6): p.608-12.
7. **Calafat, A.M., Z. Kuklennyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J. Ekong, and L.L. Needham**, Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(4): p.391-5.
8. **Calafat, A.M., X. Ye, L.Y. Wong, J.A. Reidy, and L.L. Needham**, Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*, 2008. 116(1): p.39-44.
9. **Calafat, A.M., J. Weuve, X. Ye, L.T. Jia, H. Hu, S. Ringer, et al.**, Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(4): p.639-44.
10. **Carwile, J.L., H.T. Luu, L.S. Bassett, D.A. Driscoll, C. Yuan, J.Y. Chang, et al.**, Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(9): p.1368-72.
11. **Cho, C.Y., B.S. Shin, J.H. Jung, D.H. Kim, K.C. Lee, S.Y. Han, et al.**, Pharmacokinetic scaling of bisphenol A by species-invariant time methods. *Xenobiotica*, 2002. 32(10): p.925-34.

12. **Collet S.H., N. Picard-Hagen, C. Viguié, M.Z. Lacroix, S. Puel, P.L. Toutain, V. Gayrard**, Interspecies comparison of Bisphenol A toxicokinetic: extrapolating effect from animals to human. *Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters, COW 2011* (Copenhagen, Danemark), 27-29 avril 2011, Abstract N°B-6 p.89.
13. **Collet S.H.**, Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A, 2012, Laboratoire de Toxicologie Alimentaire (UMR 1331 TOXALIM), Thèse de Doctorat universitaire de Biologie.
14. **Commission Européenne**, RÈGLEMENT (UE) No 10/2011 DE LA COMMISSION du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, *Journal officiel de l'Union européenne*, 15.1.2011, L 12 / p.1-89.
15. **Dinev T.G.**, Comparison of the pharmacokinetics of five aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics using allometric analysis in mammal and bird species. *Research in Veterinary Science*, February 2008, 84(1): p.107-118.
16. **Doerge, D.R., N.C. Twaddle, K.A. Woodling, and J.W. Fisher**, Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. 248(1): p.1-11.
17. **Doerge D. R., N. C. Twaddle, M. Vanlandingham and J. W. Fisher**, Pharmacokinetics of bisphenol A in serum and adipose tissue following intravenous administration to adult female CD-1 mice. *Toxicology Letters*, 2012. 211 : p114-119
18. **EFSA**, Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the comission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) Question member EFSA-Q-2005-100, adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* 428:1-75, 2006.
19. **EFSA**, STATEMENT OF EFSA :on a study associating bisphenol A with medical disorders<sup>1</sup>, Prepared by the Unit on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF) and the Unit on Assessment Methodology (AMU), Question No EFSA-Q-2008-702, Issued on 22 October 2008, *The EFSA Journal* 838: 1-3, 2008.
20. **EFSA**, Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A1, EFSA Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF), *EFSA Journal* 2010; 8(9) : p1829.

21. **Fernandez, M.F., J.P. Arrebola, J. Taoufik, A. Navalón, O. Ballesteros, R. Pulgar, J.L. Vilchez, N. Olea,** Bisphenol A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women, *Reproductive Toxicology*, 2007. 24 (2) : p 259–264.
22. **Fu, P. and K. Kawamura,** Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere, *Environ Pollut*, 2010. 158(10): p.3138-43.
23. **Fung, E.Y., N.O. Ewoldsen, H.A. St Germain, Jr., D.B. Marx, C.L. Miaw, C. Siew, et al.,** Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant, *J. Am. Dent. Assoc.*, 2000. 131(1): p.51-8.
24. **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(6): p.755-60.
25. **von Goetz, N., M. Wormuth, M. Scheringer, and K. Hungerbühler,** Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal*, 2010. 30(3): p.473-87.
26. **González-Castro M. I., M. F. Olea-Serrano, A. M. Rivas-Velasco, E. Medina-Rivero, Leandro G. Ordoñez-Acevedo, A. De León-Rodríguez,** Phthalates and Bisphenols Migration in Mexican Food Cans and Plastic Food Containers. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2011. 86 : p.627-631.
27. **Gould, J.C., L.S. Leonard, S.C. Maness, B.L. Wagner, K. Conner, T. Zacharewski, et al.,** Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. 142(1-2): p.203-14.
28. **Guart A, Bono-Blay F, Borrell A, Lacorte S,** Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Asses*. May 2011; 28(5) : p.676-85.
29. **Günther B., Morgado E.,** Body mass and body weight : a dual reference system in biology, *Revista chilena historia natural* vol.76 n°1 Santiago mar. 2003.
30. **He, Y., M. Miao, L.J. Herrinton, C. Wu, W. Yuan, Z. Zhou, et al.,** Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res*, 2009, 109(5): p.629-33.
31. **Hugo E.R., T.D. Brandebourg, J.G. Woo, J. Loftus, J.W. Alexander, N. Ben-Jonathan,** Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect*, 2008. 116 : p 1642–1647.

32. **Joskow R, D. Boyd Barr, J.R. Barr, A.M. Calafat, L.L. Needham, and C. Rubin,** Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate–based dental sealants. *Journal of American Dental Association*, 2006, 137(3), p 353-362.
33. **Kaddar, N., C. Harthe, H. Dechaud, E. Mappus, and M. Pugeat,** Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A*, 2008. 71(8): p.471-3.
34. **Kaddar, N., N. Bendridi, C. Harthe, M.R. de Ravel, A.L. Bienvenu, C.Y. Cuilleron, et al.,** Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Anal Chim Acta*, 2009. 645(1-2): p.1-4.
35. **Kang, J.H., Y. Katayama, and F. Kondo,** Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals. *Toxicology*, 2006. 217(2-3): p.81-90.;
36. **Kavlock, R.J., G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaattari, 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: p.715-40.
37. **Kim Y.H., C.S. Kim, S. Park, S. Y. Han, M.Y. Pyo, M. Yang,** Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 12 December 2003, Vol. 312, (2) : p.441-448.
38. **Kurebayashi, H., K. Okudaira, and Y. Ohno,** Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett*, 2010. 198(2): p.210-5.
39. **Kubwabo, C., I. Kosarac, B. Stewart, B.R. Gauthier, K. Lalonde, and P.J. Lalonde,** 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(6): p.928-37.
40. **Kurebayashi, H., K. Okudaira, and Y. Ohno,** Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett*, 2010. 198(2): p.210-5.
41. **Lacroix, M.Z., S. Puel, S.H. Collet, T. Corbel, N. Picard-Hagen, P. Toutain, et al.,** Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta*, 2011. 85(4): p.2053-9.
42. **Lakind, J.S. and D.Q. Naiman,** Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: estimates from the 2003-2004 NHANES urinary BPA data. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2008. 18(6): p.608-15.

43. **Lee, Y.J., H.Y. Ryu, H.K. Kim, C.S. Min, J.H. Lee, E. Kim, B.H. Nam, J.H. Park, J.Y. Jung, D.D. Jang, E.Y. Park, Kwan-Hee Lee, J.Y. Ma, H.S. Won, M.W. Im, J.H. Leem, Y.C. Hong, H.S. Yoon**, Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea, *Reproductive Toxicology*, 2008. 25(4) : p413-419
44. **Liao, C. and K. Kannan**, High levels of bisphenol a in paper currencies from several countries, and implications for dermal exposure. *Environ Sci Technol*, 2011. 45(16): p.6761-8.
45. **Lim D.S., S.J. Kwack, K.B. Kim, H.S. Kim, B.M. Lee**, Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A*, 2009a. 72(21-22): p.1285-91.
46. **Lim D.S., S.J. Kwack, K.B. Kim, H.S. Kim, B.M. Lee**, Risk assessment of bisphenol A migrated from canned foods in Korea, *Journal Toxicology Environ Health A.*, 2009b. 72(21-22): p.1327-35.
47. **Loganathan, S.N. and K. Kannan**, 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(1): p.68-73.
48. **Marquet, F., J.P. Payan, D. Beydon, L. Wathier, M.C. Grandclaude, and E. Ferrari**, In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [(14)C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol*, 2011. 85(9): p.1035-43.
49. **Matsumoto, A., N. Kunugita, K. Kitagawa, T. Isse, T. Oyama, G.L. Foureman, et al.**, Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect*, 2003. 111(1): p.101-4.
50. **Mielke, H. and U. Gundert-Remy**, Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett*, 2009. 190(1): p.32-40.
51. **Morgan, M.K., P.A. Jones, A.M. Calafat, X. Ye, C.W. Croghan, J.C. Chuang, et al.**, Assessing the Quantitative Relationships between Preschool Children's Exposures to Bisphenol A by Route and Urinary Biomonitoring. *Environ Sci Technol*, 2011. 45(12): p.5309-16.
52. **Nam, S.H., Y.M. Seo, and M.G. Kim**, Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, 2010. 79(9): p.949-52.].
53. **Nunez, A.A., K. Kannan, J.P. Giesy, J. Fang, L.G. Clemens**, Effects of Bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats, 2001. *Chemosphere* 42(8) : p.917-922

54. **Olea N., R. Pulgar, P. Perez, F. Olea-Serrano, A. Rivas, A. Novillo-Fertrell, et al.**, Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 1996. 104(3): p.298-305.
55. **Olea N., J.P. Arrebola, J. Taoufiki, R. Fernández-Valades, R. Prada, N. Navea, et al.** Alkylphenols and bisphenol-A and its chlorinated derivatives in adipose tissue of children, *Environmental Toxicology II WIT Transactions on Ecology and the Environment (Kungolos S, Brebbia CA, Zamorano M, eds). Granada, Spain : Wessex Institute; 2008.*
56. **Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne**, Règlement (CE) no 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) no 793/93 du Conseil et le règlement (CE) no 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*, L 396 du 30 décembre 2006, p.1-849.
57. **Pottenger, L.H., J.Y. Domoradzki, D.A. Markham, S.C. Hansen, S.Z. Cagen, and J.M. Waechter, Jr.**, The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci*, 2000. 54(1): p.3-18.
58. **Rudel R.A., J.G. Brody, J.D. Spengler, J. Vallarino, P.W. Geno, G. Sun, A. Yau**, Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *Journal Air Waste Manager Association*, 2001. 51(4):499-513.
59. **Rudel, R.A., J.M. Gray, C.L. Engel, T.W. Rawsthorne, R.E. Dodson, J.M. Ackerman, et al.**, Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention. *Environ Health Perspect*. 2011. 119(7): p.914-920.
60. **vom Saal, F.S., B.T. Akingbemi, S.M. Belcher, L.S. Birnbaum, D.A. Crain, M. Eriksen, 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(2): p.131-8.



61. **Schonfelder, G., W. Wittfoht, H. Hopp, C.E. Talsness, M. Paul, and I. Chahoud,** Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, 2002. 110(11): p.A703-7.
62. **Shin, B.S., C.H. Kim, Y.S. Jun, D.H. Kim, B.M. Lee, C.H. Yoon, et al.,** Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *J Toxicol Environ Health A*, 2004. 67(23-24): p.1971-85.
63. **Stahlhut, R.W., W.V. Welshons, and S.H. Swan,** Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(5): p.784-9.
64. **Sun H., L.C. Xu, J.F. Chen, L. Song, and X.R. Wang,** Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene, *Food and Chemical Toxicology*, 2006. 44(11) : p.1916-1921.
65. **Taylor, J.A., F.S. Vom Saal, W.V. Welshons, B. Drury, G. Rottinghaus, P.A. Hunt, and al.,** Similarity of bisphenol a pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect*, 2011. 119(4): p.422-30.
66. **Teeguarden, J.G., A.M. Calafat, X. Ye, D.R. Doerge, M.I. Churchwell, R. Gunawan, and al.,** Twenty-four hour human urine and serum profiles of Bisphenol A during high dietary exposure. *Toxicol Sci*, 2011. 123(1): p.48-57.
67. **Tominaga, T., T. Negishi, H. Hirooka, A. Miyachi, A. Inoue, I. Hayasaka, and al.,** Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology*, 2006. 226(2-3): p.208-17.
68. **Tsukioka T, Terasawa J, Sato S, Hatayama Y, Makino T, Nakazawa H,** Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *Journal Environ Chem*, 2004. 14(1) : p 57–63.
69. **Tyl, R.W., C.B. Myers, M.C. Marr, B.F. Thomas, A.R. Keimowitz, D.R. Brine, and al.,** Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 2002. 68(1): p.121-46.
70. **Tyl, R.W., C.B. Myers, M.C. Marr, C.S. Sloan, N.P. Castillo, M.M. Veselica, and al.,** Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci*, 2008. 104(2): p.362-84.

71. **Upmeier A., G.H. Degen, P. Diel, H. Michna, H. M. Bolt**, Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration, *Archives of Toxicology*, October 2000, 74(8): p.431-436.
72. **Vandenberg, L.N., R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, and W.V. Welshons**, Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 2007. 24(2): p.139-77.
73. **Volkel, W., T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, and W. Dekant**, Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, 2002. 15(10): p.1281-7.
74. **Volkel, W., N. Bittner, and W. Dekant**, Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 2005. 33(11): p.1748-57.
75. **Volkel, W., M. Kiranoglu, and H. Fromme**, Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett*, 2008. 179(3): p.155-62.
76. **Wilson N.K., J.C. Chuang, M.K. Morgan, R.A. Lordo, and L.S. Sheldon**, An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare, *Environ Res.*, 2007. 103(1):9-20.
77. **Yamamoto T., A. Yasuhara**, Determination of bisphenol A migrated from polyvinyl chloride hoses by GC/MS, 2000. *Bunseki Kagaku*, 49(6) : p 443–447.
78. **Ye, X., F.H. Pierik, R. Hauser, S. Duty, J. Angerer, M.M. Park, et al.**, Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. *Environ Res*, 2008. 108(2): p.260-7.
79. **Yoo, S.D., B.S. Shin, B.M. Lee, K.C. Lee, S.Y. Han, H.S. Kim, et al.**, Bioavailability and mammary excretion of bisphenol a in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A*, 2001. 64(5): p.417-26.
80. **Zalko D., C. Jacques, H. Duplan , S. Bruel, E. Perdu**. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*, 2011. 82 : p.424-430.

Toulouse, 2012

NOM : CHEVALLEREAU

Prénom : Virginie

TITRE : DISPOSITION DU BISHPENOL A CHEZ LE CHEVAL : ETABLISSEMENT D'UNE RELATION ALLOMETRIQUE CHEZ LES MAMMIFERES

RESUME : L'objectif de cette thèse était de décrire les paramètres pharmacocinétiques du BPA chez le cheval, de façon à compléter l'approche allométrique de la clairance du BPA précédemment établie à partir des données obtenues chez 5 espèces de mammifères et, à partir de cette approche, prédire la clairance du BPA chez l'homme. La clairance moyenne du BPA chez le cheval a été évaluée à 6.1 L/min. Cette valeur nous a permis d'estimer la clairance plasmatique de l'homme par interpolation de la relation allométrique qui lie la clairance du BPA au poids corporel de l'espèce, à 1,7 L/min, soit 24,74 mL/(kg.min), pour un Homme de 70 kg. Cette donnée pharmacocinétique est fondamentale pour interpréter les résultats des études de biosurveillance et prédire les niveaux d'exposition interne au BPA chez l'Homme dans le cadre du risque lié à l'exposition de l'homme à ce xénoestrogène.

MOTS-CLES : Bisphénol A, cheval, allométrie, exposition.

---

ENGLISH TITLE : PHARMACOKINETIC OF BISPHENOL A IN HORSE : ESTABLISHMENT OF AN ALLOMETRIC RELATION FOR MAMMALS

ABSTRACT : This thesis aimed at describing the BPA pharmacokinetic parameters in the horse, in order to complement the allometric approach of the BPA clearance previously established from the data obtained to 5 mammals species and, thus, to predict the BPA clearance in man. The average clearance of the BPA in horse was estimated at 6.1 L/min. This value enabled us to estimate the BPA clearance in man by interpolation of the allometric relation which binds the BPA clearance to the physical weight of the species, to 1,7 L/min, that is 24.74 mL/(kg.min), for a 70 kg man. This pharmacokinetic data is significant to interpret the results of biosurveillance studies and to predict the levels of human internal exposure at the BPA within the context of risks related to man exposure at this xenoestrogene.

KEYWORDS : Bisphenol A, horse, allometric relation, exposure