



THÈSE



En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par :

Glenn Gauderat

le vendredi 4 novembre 2016

Titre :

Impact des processus métaboliques fœto-placentaires sur l'exposition fœtale
au bisphénol A

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Unité de recherche :

UMR 1331 TOXALIM

Directeur/trice(s) de Thèse :

Madame le Professeur Véronique Gayrard
Madame le Professeur Nicole Picard-Hagen

Jury :

Madame le Professeur Michèle Bouchard
Monsieur le Professeur Bruno Le Bizec
Madame le Docteur Corinne Cotinot
Monsieur le Professeur Paul Fowler
Monsieur le Professeur Pierre-Louis Toutain
Madame le Professeur Véronique Gayrard
Madame le Professeur Nicole Picard-Hagen

A l'Agence Nationale de la Recherche et la région Midi-Pyrénées qui ont financé ma thèse et les travaux présentés dans ce manuscrit.

A Madame Michèle Bouchard et Monsieur Bruno Le Bizec qui ont accepté de consacrer leur temps à la lecture et l'appréciation de ce manuscrit. A Madame Corinne Cotinot, Monsieur Paul Fowler et Monsieur Pierre-Louis Toutain qui ont accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineur.

A Véronique Gayrard et Nicole Picard-Hagen pour m'avoir à la fois formé, guidé et épaulé durant ces trois années de thèse. Merci pour votre temps et votre énergie durant ces manips. J'ai pris beaucoup de plaisir lors de ces nombreuses chirurgies en trio, à faire le chef avec mes manies bizarres, à prendre toute la place autour de la table ! Merci pour vos conseils lors de la rédaction de ces articles, pour votre patience quand je ne trouvais pas des objets juste devant mon nez, et tout le reste. Je vous remercie sincèrement pour m'avoir transmis cet esprit d'équipe, de rigueur et de professionnalisme.

A Mr Pierre-Louis Toutain pour m'avoir appris la pharmacocinétique, merci pour vos conseils quand je me débattais avec mes modèles, merci pour ces débats à la cafétéria et pour votre dynamisme.

A notre chef d'équipe Catherine Viguié. Merci pour les corrections d'anglais, les coups de pouces lors des manips et les chorales tard le soir au bureau.

A Mr Alain Bousquet-Melou et qui a également grandement participé à ma formation en tant que pharmacocinéticien.

A Daniel Zalko, Virginie Rouiller-Fabre et Alain Berrebi pour avoir suivi l'avancement de ma thèse, merci pour les discussions et les conseils lors des comités de thèse.

A Marlène Lacroix et Sylvie Puel pour ces innombrables dosages, ces tests de nouvelles méthodes.

A Jean-Pierre Gau, Cédric Lacassagne et Noémie Deschamps pour leur aide indispensable lors des chirs et des manips.

A Christiane Mouilleron, Valérie Defforge, Marie-Françoise Raymond et Simone Baurès pour les publis sans accès, les étiquettes, les commandes compliquées, la gestion plus que complexe des démarches nécessaires à mon voyage en Ecosse, et pour leur bonne humeur.

A Didier Concordet et Remi Servien pour les conseils en statistiques et en PKpop et pour les débats politiques.

A Paul Fowler, Filis Panagiotis, Natasha Walker et Linda Robertson pour m'avoir accueilli à l'IMS en Ecosse, merci pour votre patience et votre tolérance vis-à-vis de mon frenglish.

A Davy Guignard mon co-thésard pour sa gentillesse, son aide pour les manips. Ces trois ans de thèse auraient été moins drôles sans nos discussions à propos des galères rencontrées !

A Béatrice Roques, Elodie Lallemant, Aude Ferran et Emmanuelle Totain pour les bowlings, les soirées et la bonne humeur transmise à la cafétéria.

A Pascal Bourdaud'hui pour l'aide avec mon PC qui commence à se faire vieux après trois ans de thèse.

A Patrick Tardivel pour les cours de danse, les soirées et les discussions de stat.

A ma famille et potes de Montpellier que j'ai regretté durant ces trois années.

A Lucile, pour ta patience et ton soutien, pour être ce que tu es, ces trois années à Toulouse auraient été bien plus difficiles sans toi.

A mes amis d'enfance Justine, David et Tony pour leur présence et pour ces moments passés ensemble qui redonnent de l'énergie.

A ma mère et mon père pour leur soutien inconditionnel comme toujours, pour leur compréhension par rapport à mes visites en coup de vent. Je suis fier d'être le premier docteur de la famille !

A mon frère et Alice pour tous ces moments avec mon petit neveu, pour le mariage formidable, et pour mon futur autre petit neveu !

A Diane Broussou et Flore Grandin les nouvelles thésardes. Je leur souhaite bon courage pour la suite et qu'elles profitent bien de ces années passées ici.

Valorisation scientifique

Communications orales:

Gauderat, G. ; Picard-Hagen, N. ; Viguié, C. ; Puel, S. ; Lacroix, MZ. ; Toutain, PL. ; Mindeguia, P. ; Bousquet-Mélou, A. ; Gayrard, V. Bisphenol A-glucuronide hydrolysis in the ovine fetal compartment prolongs the fetal exposure to Bisphenol A. 13th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT). Nantes, France. 2015.

Gauderat, G. ; Picard-Hagen, N. ; Toutain, PL. ; Servien, R. ; Viguié, C.; Puel, S.; Lacroix, MZ. ; Bousquet-Mélou, A. ; Gayrard, V. Utilisation d'un modèle pharmacocinétique pour prédire l'exposition du fœtus humain au bisphénol A. Journée thématique PA3S. Toulouse, France. 2016.

Gauderat, G. ; Picard-Hagen, N. ; Servien, R. ; Lacroix, MZ. ; Viguié, C.; Toutain, PL. ; Bousquet-Mélou, A. ; Gayrard, V. Development of an integrated physiological model to predict human fetal exposure to endocrine disruptors, applied to Bisphenol A. 18th International Congress of Animal Reproduction (ICAR). Tours, France. 2016.

Communications affichées:

Gauderat, G. ; Picard-Hagen, N. ; Mindeguia, P. ; Toutain PL. ; Lacroix, MZ.; Viguié, C.; Puel, S.; Gayrard, V. Impact of feto-placental metabolic processes on the internal fetal exposure to bisphenol A. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors. Lucca (Barga), Italy. 2014.

Gauderat, G. ; Picard-Hagen, N. ; Toutain, PL. ; Lacroix, MZ. ; Viguié, C. ; Puel, S. ; Gayrard, V. Materno-fetal toxicokinetics of bisphenol A and its main metabolite, BPA-glucuronide. GDR 3606 REPRO. Rennes, France. 2015.

Gauderat, G.; Picard-Hagen, N. ; Mindeguia, P. ; Toutain, PL. ; Lacroix, MZ. ; Viguié, C. ; Puel, S. ; Gayrard, V. Evidence of hydrolysis of bisphenol A-glucuronide in the ovine fetal-amniotic unit. 8th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors. Copenhagen, Denmark. 2015.

Gauderat, G.; Filis P. ; Picard-Hagen, N. ; Fowler PA. ; Toutain, PL. ; Viguié, C.; Puel, S.; Lacroix, MZ. ; Gayrard, V. Novel bisphenol-A glucuronide related effects during fetal life uncovered using label-free shotgun proteomics. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors. Newry, Maine, USA. 2016.

Gauderat, G. ; Picard-Hagen, N. ; Toutain, PL. ; Servien, R. ; Viguié, C.; Puel, S.; Lacroix, MZ. ; Bousquet-Mélou, A. ; Gayrard, V. Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A from an ovine semiphysiological population toxicokinetic model. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors. Newry, Maine, USA. 2016.

Publications :

Gauderat G, Picard-Hagen N, Toutain P-L, Corbel T, Viguié C, Puel S, et al. 2016. Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Int* 86:52–59; doi:10.1016/j.envint.2015.10.006.

Gayrard V, Gauderat G, Lacroix MZ, Viguié C, Bousquet-Melou A, Toutain P-L, et al. 2015. Comment on “In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes.” *Environ. Health Perspect.* 123:A289; doi:10.1289/ehp.1510315.

Guignard D, Gauderat G, Gayrard V, Lacroix MZ, Picard-Hagen N, Puel S, et al. 2016. Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. *Food Chem. Toxicol.*; doi:10.1016/j.fct.2016.04.004.

Table des matières

VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	1
SOMMAIRE	3
ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION GENERALE	9
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. LE BISPHENOL A : PROPRIETES ET HISTORIQUE	13
A. <i>Propriétés physicochimiques</i>	13
B. <i>Chronologie du bisphénol A : de l'invention à la polémique</i>	13
II. REGLEMENTATION DU BISPHENOL A.....	15
A. <i>Dose journalière tolérable et position des agences réglementaires</i>	15
B. <i>Encadrement juridique de l'utilisation du bisphénol A</i>	17
III. EXPOSITION HUMAINE AU BISPHENOL A.....	17
A. <i>Exposition externe, exposition interne et concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué</i>	18
B. <i>Exposition externe</i>	20
1) Exposition alimentaire.....	20
2) Autres sources d'exposition.....	22
3) Conclusions	23
C. <i>Données de biosurveillance humaine</i>	24
1) Concentrations urinaires et exposition journalière	24
2) Concentrations plasmatiques et controverses	26
D. <i>Toxicocinétique du bisphénol A</i>	26
1) Principes et intérêts de l'évaluation toxicocinétique	27
2) Métabolisme et excrétion.....	28
3) Clairance.....	30
4) Absorption et biodisponibilité.....	32
5) Distribution.....	34
6) Temps de demi-vie	35
7) Liaison aux protéines plasmatiques	37
E. <i>Conclusions</i>	38
IV. EXPOSITION HUMAINE PRENATALE AU BISPHENOL A.....	39
A. <i>Particularités physiologiques impliquées dans la toxicocinétique fœtale</i>	40
1) Le métabolisme fœtal	40
2) Les échanges transplacentaires.....	42
3) La circulation sanguine fœtale.....	44
4) La recirculation du liquide amniotique	45
B. <i>Toxicocinétique materno-fœtale du bisphénol A durant le dernier tiers de la gestation</i>	46
1) Passage transplacentaire du BPA.....	47
2) Métabolisme fœtal du BPA.....	48
3) Clairance fœtale du bisphénol A	48
4) Conclusions	49
C. <i>Données de biosurveillance chez la femme enceinte</i>	50
1) Données urinaires et expositions journalières chez la femme enceinte	50
2) Données plasmatiques chez la femme enceinte et le fœtus.....	52

3) Conclusions	55
D. Conclusions.....	55
OBJECTIFS ET STRATEGIE DE LA THESE	56
CHAPITRE 2 : ETUDES EXPERIMENTALES	58
I. CARACTERISATION DE LA CONTRIBUTION DU METABOLISME ET DU TRANSFERT PLACENTAIRE DANS L'ELIMINATION DU BPA ET DU BPAG PAR LE FŒTUS	58
A. Contexte et objectifs.....	58
B. Article 1	59
C. Conclusions.....	68
II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE PHARMACOCINETIQUE POUR PREDIRE L'EXPOSITION DU FŒTUS HUMAIN AU BPA	69
A. Contexte et objectifs.....	69
B. Article 2	70
A. Conclusions.....	104
III. COMPARAISON DES ALTERATIONS DU PROTEOME FŒTAL INDUITES PAR UNE EXPOSITION FŒTALE EQUIOLAIRE AU BPA ET AU BPAG	105
A. Contexte et objectifs.....	105
B. Article 3	107
C. Conclusions.....	132
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	135
DETERMINATION DE LA FRACTION DE LA DOSE DE BPA REÇUE PAR LA MERE QUI ATTEINT LA CIRCULATION GENERALE FŒTALE.....	136
DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MOYENNES EN BPA ATTENDUES DANS LE PLASMA FŒTAL CHEZ L'HOMME	137
LIMITES LIEES AU MODELE DU FŒTUS OVIN	140
LIMITES DE L'APPROCHE TOXICOCINETIQUE COMPARTIMENTALE	141
CONTRIBUTION DE L'HYDROLYSE DU BPAG AUX CONCENTRATIONS EN BPA DES TISSUS FŒTAUX	141
CONCLUSION.....	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
ANNEXE	161
DONNEES COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE 1	161
DONNÉES COMPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 2	164
DONNEES COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE 3	174

Abréviations

ANR : Agence nationale française de la recherche

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

APCI-MS/MS : Atmospheric pressure chemical ionization tandem-mass spectrometry

AUC : Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques

BPA : Bisphénol A

BPA-d6 : Bisphénol A deutéré

BPAG : Bisphénol A glucuronide

BPAG-d6 : Bisphénol A glucuronide deutéré

BPAS : Bisphénol A sulfate

CI : Clairance

DES : Diéthylstilbestrol (distilbène)

DJT : Dose journalière tolérable

E2 : Œstradiol

ECHA : Agence européenne des produits chimiques

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

FDA : Food and drug administration

GC-MS: Gas chromatography mass spectrometry

IV : Intraveineuse

LC-MS/MS : Liquid chromatography tandem-mass spectrometry

LC-UV : Liquid chromatography–ultraviolet detection

LOAEL : Dose la plus faible à laquelle un effet délétère est observé

LXR : Récepteur nucléaire des oxystérols

NCI : National cancer institute

NOAEL : Dose pour laquelle aucun effet délétère n'est observé

OATP : Organic anion-transporting polypeptide

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBPK : Pharmacocinétique physiologique

PE-HD : Polyéthylène haute densité

PET : Polytéraphthalate d'éthylène

P-gp : P-glycoprotéine

PK : Pharmacocinétique

RXR : Récepteur des rétinoïdes

SHBG : Sex Hormone-Binding Globulin

T (1/2) : Temps de demi-vie

TK : Toxicocinétique

Transporteur ABC : Transporteur à ATP Binding Cassette

Transporteur SLC : Transporteur de la famille des solute carriers

UGT2B15 : Membre B15 de la famille 2 des UDP-Glucuronosyltransferase

V_{ss} : Volume de distribution à l'état de pseudo-équilibre

V_{ss} : Volume de distribution à l'équilibre

Liste des figures

Figure 1. Structures chimiques de l'œstradiol (E2), du diéthylstilbestrol (DES) et du bisphénol A (BPA).	13
Figure 2. Nombre d'études par année dont le titre contient le mot « bisphenol A » depuis 1990 (source : PubMed-NCBI).	15
Figure 3. Exposition externe, exposition interne, concentrations plasmatiques.	19
Figure 4. Le rôle de la toxicocinétique dans l'évaluation du risque associé à l'exposition humaine au BPA.	28
Figure 5. Métabolisme du BPA.	30
Figure 6. Contribution des voies d'absorption buccales et intestinales à la biodisponibilité du BPA via l'alimentation.	34
Figure 7. Interprétation du temps de demi-vie.	36
Figure 8. Concentrations plasmatiques en BPA attendues chez l'Homme pour une dose 100% biodisponible de 100 ng.kg ⁻¹ administrée en une fois (A), en trois fois à raison d'une exposition toutes les 4h (B), ou sous forme d'une exposition continue sur 10h (C).	39
Figure 9. Représentation schématique de la contribution du métabolisme fœtal et de la barrière placentaire dans la protection du fœtus vis-à-vis de l'exposition aux xénobiotiques.	43
Figure 10. Distribution du débit ombilical chez le fœtus humain en fin de grossesse (selon (127)).	45
Figure 11. Recirculation du liquide amniotique chez le fœtus pendant le dernier tiers de la grossesse (d'après (131)).	46
Figure 12. Représentation schématique des échanges materno-fœtaux du BPA et du BPAG durant le dernier tiers de gestation tels qu'établis avant le début de la thèse.	50
Figure 13. Protocole expérimental de l'étude protéomique pour la comparaison des effets d'une exposition fœtale au BPA et au BPAG.	106
Figure 14. Comparaisons des profils protéomiques réalisées afin de déterminer les effets d'une exposition fœtale au BPAG.	107
Figure 15. Distribution tissulaire fœtale en BPA après perfusion IV fœtale de BPA ou BPAG.	133
Figure 16. Devenir d'une dose externe de BPA dans l'unité fœto-maternelle lors d'une exposition maternelle au BPA d'origine alimentaire.	136

Liste des tableaux

Tableau 1. Expositions externes moyennes alimentaires et non alimentaires au BPA selon la classe d'âge (d'après l'EFSA (11)).	23
Tableau 2. Expositions internes estimées chez l'Homme à partir des quantités de BPA total mesurées dans les urines de 24h (selon l'EFSA (11), moyennes géométriques et 95 ^e centile).	25
Tableau 3. Concentrations urinaires en BPA total rapportées chez les femmes enceintes	51
Tableau 4. Concentrations plasmatiques (moyenne géométrique ou médiane) en BPA rapportées chez la femme enceinte et dans le sang de cordon.	53

Introduction générale

La notion de perturbateur endocrinien liée à la capacité qu'auraient certaines substances chimiques présentes dans l'environnement à interférer avec l'équilibre du système hormonal, ne date que de quelques décennies, et pourtant elle est désormais au centre des préoccupations environnementales et de santé publique.

Le problème des perturbateurs endocriniens a d'abord été mis en évidence par l'observation d'impacts de pollutions chimiques environnementales sur la fonction reproductrice de la faune sauvage (1–3). L'impact potentiel de ces polluants perturbateurs endocriniens sur la santé humaine a été révélé par la mise en évidence des effets délétères d'une exposition prénatale au diéthylstilbestrol (distilbène) (DES), un œstrogène de synthèse prescrit pour les femmes ayant des difficultés à mener une grossesse à terme (4). C'est dans ce contexte, lors d'un séminaire au Wingspread Conference Center regroupant à la fois des biologistes de la faune sauvage et des endocrinologues, que le concept de perturbateur endocrinien fut évoqué pour la première fois en 1991, pour désigner les substances chimiques présentes dans l'environnement et ayant le potentiel d'altérer le système endocrinien de l'Homme et de la faune sauvage (5). Désormais la définition communément admise d'un perturbateur endocrinien est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : « une substance ou un mélange de substances exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations » (6).

La production mondiale de substances chimiques a été multipliée par plus de 400 depuis les années 1930 conduisant à la libération dans l'environnement de dizaines de milliers de molécules qui n'ont pas fait l'objet d'études de toxicité (7). Parmi ces substances, le rôle des perturbateurs endocriniens dans la baisse de la fertilité et l'augmentation de l'incidence des désordres des fonctions endocrines constatées au sein de la population humaine est aujourd'hui fortement suspecté, à tel point qu'il est mis en avant par la plupart des médias grand public (8,9).

Cependant, l'évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine représente un challenge considérable et reste un sujet controversé pour les raisons suivantes :

- L'estimation de l'exposition humaine aux polluants chimiques environnementaux est difficile car elle se heurte à des difficultés méthodologiques liées premièrement aux limites des méthodes analytiques pour la mesure de concentrations très faibles et,

deuxièmement, à la contamination potentielle des échantillons par des substances omniprésentes dans l'environnement. Des approches complémentaires de toxicocinétique et d'évaluation des sources d'expositions sont par conséquent nécessaires à cette estimation.

- Les critères établis pour l'estimation de la toxicité générale d'un composé ne sont pas suffisants pour évaluer le risque pour la santé lié à l'exposition à un perturbateur endocrinien, et ceci pour plusieurs raisons :
 - Les effets d'une perturbation endocrinienne dépendent de la fenêtre d'exposition avec un risque accru lors d'une exposition prénatale associée à une latence des effets.
 - Les mécanismes d'action impliqués sont complexes et les effets multiples, le système endocrinien interagissant entre autre le métabolisme et le système immunitaire.
 - Les effets peuvent résulter d'une exposition chronique.
 - L'existence d'une relation non-monotone entre la dose et les effets est de plus en plus considérée (10).

Parmi les perturbateurs endocriniens, le bisphénol A (BPA), molécule d'intérêt dans le cadre de notre projet de recherche, est l'un des composés chimiques les plus étudiés en raison de la prévalence élevée de l'exposition humaine au BPA et de son potentiel œstrogénomimétique. Le BPA représente également un cas exemplaire de controverse en termes d'évaluation du risque. En effet, des désaccords subsistent au sein de la communauté scientifique concernant le niveau de l'exposition humaine et la notion d'effets à faible dose. Il en résulte des divergences d'avis des agences réglementaires telles que l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) et l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) (11,12) sur l'innocuité du BPA.

Une grande partie des effets suspectés du BPA sur la santé humaine seraient initiés lors de la période prénatale. En effet, des études expérimentales suggèrent qu'une exposition *in utero* au BPA même à bas bruit au cours des périodes critiques du développement, pourrait entraîner des effets exprimés de façon différée chez l'adulte (13–16). Cependant, l'absence de données concernant l'exposition fœtale humaine au BPA empêche l'extrapolation des données expérimentales de l'animal à l'homme et l'utilisation de ces résultats dans le cadre de l'évaluation du risque.

Un des enjeux scientifiques actuels est donc de développer un modèle mathématique qui permette de prédire l'exposition du fœtus humain au BPA et qui serait fondé sur des

données obtenues chez une espèce pertinente pour l'homme en termes de physiologie fœtale.

Dans ce contexte, l'objectif du travail de thèse était de développer un modèle pharmacocinétique (PK, aussi dit toxicocinétique (TK)) à partir des données obtenues chez le fœtus ovin pour prédire l'exposition fœtale humaine au BPA et à son principal métabolite, le BPA glucuronide (BPAG).

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche intitulé « Développement d'une approche intégrative modélisatrice pour évaluer l'exposition interne fœtale humaine à un contaminant, appliquée au bisphénol A au titre de molécule modèle » cofinancé par l'ANR (Agence Nationale Française de la Recherche) dans le cadre de l'appel appels à projets « Contaminants et Environnements : Santé, Adaptabilité, Comportements et Usages » 2013 et la région Midi-Pyrénées dans le cadre des « Allocations de recherche soutien aux doctorants 2013 ».

Le premier chapitre de ce manuscrit est une synthèse bibliographique des données relatives à la problématique de l'exposition humaine au BPA. Les deux premières parties décrivent l'historique du BPA depuis sa synthèse jusqu'à ses applications qui sont à l'origine de son omniprésence dans l'environnement et ont conduit à l'établissement des données réglementaires en vigueur. La troisième partie présente les estimations actuelles de l'exposition humaine au BPA ainsi que les données TK concernant l'ensemble des déterminants de l'exposition interne au BPA chez l'homme adulte. La dernière partie consiste en une synthèse des données bibliographiques concernant l'exposition fœtale au BPA. Les particularités physiologiques de l'unité foeto-placentaire sont décrites et mises en perspective avec les données de TK materno-fœtales du BPA disponibles afin de faire une synthèse des connaissances actuelles concernant les mécanismes impliqués dans l'exposition fœtale au BPA.

Les objectifs de ce travail sont ensuite présentés ainsi que les approches méthodologiques et les stratégies expérimentales qui ont été choisies pour y répondre.

Le deuxième chapitre est consacré aux études expérimentales réalisées au cours de la thèse. La première partie présente une étude TK publiée récemment (17) dont le but était la caractérisation de la contribution du métabolisme et du transfert placentaire dans l'élimination du BPA et du BPAG par le fœtus. Le développement d'un modèle pharmacocinétique pour prédire l'exposition du fœtus humain au BPA fait l'objet de la deuxième partie. Enfin, la troisième partie est consacrée à l'utilisation d'une approche

protéomique pour comparer les voies physiologiques altérées par une exposition fœtale au BPA et au BPAG.

L'ensemble des études réalisées sont mises en perspective et les risques liés à l'exposition prénatale humaine au BPA sont discutés dans la dernière partie du manuscrit.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I. Le bisphénol A : propriétés et historique

A. Propriétés physicochimiques

Le BPA (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane) est une substance chimique de synthèse constituée de deux groupements phényles liés par un pont carbone (Figure 1). De faible poids moléculaire (228.3 g.mol^{-1}), le BPA est une molécule lipophile avec un coefficient de partage n-octanol/eau de 3.32.

Dans le règlement CLP (classification et étiquetage des produits) de l'ECHA (agence européenne des produits chimiques), le BPA est classé comme irritant pour les voies respiratoires, pouvant occasionner des lésions oculaires graves et une sensibilisation par contact avec la peau. Il est également classé comme toxique pour la reproduction (18).

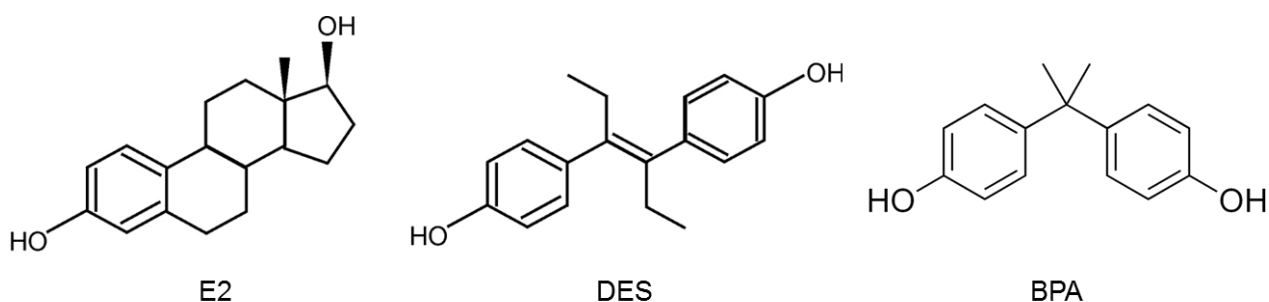


Figure 1. Structures chimiques de l'œstradiol (E2), du diéthylstilbestrol (DES) et du bisphénol A (BPA).

Bien que son affinité soit environ 1000 fois plus faible que celle de l'œstradiol, la présence de noyaux phénoliques similaires à ceux de l'œstradiol permet une liaison du BPA aux récepteurs α et β des œstrogènes (19). La proximité structurelle entre le BPA et le diéthylstilbestrol, œstrogène de synthèse responsable d'effets nocifs avérés pour le fœtus, explique le fait que leurs effets sont souvent comparés (20–23) (Figure 1).

B. Chronologie du bisphénol A : de l'invention à la polémique

Le BPA a été synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste Alexandre P. Dianin. Sa production en vue d'une utilisation commerciale n'a été envisagée que durant l'entre-deux-guerres, lorsque le britannique Edward Charles Doods l'étudia en tant que candidat pour le développement d'un œstrogène de synthèse à visée thérapeutique. Cette idée

d'utilisation du BPA comme œstrogène de synthèse a ensuite été abandonnée suite à la découverte du diéthylstilbestrol qui fut commercialisé en 1940.

Le BPA a trouvé par la suite sa première application industrielle dans la production de résines époxydes au début des années 1950. La production de BPA a commencé alors à prendre une ampleur considérable, les résines époxydes nouvellement développées trouvant des applications dans la quasi-totalité des secteurs industriels comme colle ou comme revêtements intérieur de contenants métalliques (23). En 1958, de nouvelles lois aux Etats Unis ont obligé l'obtention de l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) pour l'utilisation de produits chimiques en contact direct ou indirect avec les denrées alimentaires. Ces normes réglementaires ont conduit la FDA à évaluer la toxicité générale du BPA et son utilisation dans les contenants alimentaires tels les boîtes de conserves a été approuvée en 1960 (24).

En 1957, une nouvelle application au BPA a été développée en tant que monomère d'un nouveau type de plastique, le polycarbonate. De par sa transparence et sa résistance mécanique, le polycarbonate a connu un engouement important de la part des industriels, aboutissant à sa production massive qui atteignait déjà plusieurs centaines de milliers de tonnes dans les années 1970. Depuis lors, la production globale de BPA ne cesse d'augmenter (25) et sa présence est ubiquitaire dans l'environnement (26).

En raison du nombre croissant de personnes travaillant en contact avec le BPA, une étude de la cancérogénicité du BPA a été initiée par le NCI (National Cancer Institute) en 1977. Les conclusions de cette étude délivrées en 1982 ont fait état de l'absence de preuves convaincantes de la cancérogénicité du BPA. C'est à partir de cette étude que la FDA a fixé par la suite une dose journalière tolérable de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, soit une valeur bien au-dessus des expositions estimées, et donc que le BPA a été déclaré sans risque pour l'Homme (23).

Avec l'émergence de la problématique des perturbateurs endocriniens dans les années 1990, des études ont été réalisées dans le but d'évaluer les risques liés à l'exposition humaine au BPA, en particulier au cours de la période prénatale. Depuis lors, le BPA a fait l'objet d'un nombre croissant d'études scientifiques (Figure 2).

A ce jour, les risques liés à l'exposition humaine au BPA ont été réévalués par les agences réglementaires, et bien que des désaccords existent entre les agences, elles les considèrent globalement comme inexistantes ou faibles (11,12,24).

Indépendamment de l'avis des agences réglementaires, la méfiance vis-à-vis du bisphénol A conduit à une réduction de son utilisation dans des domaines spécifiques de l'industrie.

Ainsi, en France, il est de plus en plus fréquent de voir des tickets de caisse, des bouteilles ou encore des gobelets qui affichent la mention « sans BPA ».

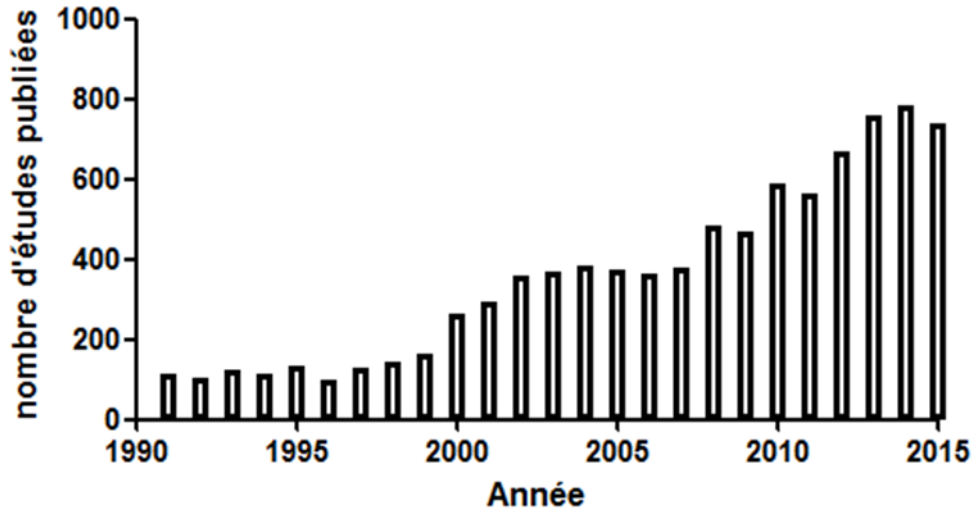


Figure 2. Nombre d'études par année dont le titre contient le mot « bisphenol A » depuis 1990 (source : PubMed-NCBI).

II. Réglementation du bisphénol A

La réglementation du BPA dépend des pays, elle est largement influencée par l'avis des agences réglementaires d'évaluation telles que la FDA, l'EFSA et l'ANSES.

A. Dose journalière tolérable et position des agences réglementaires

La dose journalière tolérable (DJT) est la dose maximale pouvant être reçue quotidiennement pendant toute la vie sans entraîner d'effets néfastes sur la santé. L'estimation de cette dose est cruciale car le niveau de risque établi par les agences réglementaires est déterminé par sa comparaison avec les estimations du niveau d'exposition humaine.

La dose pour laquelle aucun effet délétère n'est observable (NOAEL) et/ou la dose la plus faible à laquelle un effet délétère est observable (LOAEL) sont utilisées comme base pour l'établissement de la dose journalière tolérable après application d'un facteur de sécurité généralement de 100 et 1000, respectivement.

La FDA a autorisé l'utilisation du BPA dans les contenants alimentaires en 1960 aux Etats Unis. En 2008, la FDA a réalisé une évaluation des risques associés à l'utilisation du BPA (Draft Assessment of Bisphenol A for Use in Food Contact Applications (24)) et a fixé la DJT

à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Depuis lors, la FDA a maintenu la DJT à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ lors des réévaluations qui ont eu lieu en 2009 et 2014 et a considéré que le BPA ne présentait pas de risque pour la santé humaine (24). Cependant, en raison des incertitudes entourant les effets sanitaires potentiels du BPA sur la glande mammaire ainsi que sur les systèmes reproductif, métabolique, neurocomportemental et immunitaire soulevées par des études récentes, une nouvelle étude de grande envergure, le programme « CLARITY-BPA », a été initiée en 2013 par la FDA en collaboration avec le NTP (National Toxicology Program) et le NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) (27).

En 2006, l'EFSA a réalisé une première évaluation complète des risques associés au BPA, fixant une DJT de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, et a conclu que le niveau d'exposition au BPA via l'alimentation et les boissons était inférieur à la DJT. De nouveaux avis ont été rédigés en 2008, 2009, 2010 et 2011 à la demande de la Commission Européenne. En 2010, un nouvel avis prenant en compte l'ensemble des publications scientifiques les plus récentes a conclu qu'en l'absence de preuves supplémentaires, la DJT resterait fixée à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, et que la suspicion de toxicité neurocomportementale du BPA n'était pas fondée.

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

En 2012, l'EFSA a ainsi rédigé un nouvel avis complet sur les risques liés à l'exposition au BPA par voie alimentaire et non alimentaire. Les conclusions des études, publiées en 2013, 2014 et 2015 sont que le BPA ne présente pas de risques pour les consommateurs aux niveaux actuels d'exposition. Cependant, l'EFSA a préconisé une diminution significative de la DJT du BPA qui a été temporairement fixée à $4 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (11) et a recommandé des études supplémentaires concernant l'exposition non-alimentaire, la relation dose-réponse non monotone et les effets du BPA sur le rein.

Aujourd'hui, pour l'EFSA comme pour la FDA, l'exposition humaine au BPA ne présente pas de risque pour la santé humaine quelle que soit la classe d'âge, les estimations de l'exposition environnementale étant bien plus faibles que les DJT établies (11,24). L'ANSES présente un avis divergent en recommandant notamment la réduction de l'utilisation de BPA sur les tickets de caisse et la prévention de l'exposition au BPA pour les enfants en bas âge et les femmes enceinte ou allaitantes (12).

B. Encadrement juridique de l'utilisation du bisphénol A

Compte tenu des incertitudes concernant le risque lié à l'exposition humaine au BPA, le Canada a été le premier pays à légiférer sur le BPA en 2008. Cependant la France est certainement le pays ayant les lois les plus strictes quant à l'utilisation du BPA.

En France, la loi numéro 2010-729 du 30 juin 2010 a interdit « la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit et onéreux de biberons à base de BPA ». Cette mesure a été appliquée par la suite à l'ensemble de l'Union Européenne en 2011.

La loi française numéro 2012-1442 du 24 décembre 2012 a interdit le BPA dans les conditionnements, contenants ou ustensiles destinés à entrer en contact avec les aliments. Cette loi étant désormais en application depuis janvier 2015, une fois les stocks produits avant cette date écoulés, les contenants alimentaires vendus en France ne devraient plus contenir de BPA.

Enfin, le 19 mars 2014, la proposition de l'ANSES pour un reclassement européen du bisphénol A de « reprotoxique suspecté » à « toxique pour la reproduction » de catégorie 1B, a été acceptée par l'ECHA.

Aux Etats Unis, bien que des plans d'actions aient été élaborés, aucune loi n'a été adoptée quant à la restriction de l'utilisation du BPA. Seuls certains Etats ont interdit la vente de biberons contenant du BPA.

III. Exposition humaine au bisphénol A

Une estimation des risques associés à l'exposition humaine au BPA ne peut être réalisée sans avoir caractérisé l'exposition de la population humaine.

Alors que le caractère quasi-ubiquitaire de l'exposition au BPA est désormais avéré et ne fait l'objet d'aucun débat, l'estimation des concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué chez l'Homme reste l'un des sujets majeurs de controverse dans l'évaluation du risque.

Malgré les nombreuses études réalisées au cours de ces dernières décennies, un désaccord persiste au sein de la communauté scientifique entre d'une part, ceux qui en se basant principalement sur des modèles TK, estiment les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué à des valeurs dans le rang du picomolaire au sub-picomolaire (28), et d'autre part, ceux qui se basent sur certaines des valeurs élevées de concentrations plasmatiques rapportées chez l'Homme pour les estimer à des niveaux de l'ordre du nanomolaire au micromolaire (29).

Cette partie de la thèse consiste en une revue des éléments disponibles permettant l'estimation de l'exposition humaine au BPA.

A. Exposition externe, exposition interne et concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué

Trois types d'expositions ayant une signification différente sont pris en considération pour l'évaluation du risque (Figure 3) :

- L'exposition externe correspond à la dose de BPA à laquelle l'organisme est exposé via l'environnement, quelles que soient la voie d'exposition et la fraction de la dose entrant dans l'organisme.
- L'exposition interne correspond à la dose absorbée, c'est à dire ayant pénétré dans l'organisme et plus précisément ayant atteint la circulation systémique, que cela soit sous forme native ou sous forme transformée. Elle est reflétée par les concentrations plasmatiques et urinaires en BPA total (conjugué et non-conjugué).
- La concentration plasmatique en BPA non-conjugué (exposition interne au BPA). Ce sont ces concentrations qui doivent être prises en compte pour l'extrapolation des données toxicologiques de l'animal à l'homme (11,12,24), des études ayant montré que le métabolite principal du BPA (le BPA glucuronide (BPAG)) ne possède pas d'activité œstrogénique (30).

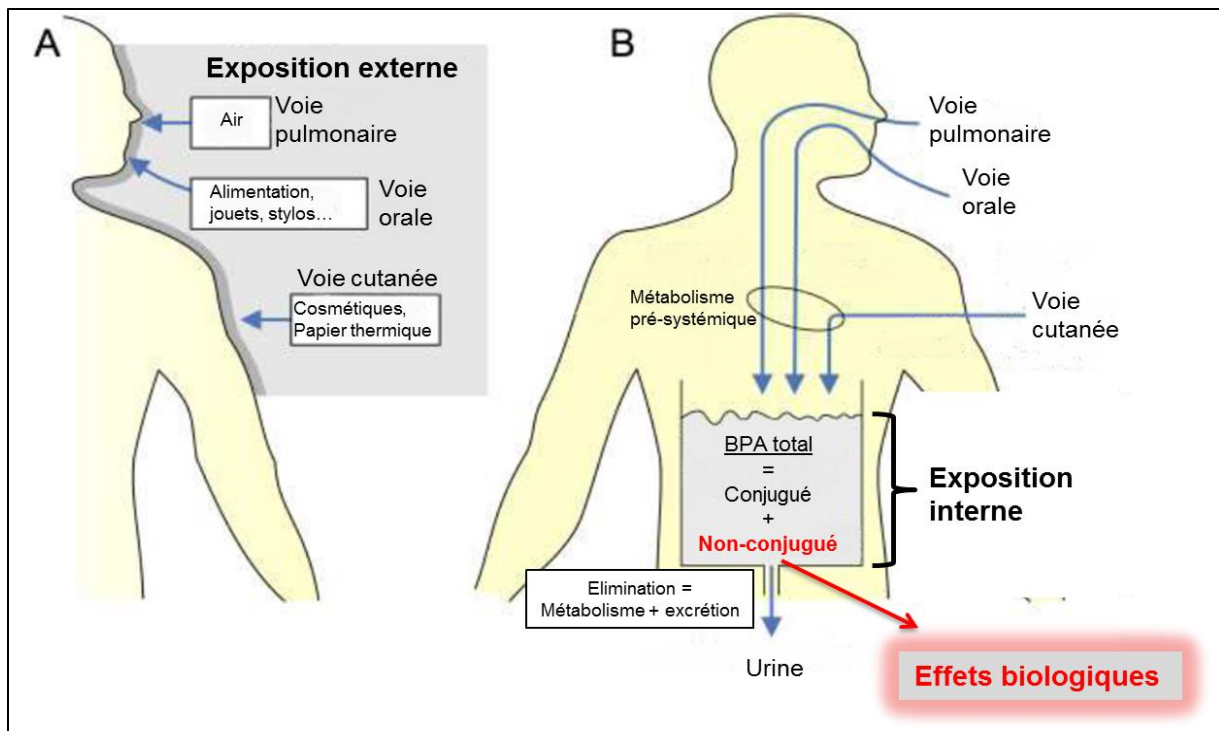


Figure 3. Exposition externe, exposition interne, concentrations plasmatiques.

Représentation schématique de la relation entre exposition externe (A), exposition interne (B) et concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué (d'après (10)).

Une première approche pour l'évaluation de l'exposition interne au BPA est la mesure directe des concentrations plasmatiques en BPA chez l'Homme. Cependant ces mesures de BPA non-conjugué restent sujettes à controverse en raison du risque de contamination des échantillons par le BPA présent dans l'environnement (31) et ne sont pas prises en considération dans l'évaluation du risque par les agences réglementaires (11).

Alternativement, l'exposition interne au BPA peut être estimée à partir d'études TK associées aux estimations du niveau d'exposition externe humaine.

L'étude de l'exposition externe permet de rendre compte de la contribution des différentes voies d'entrée à l'exposition interne. Cette évaluation est cruciale car en fonction de la voie d'entrée, une même dose interne peut mener à différents niveaux de concentrations plasmatiques de BPA et de ses métabolites selon l'existence ou non d'un métabolisme pré-systémique. Une absorption intestinale par exemple, pourra suite à un effet de premier passage hépatique, être à l'origine d'un ratio entre les concentrations plasmatiques de la molécule parent et de ses métabolites plus faible que celui associé à l'absorption par voie pulmonaire, les poumons présentant une activité métabolique plus limitée.

Sachant que la quasi-totalité de la dose interne de BPA est éliminée dans les urines sous forme de BPAG chez l'Homme (32,33), elle est facilement estimable par la mesure des

concentrations urinaires. La dose interne journalière est estimée par la quantité totale de BPA (parent et métabolites) retrouvée dans les urines totales collectées sur 24h.

Ainsi, les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué au sein de la population peuvent être déduites des paramètres TK estimés en considérant d'une part, les voies d'expositions identifiées par l'étude de l'exposition externe, et d'autre part la dose interne estimée via les données urinaires de biosurveillance.

B. Exposition externe

Tout polymère présente une stabilité limitée et se dégrade plus ou moins rapidement en relargant ses constituants. La vitesse de la dégradation dépend de la nature du polymère et des conditions physicochimiques qui lui sont appliquées. Cette propriété intrinsèque des polymères est d'ailleurs exploitée dans l'industrie pharmaceutique pour la libération contrôlée de principes actifs dans l'organisme depuis des implants en polymère spécialement conçus à cet effet. Le BPA étant principalement utilisé dans la composition de polymères, il est également relargué, dans une certaine mesure, sous forme de monomère actif dans l'environnement. Ainsi, tout objet contenant du BPA, qu'il entre dans la composition d'un polymère ou non, et entrant directement ou indirectement en contact avec l'organisme, représente une source potentielle d'exposition au BPA.

La contribution des différentes sources d'exposition externe à l'exposition interne a été estimée dans les derniers rapports de l'EFSA (11) et de l'ANSES (12). Elle dépend du niveau de dose reçue à chaque exposition ainsi que de la fréquence à laquelle se produit l'exposition. L'alimentation est considérée comme la source majeure de l'exposition humaine externe au BPA (11,12). Il s'agit également de la source d'exposition la mieux documentée. Cependant, d'autres sources d'exposition doivent être considérées comme l'exposition cutanée via la manipulation de papier thermique, l'inhalation de poussières ou encore l'exposition orale via des objets portés à la bouche.

1) Exposition alimentaire

La contamination des denrées alimentaires et des boissons destinées à la consommation humaine par du BPA peut avoir différentes origines.

Les aliments et boissons conditionnés dans des boîtes métalliques sont considérés comme les contributeurs majeurs à l'exposition alimentaire au BPA (11,12) en raison de la migration du BPA depuis les résines époxyde utilisées comme revêtement interne des contenants alimentaires. Ainsi, des concentrations en BPA de quelques dizaines de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ont été relevées dans des aliments en conserve et des concentrations de quelques $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans des

boissons en cannette (34,35). Selon la quantité d'aliments en conserve ingérée, ces concentrations peuvent mener à une dose externe allant jusqu'à plusieurs centaines de $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Bien que plus faibles, des concentrations en BPA de l'ordre du $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ont été mesurées dans des produits n'étant pas en conserve, ces concentrations pouvant atteindre jusqu'à une dizaine de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans les poissons et les viandes (34,36–38). Ces concentrations élevées rapportées dans ce type d'aliments pourraient être expliquées par une contamination de l'aliment au cours du processus de transformation et/ou par une contamination de l'animal. Etant donné la contribution potentielle non négligeable de ces produits à l'exposition externe totale moyenne estimée chez l'Homme (17% selon l'ANSES (12) soit plusieurs dizaines de $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), selon l'EFSA, ces concentrations inexpliquées doivent encore être confirmées (11).

L'eau peut également représenter une source d'exposition au BPA. Des concentrations en BPA ont été mesurées dans de l'eau contenue dans des réservoirs en polycarbonate, ces concentrations augmentent avec le temps et la température et peuvent atteindre quelques microgrammes par litre. Ce n'est cependant pas le cas pour l'eau contenue dans les bouteilles en plastique les plus couramment utilisées qui sont en polytéréphtalate d'éthylène (PET) ou polyéthylène haute densité (PE-HD) (39–42). Les concentrations en BPA dans l'eau du robinet distribuée en réseau ont été évaluées en France à seulement quelques ng.L^{-1} (43). Cependant il a été démontré que dans le cas de canalisations vieillissantes réparées avec des résines époxyde, des concentrations en BPA de plusieurs $\mu\text{g.L}^{-1}$ peuvent être observées (44). Ainsi, une eau contaminée consommée régulièrement peut entraîner une exposition externe allant de plusieurs dizaines à une centaine de $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Enfin, le lait maternel peut présenter des concentrations de quelques $\mu\text{g.L}^{-1}$ de BPA, entraînant une exposition externe du nouveau-né de l'ordre de 100 $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (11,45).

Les habitudes de consommation alimentaire sont donc des déterminants de l'exposition journalière au BPA et une grande variabilité des niveaux d'expositions est attendue au sein de la population. La consommation d'aliments en conserve et l'utilisation de bouteilles en polycarbonate semblent être les deux facteurs ayant la contribution la plus importante à l'exposition totale au BPA. Ainsi, une corrélation a été mise en évidence entre la prévalence de ces modes de consommation et le niveau d'exposition interne évalué au travers des données des concentrations urinaires en BPA total (estimées par dosage du BPA après hydrolyse des métabolites) (46,47).

2) Autres sources d'exposition

L'omniprésence du BPA dans l'environnement complique l'identification des sources principales d'expositions externes qui sont potentiellement nombreuses. Bien qu'à ce jour, l'alimentation soit considérée comme la source majeure d'exposition externe, d'autres sources d'exposition non identifiées pourraient avoir une contribution importante à l'exposition interne au BPA.

Les jouets en plastique et plus particulièrement ceux destinés à être portés à la bouche représentent une source potentielle d'exposition. Le fait de porter des jouets à la bouche entraîne des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans la salive (48), ce qui correspond à une dose externe de l'ordre d'une dizaine de $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ en supposant que les jouets utilisés quotidiennement contiennent du BPA.

L'utilisation de scellants dentaires pour éviter l'apparition de caries entraîne une augmentation des concentrations salivaires en BPA qui peuvent atteindre plusieurs $\mu\text{g.L}^{-1}$. L'augmentation de ces concentrations est cependant transitoire comme en témoigne le retour des concentrations urinaires aux niveaux de base quelques jours après la pose (49,50).

Des concentrations élevées en BPA de l'ordre du mg.kg^{-1} ont été relevées dans les poussières d'intérieur (12,51). Cependant considérant les quantités infimes de poussières ingérées, la dose journalière de BPA ingérée via la poussière est estimée à une valeur faible, d'environ $10 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les enfants les plus exposés (11).

D'autres voies d'exposition telles que l'inhalation de BPA via l'air d'intérieur dont les concentrations seraient de l'ordre du ng par m^3 (12,52) ou encore l'exposition cutanée via le BPA contenu dans les cosmétiques, conduiraient à une exposition externe faible, de l'ordre de quelques $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (11).

Enfin, du BPA appliqué sous forme de poudre à la surface des papiers thermiques à hauteur de 20 mg par g de papier peut être transféré sur les doigts, en particulier lorsque ceux-ci sont gras. Le BPA peut alors être ingéré ou absorbé directement via la peau, l'absorption serait augmentée par l'application de gel hydroalcoolique (53,54). La fréquence de survenue d'une exposition de ce type étant inconnue, le transfert de BPA depuis les tickets de caisse constitue l'un des facteurs d'incertitude les plus importants concernant l'exposition au BPA. Ainsi, l'ANSES recommande la prise de mesure pour réduire l'utilisation de BPA dans les tickets de caisse (12). D'un autre côté, L'EFSA estime que cette utilisation engendre une

dose externe faible , inférieure à $1 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ à la fois pour l'absorption orale et l'absorption cutanée (11).

3) Conclusions

L'alimentation représente la source d'exposition externe majeure au BPA avec une dose maximale d'exposition de l'ordre du $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ via la nourriture en conserve et l'eau contenue dans des réservoirs en polycarbonate. Selon l'ANSES, l'exposition au BPA via l'alimentation représenterait 84% de l'exposition totale, majoritairement via la consommation d'aliments en conserve (12).

Une estimation des sources d'exposition au BPA selon les classes d'âges réalisée par l'EFSA (Tableau 1) aboutit aux mêmes conclusions en ce qui concerne la contribution importante de l'alimentation à l'exposition externe totale. Les autres sources d'exposition seraient largement minoritaires et contribueraient à des expositions de l'ordre du $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (11).

Tableau 1. Expositions externes moyennes alimentaires et non alimentaires au BPA selon la classe d'âge (d'après l'EFSA (11)).

Groupe d'âge	Exposition alimentaire ($\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$)	Exposition non alimentaire ($\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$)			
		Orale	Papier thermique	Cosmétiques	Somme
1-5 jours nourri au sein	0.225	NA	NA	NA	NA
6 jours-trois mois nourri au sein	0.165	0.009	NA	NA	0.009
4-6 mois nourri au sein	0.145	0.009	NA	NA	0.009
0-6 mois non nourri au sein	0.030	0.009	NA	NA	0.009
6-12 mois	0.375	0.009	NA	NA	0.009
1-3 ans	0.375	0.007	NA	NA	0.007
3-10 ans	0.290	0.003	0.053	0.008	0.064
10-18 ans	0.159	0.002	0.113	0.015	0.13
Femmes 18-45 ans	0.132	0.0006	0.071	0.012	0.084
Hommes 18-45	0.126	0.0006	0.071	0.012	0.084
45-65 ans	0.126	0.0006	0.071	0.012	0.084
65 ans et plus	0.116	0.0006	0.071	0.012	0.084

Cependant, une incertitude importante persiste concernant l'exposition via les viandes et poissons et via les tickets de caisse.

La connaissance du niveau d'exposition externe et des voies principales d'exposition associées est essentielle à l'estimation des concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué à l'origine des effets biologiques potentiels du BPA. Ces estimations de l'exposition externe présentent encore des incertitudes importantes, en particulier en ce qui concerne l'identification des sources d'exposition. Elles doivent être confortées au travers de leur comparaison aux valeurs d'exposition interne estimées à partir des données de biosurveillance.

C. Données de biosurveillance humaine

La mesure des concentrations en BPA non-conjugué dans les fluides biologiques dans le but d'estimer l'exposition humaine au BPA est controversée à cause du risque élevé de contamination lié à l'omniprésence du BPA dans l'environnement.

Alors qu'une partie de la communauté scientifique affirme que la mise en place de mesures adaptées permet d'éviter ces contaminations et de mesurer les concentrations en BPA non-conjugué sans biais (29), d'autres considèrent que ces contaminations sont inévitables et attribuent les valeurs élevées des concentrations en BPA dans le plasma humain (de l'ordre du ng.mL^{-1}) à des contaminations des échantillons au cours des procédures de recueil et/ou d'analyse, y compris dans leurs propres études (55).

Les données urinaires quant à elles sont moins controversées. Des études ayant permis d'affirmer que le BPA est rapidement et majoritairement éliminé sous forme de BPAG dans les urines chez l'Homme (33,56), les concentrations urinaires en BPA total (BPA et ses métabolites), déterminées après hydrolyse des métabolites, permettent d'estimer la dose interne de BPA reçue sur la période de prélèvement des urines.

Cette partie fait la synthèse des données actuelles des concentrations plasmatiques et urinaires décrites chez l'Homme.

1) Concentrations urinaires et exposition journalière

Le caractère quasi-ubiquitaire de l'exposition humaine au BPA a été validé par la mesure des concentrations urinaires en BPA total, ces dernières étant au-dessus des limites de détection dans une grande majorité des échantillons analysés et pour un grand nombre d'études de biosurveillance (57–60).

Une méta-analyse réalisée par l'EFSA montre que les concentrations en BPA total dans les urines rapportées dans différentes études européennes sont similaires, avec des moyennes

géométriques variant entre 1.1 et 3.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (11). Les quantités de BPA total des urines de 24h ont permis d'estimer les doses internes quotidiennes par tranche d'âge (Tableau 2).

Tableau 2. Expositions internes estimées chez l'Homme à partir des quantités de BPA total mesurées dans les urines de 24h (selon l'EFSA (11), moyennes géométriques et 95^e centile).

Sous-population	Exposition moyenne ($\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$)	95 ^e centile ($\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$)
0-1 ans	<10	161
3-5 ans	107	676
5-10 ans	49	204
10-18 ans	48	228
18-65 ans	39	184
65-75 ans	56	203

Ces estimations sont en accord avec les estimations d'exposition externe au BPA et vont de quelques dizaines de $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ en moyenne à quelques centaines de $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour le 95^e centile, les enfants de 3 à 5 ans étant plus exposés que les autres tranches d'âge de la population.

L'identification de sous-populations à risque doit également être prise en compte dans l'évaluation du risque. Par exemple, une étude récente suggère une dose interne plus haute chez les caissiers avec des concentrations médianes en BPA total dans les urines de 8.92 $\mu\text{g.L}^{-1}$ contre 3.54 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans un groupe contrôle (61). L'influence de l'exposition via les tickets de caisse sur la dose interne ne serait donc pas négligeable pour cette sous-population. Par ailleurs, pour une personne donnée, l'exposition au BPA varie probablement de façon importante d'une journée à l'autre, ceci est reflété par la grande variabilité des concentrations urinaires relevées, avec des valeurs extrêmes parfois cent fois plus élevées que la moyenne (61). De tels événements d'exposition à des doses élevées de BPA doivent être pris en compte dans l'évaluation du risque.

Les doses d'exposition journalières estimées à partir des données urinaires seront utilisées dans cette thèse comme dose interne pour déterminer les concentrations plasmatiques attendues chez l'Homme.

2) Concentrations plasmatiques et controverses

Chez l'Homme adulte, les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué ou en BPA total (estimées par dosage du BPA après hydrolyse des métabolites) varient de valeurs inférieures aux limites de détection des méthodes analytiques à quelques dizaines de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (62–64).

En considérant que la biodisponibilité du BPA par voie orale (qui serait la voie majeure d'exposition) est très faible en raison d'une intense conjugaison hépatique pré-systémique, les valeurs élevées des concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué (de quelques dizaines de $\mu\text{g.L}^{-1}$) rapportées chez l'homme sont bien au-dessus des estimations PK réalisées à partir des doses internes estimées via les données urinaires (de l'ordre du ng.L^{-1} (11)). C'est la raison pour laquelle les concentrations plasmatiques élevées en BPA non-conjugué sont attribuées à des contaminations et ne sont pas prises en compte dans l'évaluation du risque par les agences réglementaires (11,24).

Ce positionnement est vivement critiqué par une partie de la communauté scientifique, qui affirme que ces données ne peuvent pas être systématiquement attribuées à des contaminations (65) et qui suggèrent que les concentrations élevées de BPA dans le plasma humain peuvent être expliquées par une sous-estimation de la biodisponibilité associée au site d'absorption du BPA (29). L'influence de l'absorption buccale ou cutanée sur les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué et sur le ratio des concentrations plasmatiques en BPA et en BPAG a notamment été montrée (53,66). Cependant, la contribution de ces voies d'absorption aux concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué dans un scénario d'exposition journalier représentatif de l'exposition humaine reste à établir.

L'estimation des concentrations plasmatiques en BPA actif au sein de la population humaine ne fait donc pas l'unanimité et joue un rôle important dans la controverse liée à l'évaluation du risque. Lors de cette thèse, suite à l'identification de la dose interne et des voies d'exposition, l'étude des caractéristiques TK du BPA permettra de rendre compte du caractère plausible des concentrations plasmatiques en BPA rapportées chez l'Homme.

D. Toxicocinétique du bisphénol A

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées dans le but d'évaluer les paramètres TK du BPA.

Des études de TK *in vivo* réalisées chez différentes espèces (rat, souris, singe, porc ou encore brebis dans notre laboratoire) et avec différentes voies d'administrations

(sous-cutanée, orale, intraveineuse...) ont permis l'évaluation des paramètres d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination du BPA.

Des études *in vitro* sur des matrices biologiques humaines et animales ont permis d'évaluer la fraction libre du BPA dans le plasma et de déterminer les principales voies de métabolisation et les clairances intrinsèques associées.

Cette partie consiste en une revue des données TK disponibles, principalement chez le rat, au titre de modèle de référence en toxicologie, le singe, qui représente le modèle animal le plus proche de l'homme, et la brebis, qui est l'espèce modèle du laboratoire.

Les voies d'administration considérées dans cette partie sont principalement :

- La voie intraveineuse qui permet l'évaluation de paramètres TK fondamentaux tels que la clairance plasmatique
- La voie orale considérée comme la voie majeure d'exposition au BPA chez l'Homme.

Les données obtenues chez l'Homme, bien que plus rares et fondées uniquement sur des administrations orales, sont également mises en perspectives par rapport aux données animales.

1) Principes et intérêts de l'évaluation toxicocinétique

La connaissance des paramètres TK permet d'estimer les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué à partir de la dose et de la voie d'exposition externe. En effet, la TK évalue l'action de l'organisme sur la molécule et les déterminants de la relation entre l'exposition externe (la dose) et l'exposition interne.

L'exposition interne est le plus souvent évaluée au travers des concentrations plasmatiques car elles reflètent les concentrations tissulaires à l'origine des effets biologiques, et également en raison de la possibilité de suivre leur décours temporel par l'intermédiaire de prélèvements sanguins répétés. En effet, c'est via la circulation sanguine qu'une molécule est distribuée dans l'organisme, ceci est vrai pour les tissus cibles et également pour les organes impliqués dans l'élimination.

Les concentrations plasmatiques permettent donc à la fois de suivre la disposition de la molécule dans l'organisme au cours du temps et de prédire l'effet biologique qui en résulte. C'est la raison pour laquelle elles sont systématiquement utilisées dans le développement de médicaments et en toxicologie. En ce qui concerne le BPA, seule sa forme non-conjuguée est biologiquement active, c'est pourquoi l'estimation des concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué chez l'Homme est essentielle à l'évaluation du risque.

Cependant, à l'heure actuelle, l'évaluation de ces concentrations se heurte à des difficultés méthodologiques liées aux limites de détection des techniques de dosage du BPA et au risque de contamination des échantillons par le BPA omniprésent dans l'environnement.

Alternativement, les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué peuvent être prédites à partir des paramètres TK. Cependant, les doses d'exposition environnementales étant plus faibles que celles appliquées habituellement pour l'évaluation TK, l'indépendance de ces paramètres TK vis-à-vis de la dose est un prérequis à l'extrapolation des prédictions TK aux conditions d'expositions environnementales. A ce sujet, les données expérimentales obtenues chez l'animal suggèrent que l'exposition en termes de concentrations plasmatiques en BPA est proportionnelle à la dose (67,68), ce qui atteste du caractère prédictif des modèles TK pour l'estimation de l'exposition humaine interne au BPA.

Alors que les paramètres de métabolisme systémique, de distribution et d'élimination sont communs à toutes les voies d'exposition, les paramètres d'absorption et de biodisponibilité sont très dépendants de la voie d'entrée. Ainsi, la source majeure d'exposition externe au BPA n'est pas nécessairement le contributeur principal de l'exposition interne ni des concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué reliées aux effets. C'est la raison pour laquelle l'étude approfondie des caractéristiques TK du BPA est importante dans l'évaluation du risque (Figure 4).

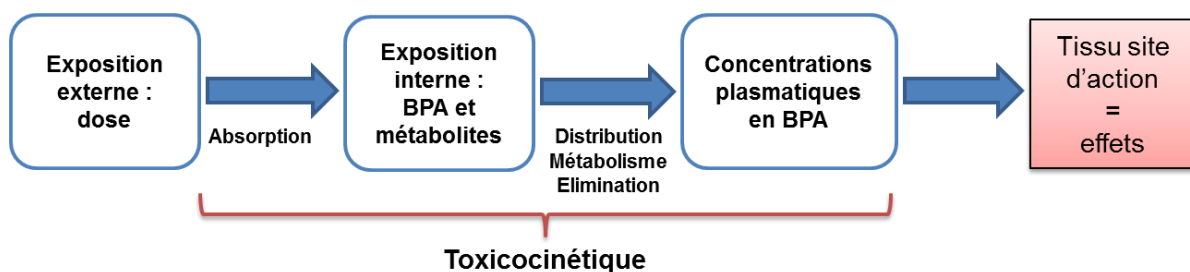


Figure 4. Le rôle de la toxicocinétique dans l'évaluation du risque associé à l'exposition humaine au BPA.

2) Métabolisme et excrétion

Les deux principales voies d'élimination d'une molécule par l'organisme sont le métabolisme, qui consiste en une transformation par réaction enzymatique, et l'excrétion, qui consiste en une sécrétion de la molécule en dehors de l'organisme (rénale le plus souvent, biliaire, pulmonaire, salivaire...).

Chez toutes les espèces étudiées, le BPA est très majoritairement éliminé par métabolisation et plus précisément via des réactions de conjugaison enzymatique de phase II. La glucuronoconjugaison, c'est-à-dire l'ajout d'un acide glucuronique, est la voie de

métabolisation majoritaire du BPA, le BPA étant également minoritairement sulfoconjugué (ajout d'un ion sulfate). Ceci a notamment été vérifié chez le singe (69,70), le rat, la souris (71,72) et la brebis (17), et a été observé également chez l'homme (56) après une administration par voie orale.

L'importance de la glucuronoconjugaison du BPA a également été évaluée *in vitro*. Comme pour la plupart des xénobiotiques, le BPA est essentiellement glucuronoconjugué par l'organe métabolique principal, le foie (73), bien qu'une activité de conjugaison ait été également mise en évidence au niveau de l'intestin (74). Des études *in vitro* ont mis en évidence des valeurs élevées de clairance intrinsèque de glucuronoconjugaison du BPA par des hépatocytes ou des fractions microsomales hépatiques de rat, de souris, de brebis et d'Homme (74–76). L'enzyme majoritairement responsable de la glucuronoconjugaison chez l'Homme a été identifiée (74,77), il s'agit du membre B15 de la famille 2 des UDP-Glucuronosyltransferase (UGT2B15).

L'ensemble de ces études vont dans le sens de faibles différences interspécifiques du métabolisme du BPA. Cependant, deux différences importantes sont constatées entre les rongeurs et les autres modèles animaux, y compris les primates :

-La première concerne le développement des capacités métaboliques de glucuronoconjugaison avec l'âge. Chez le rat, la clairance de glucuronoconjugaison du BPA est plus faible chez le nouveau-né que chez l'adulte alors que ces différences ne sont pas présentes chez le singe rhesus (71). L'immaturité de la clairance métabolique chez le rongeur nouveau-né peut avoir des conséquences importantes sur les effets du BPA en augmentant les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué pour une même dose externe. La deuxième conséquence étant une probable augmentation de la biodisponibilité du BPA par voie orale chez les rats nouveau-nés.

-La deuxième concerne l'excrétion du BPA conjugué. Alors que le BPA est principalement éliminé sous forme de BPAG dans les urines chez l'homme, le singe et la brebis (17,33,70), le BPA subit un cycle entéro-hépatique chez le rat (72,78). Il en résulte que le BPAG est excrété dans l'intestin puis y est hydrolysé avant d'être réabsorbé, entraînant des rebonds de concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué et un temps de demi-vie plus long comme décrit dans la partie III.D.6 de ce chapitre (79).

Chez l'ensemble des espèces étudiées, le BPA est donc éliminé par glucuronoconjugaison hépatique, puis le BPAG formé est éliminé dans les urines chez l'Homme et subit un cycle entéro-hépatique chez le rat conduisant à l'élimination fécale du BPA (Figure 5). Ce

métabolisme hépatique efficace aura un impact important sur les paramètres TK de clairance et de biodisponibilité décrits ci-après.

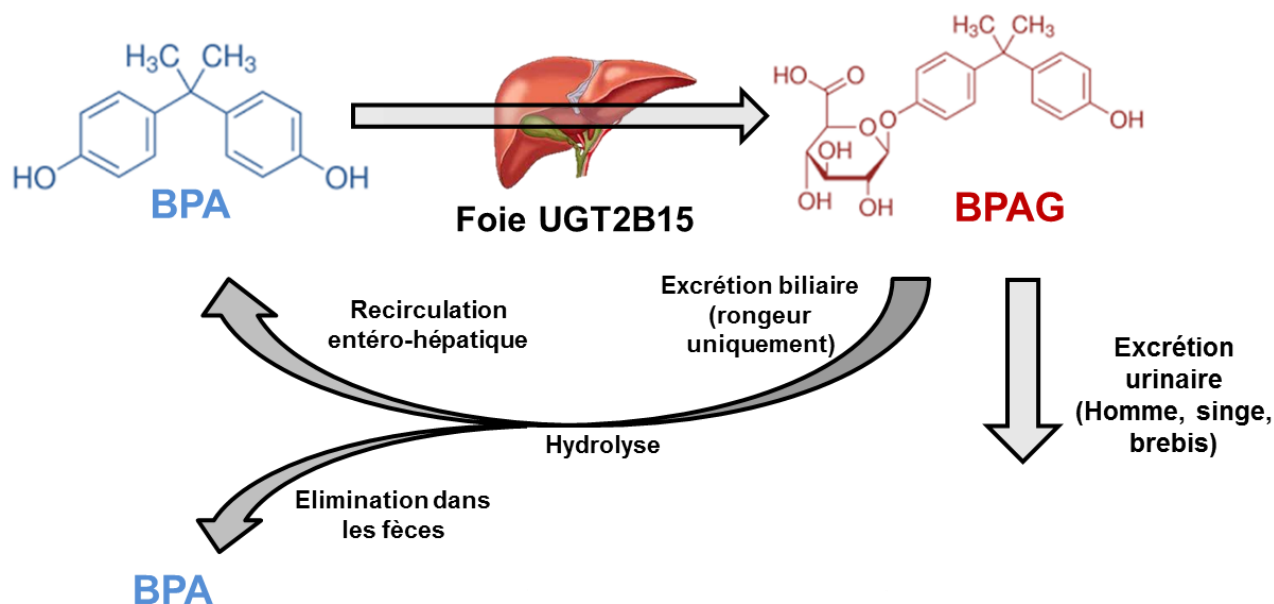


Figure 5. Métabolisme du BPA.

Représentation schématique du métabolisme du BPA chez les différentes espèces considérées. Chez l'Homme, le BPA est principalement glucuronoconjugué par l'UGT2B15 dans le foie, le BPA glucuronide est alors éliminé dans les urines.

3) Clairance

La clairance plasmatique ou plus simplement clairance, est le paramètre TK le plus important à considérer car de ce paramètre dépend l'ensemble des concentrations plasmatiques, que cela soit dans les premiers temps ou un long moment après l'exposition, et ce quelle que soit la voie d'exposition.

La clairance plasmatique est le paramètre le plus souvent utilisé car il reflète la clairance corporelle totale d'une molécule. Contrairement à ce qui est indiqué couramment, il est préférable de ne pas considérer la clairance plasmatique comme le volume apparent de plasma épuré de la molécule par unité de temps, car le terme « volume apparent » peut porter à confusion. La clairance plasmatique est la constante de proportionnalité qui relie la vitesse d'élimination à la concentration plasmatique (Équation 1):

Équation 1. Clairance plasmatique : première définition

$$Cl = \frac{V_{elim}}{C}$$

Avec V_{elim} la vitesse d'élimination depuis le compartiment plasmatique (dit central) (en g.h^{-1}), C la concentration plasmatique (en g.L^{-1}) et Cl la clairance plasmatique (en L.h^{-1} ou rapportée au poids corporel en $\text{L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$). La clairance plasmatique est donc un paramètre constant qui conditionne à tout moment la vitesse d'élimination.

La clairance plasmatique ne peut être déterminée de façon certaine que via une administration intraveineuse (IV) de la molécule suivie de la mesure du décours temporel des concentrations plasmatiques. La clairance peut alors être calculée selon l'équation suivante :

Équation 2. Clairance plasmatique : deuxième définition

$$Cl = \frac{dose}{AUC}$$

Avec *dose* la quantité de molécule administrée par voie IV (en g) et *AUC* l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de la molécule (telle qu'elle est administrée, sous la forme non-conjuguée) au cours du temps (en (g.h.L^{-1})).

La clairance plasmatique du BPA a été évaluée chez différentes espèces à des valeurs proches de leurs débits sanguins hépatiques. Elle a ainsi été estimée à $1.75 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez le mouton (17), et à 4.5 et $0.46 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez le rat et le singe respectivement (69,72).

Lors d'une étude d'allométrie, la clairance du BPA a été estimée à $0.75 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez le cheval, $1.6 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez le mouton, $3.5 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez le cochon, $1.8 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez le chien, $3.8 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez le rat et $2.1 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez la souris. Une absence de différence interspécifique a été constatée en termes de clairance plasmatique lorsqu'elle est normalisée par le poids corporel. Autrement dit, la clairance plasmatique semble simplement proportionnelle à la masse corporelle quelle que soit l'espèce (80).

A ce jour, la clairance du BPA n'a pas été déterminée chez l'homme car des administrations intraveineuses de BPA ne peuvent pas être réalisées chez l'Homme pour des raisons éthiques. Cependant, les données *in vitro* et *in vivo* disponibles ont permis l'estimation de la clairance plasmatique humaine. La clairance du BPA a été estimée à $1.54 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ pour un homme de 70 kg par allométrie à partir des clairances évaluées expérimentalement *in vivo* chez différentes espèces animales dont l'intervalle des poids corporels incluait celui de l'homme (80). Par une approche similaire, l'EFSA a estimé la clairance humaine du BPA à $1.43 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ (11).

Alternativement, étant donné que le BPA est éliminé en quasi-totalité par métabolisation hépatique, sa clairance peut être assimilée à la clairance hépatique. Cette dernière peut être estimée à partir de la clairance intrinsèque hépatique selon l'équation suivante :

Équation 3. Clairance plasmatique : troisième définition.

$$Cl_H = \frac{Q_H \times fu \times Cl_{int}}{Q_H + fu \times Cl_{int}}$$

Avec Cl_H la clairance hépatique (en $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$), Q_H le débit sanguin hépatique (en $L \cdot h^{-1}$), fu la fraction de BPA non lié aux protéines plasmatiques et Cl_{int} la clairance intrinsèque hépatique (en $L \cdot h^{-1}$ par kg) évaluée *in vitro*. De cette façon, la clairance hépatique du BPA a été estimée à $1.32 L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ (74) à partir de la clairance intrinsèque mesurée *in vitro* sur des fractions microsomales hépatiques humaines.

Enfin, l'approche par modélisation pharmacocinétique physiologique (PBPK) a également permis l'estimation d'une clairance de $1.26 L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ (81).

L'ensemble des clairances plasmatiques humaines du BPA estimées à ce jour sont donc très proches. Les clairances hépatiques estimées *in vitro* ($1.32 L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$) sont équivalentes aux clairances plasmatiques estimées *in vivo* ($1.26-1.54 L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$) et sont proches du débit sanguin hépatique humain de $1.38 L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ (82). Ceci suggère que les capacités métaboliques hépatiques envers le BPA sont si élevées que la clairance du BPA n'est limitée que par le débit hépatique, chez l'Homme comme chez les autres espèces étudiées. Une clairance hépatique élevée comme décrit ici pour le BPA indique également l'existence d'un effet de premier passage hépatique important lors d'administration par voie orale menant à une biodisponibilité réduite.

4) Absorption et biodisponibilité

Par voie orale, il a été établi que la quasi-totalité de la dose externe de BPA est absorbée. Ceci a été démontré chez l'homme, le chien, la souris, le porc, le singe, la brebis et le rat (33,56,70,72,80,83). Cela signifie que par voie orale, la dose interne est équivalente à la dose externe.

Cependant, une incertitude importante persiste concernant la biodisponibilité du BPA lors d'une exposition via l'alimentation. La biodisponibilité est la fraction de la dose externe qui atteint la circulation systémique sous forme inchangée (non-conjuguée). Étant donné que seul le BPA non-conjugué est supposé actif et est pris en considération dans l'évaluation du

risque, la biodisponibilité a plus d'importance dans l'évaluation du risque que la fraction de la dose externe absorbée.

La biodisponibilité du BPA administré par gavage orogastrique a été évaluée au laboratoire à 1.2% chez le mouton, 1.1% chez le porc, 1.9% chez le chien, 3% chez le rat et 6% chez la souris (83). Elle a été estimée dans d'autres études à 3.8% chez le rat (72) et 0.2% chez le singe (69).

Alors que l'absorption intestinale est quasi-totale, seule une faible fraction de la dose absorbée atteint ainsi la circulation générale sous forme inchangée en raison de l'intense effet de premier passage hépatique qui résulte de la forte capacité du foie à glucuronoconjuguer le BPA (III.D.2).

L'effet de premier passage hépatique consiste en une métabolisation pré-systémique du BPA, il est dû au fait que le BPA quittant l'intestin arrive directement dans le foie via la veine porte pour y être en quasi-totalité transformé en BPAG, avant d'atteindre la circulation sanguine systémique (Figure 6). Il en résulte une exposition systémique beaucoup plus élevée au BPAG qu'au BPA comme cela a pu être observé chez l'Homme suite à une administration de BPA par voie orale (32,33,56).

Des biodisponibilités plus élevées ont été observées lorsque le BPA est administré via l'aliment et non par gavage. Ainsi, la biodisponibilité du BPA administré avec un morceau de pomme a été estimée à 7.3% chez le singe Rhésus (84) alors que la biodisponibilité du BPA administré par gavage a été estimée à une valeur environ 35 fois plus faible (0.2%) chez la même espèce (69). La différence peut être expliquée par le comportement de « hoarding » (faire magasin) des singes qui consiste à garder le morceau de fruit dans la bouche, ce qui en augmentant le temps de résidence du BPA dans la cavité orale, faciliterait son absorption buccale. En effet, il a été démontré chez le chien que le BPA peut être directement absorbé via la muqueuse buccale qui est très fine et très vascularisée, et accéder directement à la circulation générale, sans passer par le foie (66), évitant ainsi l'effet de premier passage hépatique (Figure 6). Cette capacité d'absorption des composées hydrophobes par la muqueuse buccale est connue et est exploitée dans l'industrie pharmaceutique pour la délivrance rapide de certains principes actifs dans l'organisme comme par exemple la trinitrine qui est administrée sous la langue.

Ainsi, l'influence de l'absorption buccale sur la biodisponibilité du BPA n'est probablement pas négligeable comme le suggèrent des études réalisées chez le mouton (85) et la souris (86). La biodisponibilité du BPA via l'alimentation dépend donc probablement du type d'aliment ingéré et du temps de résidence dans la bouche.

Ceci est également conforté par les valeurs différentes des ratios entre les aires sous la courbe des concentrations plasmatiques (AUC) en BPA et en BPAG rapportées dans les différentes études TK réalisées chez l'Homme (32,33). En effet, le rapport entre les AUCs de BPA et de BPAG est 2 fois plus élevé après l'ingestion de BPA contenu dans des cookies (33) qu'après ingestion de BPA via une soupe (32) dont le temps de séjour dans la cavité buccale est plus réduit.

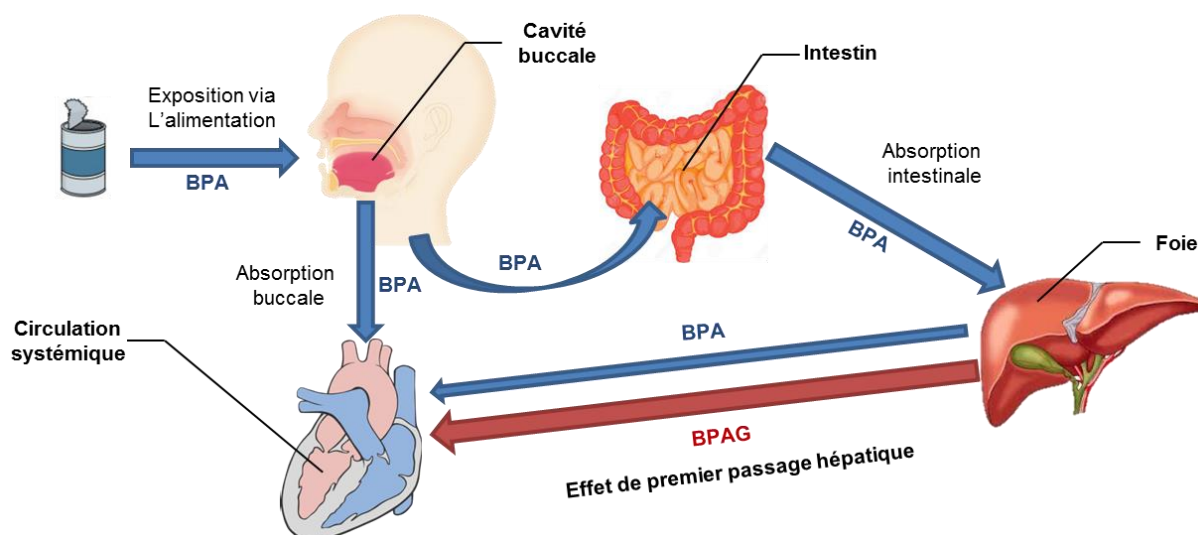


Figure 6. Contribution des voies d'absorption buccales et intestinales à la biodisponibilité du BPA via l'alimentation.

En conclusion, les études récentes indiquent que les voies d'absorption buccale et intestinale doivent être prises en compte pour l'évaluation du risque lié à l'exposition humaine au BPA, et remettent en question la biodisponibilité du BPA actuellement estimée à une valeur faible pour la voie d'exposition orale qui est la voie d'exposition majeure. A ce jour, la contribution de ces deux voies d'absorption reste à déterminer et la biodisponibilité orale « moyenne » du BPA contenu dans l'alimentation chez l'Homme n'est pas connue. Les concentrations plasmatiques en BPA actif chez l'Homme sont donc probablement sous estimées par les agences réglementaires telles que l'ANSES et l'EFSA qui considèrent une biodisponibilité orale du BPA de 3% ou encore la FDA qui la considère à 1% (11,12,24). Dans ce contexte, il est également important de souligner que les doses journalières tolérables ont été fixées par les agences réglementaires à partir de données issues d'administration de BPA par gavage.

5) Distribution

Le paramètre TK rendant le mieux compte de l'importance de la distribution d'une molécule dans l'organisme est le volume de distribution à l'équilibre (V_{ss}). Il peut être considéré

comme étant le volume fictif dans lequel se distribue la molécule pour être à l'équilibre avec les concentrations plasmatiques.

Le V_{ss} est un paramètre TK indépendant de la clairance plasmatique et qui permet de calculer la quantité de molécule dans l'organisme à l'équilibre, c'est-à-dire durant une perfusion intraveineuse ou dans le cas d'expositions répétées (87).

Le V_{ss} est la constante de proportionnalité entre la quantité de molécule dans l'organisme et la concentration plasmatique mesurée à l'équilibre :

Équation 4. Volume de distribution à l'équilibre.

$$V_{ss} = \frac{\text{quantité de molécule dans l'organisme (en mg)}}{\text{concentrations plasmatiques (en mg.L}^{-1}\text{)}}$$

Le V_{ss} du BPA a été estimé au laboratoire à 232 L chez le cheval, 65 L chez le porc, 10 L chez le chien, 3.6 L chez le rat et 0.44 L chez la souris, ce qui correspond à un rang de valeurs allant de 0.5 L.kg⁻¹ chez le cheval à 20 L.kg⁻¹ chez la souris. Cette étude a permis d'estimer le V_{ss} du BPA chez l'Homme par allométrie à 1 L.kg⁻¹ (80). Ce volume de distribution élevé observé chez toutes les espèces suggère une distribution tissulaire importante du BPA.

Chez le mouton, le V_{ss} du BPA a été estimé à 1.3 L.kg⁻¹ contre 0.3 L.kg⁻¹ pour le BPAG. Le BPAG semble donc être peu distribué comparativement au BPA, ce qui peut être expliqué par une hydrophobicité élevée du BPA par rapport au BPAG (17).

En conclusion, le BPA qui atteint la circulation systémique est largement distribué dans les tissus, en accord avec ce qui est prédit par les modèles PBPK à partir des coefficients de partage tissulaires du BPA (88) et ce qui a été observé expérimentalement chez le rat avec des ratios de concentration tissu/plasma de 2 à 6 (67).

6) Temps de demi-vie

Le temps de demi-vie ($T_{\frac{1}{2}}$) est le temps nécessaire pour que les concentrations plasmatiques soient divisées de moitié après avoir atteint l'état de pseudo-équilibre, c'est-à-dire lorsque la pente finale du décours temporel des concentrations plasmatiques est observée :

Équation 5. Temps de demi-vie. Première définition.

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{Ke}$$

Avec K_e la pente de la phase terminale d'élimination (en h^{-1}).

Il est dépendant à la fois de la clairance et du volume de distribution comme en témoigne l'équation suivante :

Équation 6. Temps de demi-vie. Deuxième définition.

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2) \times V_{area}}{Cl}$$

Avec V_{area} le volume de distribution à l'état de pseudo-équilibre (en L) et Cl la clairance plasmatique (en $L.h^{-1}$).

Le temps de demi-vie est utile pour l'estimation du temps nécessaire à atteindre l'état d'équilibre dans le cadre d'expositions répétées ou de perfusions. Cependant il ne permet pas de préjuger de la contribution de la phase terminale à l'exposition globale en termes d'AUC comme l'illustre la Figure 7.

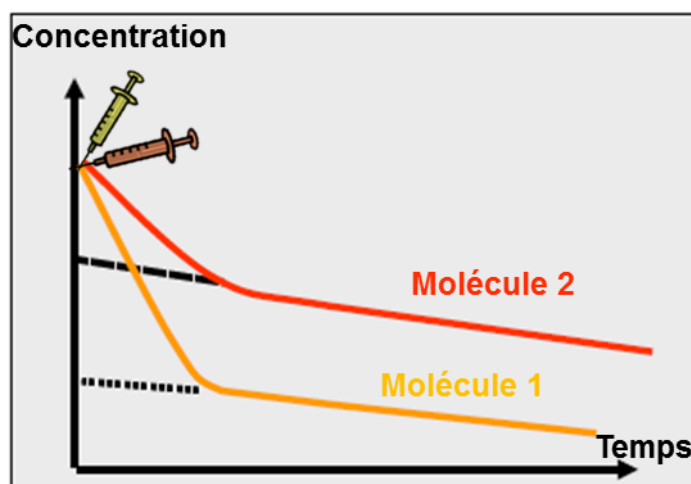


Figure 7. Interprétation du temps de demi-vie.

Représentation des concentrations plasmatiques en fonction du temps pour deux molécules ayant le même temps de demi-vie. Alors que les molécules 1 et 2 ont une demi-vie identique, l'AUC est plus importante pour la molécule 2.

Le temps de demi-vie du BPA a été estimé à 0.66 et 8.9 h chez le rat après une administration intraveineuse et orale respectivement (78). Une comparaison interspécifique réalisée à partir d'administrations IV a révélé une demi-vie comprise entre 0.62 et 1.3 h chez le mouton, le cheval, le chien et le porc contre 5.6 et 13.3 h chez le rat et la souris respectivement (80). Le temps de demi-vie du BPA a été estimé chez le singe après administration IV à environ 0.5 h (70) et à 3.6 h dans une étude plus récente (69). La demi-vie élevée du BPA chez le rongeur comparativement aux autres espèces s'explique par la recirculation entéro-hépatique décrite précédemment (chapitre I.III.D.2).

Les temps de demi-vie du BPA et du BPAG ont également été estimés chez l'homme à des valeurs très différentes selon les études après administration orale, soit à 0.45 et 0.29 h respectivement (32) et à 6.4 et 6.2 h respectivement dans une étude plus récente (33).

La plupart des études réalisées indiquent une demi-vie du BPA de l'ordre de l'heure et montrent une absence d'accumulation du BPA pouvant avoir des conséquences importantes sur l'exposition systémique totale au BPA dans un contexte d'exposition répétée. Les valeurs de temps de demi-vie plus élevées pour les études récentes chez le singe et l'Homme pourraient être expliquées par la diminution des limites de détection des méthodes analytiques. La présence d'une phase d'élimination terminale encore mal caractérisée chez le primate ne peut donc pas être exclue. Cette dernière pourrait être due à une accumulation de BPA dans un tissu spécifique ou à la présence d'un cycle entéro-hépatique chez le primate, même s'il est moins important que chez le rongeur.

7) Liaison aux protéines plasmatiques

La liaison aux protéines plasmatiques est une liaison réversible de la molécule aux protéines présentes dans le plasma. Lorsqu'une molécule atteint la circulation systémique, un équilibre se crée entre la fraction libre et la fraction liée aux protéines plasmatiques. Seule la fraction libre pourra être distribuée hors de la circulation systémique, être éliminée, ou encore atteindre les tissus cibles pour exercer un effet biologique. La liaison aux protéines plasmatiques peut donc influencer le volume de distribution, la clairance ainsi que la demi-vie d'une molécule (89).

Lorsque nous parlons de concentrations plasmatiques en BPA, nous désignons la concentration en BPA libre et lié aux protéines plasmatiques présentes dans plasma. Or seule la fraction libre peut exercer un effet biologique, signifiant qu'une même concentration plasmatique peut exercer des effets plus ou moins intenses selon l'importance de la fraction libre. Les différences interspécifiques de liaison aux protéines plasmatiques doivent donc être prises en compte dans l'évaluation du risque.

Le BPA se lie aux protéines plasmatiques, majoritairement à l'albumine et également à la SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) (90,91). La liaison du BPA aux protéines plasmatiques a été évaluée chez l'homme (90), la brebis (92), le rat (93) et le macaque *Cynomolgus* (70). La variabilité interspécifique s'est révélée faible chez ces espèces avec une faible fraction libre du BPA plasmatique d'environ 5-6%. Pour le BPA, la liaison aux protéines plasmatiques ne semble donc pas présenter une source potentielle d'erreur pour l'extrapolation à l'Homme des résultats des études toxicologiques.

E. Conclusions

Les paramètres TK qui influencent les concentrations plasmatiques peuvent varier en fonction de l'espèce et de la voie d'administration. La pertinence des études *in vivo* portant sur les effets du BPA et visant à reproduire les conditions d'exposition humaine au BPA ne peut donc pas être évaluée simplement au travers de la pertinence de la dose (correspondant à l'exposition externe). En raison de l'impact des modalités d'exposition au BPA (voie orale, dermale...) sur les concentrations plasmatiques en BPA, ce sont avant tout les concentrations plasmatiques en BPA associées à des effets délétères qui doivent être comparées à celles attendues chez l'Homme. Or il existe à l'heure actuelle une controverse concernant les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué chez l'Homme (chapitre I. III.C.2)).

Mise à part la demi-vie plus longue du BPA chez les rongeurs, peu de différences interspécifiques sont relevées en termes de TK du BPA. Ceci, associé à la cohérence entre les données TK obtenues *in vivo* sur des modèles animaux, et les études *in vitro* réalisées à partir de matrices biologiques humaines, conforte les estimations actuelles des paramètres TK humains du BPA. Le paramètre TK sur lequel repose encore une grande incertitude est la biodisponibilité associée à la voie d'exposition la plus importante au BPA chez l'Homme, l'alimentation.

A l'aide d'un simple modèle mono-compartmentale avec la clairance plasmatique et le volume de distribution à l'équilibre estimé par allométrie ($1.54 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}$ et 1 L.kg^{-1} respectivement (80)), nous pouvons estimer l'ordre de grandeur des concentrations plasmatiques en BPA attendues chez l'Homme (Figure 8).

En considérant une dose interne de $100 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ qui est de l'ordre de grandeur des valeurs d'exposition estimées à partir des données urinaires issues des études de biosurveillance (chapitre I. III.C.1)), et en considérant une biodisponibilité de 100% qui est le pire scénario envisageable, les concentrations plasmatiques attendues sont encore bien en dessous des valeurs élevées rapportées dans certaines des études de biosurveillance (de l'ordre du ng.mL^{-1} , chapitre I. III.C.1) (Figure 8).

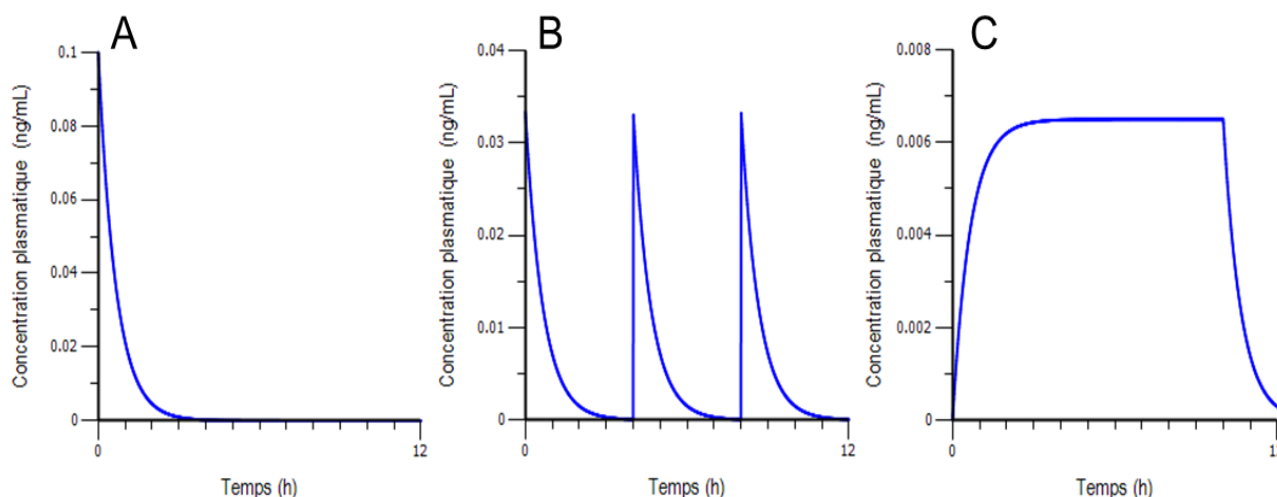


Figure 8. Concentrations plasmatiques en BPA attendues chez l'Homme pour une dose 100% biodisponible de 100 ng.kg^{-1} administrée en une fois (A), en trois fois à raison d'une exposition toutes les 4h (B), ou sous forme d'une exposition continue sur 10h (C).

Pour une dose de $100 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j.}^{-1}$, les concentrations plasmatiques en BPA rapportées dans certaines des études de biosurveillance humaine sont donc 1000 fois supérieures aux valeurs moyennes attendues ($0.0065 \text{ ng.mL}^{-1}$, (Figure 8.C) et au moins 30 fois supérieures aux concentrations maximales prédites pour une dose distribuée à 3 occasions par période de 12h (Figure 8.B).

En conclusion, l'ensemble des études TK montrent que les concentrations plasmatiques en BPA rapportées chez l'Homme sont en totale inadéquation avec les valeurs des expositions internes estimées à partir des données urinaires issues des études de biosurveillance. Ceci laisse supposer que les concentrations plasmatiques rapportées sont dues à des contaminations environnementales ou des conditions d'exposition particulières, et ne reflètent pas l'exposition moyenne humaine au BPA. Une autre explication aux concentrations plasmatiques élevées en BPA chez l'Homme pourrait être la présence d'un composé endogène identique ou très proche du BPA qui interférerait avec le dosage du BPA.

IV. Exposition humaine prénatale au bisphénol A

Une grande part des préoccupations liées aux risques de l'exposition humaine au BPA concerne la période critique du développement (12,94,95) en raison des effets potentiellement délétères d'une exposition prénatale aux xénoestrogènes. Le cas du diéthylstilbestrol a particulièrement marqué les esprits (4,96).

Des études *in vivo* ont montré qu'une exposition prénatale au bisphénol A à des doses proches ou inférieures aux doses journalières tolérables établies par les agences

réglementaires pouvait exercer des effets à long terme sur le fœtus. Un effet sur le développement de la glande mammaire chez le rongeur est le plus fréquemment reporté (14–16). Des effets sur le métabolisme (13), sur l'insulinorésistance (97), sur la fertilité (98) et sur l'émail dentaire (99) ont également été reportés chez le rongeur lors d'exposition prénatale au BPA.

Dans ce contexte, une estimation de l'exposition humaine prénatale au BPA est indispensable à l'évaluation du risque. Considérant la difficulté d'accès aux matrices biologiques fœtales humaines et dans un contexte où les données des concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué sont controversées et sujettes à caution, la mesure des concentrations en BPA dans le sang de cordon n'est pas suffisante. Des considérations TK et physiologiques doivent donc être prises en compte pour l'évaluation de l'exposition fœtale au BPA. Cette partie de la thèse vise à décrire les mécanismes physiologiques impliqués dans l'exposition fœtale au BPA, les données TK fœtales, ainsi que les données de biosurveillance humaine disponibles.

A. Particularités physiologiques impliquées dans la toxicocinétique fœtale

La physiologie fœtale qui contribue aux mécanismes TK diffère par de nombreux aspects de celle de l'adulte. En conséquence, le profil temporel ainsi que le niveau d'exposition aux xénobiotiques du fœtus peuvent différer par rapport à sa mère. Les capacités métaboliques intrinsèques, l'organisation de la circulation sanguine, les échanges transplacentaires ou encore la recirculation des urines via le liquide amniotique sont des déterminants de l'exposition fœtale. Ces particularités sont décrites dans cette partie pour l'Homme ainsi que pour le mouton, modèle animal utilisé dans le cadre de cette thèse et modèle de référence pour l'étude de la physiologie fœtale (100).

1) Le métabolisme fœtal

Comme chez l'adulte, le foie est l'organe majeur de la métabolisation chez le fœtus. Sa structure est mise en place lors du premier mois de gestation chez l'Homme et les capacités de métabolisation hépatiques se développent plus ou moins précocement selon les voies de métabolisation considérées.

Les capacités de réaction de phase 1 sont présentes dès le premier trimestre chez le fœtus humain. Les niveaux d'expression des différentes classes de Cytochromes P450 évoluent différemment au cours du développement du fœtus et varient entre 30 et 60% de ceux rapportés chez l'adulte (101,102). La présence de ces enzymes a également été mise en évidence chez le fœtus ovin (103).

De la même façon, les capacités de réaction de phase 2 évoluent différemment selon la famille d'enzyme.

Les capacités de sulfoconjugaison sont égales voire supérieures chez le fœtus humain comparativement à celles de l'adulte et semblent être en place dès le troisième mois de grossesse (104–107). Ainsi, la sulfoconjugaison semble être une voie de métabolisation importante pour le fœtus humain durant la première moitié de la gestation avec certaines isoformes de sulfotransférases uniquement exprimées chez le fœtus comme la SULT1A3, ceci étant probablement lié au rôle important des sulfotransférases dans le métabolisme des hormones et des stéroïdes durant la vie fœtale (108,109).

La capacité du fœtus à glucuronoconjuguer est également présente dès le premier trimestre chez le fœtus humain, mais contrairement aux capacités de sulfoconjugaison, les capacités de glucuronoconjugaison augmentent plus progressivement au cours du développement fœtal (110). Les capacités intrinsèques de glucuronoconjugaison hépatique fœtales humaines ne semblent pas dépasser 20% de celles observées chez l'adulte et se développent fortement dans les premiers mois après la naissance (110,111). Chez le mouton comme chez l'Homme, les niveaux d'expression des UDP-glucuronyltransférases sont également beaucoup plus faibles chez le nouveau-né et le fœtus que chez l'adulte (112).

Cependant, il est important de préciser que les niveaux relatifs d'expression des UDP-glucuronyltransférases et sulfotransférases chez le fœtus par rapport à l'adulte ne permettent pas de prédire les clairances de glucuronoconjugaison et sulfoconjugaison chez le fœtus ainsi que leurs contributions respectives à la détoxification des xénobiotiques. En effet, dans le cas où la clairance hépatique intrinsèque est très élevée et limitée par le flux sanguin hépatique chez l'adulte, une capacité métabolique du fœtus, bien qu'inférieure à celle de l'adulte, peut être suffisamment élevée pour ne pas constituer un facteur limitant de la clairance fœtale, qui pourrait également dépendre uniquement du débit sanguin hépatique fœtal (Équation 3). Il a ainsi été montré *in vivo* chez le singe que la clairance fœtale de glucuronoconjugaison de la morphine est équivalente au débit sanguin hépatique (sans prendre en compte le débit ombilical) du fœtus en fin de gestation (113). Toujours en fin de gestation, les clairances hépatiques fœtales de sulfoconjugaison et de glucuronoconjugaison du para-nitrophenol ont également été estimées équivalentes à celles de l'adulte chez le mouton (114).

En conclusion, la sulfoconjugaison représenterait la voie de métabolisation et de détoxification majeure durant la première moitié de la grossesse par rapport à la glucuronoconjugaison. Cette contribution importante a été démontrée notamment vis-à-vis

de la ritodrine avec des capacités de sulfoconjugaison du foie de fœtus humain en milieu de gestation plus importantes que celles de glucuronoconjugaison (115). Toutefois, comme chez l'adulte, la glucuronoconjugaison est le contributeur majeur du métabolisme des xénobiotiques chez le fœtus en fin de gestation. Les capacités de glucuronoconjugaison fœtales dépasseraient donc celles de sulfoconjugaison à partir de la moitié de la gestation.

2) Les échanges transplacentaires

Le placenta est l'organe jouant le rôle d'intermédiaire entre les circulations sanguines maternelle et fœtale.

En plus d'avoir une faible activité de métabolisation, le placenta exprime des transporteurs de la famille des ABC (ou transporteurs à ATP Binding Cassette) et de la famille des solute carriers (SLC) qui peuvent jouer un rôle, favorisant ou limitant le passage de certaines molécules de la mère au fœtus. Le rôle de ces transporteurs est relativement bien documenté chez l'Homme mais très peu chez le mouton (116–118).

Les transporteurs SLC pourraient jouer un rôle dans le transport des xénobiotiques de la mère au fœtus, de la même façon qu'ils permettent le transport d'hormones (118). A l'opposé, les P-glycoprotéines (P-gp) de la famille des transporteurs ABC sont des protéines d'efflux localisées principalement du côté maternel du placenta qui permettent de limiter le passage de substrats spécifiques dans la circulation fœtale. De la même façon que leur présence au niveau de l'intestin peut diminuer la biodisponibilité de certaines molécules (119) chez l'adulte, au niveau du placenta, elles peuvent probablement limiter l'exposition fœtale à certains xénobiotiques (118).

Globalement, le niveau d'expression placentaire des transporteurs diminue au cours de la gestation. En particulier, le niveau d'expression des P-gp diminue avec l'avancée de la grossesse chez l'Homme (118). Ainsi, la diminution du rôle protecteur du placenta vis-à-vis des xénobiotiques au cours de la gestation va de pair avec l'augmentation des capacités métaboliques fœtales (Figure 9).

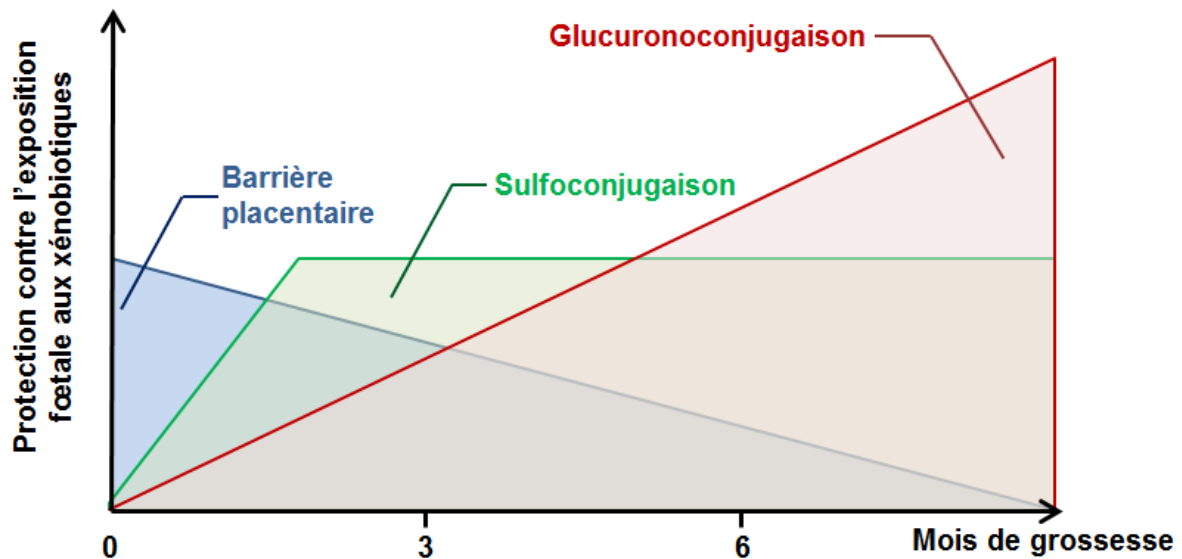


Figure 9. Représentation schématique de la contribution du métabolisme fœtal et de la barrière placentaire dans la protection du fœtus vis-à-vis de l'exposition aux xénobiotiques.

La contribution de l'ensemble de ces mécanismes de transport actif à l'exposition fœtale aux xénobiotiques reste cependant peu documentée et il semble que la diffusion passive représente le mécanisme majeur d'échange placentaire (116).

La diffusion passive à travers le placenta concerne les molécules de faible poids moléculaire, liposolubles et non-ionisées. Elle est simplement due au gradient de concentrations entre les circulations sanguines maternelles et fœtales. Son intensité dépend des débits sanguins placentaires, de la surface d'échange entre les deux compartiments sanguins, des propriétés physicochimiques de la substance et de sa liaison aux protéines plasmatiques. Contrairement aux mécanismes de transport actif, elle ne requiert pas d'énergie et n'est pas saturable. Elle n'est donc pas susceptible d'entraîner une modification de la clairance fœtale avec la dose d'exposition.

La diffusion passive, mécanisme principal d'exposition fœtale aux xénobiotiques, dépend donc de la structure du placenta. Or anatomiquement la placentation ovine diffère par de nombreux aspects de la placentation humaine, laissant supposer des différences interspécifiques importantes en termes de transfert des xénobiotiques. Chez l'ovin, la placentation est syndesmochoriale, la circulation sanguine maternelle est séparée de la circulation fœtale par cinq couches de tissus contre trois chez l'Homme qui a une placentation hémochoriale (100). Cependant, l'organisation en villosités du cotylédon ovine est structuralement similaire à celle du placenta humain (100,120). De plus, la présence de zones d'érosion de la muqueuse utérine et de l'endothélium vasculaire maternel chez l'ovin entraîne un contact direct du sang maternel avec le trophoblaste fœtal, rapprochant les

circulations maternelles et fœtales et lui conférant des similitudes avec la placentation hémochoriale humaine (100,121).

La placentation des ovins n'est donc pas identique à celle de l'Homme, cependant, elle en est suffisamment proche pour que la plupart des mécanismes de transfert d'oxygène et de nutriments qui ont été découverts chez le mouton soient par la suite confirmés chez l'Homme (122). Les similarités par rapport à l'Homme en termes de poids fœtal, de nombre de fœtus par individu et de maturité fœtale à la naissance, ainsi que la possibilité de réaliser des prélèvements fœtaux sériés, font du mouton un modèle pertinent pour l'étude des échanges transplacentaires des xénobiotiques.

3) La circulation sanguine fœtale

Deux particularités doivent être prises en considération concernant la circulation sanguine fœtale au dernier tiers de la gestation.

La première est la circulation sanguine transplacentaire. La veine ombilicale véhicule le sang du placenta vers le fœtus et les artères ombilicales du fœtus au placenta à un débit équivalent, qui rapporté au poids du fœtus, est d'environ $12 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ (123–125) chez le mouton et $7 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ chez l'Homme (126–128). Ces débits représentent environ la moitié du débit cardiaque fœtal. A titre de comparaison, chez l'Homme adulte, le débit hépatique de $1.38 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ représente 26% du débit cardiaque (82). Par conséquent, le passage transplacentaire représente potentiellement la voie d'exposition et d'élimination majeure des xénobiotiques pour le fœtus avec des débits, qui rapportés au poids du fœtus, sont beaucoup plus importants que ceux habituellement impliqués dans la clairance des xénobiotiques chez l'adulte.

La deuxième particularité est la circulation hépatique fœtale. Une fraction importante du débit ombilical veineux, d'environ 75% chez l'Homme et 50% chez le mouton, passe par le foie fœtal avant d'atteindre la circulation systémique, le reste du débit ombilical court-circuite le foie et atteint la circulation systémique fœtale via le ductus venosus (ou canal d'Arantius) (123,127). Ainsi, il a été estimé chez le mouton qu'environ 30% du débit sanguin hépatique fœtal qui est de 26 L.h^{-1} provient de la veine porte et des artères hépatiques fœtales alors que le reste provient de la veine ombilicale. Chez l'Homme, une configuration similaire a été mise en évidence par échographie doppler avec 20% du débit hépatique fœtal (11 L.h^{-1}) provenant de la veine porte et le reste de la veine ombilicale.

De la même façon qu'un premier passage hépatique peut survenir pour une molécule absorbée via l'intestin chez l'adulte (chapitre I. III.D.4), une conjugaison pré-systémique peut

survenir entre les circulations maternelle et fœtale (Figure 10). L'importance de cet effet de premier passage a d'ailleurs été mis en évidence chez le fœtus ovin pour la diphenhydramine (129).

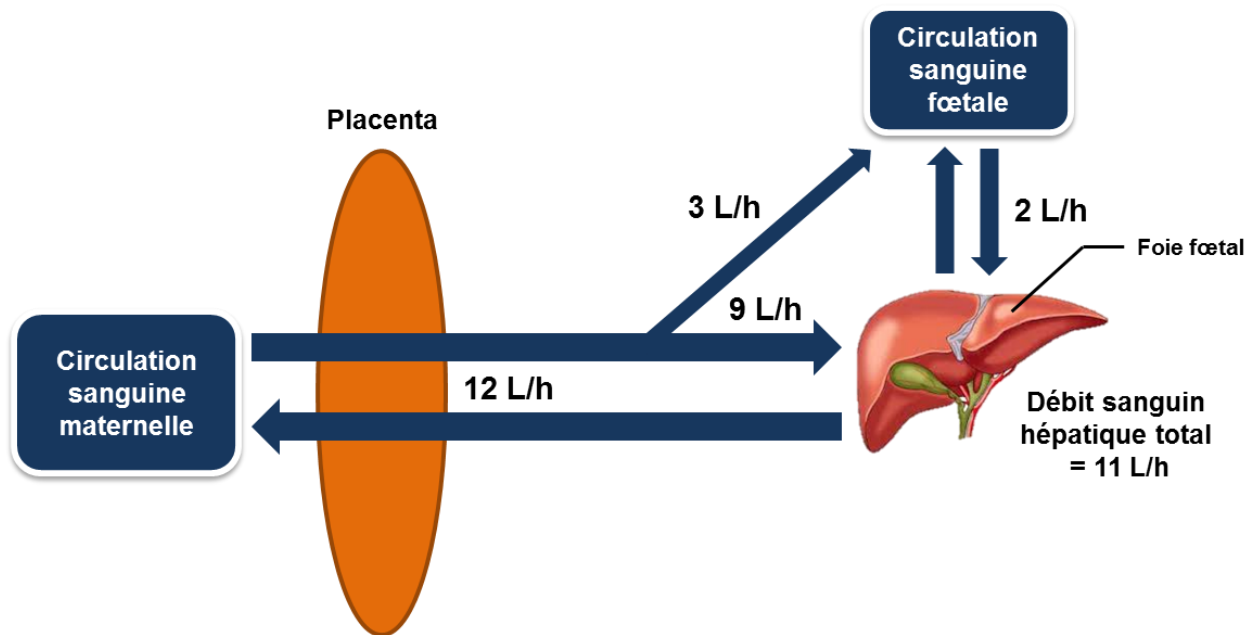


Figure 10. Distribution du débit ombilical chez le fœtus humain en fin de grossesse (selon (127)).

Après le débit cardiaque, le débit ombilical rapporté au poids du fœtus est le plus élevé des débits sanguins. Les débits sont estimés à des valeurs environ deux fois plus élevées chez le fœtus ovin que chez le fœtus humain avec une fraction de 50% du débit ombilical atteignant la circulation hépatique avant de rejoindre la circulation systémique.

4) La recirculation du liquide amniotique

Alors que l'excrétion dans les urines représente la voie d'élimination majeure des métabolites de phase II chez l'adulte, les urines fœtales ne sont pas éliminées dans le milieu extérieur mais dans le liquide amniotique dans lequel baigne le fœtus. A partir de la deuxième moitié de la gestation, le liquide amniotique est principalement composé d'urines fœtales excrétées à raison d'un litre par jour en fin de gestation, et en moindre proportion, de fluides sécrétés par les poumons.

Aussi bien chez l'Homme que chez le mouton, le volume de liquide amniotique est maintenu constant autour d'un litre par sa déglutition régulière par le fœtus (plusieurs centaines de mL par jour) (130) et par son absorption au travers les membranes fœtales (131).

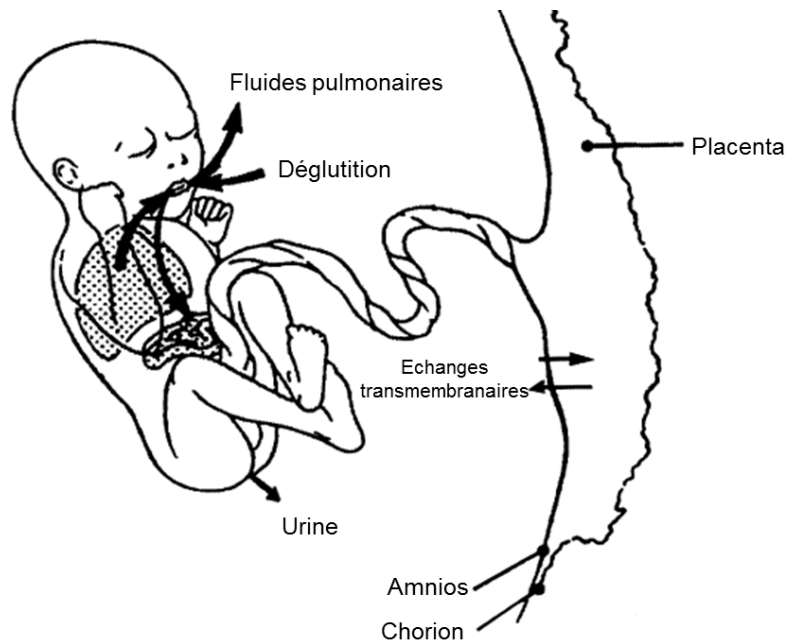


Figure 11. Recirculation du liquide amniotique chez le fœtus pendant le dernier tiers de la grossesse (d'après (131)).

La recirculation du liquide amniotique peut donc prolonger l'exposition fœtale aux molécules excrétées qui pourront être par la suite réabsorbées d'une façon similaire au cycle entéro-hépatique chez l'adulte. Les échanges transmembranaires entre le liquide amniotique et la circulation maternelle peuvent également constituer une voie d'exposition et d'élimination des xénobiotiques pour le fœtus.

Il est également important de considérer que le liquide amniotique n'est pas biochimiquement inerte. Il contient entre autres des nutriments, des agents antimicrobiens et des facteurs de croissance (132). De plus, la présence de glucuronidases pouvant hydrolyser les métabolites de phase II qui y sont excrétés a été démontrée (133).

B. Toxicocinétique materno-fœtale du bisphénol A durant le dernier tiers de la gestation

De la même façon que chez l'adulte, des études TK fœtales du BPA ont été réalisées *in vivo* chez la brebis et le singe. Ces études combinées avec des études *in vitro* de capacités métaboliques fœtales envers le BPA et des études de transfert placentaire réalisées *ex vivo* sur le placenta humain ont permis d'identifier les mécanismes intervenant dans l'exposition fœtale humaine au BPA.

1) Passage transplacentaire du BPA

Il a été démontré par des expériences de perfusion réalisées *ex vivo* sur des placentas humains que le BPA traverse le placenta par diffusion passive de façon très efficace, aussi bien dans le sens fœto-maternel que materno-fœtal (134,135). Le passage transplacentaire du BPAG a également été évalué selon la même méthode et il s'est avéré très limité par rapport à celui du BPA (135).

Des études *in vivo* réalisées chez le fœtus ovin et le fœtus de singe rhesus ont permis de confirmer le passage très efficace du BPA à travers le placenta au cours du dernier tiers de gestation (92,136). Au cours d'une étude réalisée chez le singe rhésus, l'administration maternelle intraveineuse de BPA sous forme de bolus a révélé un passage quasi-instantané du BPA de la circulation maternelle à la circulation fœtale (136). Une étude basée sur des perfusions intraveineuses maternelles et fœtales de BPA et BPAG a également été réalisée au laboratoire sur le fœtus ovin (92). Cette étude a confirmé le passage efficace du BPA dans les sens materno-fœtal et fœto-maternel et a également permis d'estimer que le fœtus reçoit une dose de BPA biodisponible qui rapportée à son poids, est équivalente à la dose de BPA administrée par voie IV à la mère. Cette étude a également mis en évidence un passage limité voire inexistant du BPAG de la mère au fœtus et un passage limité du BPAG du fœtus à la mère.

Le métabolisme placentaire a également été évalué à partir du modèle du placenta humain *ex vivo* et il a été montré que seulement quelques pourcents du BPA traversant le placenta dans le sens materno-fœtal étaient conjugués par le placenta (134).

L'hypothèse d'une hydrolyse placentaire du BPAG avant d'atteindre le fœtus a également été étudiée. Il a été estimé *in vivo* chez le rat que 4.4% du BPAG administré du côté maternel sous forme de perfusion dans la veine utérine était retrouvé sous forme non-conjugué dans la circulation fœtale (137). Il a également été démontré *ex vivo* que les activités de conjugaison et déconjugaison du BPA par le placenta étaient en équilibre chez le mouton (76).

Pour conclure, l'ensemble des études réalisées montre que le placenta joue un rôle passif quant au passage du BPA. Il ne semble ni jouer le rôle de barrière, ni présenter d'activité métabolique importante par rapport au BPA. En revanche, le passage transplacentaire du BPAG est limité.

2) Métabolisme fœtal du BPA

L'expression de l'UGT2B15, l'enzyme principalement responsable de la glucuronoconjugaison du BPA chez l'Homme, a été mesurée dans le foie de fœtus humain en fin de grossesse à un niveau correspondant à environ 18% de celui mesuré chez l'adulte (138). En cohérence avec ces données humaines, la clairance intrinsèque de glucuronoconjugaison hépatique du BPA estimée chez le fœtus ovin au laboratoire à partir de fractions microsomales s'est révélée deux fois plus faible que celle de l'adulte (76).

Cependant comme discuté précédemment, cela n'implique pas obligatoirement une faible clairance hépatique fœtale de glucuronoconjugaison (chapitre I. IV.A.1).

Il a été constaté chez le rat, le mouton et le singe qu'une administration maternelle IV de BPA en fin de gestation entraînait des concentrations plasmatiques fœtales en BPAG plus élevées que les concentrations maternelles correspondantes, et que ces concentrations fœtales diminuaient très lentement au cours du temps chez le mouton et le singe (92,136,139). L'étude réalisée chez le fœtus ovin a permis de confirmer, via une administration fœtale de BPA, l'origine fœtale du BPAG (92). Elle a également montré la présence de concentrations plasmatiques fœtales en BPA sulfate (BPAS) lors d'une exposition fœtale au BPA, qui présentent un décours temporel similaire à celui du BPAG avec des valeurs environ 10 fois inférieures, démontrant ainsi qu'une partie plus faible du BPA est également sulfoconjugué par le fœtus.

Chez l'Homme, les données obtenues chez les nouveaux nés montrent la présence de BPAG dans les urines dès la naissance, suggérant que le nouveau-né est également capable de glucuronoconjuguer le BPA (140).

L'ensemble de ces données suggère que le métabolisme hépatique du fœtus humain envers le BPA est présent en fin de gestation. Cependant les clairances métaboliques fœtales du BPA sont inconnues.

3) Clairance fœtale du bisphénol A

La diffusion passive importante du BPA à travers le placenta suggère une clairance fœtale élevée et majoritairement placentaire en fin de gestation comme discuté précédemment (chapitre I. IV.A.3).

La clairance fœtale du BPA a été effectivement estimée très majoritairement placentaire chez le mouton avec une valeur de 30 L.h^{-1} qui est proche de celle du débit sanguin ombilical (92). Le fœtus ovin présente donc une clairance du BPA très majoritairement

transplacentaire, et qui rapportée à son poids corporel, est environ 4 fois plus élevée que celle de l'adulte (92).

Cependant, bien que la clairance fœtale soit majoritairement placentaire, les capacités de sulfoconjugaison et glucuronoconjugaison du fœtus au cours du dernier tiers de la gestation semblent également intervenir de façon non négligeable dans la disposition fœtale du BPA comme en témoigne l'accumulation de BPAG dans la circulation fœtale.

La clairance fœtale élevée du BPA serait à l'origine de concentrations plasmatiques fœtales globalement plus faibles que celles de l'adulte lors d'expositions maternelles comme cela a été observé chez le mouton, le singe et le rat en fin de gestation (92,136,139), alors que la dose reçue est estimée équivalente.

4) Conclusions

L'ensemble des études réalisées ont permis de révéler un passage transplacentaire très efficace du BPA et limité du BPAG en fin de gestation. Les résultats obtenus chez le fœtus ovin suggèrent que la clairance placentaire fœto-maternelle très élevée du BPA conduit à une dose d'exposition biodisponible équivalente chez le fœtus et sa mère, mais également à des concentrations plasmatiques faibles en BPA chez le fœtus.

Le métabolisme fœtal associé à la clairance placentaire faible du BPAG et sa recirculation via le liquide amniotique expliquent des concentrations plasmatiques fœtales en BPAG beaucoup plus importantes que celles de l'adulte (Figure 12).

Cette surexposition fœtale au BPAG soulève des questions quant aux risques associés au BPAG pour le fœtus. Le rôle des métabolites glucuronoconjugués dans l'effet exercé par un composé s'est parfois avéré important, notamment via une réactivation au sein de tissus sensibles (141). Par ailleurs, la possible réactivation du BPAG piégé dans le compartiment fœtal a été étudiée via l'évaluation *ex vivo* de la balance conjugaison/hydrolyse du BPA dans les tissus fœtaux et les résultats ont montré que les gonades fœtales étaient capables d'hydrolyser le BPAG, la balance conjugaison/hydrolyse étant en faveur de l'hydrolyse (76).

La clairance de conjugaison fœtale du BPA ainsi que les mécanismes impliqués dans la clairance fœtale du BPAG ont été mis en évidence lors d'études réalisées au cours de la thèse (voir chapitre II de la thèse).

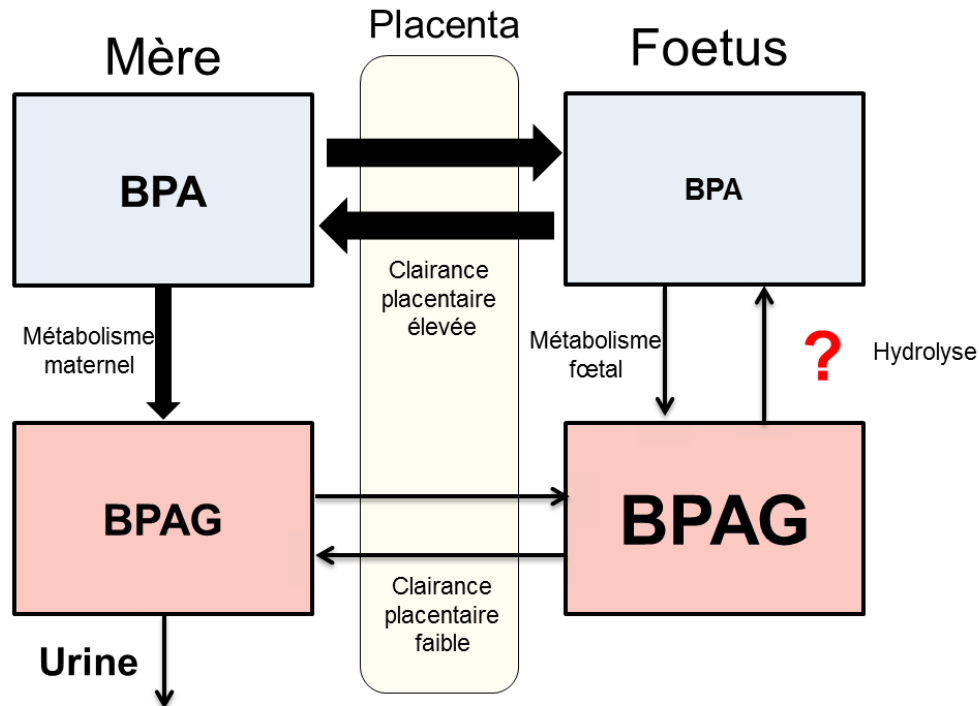


Figure 12. Représentation schématique des échanges materno-fœtaux du BPA et du BPAG durant le dernier tiers de gestation tels qu'établis avant le début de la thèse.

Les études ont révélé que le fœtus reçoit environ 4.5% de la dose de BPA administrée à la mère, la majeure fraction de la dose de BPA administrée à la mère étant métabolisée et éliminée dans les urines sous la forme de BPAG. La clairance fœtale du BPA est principalement placentaire et limite l'exposition fœtale au BPA en termes de concentrations plasmatiques. Le BPAG produit par les activités métaboliques fœtales s'accumule dans la circulation fœtale lors d'exposition maternelle au BPA en raison d'un défaut de passage transplacentaire.

C. Données de biosurveillance chez la femme enceinte

La dose interne de BPA moyenne chez la femme enceinte a pu être estimée via les données urinaires. En revanche peu de données sont disponibles en ce qui concerne l'exposition fœtale. La plupart des études rapportent uniquement des valeurs de concentrations en BPA non-conjugué dans le sang maternel et le sang de cordon qui font l'objet de controverses.

1) Données urinaires et expositions journalières chez la femme enceinte

Les concentrations urinaires en BPA rapportées chez les femmes enceintes sont similaires à celles de la population générale (qui se situent entre 1.1 et 3.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (11)) avec une fréquence de détection élevée dans les échantillons analysés (voir Tableau 3). De plus, il ne semble pas y avoir de modification des concentrations urinaires au cours des différentes périodes de la grossesse (142–144).

Tableau 3. Concentrations urinaires en BPA total rapportées chez les femmes enceintes

Publication	Nombre de sujets	Fréquence de détection (%)	Moyenne géométrique ou médiane ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Moyenne géométrique ou médiane ajustée par la créatinine ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Arbuckle et al. 2014 (145)	2000	88	0.8	NA
Arbuckle et al. 2015 (146)	1890	95	0.8	NA
Braun et al. 2014 (147)	297	NA	2.1	NA
Callan et al. 2013 (148)	26	85	2.41	NA
Casas et al. 2013 (149)	479	≈ 100	1.8	NA
Casas et al. 2016 (143)	488	≈ 100	2.3	2.6
Chevrier et al. 2013 (142)	476	82	NA	1.3
Gascon et al. 2015 (150)	462	NA	NA	2.4
Gerona et al. 2016 (151)	112	100	4.61	3.97
Lee et al. 2014 (152)	757	NA	1.29	1.87
Meeker et al. 2013 (153)	105	>95	2.6	NA
Mortensen et al. 2014 (154)	506	>81	1.4	NA
Myridakis et al. 2015 (155)	239	> 90.8	NA	1.1
Quirós-Alcalá et al. 2013 (156)	491	> 79	1	1.2
Romano et al. 2015 (157)	389	NA	NA	2.1
Vandentorren et al. 2011 (158)	279	90	2.5	NA
Watkins et al. 2015 (159)	106	99	2.86	NA

Les dernières estimations de l'EFSA vont dans le même sens avec une dose interne moyenne estimée à $36 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et un 95ème centile de $182 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les femmes en âge de procréer (11).

Enfin, une exposition journalière moyenne de $37 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a été reportée chez une cohorte de 30 femmes enceintes dans une étude récente (55). Cette étude a également révélé des doses journalières deux fois plus élevées en moyenne durant une période d'hospitalisation comparativement à une période au cours de laquelle les patientes restaient à leur domicile.

La dose journalière moyenne d'exposition interne estimée chez la femme enceinte est donc de l'ordre de quelques dizaines de $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, soit équivalente à celle de la population adulte générale. Cependant, une période d'hospitalisation semble pouvoir augmenter cette dose interne, les sources d'exposition externe additionnelles étant non identifiées et la biodisponibilité associée inconnue.

2) Données plasmatiques chez la femme enceinte et le fœtus

Les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué mesurées chez les femmes enceintes varient entre des valeurs non détectables et quelques ng.mL^{-1} (160–165), qu'il s'agisse de BPA non-conjugué ou de BPA total mesuré après hydrolyse des métabolites. Certains auteurs attribuent les valeurs élevées des concentrations plasmatiques en BPA à une accumulation de BPA non-conjugué dans l'unité materno-fœtale (165) alors que d'autres les attribuent à des contaminations en lien avec les conditions de prélèvements dans le contexte médicalisé de l'accouchement (55).

Dans le sang de cordon ombilical comme dans le sang maternel, les concentrations en BPA rapportées varient de valeurs inférieures aux limites de détection à quelques ng.mL^{-1} (55,160–165). La proportion d'échantillons de plasma avec des niveaux détectables de BPA ainsi que les niveaux moyens sont variables d'une étude à l'autre. Les concentrations en BPA non-conjugué rapportées chez la mère sont parfois 5 à 10 fois plus élevées et parfois similaires à celles mesurées dans le sang de cordon et il en est de même pour les concentrations en BPA total (voir Tableau 4).

Il est intéressant de noter que certaines études rapportent une corrélation entre les concentrations en BPA non-conjugué dans le sang maternel et le sang de cordon (163), cette corrélation a également été rapportée pour les concentrations en BPA total (164). Cependant, d'autres études font état d'une absence de corrélation (161,166).

Tableau 4. Concentrations plasmatiques (moyenne géométrique ou médiane) en BPA rapportées chez la femme enceinte et dans le sang de cordon.

Etude	Méthode analytique	Limite de détection ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Plasma maternel ($\mu\text{g.L}^{-1}$ (% détectable))		Plasma foetal ($\mu\text{g.L}^{-1}$ (% détectable))	
			BPA non-conjugué	BPA total après hydrolyse	BPA non-conjugué	BPA total après hydrolyse
Aris 2014 (163)*	GC-MS	0.01	1.36 (97%)	NA	1.23 (95%)	NA
Burstyn et al. 2013 (167)	APCI-MS/MS	0.1	NA	0.5 (100% échantillons poolés)	NA	NA
Chou et al. 2011 (161)	LC-UV	0.13	2.5 (74%)	NA	0.5	NA
Fénichel et al. 2012 (168)*	RIA et LC-MS/MS	0.08 et 0.05	NA	NA	1.1 (100%)	NA
Gerona et al. 2013 (169)	LC-MS/MS	0.05	NA	NA	0.16 (47%)	NA
Guida et al. 2015 (170)*	GC-MS	0.01	0.36 et 0.64 (100%)	2.39 et 2.14 (100%)	NA	NA
Kosarac et al. 2012 (160)*	LC-MS/MS	0.026	1.461 (58%)	NA	1.823 (42%)	NA
Lee et al. 2008 (164)	GC-MS	0.62	NA	3.10 (84%)	NA	0.65 (40%)
Padmanabhan et al. 2008 (171)*	LC-MS/MS	0.5	5.9 (100%)	NA	NA	NA
Schönfelder et al. 2002 (165)	GC-MS	0.01	3.1 (100%)	NA	2.3 (100%)	NA
Teeguarden et al. 2016 (55)*	LC-MS/MS	0.045-0.35	0.34 (25%)	NA	NA	NA
Veiga-Lopez et al. 2015 (172)*	LC-MS/MS	0.05	11.9 (>95%)	NA	3.1 (>50%)	NA
Wan et al. 2010 (173)	LC-MS/MS	0.6	0.7 (27%)	NA	<0.6 (8%)	NA
Yamamoto et al. 2016 (166)	LC-MS/MS	0.04	NA	0.057 (69%)	NA	0.051 (76.3 %)
Zhang et al. 2013 (162)	LC-MS/MS	0.1	NA	0.6 (67%)	NA	0.08 (27%)

* la concentration rapportée est la moyenne arithmétique

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne les concentrations en métabolites du BPA dans le plasma foetal ou maternel lors de la grossesse malgré la controverse

concernant les mesures en BPA non-conjugué. Les seules études disponibles sont décrites ci-dessous.

Une étude réalisée sur une cohorte de 85 femmes enceintes a rapporté la présence de BPA, BPAG et BPAS dans le sang de cordon de fœtus issus d'interruptions volontaires de grossesse réalisées au cours du deuxième trimestre de grossesse (13.3 à 24 semaines) (169). Du BPA, du BPAG et du BPAS ont été détectés dans 46, 76 et 96% des échantillons avec des concentrations moyennes de 0.16, 0.14 et 0.32 ng.mL⁻¹ respectivement. Une variabilité plus importante a été constatée pour les concentrations de BPA, qui ont variées de valeurs non détectables (<0.05 ng.mL⁻¹) à 52.3 ng.mL⁻¹, et de BPAS, comprises entre des valeurs inférieures à la limite de détection (0.025) et 9.4 ng.mL⁻¹, comparativement aux concentrations en BPAG allant de valeurs non détectables à (<0.05 ng.mL⁻¹) à 3 ng.mL⁻¹. Les auteurs ont également constaté une corrélation entre les niveaux des concentrations en BPAG et en BPAS dans le sang de cordon mais pas entre les concentrations de BPA et celles de BPAG et de BPAS.

Une autre étude rapporte les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué et en BPAG chez une cohorte de 80 femmes enceintes. Dans cette étude, un prélèvement sanguin maternel a été réalisé lors du premier trimestre de grossesse et lors de l'accouchement à l'issue duquel du sang de cordon a été prélevé (172). 92% des échantillons de sang de cordon présentaient des niveaux détectables de BPAG contre 61 et 81% des échantillons de sang maternel au premier trimestre et au moment de l'accouchement respectivement. Cette étude a également montré que les concentrations en BPAG étaient moins variables dans le sang de cordon que dans le sang maternel avec une valeur médiane de 0.19 ng.mL⁻¹ et un 95^e centile de 2.3 ng.mL⁻¹ dans le sang de cordon contre des valeurs médianes de 0.07 et 0.1 ng.mL⁻¹ et des 95^e centiles de 6.2 et 2.8 ng.mL⁻¹ pour les prélèvements de sang maternels du premier trimestre et de l'accouchement respectivement.

Lors d'une étude de Teegarden et al. 2016 (55), dont les données urinaires ont été mentionnées dans la partie précédente, les concentrations en BPA, BPAG et BPAS ont également été directement mesurées (sans recours à une hydrolyse des métabolites) dans des échantillons de plasma maternel issus de la période d'hospitalisation. 13% des échantillons de plasma présentaient des niveaux détectables en BPAG avec des concentrations atteignant 0.080 ng.mL⁻¹. Les concentrations plasmatiques maternelle en BPA (supérieures aux limites de détection dans 26% des échantillons) n'étaient pas corrélées aux concentrations plasmatiques en BPAG ni aux concentrations urinaires en BPA total correspondantes (même sujet, temps de prélèvements proches). Au contraire, le BPAG

a été détecté dans le plasma des femmes qui présentaient les concentrations urinaires en BPA total les plus élevées.

3) Conclusions

Comme pour les données recueillies au sein de la population générale, les mesures de BPA non-conjugué dans le plasma des femmes enceintes et le sang de cordon sont controversées car suspectées d'être biaisées par des contaminations (55).

Les trois études mentionnées plus haut (55,169,172) sont les seules à ce jour à rapporter des mesures des métabolites du BPA dans le plasma maternel et/ou le sang de cordon. Elles montrent que le BPAG peut être quantifié dans le plasma maternel au cours de la grossesse et que les concentrations plasmatiques en BPAG pourraient représenter des indicateurs fiables de l'exposition au BPA contrairement aux concentrations en BPA non-conjugué dont l'évaluation reste sujette à caution. Cependant, les données TK suggèrent que les concentrations plasmatiques en BPAG chez les femmes sont très largement dépendantes du temps écoulé entre le moment où a lieu l'exposition et le moment où le prélèvement est réalisé. La proportion d'échantillons de sang de cordon présentant des niveaux quantifiables de BPAG est plus élevée avec une variabilité des concentrations plus limitée comparativement à l'adulte. Ces données suggèrent que les concentrations plasmatiques en BPAG pourraient être plus stables et atteindre quelques dizaines à quelques centaines de ng.L^{-1} chez le fœtus en fin de grossesse.

Ces données humaines sont donc cohérentes avec une accumulation des métabolites du BPA chez le fœtus, avec une sulfoconjugaison globalement plus importante que la glucuronoconjugaison en milieu de grossesse.

D. Conclusions

L'ensemble des données TK fœtale et les données de biosurveillance disponibles indiquent que le fœtus humain est également exposé au BPA.

Durant la deuxième moitié de la grossesse, les concentrations plasmatiques attendues en BPA chez le fœtus seraient plus faibles que celles de sa mère en raison d'une clairance placentaire fœto-maternelle élevée du BPA. Cependant, le métabolisme fœtal déjà présent, le faible passage des métabolites du BPA à travers le placenta et la recirculation du liquide amniotique constituent autant de mécanismes favorisant l'accumulation du BPAG dans le compartiment fœtal. Ces considérations TK suggèrent que les concentrations plasmatiques fœtales en BPAG et BPAS chez l'Homme seraient plus élevées et persistantes comparativement à l'adulte en fin de grossesse.

Objectifs et stratégie de la thèse

La synthèse bibliographique met en évidence le besoin d'une évaluation de l'exposition humaine prénatale au BPA et des risques liés à une surexposition du fœtus au BPAG.

Les études de biosurveillance humaine montrent que le BPA passe la barrière placentaire et que le fœtus humain est exposé au BPA et à ses métabolites, mais le niveau de cette exposition fœtale reste indéterminé. Les valeurs élevées des concentrations plasmatiques en BPA rapportées dans certaines études sont attribuées à des contaminations des échantillons par le BPA omniprésent dans l'environnement et ne sont pas prises en compte dans l'évaluation du risque.

Les études les plus récentes suggèrent que le fœtus humain est capable de métaboliser le BPA en BPAG qui pourrait s'accumuler dans le compartiment fœtal en raison d'un passage transplacentaire limité comme cela a été démontré chez la brebis et le singe (84,92,135,136). Les conséquences potentielles d'une surexposition fœtale au BPAG doivent être évaluées en raison de la possible réactivation du BPA conjugué par les activités enzymatiques d'hydrolyse au niveau des tissus fœtaux.

Dans ce contexte, le premier objectif du projet de thèse était le développement d'une approche intégrative modélisatrice fondée sur des données obtenues chez une espèce pertinente pour l'homme en termes de physiologie fœtale afin d'évaluer l'exposition interne fœtale humaine au bisphénol A. Le modèle animal utilisé est celui de la brebis gravide instrumentée. Ce modèle présente un grand nombre d'avantages pour répondre à cette problématique car il autorise la réalisation à la fois d'administrations maternelles ou fœtales et des prélèvements simultanés de sang maternel et fœtal. Des données TK fœtales du BPA et du BPAG précédemment obtenues au laboratoire à partir de ce modèle avaient permis de montrer que les clairances placentaires et métaboliques sont les principaux déterminants de l'exposition fœtale au BPA. Ces données n'avaient cependant pas permis d'évaluer la clairance fœtale de glucuronoconjugaison et la clairance fœtale du BPAG nécessaires au développement d'un modèle TK fœto-maternel complet.

Ainsi, afin de développer le modèle TK fœto-maternel, nous avons dans un premier temps réalisé une étude toxicocinétique du BPA et du BPAG sur le modèle du fœtus ovin instrumenté qui nous a permis d'estimer la contribution de l'hydrolyse du BPAG au processus de clairance fœtale du BPAG et son impact sur l'exposition fœtale au BPA (Article 1).

L'utilisation des données d'exposition fœto-maternelles au BPA et au BPAG issues de l'ensemble des études expérimentales réalisées au laboratoire chez le fœtus ovin a ensuite permis la construction d'un modèle TK complet décrivant la disposition du BPA et du BPAG dans l'unité materno-fœtale. L'établissement des cinétiques temporelles des concentrations de BPA et de BPAG dans les différents compartiments de l'unité materno-fœto-placentaire ovine ayant nécessité le recours à des doses élevées de BPA et de BPAG, nous avons préalablement vérifié la dose-proportionnalité de la disposition du BPA et du BPAG chez le fœtus ovin, afin d'attester la validité du modèle pour des faibles niveaux d'exposition au BPA. Nous avons également évalué l'importance de l'effet de premier passage hépatique du BPA entre les circulations maternelles et fœtales via la détermination de la clairance de conjugaison du BPA transféré de la mère au fœtus (voir chapitre I. IV. A. 3).

Le modèle développé chez la brebis a ensuite été transposé à l'Homme en remplaçant les paramètres TK maternels ovins par des paramètres humains déterminés à partir des données TK publiées chez l'homme suite à une ingestion de BPA par voie alimentaire. Cette démarche a permis l'obtention de prédictions de l'exposition fœtale humaine dans des conditions d'exposition maternelle pertinentes par rapport à l'exposition environnementale (Article 2).

Le BPAG n'est pas pris en compte dans l'évaluation du risque car il est considéré comme un métabolite inactif et est rapidement éliminé dans les urines. Cependant le niveau élevé des concentrations plasmatiques fœtales en BPAG mises en évidence chez la brebis est préoccupant en raison de la possible réactivation du BPAG par les glucuronidases tissulaires. C'est la raison pour laquelle notre deuxième objectif était d'utiliser le modèle intégratif de la brebis gravide pour caractériser des biomarqueurs fœtaux révélateurs de la réactivation du BPAG en BPA. Pour cela, en collaboration avec l'équipe du professeur Paul Fowler de l'Institute of Medical Sciences et à l'aide d'une approche sans a priori basée sur l'analyse du protéome, nous avons comparé les altérations du protéome induites par une exposition fœtale équimolaire au BPA ou au BPAG au niveau du plasma et de tissus fœtaux (glande mammaire, foie et ovaire) (Article 3).

Chapitre 2 : Etudes expérimentales

I. Caractérisation de la contribution du métabolisme et du transfert placentaire dans l'élimination du BPA et du BPAG par le fœtus

A. Contexte et objectifs

Les données TK obtenues chez le fœtus ovin et chez le fœtus de singe rhésus ont permis de montrer que l'unité foeto-placentaire est capable de métaboliser le BPA en composés glucurono (BPAG) et sulfoconjugués (BPAS) qui s'accumulent dans le compartiment plasmatique fœtal en raison d'un défaut de passage transplacentaire (92,136). L'étude réalisée sur le fœtus ovin au laboratoire a également permis d'estimer les clairances materno-fœtales du BPA et a montré que la clairance maternelle du BPA n'est pas modifiée par la gestation.

Ces données n'avaient cependant pas permis d'évaluer la clairance fœtale de glucuronoconjugaison du BPA et la clairance fœtale du BPAG.

L'étude *ex vivo* réalisée au laboratoire avait montré que les gonades fœtales ovines incubées en présence de BPAG, sont capables de convertir le BPAG en BPA, le métabolisme réversible étant en faveur de l'hydrolyse du BPAG (76). Ces résultats ne peuvent cependant, pas être directement extrapolés aux conditions *in vivo* qui intègrent l'ensemble des processus de distribution et d'élimination du BPA et du BPAG. C'est la raison pour laquelle, nous avons utilisé le modèle du fœtus ovin qui permet de prendre en compte l'ensemble de ces processus physiologiques. Le fœtus ovin instrumenté constitue ainsi un modèle unique pour évaluer *in vivo* l'implication du processus d'hydrolyse du BPAG dans les mécanismes de clairance fœtale du BPAG et son impact sur l'exposition fœtale au BPA.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la contribution du métabolisme fœtal (conjugaison et hydrolyse) et des clairances placentaires à la clairance fœtale du BPA et du BPAG à travers la détermination des paramètres suivants :

- La clairance fœtale du BPAG
- La clairance de glucuronoconjugaison fœtale évaluée à partir de la clairance fœtale du BPA et du BPAG

Pour cela nous avons réalisé des administrations IV fœtales de BPAG et de BPA qui nous ont permis d'évaluer les clairances fœtales du BPA et du BPAG et la clairance fœtale de glucuronoconjugaison du BPA. Nous avons également déterminé les paramètres TK du BPA

et du BPAG des mères après une césarienne, ces paramètres étant nécessaires à l'évaluation des clairances placentaires fœto-maternelles.

Cette étude publiée dans la revue « Environment International » a permis une meilleure compréhension des déterminants de l'exposition fœtale au BPA. Les données complémentaires sont présentées en annexe de cette thèse.

B. Article 1



Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A



Glenn Gauderat^{a,b,c}, Nicole Picard-Hagen^{a,b}, Pierre-Louis Toutain^{a,b}, Tanguy Corbel^{a,b}, Catherine Viguié^{a,b}, Sylvie Puel^{a,b}, Marlène Z. Lacroix^{a,b}, Pierre Mindeguia^{a,b}, Alain Bousquet-Melou^{a,b}, Véronique Gayrard^{a,b,*}

^a INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UMR1331 (Unité Mixte de Recherche 1331), Toxalim, Research Center in Food Toxicology, Toulouse F-31027, France

^b Université de Toulouse, INPT (Institut National Polytechnique de Toulouse), ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), EIP (Ecole d'Ingénieurs de Purpan), UPS (Université Paul Sabatier), F-31076 Toulouse, France

^c Agreenium's International Research School (EIR-A), Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2015

Received in revised form 7 October 2015

Accepted 11 October 2015

Available online 24 October 2015

Keywords:

Bisphenol A

Bisphenol A glucuronide

Hydrolysis

Fetus

Toxicokinetic

ABSTRACT

Previous studies in experimental animals have shown that maternal exposure to bisphenol A (BPA) during late pregnancy leads to high plasma concentrations of BPA glucuronide (BPAG) in fetus compared to mother due to the inability of BPAG to cross the placental barrier. A recent *in vitro* study has reported that BPAG can exert adipogenic effect underlining the need for characterization of the fetal disposition of BPAG.

Experiments were conducted in chronically catheterized fetal sheep to determine the contribution of BPAG hydrolysis to BPA to the elimination of BPAG from the fetal compartment and its resulting effect on the overall fetal exposure to free BPA. Serial sampling of fetal arterial blood, amniotic fluid, maternal venous blood and urine was performed following separate single doses of BPA and BPAG administered intravenously to eight fetal/maternal pairs after cesarean section, and repeated BPAG doses given to two fetal sheep. On average 67% of the BPA entering the fetal circulation was rapidly eliminated through fetal to maternal clearance, with a very short half-life (20 min), while the remaining fraction (24%) was glucuronidated. BPA conjugation–deconjugation cycling was responsible for a 43% increase of the overall fetal exposure to free BPA. A very specific pattern of fetal exposure to free BPA was observed due to its highly increased persistence with a hydrolysis-dependent plasma terminal free BPA half-life of several tens of hours. These findings suggest that although the high fetal to maternal clearance of free BPA protects the fetus from transient increases in free BPA plasma concentrations associated with maternal BPA intake, low but sustained basal free BPA concentrations are maintained in the fetus through BPA conjugation–deconjugation cycling. The potential health implications of these low but sustained basal concentrations of free BPA in fetal plasma should be addressed especially when considering time-dependent effects.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Much of the concern about bisphenol A (BPA) originates from experimental studies (Cabaton et al., 2011; Vandenberg et al., 2008) showing adverse effects of BPA exposure during fetal life at doses below the newly proposed reference dose of 4 µg/kg (body weight (BW)) per day (EFSA, 2015). The reliance on findings from animal studies to determine human health consequences of BPA exposure during prenatal life

emphasizes the importance of toxicokinetic approaches in animal models for predicting human fetal exposure to BPA.

Previous studies of BPA toxicokinetics (TK) in fetal sheep and rhesus monkey have shown that substantial fetal Phase II metabolism leads to the production of conjugates, mainly BPA glucuronide (BPAG) and BPA sulfate (BPAS), which accumulate in the fetal circulation owing to their inability to cross the placenta (Corbel et al., 2013; Patterson et al., 2013; Viguié et al., 2013; Vom Saal et al., 2014). BPA conjugated metabolites are generally not taken into account in evaluating BPA effects as they are assumed to be inactive in terms of estrogenicity (Matthews et al., 2001) and rapidly eliminated by renal excretion. In a recent *in vitro* study, Boucher et al. (2015) reported that BPAG can develop effects of its own but the actual effects remain unclear due to the high level of BPAG concentrations and the possible back conversion of BPAG to its unconjugated form (free BPA) in the cell system (Gayrard et al., *in press*). The high level of BPAG concentrations in fetal blood might be of concern for the fetus due to the possible recycling of BPAG to its

* Corresponding author at: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Laboratoire de Physiologie, UMR1331 Toxalim, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 3, France.

E-mail addresses: glenn.gauderat@gmail.com (G. Gauderat), n.hagen-picard@envt.fr (N. Picard-Hagen), pltoutain@wanadoo.fr (P.-L. Toutain), tanguycorbel30@gmail.com (T. Corbel), c.viguié@envt.fr (C. Viguié), s.puel@envt.fr (S. Puel), m.lacroix@envt.fr (M.Z. Lacroix), p.mindeguia_12@envt.fr (P. Mindeguia), a.bousquet-melou@envt.fr (A. Bousquet-Melou), Gayrardv.gayrard@envt.fr (V. Gayrard).

biologically active parent compound free BPA through the action of tissue glucuronidases (Ginsberg and Rice, 2009). In a recent *ex vivo* study, we showed that BPAG was readily converted back to free BPA in ovine gonads, BPA conjugation–deconjugation cycling being in favor of BPAG hydrolysis (Corbel et al., 2015). More generally, it was demonstrated that such a reversible metabolism serves to conserve the parent compound and increases its overall exposure (Cheng and Jusko, 1993).

However, the extent of BPAG hydrolysis at the level of the fetoplacental unit is difficult to evidence since BPAG formation, distribution and hydrolysis occur concurrently and free BPA and its metabolite may be excreted in the amniotic fluid compartment and/or cross the placenta and mix with those formed in the maternal blood. Chronically catheterized fetal sheep can be used to simultaneously sample multiple fluid compartments (blood from fetus and mother and amniotic fluid), and administer BPAG and BPA to the fetus, and thus provide a unique model to address the possible reemergence of active free BPA by deglucuronidation reactions at the level of the fetoplacental unit. In our previous study, no free BPA could be detected in fetal plasma following IV infusion with BPAG. This does not allow discarding a significant reentry of free BPA in the fetal circulation since the high fetal clearance of back converted BPAG might result in undetectable free BPA concentrations in fetal blood (Corbel et al., 2013).

Given the potential role of BPAG as a precursor for free BPA supply to sensitive target tissue, understanding mechanisms underlying fetal exposure and accumulation of this metabolite appears as a major issue. In the present study, an *in vivo* TK approach was used to quantify the contribution of metabolism and transplacental transfer to the fetal elimination of BPA and BPAG. This approach enabled us to determine the specific contribution of BPAG hydrolysis to fetal exposure to free BPA.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of humane animal care under agreement number 31-115545 from the French Ministry of Agriculture.

The first experiment was carried out on 8 pregnant Lacaune ewes with a mean ($\pm$ SD) body weight of 60 ± 10 kg and the second experiment on 2 other pregnant Lacaune ewes with a mean ($\pm$ SD) body weight of 67 ± 4 kg. All animals received two commercial pelleted rations daily, and hay and water were given *ad libitum*. For each experiment, one fetus per ewe was chronically catheterized between 107 and 125 days of gestation (pregnancy length 147 days) as previously described (Corbel et al., 2013).

2.2. Experimental design

2.2.1. Experiment 1: BPA and BPAG fetomaternal toxicokinetics

This first experiment was designed to examine the pathways involved in free BPA and BPAG fetal elimination through a TK approach.

During the first part of the experiment, fetal and maternal blood samples were drawn before and at 7, 15, 30, 60, 120 min, every 2 h for 8 h and at 24, 34, 48, 58 and 72 h after two fetal intravenous (IV) administrations of the same molar dose of $21.9 \mu\text{mol/kg}$ BPA (5 mg/kg) and of BPAG (8.86 mg/kg), 3 days apart to monitor the temporal decay of fetal free BPA and BPAG plasma concentrations. Total urine was collected over 34 h with collections at 0, 3, 6, 10, 14, 19, 23, 27, 30 and 34 h, after BPA and BPAG administration to the fetuses.

Since we had previously shown that free BPA and BPAG pharmacokinetic parameters in adult sheep were not affected by pregnancy, maternal free BPA and BPAG toxicokinetic parameters were evaluated after a cesarean section. Fetal weights were then recorded.

During the second part of the experiment that was performed at least 15 days after the cesarean section, the adult sheep received two intravenous administrations of BPA ($21.9 \mu\text{mol/kg}$, 5 mg/kg) and BPAG

($8.76 \mu\text{mol/kg}$, 3.54 mg/kg), 3 days apart. Blood was collected using the same procedure as for fetal administrations with a supplementary sample, 4 min post-dosing. Total urine was collected as previously described.

2.2.2. Experiment 2: repeated BPAG dosing in fetuses

The experiment was designed to examine the relationship between BPAG and unconjugated BPA fetal plasma concentrations using repeated BPAG dosing. Since in the first experiment, most of the free BPA fetal plasma levels attained after a single BPAG fetal administration were close to the limit of quantification (LOQ) of the assay, repeated BPAG dosing enabled higher plasma free BPA levels to be obtained and improved precision of the estimated fetal exposure to free BPA. Using synthetic BPAG in this experiment also made it possible to determine the concentration of BPAS in fetal plasma resulting from sulfocoupling of previously hydrolyzed BPAG.

Fetal sheep received 5 IV administrations of BPAG ($24.8 \mu\text{mol/kg}$, 10 mg/kg) 6 h apart. Fetal, maternal blood and amniotic fluid samples were drawn before each BPAG administration then 15, 30, 60, 120, 240 and 360 min after the first administration and 10, 30, 60, 180 and 360 min after the next 4 administrations. Additional samples were obtained 10, 26, 29, 33, 48, 52 and 54 h after the final dosing to monitor the temporal decay of free BPA, BPAG and BPAS concentrations. Total urine was collected as previously described.

At the end of the experiment, the fetuses were extracted by cesarean section and weighed.

2.3. Test material and treatments

All materials for the preparation of solutions, including materials used for sampling, processing and analysis, were in glass or BPA-free plastic (polypropylene). BPA (purity 99%) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). BPA was extemporaneously dissolved in ethanol/propylene glycol (1/49, vol/vol) at concentrations ranging from 12.5 to 50 mg/mL.

For experiment 1, fractions of BPAG purified (75–86%) as previously described (Lacroix et al., 2011) were used for fetal and maternal administrations. These fractions did not contain any detectable BPA (i.e., less than 0.2%). For experiment 2, synthetic BPAG (purity 98%) purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) was used for the fetal administrations. BPAG was extemporaneously dissolved in 0.9% NaCl buffer at concentrations ranging from 6.25 to 42.6 mg/mL.

For maternal administrations, the volumes of BPA and BPAG solutions were adjusted to the body weights recorded on the two previous days. For fetal administrations, the fetal body weight was arbitrarily fixed at 2.5 kg (Bazer et al., 2012). Maternal IV doses were administered into the left jugular vein via an indwelling catheter and fetal IV doses were administered via a catheter chronically implanted in the jugular vein.

2.4. Sample collection

Maternal blood samples (3 mL) were obtained by direct puncture of the right jugular vein. Fetal blood samples (0.5 mL) were collected via the indwelling catheter chronically implanted in the fetal carotid. Amniotic fluid (1 mL) samples were drawn via the indwelling catheter permanently implanted in the amniotic sac. Total urine was collected via a Foley catheter aseptically placed in the urethra of the ewes.

Blood samples were collected in heparinized tubes, immediately chilled in ice and centrifuged for 20 min at 3000 g. Plasma was separated and stored at -20°C until assayed.

Amniotic fluid and urine samples were collected in polypropylene tubes, immediately chilled in ice, centrifuged for 20 min at 3000 g and the supernatants stored at -20°C until assay.

2.5. Sample analysis

Free BPA, BPAG and BPAS were simultaneously quantified without recourse to a hydrolysis step with an Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA), according to a method that has been validated in compliance with FDA guidelines (Lacroix et al., 2011). Briefly, plasma, urine or amniotic fluid samples (100 μ L) were diluted with 150 μ L of acetonitrile (for protein precipitation) and 50 μ L of internal standards BPA-d16 and BPAG 13C12 separated on a C18 column with a water/acetonitrile gradient elution. The multiple reaction monitoring transitions used to detect BPA, BPA-d16, BPAG and BPAG 13C12 were 227 > 212, 241 > 142, 403 > 227 and 415 > 239 with collision energies of 28, 20 and 30 eV, respectively. Chromatographic data were monitored by Targetlynx® software (Water, Milford, MA, USA). Blanks and quality control samples were used to monitor potential contamination during analysis and the accuracy and precision of the method. The mean intra- and inter-day coefficients of variation for three concentration levels and for free BPA, BPAS and BPAG were lower than 15% and the limits of quantification (LOQ) were validated at 1 ng/ml (free BPA) and 5 ng/ml (BPAG and BPAS).

2.6. Toxicokinetic analysis

Individual plasma concentration–time profiles of free BPA and BPAG were analyzed with a non-compartmental approach using Phoenix® NLME™ (version 6.4; Pharsight, Mountain View, CA, USA).

The free BPA and BPAG concentrations were converted into molar concentrations.

The quantity of BPAG excreted in urine was calculated by multiplying the urine BPAG concentrations by the total volume of urine at each sampling time. Fetal doses and TK parameters were normalized by the fetal weight recorded after cesarean.

For the first experiment, the fetal plasma BPAG concentrations remaining 72 h after fetal BPA administration were considered negligible as they represented about 4% of the peak value of BPAG plasma concentrations attained after fetal BPAG administration. The area under the plasma concentration–time curve (AUC_{last}) from dosing time to the last sampling time was calculated using the linear-up/log-down rule. The AUC from $t = 0$ to infinity was obtained by adding to AUC_{last} , the area extrapolated from the last observation to infinity by dividing the last observed quantifiable plasma concentration by the slope of the terminal phase as estimated by linear regression, using the best fit option of Phoenix®.

The clearance (Cl), mean residence time (MRT), terminal half-life ($T_{1/2}$) and steady-state volume of distribution (V_{ss}) of free BPA (BPAG) were computed using classical pharmacokinetic equations (Gibaldi and Perrier, 1982).

For each fetus (or adult), the extent of BPA glucuronidation over the sampling period was calculated by multiplying the fetal (or adult) BPAG AUC_{last} value obtained after IV fetal (adult) BPA administration by the corresponding fetal (adult) clearance of BPAG. The extent of BPAG hydrolysis over the sampling period was calculated from the product of the free BPA AUC_{last} value obtained after BPAG administration by the corresponding free BPA clearance.

Assuming that the totality of BPA entering maternal circulation was metabolized to BPAG by the mother, the fetal to maternal transfer of BPA (BPAG) for each paired fetus–mother over the sampling period was estimated from the product of the maternal BPAG AUC_{last} value obtained after fetal BPA (BPAG) administration and the corresponding adult clearance of BPAG.

These parameters, expressed as a percentage of the administered dose, were used to normalize fetal free BPA and BPAG clearances and to estimate BPA and BPAG interconversion and elimination fetal clearances. These clearances were then used to calculate the degree of exposure enhancement of free BPA and its metabolite, respectively, afforded

by reversible metabolism (for a review, see Cheng and Jusko, 1993, see Supplementary data).

Maternal and fetal time–concentration profiles of free BPA and BPAG after repeated BPA dosing (1 μ g/kg, 6 h intervals) to the mother were simulated using a four compartment model designed on the Phoenix® graphical model interface (see Supplementary data) built using TK parameters derived from single BPA and BPAG dosing to fetuses and adults (experiment 1) and considering a BPA maternal to fetal transfer of 4.5% (Corbel et al., 2013).

3. Results

Only the quantities of BPAG in maternal urine are reported since free BPA represented less than 1% of the sum of the amounts of BPAG and free BPA recovered from urine. Cumulative amounts of BPAG excreted in urine were successfully computed for 6 out of 8 ewes. All results are presented as mean $\pm$ SD. The concentrations of free BPA, BPAG and BPAS in all control samples drawn before the first dosing were systematically below the limit of quantification of the analytical method.

3.1. Experiment 1: BPA and BPAG feto-maternal toxicokinetics

The experiment was performed on 4 female and 4 male fetuses with a mean body weight of 2.04 ± 0.38 kg. The average age of the fetuses was 115 ± 4.2 days at the beginning of the experiment.

3.1.1. IV dosing in adult sheep

Fig. 1 shows the time course of mean ($\pm$ SD) free BPA, BPAG and BPAS plasma (A) and urinary BPAG concentrations of adult ewe after an IV bolus of BPA (5 mg/kg) followed three days later by an IV bolus of BPAG (3.54 mg/kg).

After BPA administration to adult sheep, plasma free BPA concentrations decreased rapidly to reach values below the LOQ, about 10 h after BPA administration. Plasma BPAS and BPAG concentrations were maximal 15 min after BPA administration then decreased slowly to values below the LOQ of the assay, 10 h (BPAS) and 24 h (BPAG) after BPA administration (Fig. 1A). Fifty-nine (± 14) % of the BPA dose administered to adult sheep were recovered in urine during the 34 h following BPA dosing, mostly (77 ± 8 %) at the first collection time, i.e., 3 h after BPA administration as reflected by the maximal BPAG urinary concentrations observed at this time (Fig. 1B).

After BPAG administration to adult sheep, BPAG plasma concentrations decreased rapidly to values below the LOQ about 8 h after BPAG administration. Free BPA was not detected in plasma after BPAG administration. Sixty-five (± 39) percent of the BPAG dose administered to adult sheep was recovered in urine during the 34 h following BPAG dosing, mostly (77 ± 19 %) at the first collection time, i.e., 3 h after BPAG administration as reflected by the maximal BPAG urinary concentrations observed at this time (Fig. 1B). Among the toxicokinetic parameters measured in adult sheep, the plasma clearance and V_{ss} of BPAG were lower (5.5-fold and 4-fold respectively) than the corresponding values for free BPA while the BPAG half-life was higher (2-fold) and the MRT did not differ (Table 1). The estimated mean fraction of BPA metabolized to BPAG was 106 ± 14 %.

3.1.2. IV dosing in fetuses

Fig. 2 shows the time course of mean ($\pm$ SD) fetal (A), maternal (B) plasma free BPA, BPAG and BPAS and maternal urine BPAG concentrations (C) after a fetal IV BPA bolus (5 mg/kg) followed three days later by a fetal IV bolus of BPAG at an equimolar dose.

After fetal BPA administration, fetal plasma concentrations of free BPA decreased rapidly to reach values below the LOQ, about 2 h after BPA administration. The fetal plasma BPAG concentrations, that were maximal at this time, decreased very slowly over the sampling period. Fetal plasma BPAS concentrations exhibited a similar temporal profile (Fig. 2A). In maternal plasma, the free BPA concentrations that were

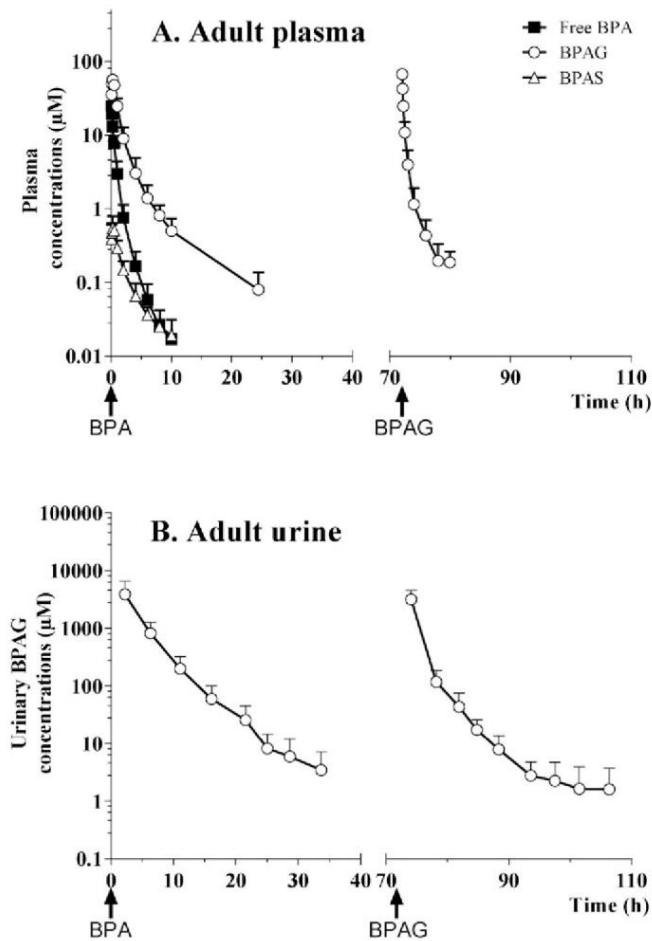


Fig. 1. Semilogarithmic plots of mean ($\pm$ SD) concentration–time profile (μ M) for free BPA (closed squares), BPAG (open circles) and BPAS (open triangles) in adult plasma (A), and for BPAG in urine (B) following IV administrations of BPA (21.9 μ mol/kg, 5 mg/kg, $n = 8$) and BPAG (8.76 μ mol/kg, 3.54 mg/kg, $n = 7$) to adult sheep separated by 72 h. BPAS concentrations were not measured after BPAG administrations. For plasma concentrations, means were represented for sampling times at which the plasma concentrations in at least 50% of the animals were higher than the LOQ. BPAS concentrations were not measured after BPAG administrations.

maximal at the first sampling time (7 min post-fetal administration), decreased rapidly according to a single log linear process similar to that observed in fetuses. Maternal plasma BPAG and BPAS concentrations peaked 15 min after BPA administration to the fetus then the concentration–time profiles of BPAG showed biphasic decay, BPAG concentrations reaching values below the LOQ, 24 h after BPA administration. BPAS was no longer detected in maternal plasma about 2 h after fetal BPA administration (Fig. 2B). Thirty-five (± 15) percent of the BPA dose administered to the fetus was excreted in the maternal urine during the 34 h following fetal BPA administration, mostly ($69 \pm 13\%$) at

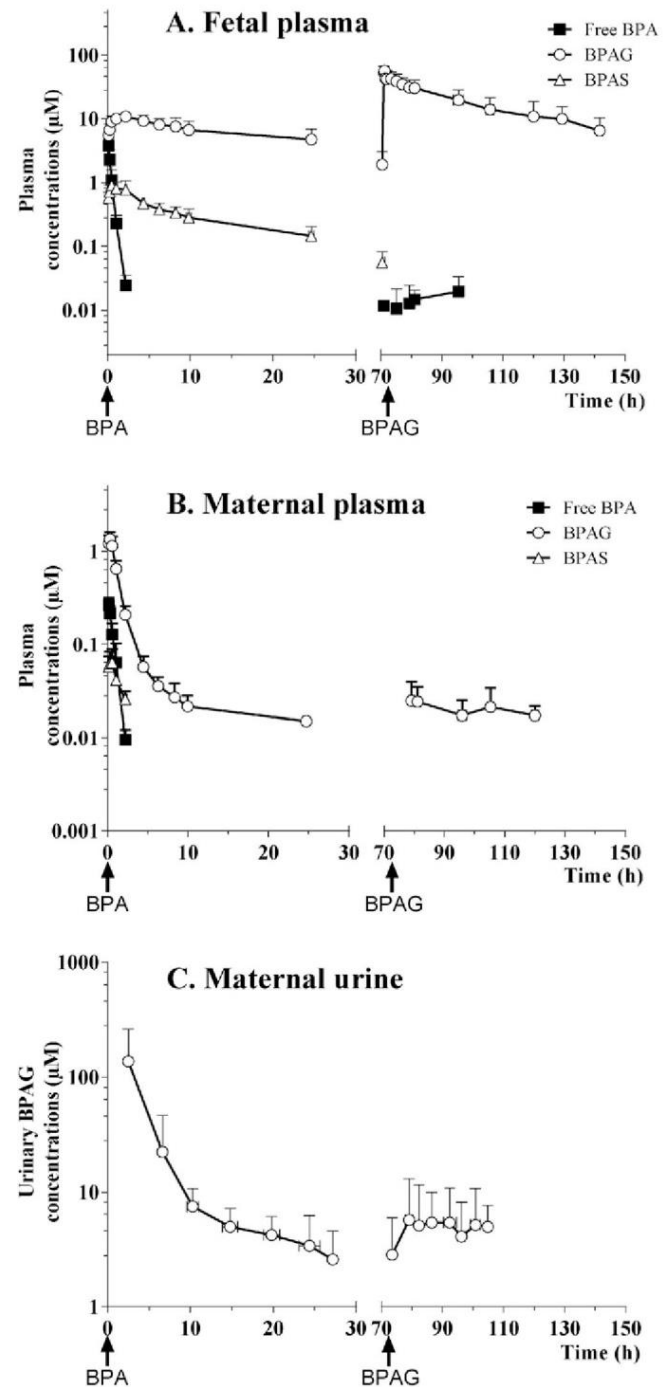


Fig. 2. Semilogarithmic plots of mean ($\pm$ SD) concentration–time profile (μ M) for free BPA (closed squares), BPAG (open circles) and BPAS (open triangles) in fetal plasma (A), maternal plasma (B) and for BPAG in maternal urine (C) following fetal IV administrations of BPA (21.9 μ mol/kg, 5 mg/kg, $n = 8$) and BPAG (21.9 μ mol/kg, 8.86 mg/kg, $n = 8$) separated by 72 h. For plasma concentrations, means were represented for sampling times at which the plasma concentrations in at least 50% of the animals were higher than the LOQ. BPAS concentrations were not measured after BPAG administrations.

Table 1

Mean ($\pm$ SD) toxicokinetic parameters of unconjugated BPA (free BPA) and BPAG from ovine fetuses and adult sheep after a single administration of an intravenous BPA dose of 21.92 μ mol/kg (5 mg/kg) or of an intravenous BPAG dose of 21.92 μ mol/kg (8.8 mg/kg, fetuses) and 8.76 μ mol/kg (3.54 mg/kg, adult sheep).

Toxicokinetic parameters	Free BPA		BPAG	
	Fetuses ($n = 8$)	Adult ($n = 8$)	Fetuses ($n = 8$)	Adult ($n = 7$)
Cl (L/(h·kg))	14.8 $\pm$ 4.07	1.75 $\pm$ 0.38	0.020 $\pm$ 0.013	0.33 $\pm$ 0.076
V _{ss} (L/kg)	5.1 $\pm$ 1.4	1.28 $\pm$ 0.30	0.70 $\pm$ 0.22	0.32 $\pm$ 0.096
MRT (h)	0.34 $\pm$ 0.026	0.75 $\pm$ 0.15	39.3 $\pm$ 10.9	0.84 $\pm$ 54
T _{1/2} (h)	0.31 $\pm$ 0.030	1.6 $\pm$ 0.46	28 $\pm$ 6.4	3.2 $\pm$ 1.8

the first collection time, i.e., 3 h after BPA administration, as reflected by the maximal BPAG urinary concentrations observed at this time (Fig. 2C).

After BPAG fetal administration, fetal plasma BPAG concentrations decreased slowly and were still measurable 72 h after BPAG dosing. Free BPA was quantified in plasma samples from 7 out of 8 fetuses after BPAG administration. When detected, fetal plasma free BPA and maternal plasma BPAG concentrations tended to be relatively constant,

fluctuating between values slightly higher or lower than the LOQ (Fig. 2A and B). The amount of BPAG excreted in maternal urine remained low and constant over time, as reflected by the steady BPAG concentrations in maternal urine. Only $4.9 \pm 2.0\%$ of the BPAG dose administered to the fetus was recovered in maternal urine, over the first 34 h after dosing (Fig. 2C).

Among the toxicokinetic parameters measured, the BPAG fetal clearance and V_{SS} were much lower (740 and 7 fold respectively) than the corresponding values for free BPA while the BPAG MRT and $T_{1/2}$ values were higher (116-fold and 90-fold respectively) (Table 1).

Assuming that all BPA entering maternal circulation is subsequently glucuronidated by the mother, the mean fetal to maternal transfer of BPA estimated from the time course of plasma maternal exposure to BPAG was $67 \pm 16\%$. This fraction was of the same order as the percentage of the BPA dose recovered over 34 h in maternal urine after fetal BPA administration, normalized by the BPAG urinary output after BPA administration to adult sheep over the same period (59%). The estimated mean extent of BPA glucuronidation was $19 \pm 4\%$ of the fetal BPA dose over the sampling period and $24 \pm 3\%$ when the AUC values were extrapolated to infinity.

The fractions of BPAG transferred from the fetus to its mother and hydrolyzed into BPA could not be computed due to analytical limitations, most of free BPA fetal and BPAG maternal plasma concentrations being close to the LOQ.

3.2. Experiment 2: repeated BPAG dosing in fetuses

Experiment 2 was performed on 2 male fetuses with body weights of 2.80 and 2.84 kg and 125 days old at the beginning of the experiment.

Fig. 3 shows a representative time course of fetal (A) and maternal (B) plasma and amniotic fluid (C) free BPA, BPAG and BPAS concentrations and maternal urine (D) BPAG concentrations following five repeated fetal BPAG intravenous administrations (10 mg/kg) 6 h apart.

The concentration–time profiles of BPAG in fetal plasma were characterized by a succession of peak and trough concentrations. The gradual increase in BPAG peak concentrations after each administration was associated with an increase in free BPA and BPAS plasma concentrations (Fig. 3A). Free BPA, BPAG and BPAS plasma concentrations decreased slowly after the last dosing with terminal half-lives of the same order of magnitude (105 and 127 h for free BPA, 75 and 90 h for BPAG, and 62 and 92 h for BPAS).

The BPAG concentrations in maternal plasma fluctuated but tended to increase during the dosing period. Some maternal plasma free BPA and BPAS concentrations were measurable, mainly after the last fetal dosing (Fig. 3B).

In the amniotic fluid, the BPAG, free BPA and BPAS concentrations increased gradually to reach maximal values a few hours after the last BPAG administration, then remained relatively constant over the sampling period (Fig. 3C).

The fractions of BPAG transferred from fetus to mother estimated over the sampling period (i.e., within 78 h after the first dosing) were 23 and 42%. Over the same period, the estimated fractions of the total BPAG dose that were hydrolyzed, obtained using the mean fetal free BPA clearance determined in the first experiment, were 12 and 29%. Extrapolation of the AUC to infinity indicated that these fractions might attain 45 and 97%.

The amount of BPAG excreted in urine increased after each BPAG administration (Fig. 3D), 5.4 and 7.3% of the total BPAG dose administered to the fetus being recovered in maternal urine over the first 34 h after the first dosing.

3.3. Repeated dosing simulation and degree of exposure enhancement of free BPA and BPAG in the fetus

Fig. 4 shows the results obtained using a four compartmental model (A) with the mean toxicokinetic parameters of BPA and BPAG

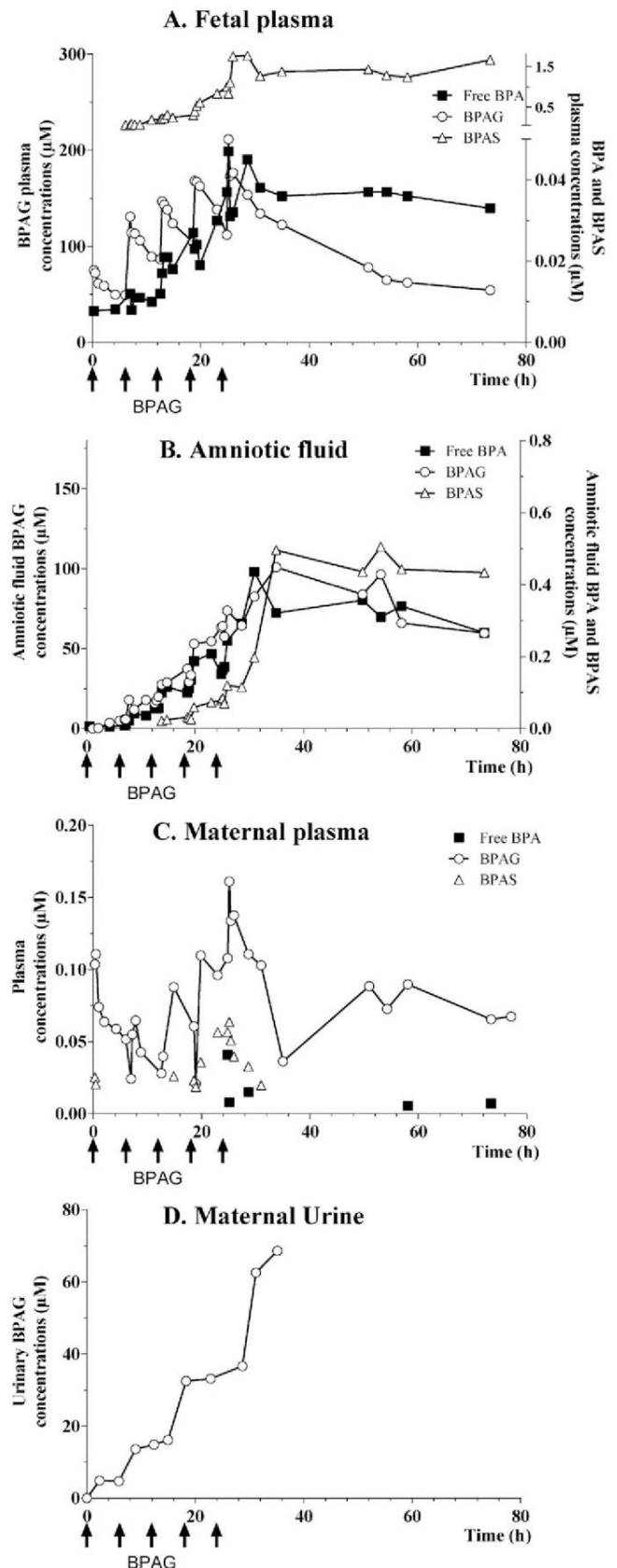


Fig. 3. Representative concentration–time profile (µM) for free BPA (closed squares), BPAG (open circles) and BPAS (open triangles) in fetal plasma (A), amniotic fluid (B), maternal plasma (C), and for BPAG in maternal urine (D), following five IV fetal administrations of $24.8 \mu\text{mol/kg}$ BPAG (10 mg/kg) separated by 6 h. BPAG was administered at times 0, 6, 12, 18 and 24 h.

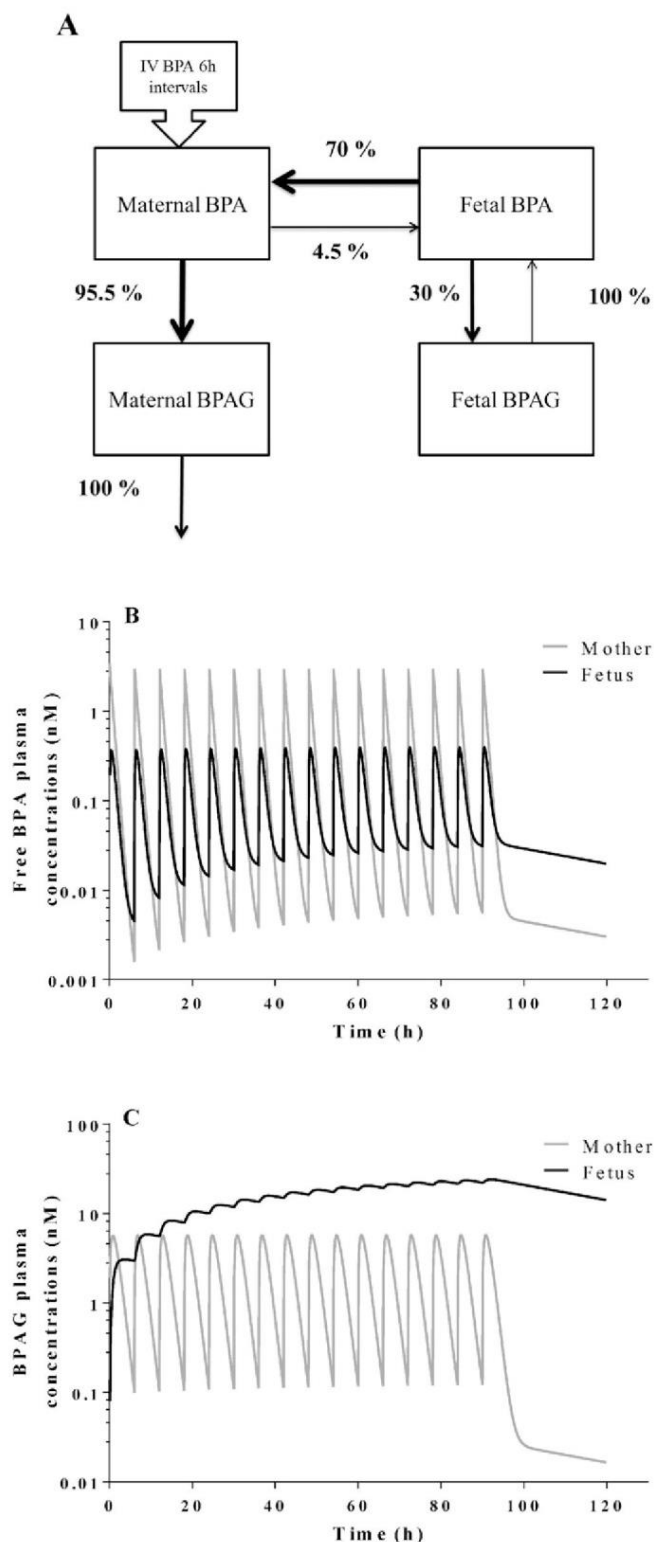


Fig. 4. Repeated maternal dosing simulation. Diagram of paired fetus–mother pharmacokinetic model for BPAG and free BPA based on previous results of the non-compartmental analysis (A). A small fraction of the BPA dose given intravenously to the mother (4.5%) is transferred to the fetus, the remaining fraction (95.5%) being metabolized to BPAG. Thirty percent of BPA entering fetal compartment is metabolized into BPAG, the major fraction (70%) being eliminated through fetal to maternal placental clearance. The fetal BPAG clearance process is only due to BPAG conversion back to its parent BPA. Model predicted plasma free BPA (B) and BPAG (C) concentration–time profiles (nM) for a paired 2-kg BW fetus (black line) and 75-kg BW mother (gray line) during administration of 16 repeated IV doses of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA to the mother with 6 h between each dose. Inspection of Fig. 4 B shows that the BPA trough concentrations were 7 fold higher in the fetal plasma than in the maternal plasma despite a lower overall BPA exposure.

(estimated in experiment 1) for a paired 2-kg BW fetus–75-kg BW mother to simulate the plasma concentration–time profile of fetal and maternal free BPA (B) and BPAG (C) after a repeated BPA maternal IV dose of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW administered at 6-h intervals.

The free BPA concentrations in maternal and fetal plasma were characterized by a succession of peaks and troughs. The maximal free BPA concentrations were about 7 fold lower in fetal plasma than in maternal plasma due to the highly efficient fetal to maternal clearance. Although the maximal BPAG concentrations did not increase in maternal plasma over time, the much lower fetal clearance of BPAG led to an accumulation factor of 8 for the maximal fetal BPAG concentrations that were attained after about 20 days. The sustained fetal exposure to BPAG was reflected by the high ratio 200:1 between the basal fetal and maternal concentrations of BPAG at pseudo-steady state. Although the BPA derived from BPAG hydrolysis was rapidly eliminated by the placenta, the near steady re-entry of BPA from BPAG resulted in the persistence of basal concentrations of free BPA in maternal and fetal plasma between the successive peaks.

The simulation predicted that basal free BPA concentrations should increase over time with an accumulation ratio of 8 and 3 in fetal and maternal plasma respectively, at the pseudo-steady state reached after about 20 days. The increase of basal free BPA concentrations in maternal plasma results from the constant delivery of BPA through fetal to maternal transfer. More importantly, in steady state conditions and for several days after the last dosing, the basal free BPA concentrations remained 7 times higher in fetal plasma than in the corresponding maternal plasma.

The degree of exposure enhancement of free BPA and BPAG due to recycling per se estimated from the BPA and BPAG fetal clearances, was 1.43 (see Supplementary data). In addition, the slow back-conversion of BPAG to BPA led to progressive accumulation of free BPA (factor of 1.40).

4. Discussion

In the present study, toxicokinetic experiments in pregnant sheep were designed to estimate the contribution of BPAG hydrolysis to the mechanism of BPAG elimination from the fetus and to determine its overall impact on free BPA fetal exposure.

To our knowledge, this is the first study to quantify fetal BPAG clearance, fetal BPA glucurono-conjugation and the re-entry of BPA into fetal circulation resulting from BPAG hydrolysis. We have shown that about 67% of BPA entering fetal circulation was rapidly eliminated, with a very short elimination half-life through placental clearance, while 24% of BPA was glucurono-conjugated by the fetus. The slow elimination of BPAG from the fetal compartment, involving deconjugation–conjugation recycling, was associated with low but steady re-entry of BPA into the fetal blood resulting in a highly increased persistence of fetal free BPA with a hydrolysis-dependent plasma terminal half-life of several tens of hours. In addition, it was computed that BPA–BPAG interconversion in the fetal compartment increased the overall fetal exposure to free BPA by about 43% (in comparison to a situation without interconversion), meaning that BPAG is putatively an important determinant of the action of BPA in the fetus, despite the fact that BPAG itself is an inactive substance.

Our study was based on the evaluation of BPA and BPAG toxicokinetics in fetal plasma, maternal plasma and maternal urine following IV bolus administrations of BPA and BPAG to the fetus. These data were then combined with the BPA and BPAG kinetics of the paired mother, determined after the IV administrations to each mother following the cesarean. This approach was selected to avoid confounding the fetal free BPA and BPAG concentrations remaining from previous fetal administrations with those resulting from maternal administrations.

First, differences were evidenced in the disposition of free BPA and BPAG between fetal and adult sheep. The 8-fold higher free BPA clearance in the fetus compared to the adult resulted in the systemically overall lower concentrations of free BPA in fetal plasma compared to

adult plasma, despite the enhancement effect of the back conversion of BPAG. The placental transfer of free BPA from fetus to mother appears to be extremely rapid with maximal free BPA concentrations occurring in maternal plasma within the first 7 min after fetal IV bolus administration of BPA and it was estimated that two thirds of the fetal BPA dose were eliminated by the mother during the first hours following a fetal BPA administration. In contrast, the fraction glucuronidated by the fetus (24%) was very slowly eliminated, resulting in a much higher fetal exposure to BPAG than to free BPA due to the much lower fetal BPAG clearance. These results are in agreement with previous findings which indicated that the fetal free BPA clearance is largely placental representing 74% of the umbilical blood flow (Corbel et al., 2013; Rudolph, 1985) while BPAG cannot cross the placenta (see later).

The contribution of BPAG to the fetal exposure to free BPA was directly demonstrated by administering BPAG to the fetus. Very low and relatively stable concentrations of BPA and BPAG respectively were measured in fetal and maternal plasma after a single BPAG fetal administration. Contrary to the findings for BPA, no proportionality was observed between the fetal and maternal plasma BPAG concentrations, strongly suggesting that BPAG does not readily cross the placenta and that fetal to maternal transfer of BPAG requires its prior hydrolysis by the fetus.

The use of repeated BPAG dosing in two fetuses enabled us to qualify the fetal BPA and maternal BPAG exposures associated with fetal BPAG exposure. Furthermore, this BPAG exposure pattern enabled us to describe the resulting time course of free BPA and BPAS concentrations, the parallel and gradual increase of free BPA and BPAS in both fetal plasma and amniotic fluid reflecting sulfo-conjugation of part of the hydrolyzed fraction of BPAG. Using TK parameters from the first experiment, the estimated fractions of BPAG hydrolyzed to BPA represented 45 and 97% of the total fetal BPAG dose for the two fetuses, suggesting that all the fetal BPAG is likely to be eliminated through hydrolysis by the fetus into BPA.

The estimated fetal terminal half-lives of BPAG and the back-formed BPA were of the same order of magnitude (several tens of hours) and were about 300 times higher than the mean elimination free BPA fetal plasma half-life (0.3 h) calculated from a single BPA fetal administration. This highly prolonged free BPA terminal half-life following a fetal BPAG administration indicates that the very slow terminal phase of free BPA elimination from the fetus is controlled by the gradual re-entry of BPA from BPAG hydrolysis.

Although near total, the re-entry of BPA from BPAG into the fetal circulation did not lead to a high level of fetal exposure to free BPA due to the fact that the recirculated BPA is quite rapidly transferred across the placenta or undergoes new recycling. The degree of exposure enhancement of free BPA, computed from free BPA and BPAG fetal clearances (see Cheng and Jusko, 1993 for theoretical explanation), was 1.4, indicating that BPAG hydrolysis back to BPA increased the fetal exposure to free BPA by 43% (see Supplementary data).

Besides its impact on the extent of overall fetal exposure to BPA, the use of a simplified toxicokinetic model enabled us to predict that, in the context of repeated maternal exposure to BPA, the occurrence of reversible BPA/BPAG metabolism in the fetal compartment leads to considerable differences between the shapes of the fetal and maternal free BPA concentration–time profiles. The predicted time course of free BPA concentrations in fetal plasma associated with repeated maternal dosing with BPA was characterized by lower free BPA peak but much higher trough concentrations than in the corresponding pattern obtained for maternal plasma. Thus, in comparison to the adult, the fetus is protected from transient increases in plasma free BPA concentrations associated with maternal intake of BPA thanks to the highly efficient fetal to maternal clearance, but is also more exposed to persistent higher trough concentrations between episodes of BPA intake (9.0 vs 1.5 pg/mL in the mother under our simulation conditions) due to the constant re-entry of BPA from BPAG hydrolysis. Although the pattern of human exposure to BPA is going to exhibit a fluctuating picture, our modeling approach

predicts relatively steady BPAG concentrations in fetal plasma that could be evaluated through biomonitoring surveys.

Ultimately, the reversible metabolism of BPA into BPAG associated with a high placental free BPA clearance in the fetus leads to a specific pattern of BPA exposure in the fetus that is characterized by three features (i) lower overall BPA exposure of the fetus compared to its mother, (ii) a clipping of the peak plasma free BPA concentrations in the fetus but (iii) an increase of the trough free BPA concentrations in fetal plasma, as compared maternal plasma, due to the very slow back-metabolism of BPAG to BPA. These trough free BPA concentrations in the fetal plasma require attention when discussing the potential health implications of the recycling of BPAG into BPA, especially when considering time-dependent effects.

In addition, it cannot be excluded that local fetal hydrolysis of BPAG into BPA may overexpose some specific tissues, even when free BPA concentrations in the fetal plasma have already dropped to insignificant levels. The plausibility of such a local pharmacokinetic mechanism for BPA is supported by the expression of molecular transporters of glucuronidated compounds in fetal human liver (Moscovitz and Aleksunes, 2013). Pacifici (2005) suggested that the highly abundant sulfated hormones in fetal blood may serve as a circulating store from which the free hormone can be regenerated through the action of sulfatases that are highly expressed in human placenta (Miki et al., 2002). It is reasonable to assume that BPAS would also be subject to deconjugation by tissue sulfatases and that, in a manner similar to sulfatases, the local action of β -glucuronidases could regenerate free BPA from circulating BPAG in placenta and various other fetal tissues (Ginsberg and Rice, 2009).

5. Conclusion

This study provides novel and critical information about the contribution of BPAG hydrolysis to the extent of fetal exposure to free BPA, an apparently futile cycle that could be a common mechanism involved in fetal exposure to conjugated compounds. We have demonstrated that the slow elimination of BPAG from the fetal compartment through hydrolysis into BPA acts as a mechanism prolonging fetal exposure to the active form of BPA while BPAG is rapidly excreted in adult urine. Adult free BPA plasma concentrations are characterized by transient peaks (associated with meals), but, in contrast, corresponding fetal exposure are characterized by a low but sustained basal BPA concentration due to the reversible metabolism of BPAG into BPA. The health implications of this specific pattern of fetal exposure to free BPA should be addressed, especially when considering time-dependent BPA effects.

Acknowledgments

The authors thank C. Lacassagne, JP Gau, and N. Deschamp for their assistance and involvement in the animal care.

This work was supported by the French Region Midi-Pyrénées [31000642] and government funds: French National Research Agency [ANR-13-CESA0007-1].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.006>.

References

- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Thatcher, W.W., 2012. Growth and development of the ovine conceptus. *J. Anim. Sci.* 90, 159–170.
- Boucher, J.G., Boudreau, A., Ahmed, S., Atlas, E., 2015. In vitro effects of bisphenol A β -D-glucuronide (BPA-G) on adipogenesis in human and murine preadipocytes. *Environ. Health Perspect.* <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1409143> (Advance online publication).
- Cabaton, N.J., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Zalko, D., Schaeberle, C.M., Askenase, M.H., Gadbois, J.L., Tharp, A.P., Whitt, G.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2011. Perinatal exposure to

- environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* 119, 547–552.
- Cheng, H., Jusko, W., 1993. Pharmacokinetics of reversible metabolic systems. *Biopharm. Drug Dispos.* 14, 721–766.
- Corbel, T., Gayraud, V., Viguié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Toutain, P.L., Picard-Hagen, N., 2013. Bisphenol A disposition in the sheep maternal–placental–fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol. Reprod.* 89 (1), 11.
- Corbel, T., Perdu, E., Gayraud, V., Puel, S., Lacroix, M.Z., Viguié, C., Toutain, P.L., Zalko, D., Picard-Hagen, N., 2015. Conjugation and deconjugation reactions within the fetoplacental compartment in a sheep model: a key factor determining bisphenol A fetal exposure. *Drug Metab. Dispos.* 43, 467–476.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2015. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: executive summary. *EFSA J.* 13 (1), 3978.
- Gayraud, V., Gauderat, G., Lacroix, M.Z., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.L., Picard-Hagen, N., 2015. Deconjugation of Bisphenol A glucuronide in preadipocyte cells must be considered for interpreting the effects of BPAG on adipogenesis. *Environ. Health Perspect.* (in press).
- Gibaldi, M., Perrier, D., 1982. *Pharmacokinetics*. 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Ginsberg, G., Rice, D.C., 2009. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ. Health Perspect.* 117, 1639–1643.
- Lacroix, M.Z., Puel, S., Collet, S.H., Corbel, T., Picard-Hagen, N., Toutain, P.L., Viguié, C., Gayraud, V., 2011. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85, 2053–2059.
- Matthews, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R., 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β . *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157.
- Miki, Y., Nakata, T., Suzuki, T., Darnel, A.D., Moriya, T., Kaneko, C., Hidaka, K., Shiotsu, Y., Kusaka, H., Sasano, H., 2002. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5760–5768.
- Moscovitz, J.E., Aleksunes, L.M., 2013. Establishment of metabolism and transport pathways in the rodent and human fetal liver. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23801–23827.
- Pacifici, G.M., 2005. Sulfation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus. *Early Hum. Dev.* 81, 573–581.
- Patterson, T.A., Twaddle, N.C., Roegge, C.S., Callicott, R.J., Fisher, J.W., Doerge, D.R., 2013. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267, 41–48.
- Rudolph, A.M., 1985. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ. Res.* 57, 811–821.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Schaeberle, C.M., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M., 2008. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod. Toxicol.* 26, 210–219.
- Viguié, C., Collet, S.H., Gayraud, V., Picard-Hagen, N., Puel, S., Roques, B.B., Toutain, P.L., Lacroix, M.Z., 2013. Maternal and fetal exposure to bisphenol A is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 154, 521–528.
- Vom Saal, F.S., VandeVoort, C.A., Taylor, J.A., Welshons, W.V., Toutain, P.L., Hunt, P.A., 2014. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: relevance for human exposures. *Reprod. Toxicol.* 45, 105–116.

C. Conclusions

Dans cette étude, la détermination des clairances individuelles du BPA et du BPAG chez le fœtus et sa mère a permis d'estimer précisément les contributions relatives de la glucuronoconjugaison et de la clairance placentaire à la clairance fœtale du BPA.

La clairance placentaire fœto-maternelle du BPA représente environ deux tiers de la clairance fœtale du BPA et explique la clairance fœtale élevée du BPA par rapport à l'adulte. La clairance fœtale de glucuronoconjugaison du BPA représente environ un tiers de la clairance fœtale totale, soit $3.6 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ ce qui est très proche du débit hépatique fœtal total provenant des artères hépatiques et de la veine porte qui est de $3.1 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ (voir chapitre I. IV.A.3).

A titre de comparaison la clairance de glucuronoconjugaison du BPA chez l'adulte a été estimée à $1.8 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Il apparaît donc que la clairance fœtale de glucuronoconjugaison n'est pas limitée par la clairance intrinsèque hépatique du BPA qui est environ deux fois plus faible chez le fœtus que chez l'adulte (76), mais par le flux sanguin hépatique du fœtus, qui rapporté à son poids, est plus élevé que celui de l'adulte.

La clairance fœtale du BPAG a été estimée à une valeur environ 750 fois plus faible que la clairance fœtale du BPA (0.02 vs $14.8 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$). C'est cette clairance extrêmement faible, combinée au métabolisme efficace du fœtus qui explique les concentrations très importantes en BPAG observées chez le fœtus par rapport à sa mère lors d'une exposition maternelle au BPA.

Cette étude a également permis de montrer que l'hydrolyse du BPAG est le principal mécanisme d'élimination du BPAG par le fœtus, contrairement à l'adulte qui élimine le BPAG dans les urines. Les concentrations plasmatiques fœtales en BPA qui en résultent sont cependant extrêmement faibles en raison de la clairance fœtale élevée du BPA. L'accumulation du BPAG est donc associée à une entrée faible mais constante de BPA dans le sang fœtal. Il en résulte une augmentation de la persistance du BPA avec une demi-vie dépendante de l'hydrolyse qui atteint plusieurs centaines d'heures. Nous avons également estimé que le métabolisme réversible du BPA dans le compartiment fœtal augmente de 43% l'exposition fœtale au BPA.

Parallèlement à son impact sur l'exposition fœtale au BPA en termes de concentrations plasmatiques, on ne peut pas exclure l'hypothèse selon laquelle l'hydrolyse du BPAG par les glucuronidases, exprimées dans l'ensemble des tissus (141), pourrait surexposer des tissus sensibles au BPA comme les gonades alors que les concentrations plasmatiques ont

diminué pour atteindre des valeurs très faibles. L'hydrolyse du BPAG dans les tissus fœtaux pourrait donc être responsable d'un découplage entre les concentrations circulantes et les concentrations tissulaires en BPA non-conjugué, qui représentent l'exposition fœtale critique en termes d'effet.

Le ratio entre les concentrations en BPA et en BPAG environ 10 fois plus important dans le liquide amniotique que dans le plasma fœtal après une administration fœtale de BPAG suggère que le liquide amniotique pourrait également contribuer à l'hydrolyse du BPAG.

Cette étude a permis de renseigner de nombreux mécanismes d'élimination du BPA et du BPAG par le fœtus. Elle a apporté en particulier des informations fondamentales en ce qui concerne la contribution de l'hydrolyse du BPAG à l'exposition fœtale au BPA, qui permettent de conclure que même si le BPAG est inactif par lui-même, il constitue un déterminant de l'exposition fœtale au BPA.

II. Développement d'un modèle pharmacocinétique pour prédire l'exposition du fœtus humain au BPA

A. Contexte et objectifs

Un grand nombre d'études montrent des effets délétères d'une exposition prénatale au BPA. Ces données ne peuvent pas être extrapolées à l'Homme à cause du manque de données concernant l'exposition du fœtus humain au BPA qui constitue donc une limite importante à l'évaluation du risque.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était de construire un modèle mathématique pharmacocinétique capable de prédire l'exposition du fœtus humain au BPA en termes de concentrations plasmatiques dans un contexte d'exposition environnementale.

En effet, pour évaluer de faibles niveaux de concentrations de BPA, les laboratoires analytiques se heurtent à des difficultés méthodologiques pour éliminer les sources de contamination des échantillons par le BPA omniprésent dans les dispositifs de collecte et d'analyse. L'approche modélisatrice permet de prédire des concentrations en BPA non-quantifiables et leurs décours temporel pour différents scénarios d'exposition maternelle.

Avant de construire le modèle PK, les données PK fœtales ovines du BPA et du BPAG du laboratoire ont dans un premier temps été complétées pour :

- Vérifier la proportionnalité de la PK fœtale du BPA et BPAG de façon à attester la validité de notre modèle pour prédire l'exposition fœtale associée à de faibles niveaux d'exposition au BPA. Ces données étaient nécessaires car le développement du modèle

TK fœto-maternel ovin a nécessité le recours à des doses élevées de BPA et de BPAG (de plusieurs mg.kg^{-1}) par rapport aux expositions environnementales. Pour cela nous avons mesuré les concentrations plasmatiques fœtales en BPA et BPAG à l'issue de trois jours de perfusion fœtales de BPA ou BPAG à différentes doses.

- Evaluer le taux de conjugaison pré-systémique du BPA transféré de la mère au fœtus lors du premier passage hépatique fœtal. Dans nos études PK précédentes, nous avons administré le BPA et le BPAG au fœtus par voie intraveineuse. Cette modalité d'administration a permis l'évaluation de la clairance fœtale du BPA mais pourrait être à l'origine d'une sous-estimation de la quantité totale de BPA transférée de la mère au fœtus car elle ne permet pas de prendre en compte la fraction de la dose interne fœtale métabolisée par le foie du fœtus avant d'atteindre sa circulation générale (voir chapitre I. IV.A.3). Pour cela nous avons réalisé une administration IV simultanée de BPA à la mère et de BPAG-d6 au fœtus pour deux brebis gestantes, et avons comparé les profils des concentrations plasmatiques fœtales en BPA et en BPAG à ceux obtenus après une administration fœtale directe de BPA. L'administration fœtale de BPAG-d6 réalisée simultanément a permis l'obtention de la clairance fœtale du BPAG nécessaire à l'évaluation de la quantité de BPAG retrouvée dans le compartiment fœtal résultant de la conjugaison du BPA transféré de la mère au fœtus.

Dans un deuxième temps, une approche de pharmacocinétique de population a été utilisée afin d'analyser simultanément l'ensemble des données de TK fœto-maternelles du BPA et du BPAG obtenues au laboratoire à partir du modèle du fœtus ovin. Le modèle ainsi développé a ensuite été transposé à l'Homme en remplaçant les paramètres TK maternels ovins par des paramètres humains déterminés à partir de l'analyse de données publiées de concentrations plasmatiques en BPA-d6 et BPAG-d6 après ingestion de BPA-d6 par voie alimentaire (34). Cette approche nous a ainsi permis d'obtenir un jeu de paramètres TK humains du BPA et du BPAG, mais également d'estimer la biodisponibilité du BPA lorsqu'il est ingéré par voie alimentaire chez l'Homme.

Ce modèle fœto-maternel humanisé a enfin été utilisé pour prédire l'exposition fœto-maternelle humaine au BPA et au BPAG selon un schéma d'exposition pertinent par rapport aux niveaux des expositions environnementales estimés par l'EFSA. Cette étude fera l'objet d'une publication scientifique. Les données complémentaires sont présentées en annexe de cette thèse.

B. Article 2

**Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A and bisphenol A glucuronide
from an ovine semi-physiological pharmacokinetic model**

Glenn Gauderat^{1,2}, Nicole Picard-Hagen¹, Pierre-Louis Toutain¹, Servien Rémi¹, Catherine Viguié¹, Sylvie Puel¹, Marlène Z. Lacroix¹, Alain Bousquet-Melou¹ and Véronique Gayrard¹

¹Toxalim, Université de Toulouse, INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), INP (Institut National Polytechnique de Toulouse) –ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), Toulouse, France

²Agreenium's International Research School (EIR-A), Paris, France

Corresponding author : Véronique Gayrard, UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Laboratoire de Physiologie, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France, Tel. : 33 (0)5 61 19 39 18, Fax. : 33 (0)5 61 19 39 17, E-mail : v.gayrard@envt.fr

Running title: Compartmental modeling of BPA pharmacokinetics in the maternal fetal unit

Acknowledgments: The authors thank C. Lacassagne, JP Gau, and Deschamp N. for their assistance and involvement in the animal care.

Funding:

This work was supported by the French Region Midi-Pyrénées (31000642) and government funds from the French National Research Agency (ANR-13-CESA0007-1) and the French National Center for Scientific Research (CNRS, PEPS FaiDoRa 2015)

Competing financial interests: The authors declare no conflicts of interest.

Abstract

Background: The level of unconjugated bisphenol A (BPA) in human plasma is a highly controversial topic on which biomonitoring data are inconsistent with pharmacokinetically based predictions. In particular, great uncertainty remains concerning human exposure during the critical period of the fetal development.

Objective: To predict the internal exposure to bisphenol A of the human fetus during late pregnancy using a semi-physiological pharmacokinetic model.

Methods: We used ovine fetomaternal pharmacokinetic (PK) data to assess the dose-proportionality of BPA and its glucuronidated form (BPAG) in the fetus and to build an ovine fetomaternal PK model. The adult part of the model was then reparametrized with human PK parameters of deuterated-BPA delivered in cookies to adult humans and the predictive value of this humanized model was assessed by comparing model predictions to published fetal rhesus monkey data. Finally the humanized model was used to predict BPA and BPAG concentrations in fetal and maternal plasma under a relevant human exposure scenario.

Results: We observed no evidence of deviance from dose linearity of BPA and BPAG in the fetus. The ovine fetomaternal model allowed to confirm BPAG hydrolysis in the fetal compartment and to establish that a maternal-to-fetal first-pass conjugation effect accounts for 69 % of fetal exposure to BPAG. The adult humanized model allowed estimating an oral BPA bioavailability of 7.3 % through the diet that represents a key issue for human exposure assessment. The predicted BPA plasma kinetics in fetal rhesus monkey after oral administration well fitted previously published data. Based on EFSA's external exposure estimations, the final humanized model predicted steady fetal BPAG concentrations at about 40 ng/L while BPAG levels in maternal plasma exhibited a fluctuating pattern according to episodic BPA intakes varying from 1.6 to 40 ng/L. Peak BPA concentrations in fetal plasma (23 pg/L) were predicted to be lower than corresponding maternal exposure (140 pg/L) while BPA and BPAG steady concentrations after the last administration resulting from BPAG accumulation and its subsequent hydrolysis were 5 and 780 times higher in the fetus than its mother respectively.

Conclusions: While BPA concentrations in human cord blood are expected to be below the current limits of detection, the model predicted steady BPAG concentrations in the range of reported BPAG levels in human cord blood and support the relevance of these levels as an

indicator of fetal exposure to BPA during late pregnancy. The potential health implications of the BPAG sustained fetal exposure should be explored for a supplementary assessment.

Introduction

Bisphenol A (BPA) is a high production volume industrial chemical present in a wide variety of consumer products worldwide. As a result of its large and frequent use, human exposure to BPA is widespread with over 90 % of the population of the US (Calafat et al. 2008), Canada (Haines and Murray 2012) and Europe (Covaci et al. 2015) being exposed.

The risk assessment for BPA is controversial because the tolerable daily intake (4 µg/kg per day (EFSA. 2015)) is higher than doses that have been shown to produce adverse effects on laboratory animals, especially if dosing occurs during the perinatal period (Cabaton et al. 2011; Vandenberg et al. 2008).

Resolution of the public health debate surrounding the risk for human health associated to fetal exposure to BPA remains largely on determining whether human fetal blood concentrations of unconjugated BPA are similar to or much lower than concentrations measured in test species responding adversely to exposure. Currently, the levels of BPA concentrations in human fetal plasma are unknown. Biomonitoring studies conducted in neonates have reported BPA in serum in the ng/mL range (Chou et al. 2011; Fénichel et al. 2012; Gerona et al. 2013; Schönfelder et al. 2002; Zhang et al. 2013). However, the reliability of such high BPA concentrations is questioned due to possible uncommon exposure settings specifically related to exposure during delivery or post-exposure sample contamination (Dekant and Völkel 2008).

Given the inability to know univocally the internal exposure of the human fetus to BPA, its prediction can be done from animal data using two approaches: compartmental and physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling. PBPK is a mechanistic-based modeling involving mass-balance considerations to simulate organs and tissues concentrations; these models have the theoretical potential to predict the plasma BPA concentration-time curve in man but they are complex, labor-intensive to build and they require assumptions and/or experimental data (parameters) that are challenged for their predictability (Vom Saal et al. 2012). At the opposite, the compartmental modeling can be viewed as an easy empirical or semi-mechanistic approach to build, from actually collected raw data, simple models. The value of using such models to predict undetectable BPA levels has been shown in the sheep model (Gauderat et al. 2016). By scaling such semi-mechanistic models describing BPA disposition on animals using corresponding human raw data, a

humanized model can be obtained to predict human BPA internal exposure using a set of minimal assumptions.

The selection of an animal model for extrapolation of BPA kinetics from animal to human fetus should deserve attention. The pregnant sheep is an acknowledged model for studying placental transport and xenobiotic pharmacokinetics in the maternal-fetal unit (Barry and Anthony 2008) and is frequently used for characterizing drug disposition during the prenatal period (Kumar et al. 1997; Ngamprasertwong et al. 2016). Furthermore, high similarities have been evidenced between human and sheep for BPA glucuronidation that is near total in adults (Gauderat et al. 2016; Völkel et al. 2002). The relevance of the sheep model for predicting human BPA fetal kinetic is also comforted by the similarity of the mechanisms of the BPA placental clearances evaluated *in vivo* in fetal sheep experiments and *ex vivo* using human placentas (Corbel et al. 2014, 2013).

Previous studies of BPA toxicokinetics (TK) in fetal sheep have shown that maternal exposure to BPA leads to the accumulation of BPAG in the fetal circulation (Corbel et al. 2013; Viguié et al. 2013) which is slowly eliminated through back conversion into BPA, resulting in a gradual reentry of BPA into fetal blood (Gauderat et al. 2016). Together with recent report of BPAG effects in a cell model (Boucher et al. 2015); these results indicate that BPAG might not be simply considered as an inactive terminal metabolite and underline the need for characterization of human fetal exposure to both BPA and BPAG.

In the present paper, a compartmental PK model was developed from data obtained in the fetomaternal sheep unit following maternal and fetal BPA or BPAG administrations. Since high doses of BPA and BPAG have been required to evaluate fetal BPA and BPAG pharmacokinetics, the reliability of our modeling approach for more relevant low BPA exposure levels was first checked through the assessment of the dose-proportionality of fetal BPA and BPAG TK.

The adult part of the ovine model was then humanized by parameter substitution, i.e. by replacing maternal ovine parameters by human parameters obtained from human data of BPA-d6 exposure through the diet (Thayer et al. 2015) that allowed a direct estimation of the human absorption and distribution parameters under a relevant scheme of exposure. The predictive value of the final fetomaternal humanized model was then assessed by its ability to predict the disposition of BPA and BPAG in pregnant primates through the comparison of modeled and actually observed fetal and maternal concentrations after maternal BPA

intravenous (IV) dosing (Patterson et al. 2013). Finally, the final humanized model was used to predict BPA and BPAG plasma concentrations in the human feto-maternal unit under an exposure scheme corresponding to the latest to date human external exposure estimations.

Methods

Animals

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of human animal care under agreement number 31-1155545 from the French Ministry of Agriculture.

The experiment was carried out on 32 pregnant Lacaune ewes with a mean ($\pm$ SD) bodyweight of 74 ± 10 kg. All animals received two commercial pelleted rations daily, and hay and water were given *ad libitum*. One fetus per ewe was chronically catheterized between 105 and 128 days of gestation, as previously described (Corbel et al. 2013).

Experimental design

A first experiment was designed to check the dose-proportionality of BPA and BPAG fetal disposition by analyzing the relationship between fetal BPA and BPAG infusion rates and corresponding fetal plasma concentrations of BPA and BPAG measured about 3 days after the beginning of the infusions. Nominal fetal body weight was arbitrarily fixed at 2.5 kg (Bazer et al. 2012).

Five dose levels were tested and each fetus was randomly assigned to receive a single dose of each compound. Sixteen fetuses received three days IV infusions of BPA at doses of 4.6 nmol/h (0.01 mg/kg.d, n=3), 45.7 nmol/h (0.1 mg/kg.d, n=3), 456.6 nmol/h (1 mg/kg.d, n=5), 4566.4 nmol/h (10 mg/kg.d, n=3) or 45664.1 nmol/h (100 mg/kg.d, n=3). Fourteen fetuses received three days IV infusions of BPAG at doses of 4.6 nmol/h (0.018 mg/kg.d, n=3), 46.4 nmol/h (0.18 mg/kg.d, n=3), 456.2 nmol/h (1.8 mg/kg.d, n=4), 4562.1 nmol/h (18 mg/kg.d, n=2) or 23712 nmol/h (92 mg/kg.d, n=2). Serial blood samples were taken for 4-6 h before and about three days after the beginning of the infusions for hormonal measurements (results not shown). Two to four serial fetal blood samples (1 mL) were drawn before the beginning of the infusion and 3 days after the beginning of the infusions to determine BPA and BPAG plasma concentrations.

During a second experiment aiming to refine the sheep feto-maternal model, simultaneous IV bolus administrations of BPA (4.4 μ mol/kg, 1 mg/kg) to the mother and of BPAG-d6

(11.2 μ mol, 4.6 mg) to the fetus were applied to two ewes. Fetal and maternal blood samples (0.5mL) were drawn before and at 7, 15, 30, 60, 120 min, every 2 h for 8 h and at 24, 34, 48, 56 and 70 h after the administrations.

Test material and treatments

All materials for the preparation of solutions, including materials used for sampling, processing and analysis, were in glass or BPA-free plastic (polypropylene).

BPA (purity 99 %) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and was extemporaneously dissolved in ethanol/propylene glycol (1/49, vol/vol) at concentrations ranging from 0.00347 to 34.7 mg/mL.

BPAG (purity 98 %) was purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) and was extemporaneously dissolved in ethanol/propylene glycol (1/49, vol/vol) at concentrations ranging from 0.00625 to 31.9 mg/mL.

BPAG-d6 (purity 95 %) used was purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) and was extemporaneously dissolved in 0.9 % NaCl buffer at 2 mg/mL.

Fetal bolus IV doses were administered via a catheter chronically implanted in the jugular vein. Intravenous infusions were performed into the jugular vein via an indwelling catheter connected to a portable syringe pump (Graseby[®] MS 32) as previously described (Collet et al. 2010).

Sample Collection and analysis

Blood samples were collected in heparinized tubes, immediately chilled in ice and centrifuged for 20 min at 3000 g. Plasma was separated and stored at -20°C until assayed.

Analytes were quantified with an Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic data were monitored by Targetlynx[®] software (Water, Milford, MA, USA).

BPA and BPAG were simultaneously quantified without recourse to a hydrolysis step according to a method that has been validated in compliance with FDA guidelines (Lacroix et al. 2011). Briefly, plasma samples (100 μ L) were diluted with 150 μ L of acetonitrile (for protein precipitation) and 50 μ L of internal standards BPA-d16 and BPAG 13C12 separated

on a C18 column with a water/acetonitrile gradient elution. The limits of quantification (LOQ) were 1 ng/mL (BPA) and 5 ng/mL (BPAG).

For BPA-d6 and BPAG-d6 quantification, plasma samples (100 µL) were diluted with 200 µL of acetonitrile and 30 µL of internal standards BPA-d16 and BPAG 13C12 at 10 ng/mL prepared in AcN/H₂O (50/50, v/v). Samples were then mixed and centrifuged at 20,000 × g at 4 °C for 10 min, supernatant were transferred to 5 mL glass tubes, evaporated to dryness under a stream of nitrogen and resuspended in 100 µL carbonate buffer and 100 µL of a 1 mg/mL solution of dansyl chloride in acetone. After mixing, the solutions were heated for 10 min at 60 °C, the reactions were stopped by cooling the samples on ice and BPAG-d6-(dansyl)(1) and BPA-d6-(dansyl)(2) derivatives were quantified. The limits of quantification were 0.1 ng/mL (BPA-d6) and 0.25 ng/mL (BPAG-d6). Blanks and quality control samples (at concentrations of 0.25, 2.5 and 75 ng/mL BPA-d6 and BPAG-d6) were used to check the absence of contamination during analysis and the accuracy of the method.

Pharmacokinetic analysis

All the statistical analysis has been done using Phoenix NLME (version 6.4; Pharsight, Mountain View, CA, USA).

Dose linearity analysis

Fetal BPA and BPAG plasma concentrations at the end of the infusion were fitted against BPA or BPAG infusion rates using a quadratic polynomial model of the form:

$$\text{Eq.1: } C_{ss} = \alpha + \beta_1(\tau) + \beta_2(\tau)^2$$

And a simple linear model of the form:

$$\text{Eq.2: } C_{ss} = \alpha + \beta_1(\tau)$$

Where C_{ss} was the mean fetal plasma concentrations (in µM) at the end of the infusion, τ was the rate of intravenous fetal infusion (in nmol/h) and β_1 and β_2 were the linear and quadratic components of the model respectively.

Both models were resolved using a proportional residual error model of the form:

$$\text{Eq.3: } C_{ssObs} = C_{ss} \times (1 + \varepsilon)$$

Where C_{ss} and C_{ssObs} were the predicted and observed fetal plasma concentrations and ε was the residual error.

Dose-linearity was considered when the 95 % confidence interval of the estimated terms β_2 included 0 when fitting the data to the quadratic model (Eq.1) and in case of accepted dose-linearity, dose-proportionality was tested and accepted when the 95 % confidence interval of the estimated term α included 0 when fitting the data to the simple linear model (Eq.2) (Smith et al. 2000).

Analysis of the simultaneous fetal BPAG-d6 and maternal BPA dosing

In order to characterize the structure of the ovine model and in particular to identify an eventual first-pass conjugation between the maternal and fetal circulation, a non-compartmental analysis has been done to compare the ratios between the BPAG and the BPA area under the plasma concentration-time curve (AUC) obtained in fetal plasma after the present BPA maternal IV dosing to the corresponding ratio obtained previously after a fetal BPA IV dosing (Gauderat et al. 2016). The BPA concentration considered to evaluate the BPA AUC were the concentrations corresponding to the decreasing phase following the maternal administration, the phase during which was observed fluctuating BPA concentrations resulting from BPAG hydrolysis being not taken in account. AUCs were estimated from $t = 0$ to infinity using the slope of the terminal phase as estimated by linear regression with the best-fit option of Phoenix®.

Development of a semi-physiological humanized model of BPA and BPAG in the fetomaternal unit

Modeling was carried out using the Phoenix® NLME textual model interface with microconstant parameterization. All plasma concentrations were converted into micromolar concentrations before the analysis. All concentrations obtained below the quantification limits were included in the analysis and handled as censored observations according to the M4 method described in Beal. (2001). Different model structures were initially evaluated using the Naïve pooled engine computation. Once the model structure was defined, a population approach (mixed effect nonlinear regression) was applied using the Laplacian approximation method with Naïve pooled results as initial estimates. Bayesian information criterion (BIC) and visual inspection of residues and fitted curves were used to select the models that best described the data.

Ovine feto-maternal model development

Since we had previously shown that free BPA and BPAG pharmacokinetic parameters in adult sheep were not affected by pregnancy (Corbel et al. 2013), the ovine feto-maternal model development was initiated with the characterization of its adult (maternal) part using BPAG and BPA plasma concentrations obtained in a previous experiment that involved BPA and BPAG intravenous administrations in 8 adult sheep after cesarean section (Gauderat et al. 2016).

The structure of the ovine adult model and corresponding estimated population parameters (the so-called fixed effects or structural parameters) were then frozen as the maternal part of the full ovine feto-maternal model in order to facilitate the estimability of the fetal part of the model.

The full population ovine feto-maternal model was then developed from a combination of datasets that included a total of 54 paired mother-fetuses. Population modeling is the appropriate tool for meta-analysis of data pooled across different studies (Bonate. 2011).

The first data set used was taken from the present study. A second data set used was from our recent PK study (Gauderat et al. 2016) where measurements of the time courses of BPA and BPAG concentrations in maternal and fetal plasma were carried out following separate single doses of BPA and BPAG administered intravenously to eight sheep fetal/maternal pairs. The last data set used for the ovine feto-maternal modeling was from Corbel et al. (2013) where measurements of the time course of BPA and BPAG concentrations in maternal and fetal plasma were carried out in sheep fetal/maternal pairs following two IV fetal infusions of BPA and BPA-G separated by 7 days or following maternal IV infusions of BPA and BPA-G 7 days apart.

Human feto-maternal model development and simulations

First, the maternal part of the ovine feto-maternal model was reparametrized with human parameters that we estimated using raw BPA-d6 and BPAG-d6 plasma concentrations as obtained after oral BPA-d6 administration in human and previously reported in Thayer et al. (2015). The model structure used to fit the human data was the adult part of the ovine model on which has been added an absorption sub-model that included the conjugation first-pass effect and considering that the entire BPA-d6 dose was absorbed (Völkel et al. 2002). To make possible the identifiability of the whole model from this single route of administration and in the absence of human IV data, the human BPA glucuronidation clearance was fixed to

the 1,536 L/kg.h clearance estimated using an allometric approach (Collet et al. 2015) and the volume of the human BPAG central compartment was fixed to the value obtained in sheep (94.5mL/kg). This last step in the model development allowed us to get an estimation of the human distribution and absorption parameters under a relevant scheme of exposure through the diet.

A humanized feto-maternal model corresponding to the human parameterized model on which has been grafted the full ovine fetal model was then build by linking the two submodels (adult humanized and ovine fetal models) using maternal-to-fetal clearances as estimated in the ovine model

Between subject and residual variability modeling

The between subject variability (BSV) and the residual unexplained variability (RUV) were modeled the same way for all the models.

The BSV was modeled using an exponential model of the form:

$$\text{Eq.4: } \theta_i = \theta_1 \times \text{Exp}(\eta_i)$$

With θ_i (noted theta) the value of PK parameter in the i th animal, θ_1 the typical population value of this parameter and η_i the deviation (noted eta) associated to the i th animal from the corresponding population value.

It was assumed that etas were not correlated and no covariance terms were considered.

The RUV was modeled using combined additive and proportional errors of the form:

$$\text{Eq.5: } C_{obs} = C_{pred} + \varepsilon(1) + C_{pred} \times \varepsilon(2)$$

With C_{obs} and C_{pred} the observed and predicted concentrations and $\varepsilon(1)$ and $\varepsilon(2)$ the additive and multiplicative residual terms.

One residual error model per analyte was defined (BPA, BPAG, BPA-d6 and BPAG-d6).

Human exposure simulation

The humanized feto-maternal model was first evaluated against published fetal pharmacokinetic data in rhesus monkeys as its placentation is more similar to the human one (Grigsby 2016). The time course of BPA-d6 and BPAG-d6 fetal and maternal plasma concentrations after maternal 100 µg/kg BPA-d6 IV dosing in rhesus monkeys (Patterson et

al., 2013) was compared to our model predicted values. We then simulated human maternal and fetal BPA and BPAG plasma concentrations resulting from a 4 week exposure scenario relevant to typical environmental exposures. Since diet is considered as the main source of human exposure to BPA (EFSA 2015), BPA maternal dosing was applied to the absorption compartment. The selected dose was the mean daily dose estimated by EFSA of 36 ng/(kg.d) (11.05 nmol/d for the selected bodyweight of 70kg) for women of childbearing age that was divided in 3 doses delivered at the respective intervals of 5, 7 and 12 h to mimic three meals per day. A single dose corresponding to the 95th percentile estimation of 182 ng/(kg.d) (mean-95th percentile, 55.85 nmol) was applied once after three weeks of daily exposure to the mean dose to evaluate the impact of a high occasional burst exposure event on the time course of BPA and BPAG concentration levels in maternal and fetal plasma.

RESULTS

The concentrations of BPA and BPAG in all control samples drawn before test article dosing were below the limit of quantification of the analytical method. All results are presented as mean $\pm$ SD.

Dose linearity assessment

The experiment was performed on 16 female and 14 male fetuses with a mean body weight of 2.3 ± 0.7 kg. The average age of the fetuses was 118 ± 5 days at the beginning of the experiment. Estimated parameters, confidence intervals and residual plots are available in supplemental material. No regression analysis have been done for the BPA fetal plasma levels reached after BPAG fetal infusions since they were only detected for the two highest BPAG infusion rates.

Figure 1 shows that a simple linear model (Eq.2) is able to fit the observed fetal plasma concentrations of BPA and BPAG against the infusion rates of BPA (Fig1.A) and BPAG (Fig1.B).

For BPA infusions, the 95% confidence interval of both the intercept coefficient α calculated with the linear model (Eq.2) and the quadratic coefficient β_2 estimated with the quadratic model (Eq.1) included 0 for both BPA and BPAG concentrations, suggesting not only dose-linearity but also dose proportionality of BPA fetal disposition.

For BPAG infusions, predicted BPAG concentrations were slightly higher than the observations for the two fetuses that received the highest dose (Fig.1B), suggesting deviance

from linearity for the higher dose. As a result, the 95 % confidence interval of the quadratic coefficient β_2 was negative. This was no longer observed when the two fetuses that received the highest dose were excluded from the regression analysis (see supplemental data). On the other hand, the intercept coefficient α calculated with the linear model (Eq.2) did included 0.

By taking the reciprocal of the slope β calculated with the linear model describing BPA concentrations versus BPA infusion rates and BPAG concentrations against BPAG infusion rates, the fetal BPA and BPAG clearances can be computed (Gibaldi and Perrier 1982) and were estimated at 22.5 L/h and 0.058 L/h respectively.

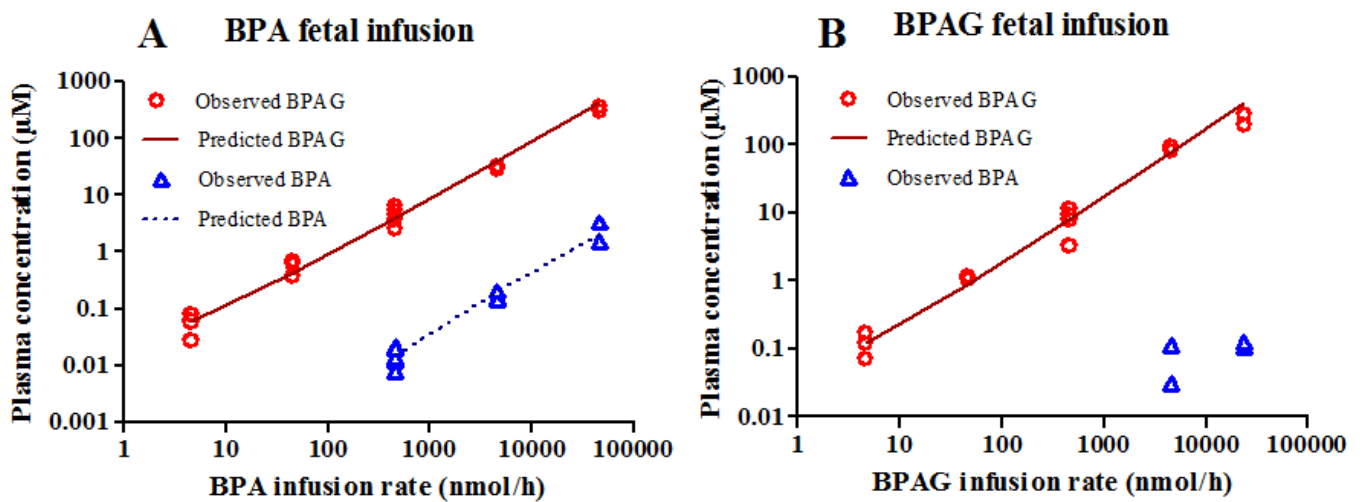


Figure 1: Dose proportionality of fetal BPAG and BPA plasma concentrations at the end of a three days lasting fetal IV infusion of BPA (A) or BPAG (B). Lines are the simple linear model predictions (Eq.2) and dots are the mean fetal plasma concentrations per fetus.

Pharmacokinetic model development

Compartmental representations of the three models developed in Phoenix® for each modeling steps (adult sheep, feto-maternal sheep and adult human data fittings) are described in the supplementary data (code is available upon request). The full list of population parameter estimates, BSV parameter estimates and associated eta shrinkages, as well as additive and multiplicative error terms are available in the supplementary data. Selected clearances were calculated as secondary parameters by multiplying the involved volumes of distribution by their corresponding elimination rate constants.

Ovine modeling

Simultaneous fetal BPAG-d6 and maternal BPA dosing

Figure 2 shows the time course of mean and individual fetal and maternal BPA, BPAG, BPA-d6 and BPAG-d6 plasma concentrations following simultaneous fetal BPAG-d6 and maternal BPA dosing.

After BPAG-d6 fetal administration, the slow decrease of fetal plasma BPAG-d6 concentrations was associated to low and relatively steady BPA-d6 concentrations. In maternal plasma, BPA-d6 was quantified in only five samples taken within the first sampling hour while BPAG-d6 plasma concentrations slightly fluctuated over the sampling period. The immediate occurrence of BPA-d6 in fetal plasma indicate that part of the hydrolysis took place in the central compartment and the lower terminal slope of BPA-d6 time course concentrations in fetal plasma compared to BPAG-d6 suggested that BPAG-d6 hydrolysis may also occur in peripheral compartments.

Interestingly, the ratios between the AUCs of fetal BPAG and BPA plasma concentrations originating from the maternal to fetal BPA transfer (364 and 407 for the two fetal/maternal pairs) were higher than the corresponding ratios previously observed after direct BPA administration to the fetuses (mean of 262 ± 119 , (Gauderat et al. 2016)), suggesting that a fraction of the BPA transferred from the mother to the fetus have been already conjugated before reaching the systemic fetal circulation.

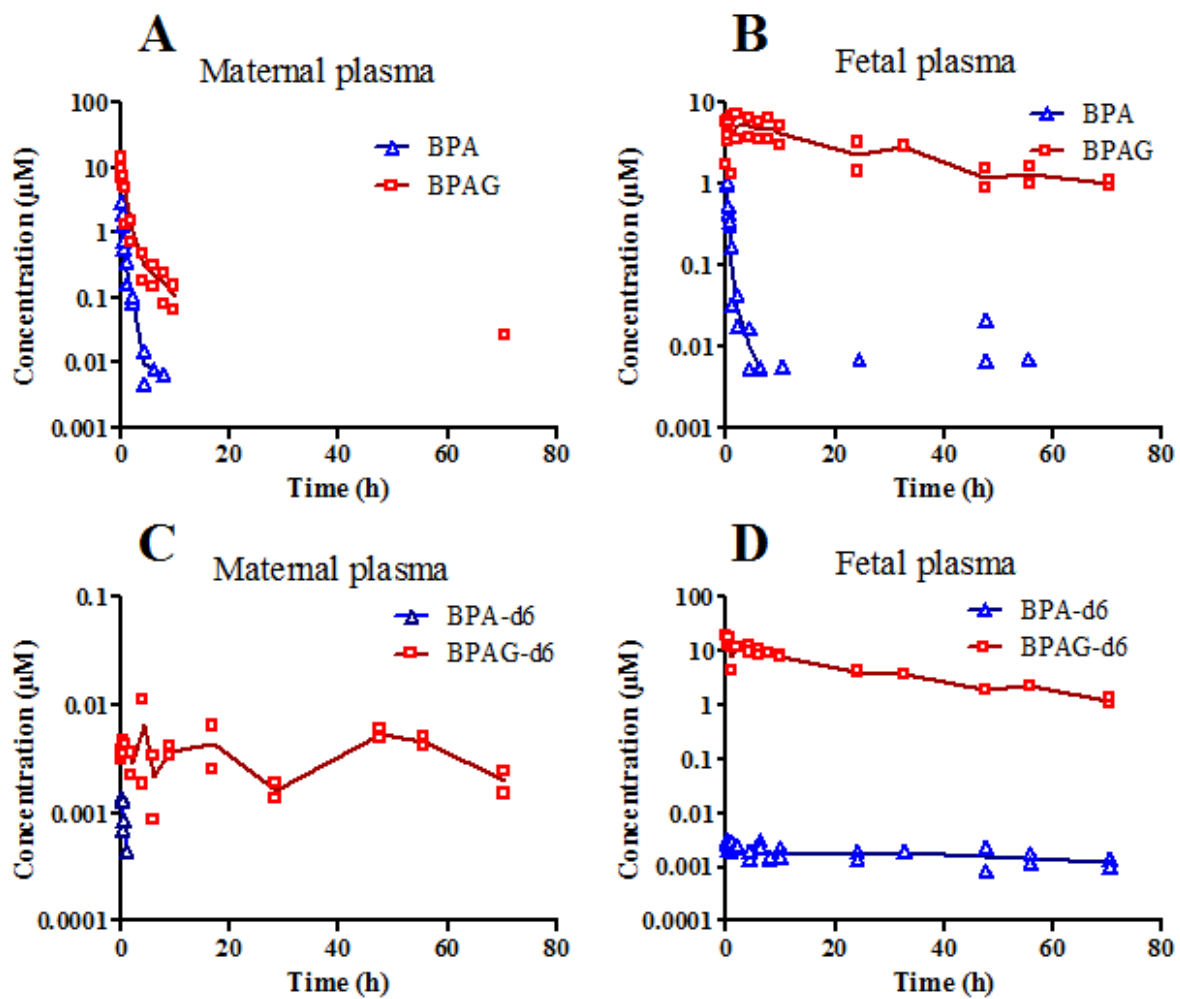


Figure 2: Semilogarithmic plots of mean (lines) and individual (dots) concentration-time profiles (μM) of BPA, BPAG, BPA-d6 and BPAG-d6 in maternal and fetal plasma following simultaneous IV administrations of BPAG-d6 to fetus (11.2 μmol, 4.6 mg) and BPA to the mother (4.4 μmol/kg, 1 mg/kg). Unlabeled BPA and BPAG plasma concentrations resulting from the maternal BPA administration are presented in the top panels for the mother (A) and the fetus (B). Labeled BPA-d6 and BPAG-d6 plasma concentrations resulting from the fetal BPAG-d6 administration are presented in the bottom panels (C and D).

Maternal (adult) sheep modeling

The ovine maternal model, which was developed first, included a distribution compartment for both BPA and BPAG with a glucuronoconjugation constant between the central BPA and the central BPAG compartment.

BSV was modeled for all the structural parameters except the BPAG distribution parameters that could not be estimated. Corresponding coefficients of variation (CV) ranged between 10 and 33 % (see supplementary data). The standard deviations (SD) of the additive error models were close to the LOQ of corresponding analytes (see additive and multiplicative error terms in supplementary data). The goodness of fit plots (fig.3) show that the model described appropriately the data confirming that BPA elimination is almost exclusively done through glucuronidation.

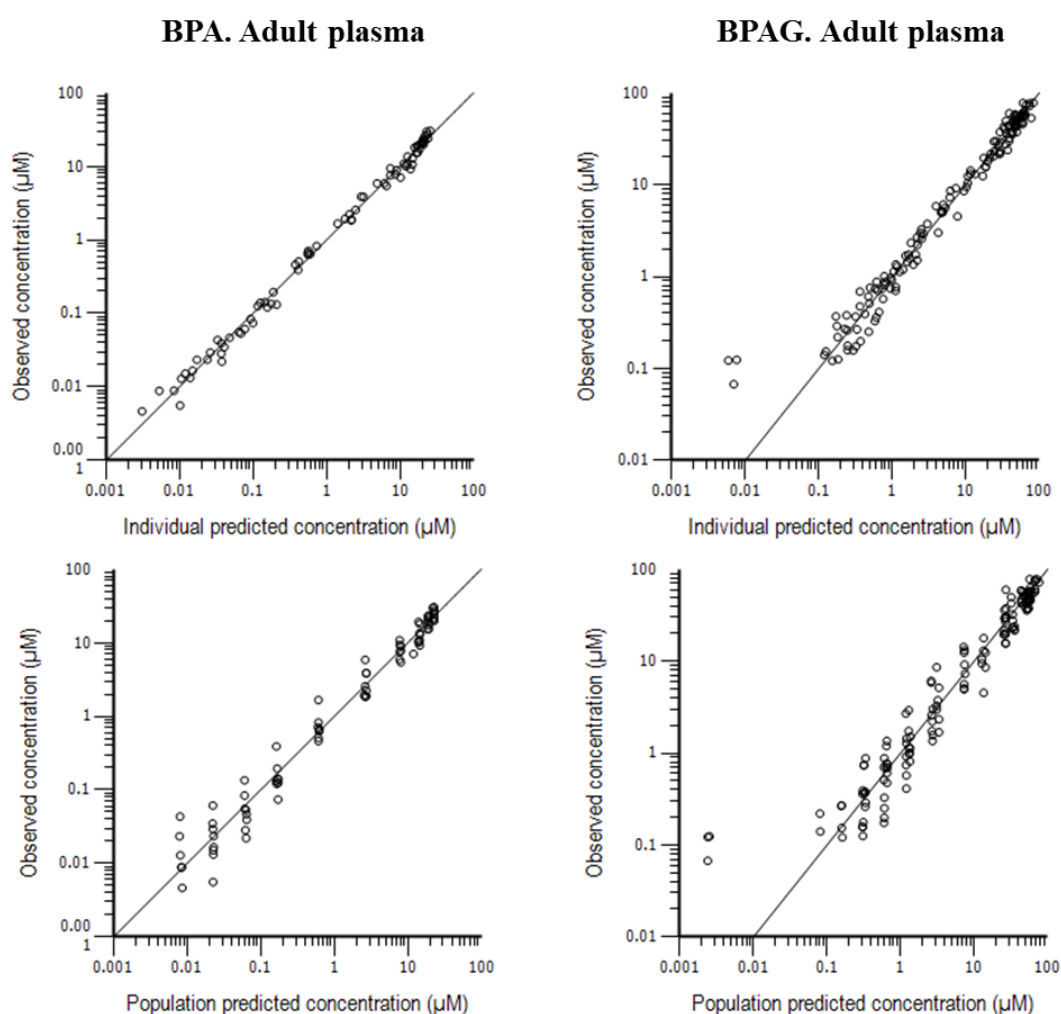


Figure 3: Diagnostic plots for the adult (non-pregnant) sheep PK model obtained after simultaneous fitting of BPA and BPAG plasma concentrations following a BPA and BPAG IV administration. Individual (top panels) and population (bottom panels) predictions of BPA (left panels) and BPAG (right panels) plasma concentrations are presented.

The central maternal compartment volume of BPA was much higher (0.815 L/kg) than that of BPAG (0.0945 L/kg). The maternal BPA and BPAG clearances were estimated at 1.75 and 0.30 L/(h.kg) respectively (see population parameter estimates in supplementary data).

Ovine feto-maternal modeling

The fetal model grafted to the adult model included a recirculation compartment for BPAG only, a glucuronoconjugation constant between the central BPA and the central BPAG fetal compartments, and a single fetal BPAG hydrolysis constant that linked both the central and peripheral BPAG compartment to the central fetal BPA compartment. The maternal and fetal BPA central compartments were directly linked in both ways, meaning that the BPA bidirectional transfer was rapid, while the central BPAG compartments were linked only in the fetal-to-maternal way since no BPAG was detected in fetal plasma after BPAG maternal administrations. An additional rate constant between the central BPA maternal compartment and the central BPAG fetal compartment was added to model the first-pass conjugation effect occurring between the maternal and the fetal circulation.

The analyzed data included various IV routes of administrations and dosages that allowed the estimation of different sets of parameters for a limited number of individuals. As a result of this particularly complex dataset leading to identifiability issues, the estimation of the BSV was not obtained for all structural parameters. Nevertheless, the between subject variability was modeled for some structural parameters (see associated CV and eta shrinkages in supplementary data). The SD of the additive and multiplicative error terms corresponding to each analytes are given in supplementary data. Overall, the goodness of fit plots (fig.4) show that the model described appropriately the data. Only the BPA-d6 maternal plasma concentrations that briefly emerged after BPAG-d6 fetal dosing presented a departure to the model (fig4). However, those concentrations could originate from residual BPA-d6 in the BPAG-d6 dose that has been estimated at less than 1 % of the fetal BPAG-d6 dose considering the adult sheep clearance of BPA and the maternal BPA-d6 AUC.

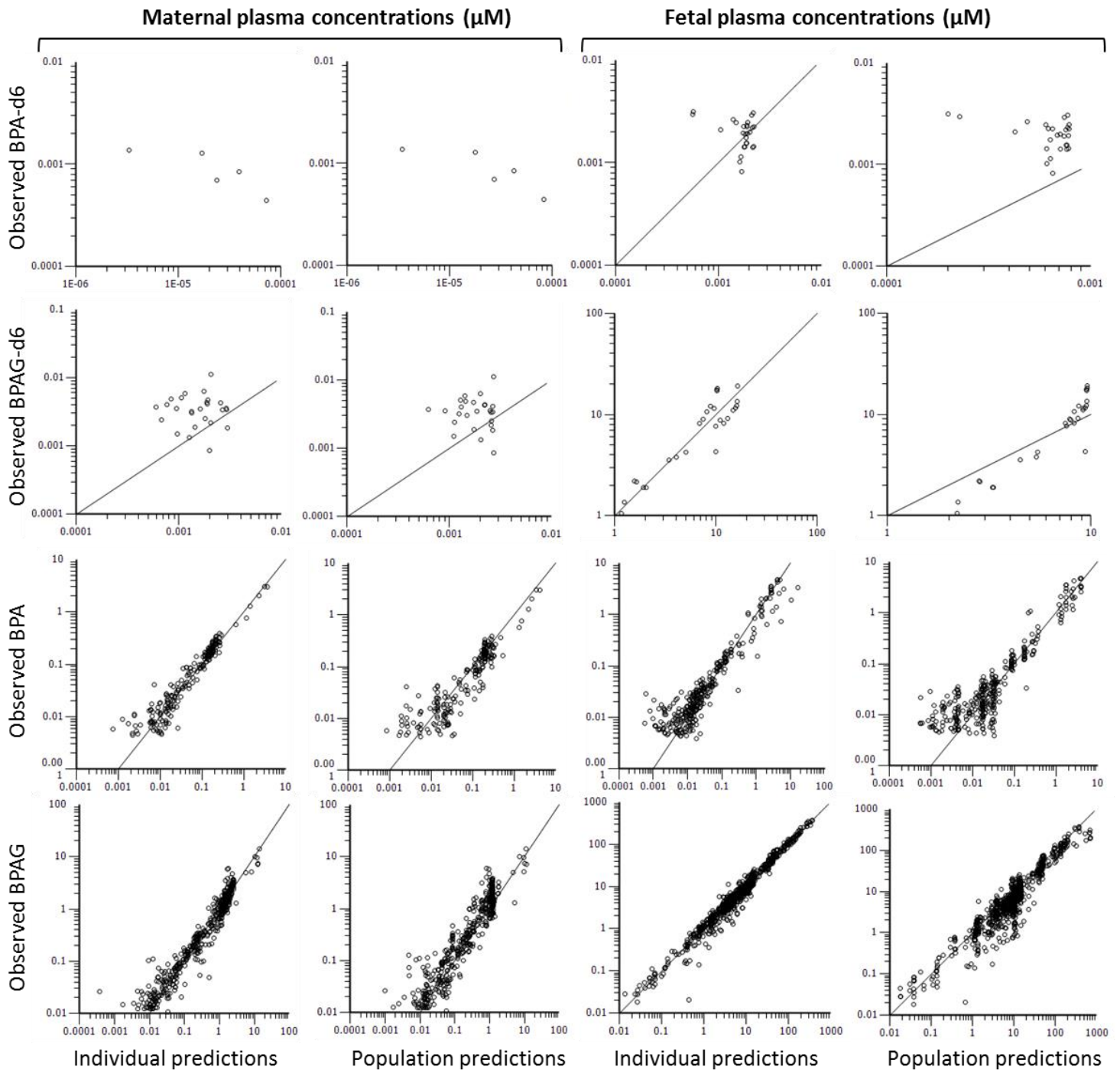


Figure 4: Diagnostic plots for the feto-maternal PK model obtained after simultaneous fitting of BPA, BPAG, BPA-d6 and BPAG-d6 concentrations in maternal and fetal plasma after various IV administrations (BPA and BPAG fetal and maternal bolus and infusions, BPAG-d6 fetal bolus). Analytes are grouped by line with individual and corresponding population predictions presented side by side (left and right panels respectively). The left half of the panels represents maternal plasma results and the right half represents fetal plasma results.

The computed feto-maternal population parameters (given in supplementary data) allowed estimating that the total maternal-to-fetal BPA transfer represented 6 % of the total BPA

maternal clearance, meaning that the fetus received a dose reported to its bodyweight equivalent to the maternal IV dose. The fetal BPA conjugation clearance (7.0 L/h) represented 26 % of the total fetal clearance; the remaining BPA was eliminated through the fetal-to-maternal BPA transfer. 36 % of the BPA transferred from the mother to the fetus was previously conjugated before reaching the fetal circulation, meaning that this first-pass effect contributed for 69 % of the total fetal BPAG exposure when BPA is delivered to the mother. BPAG fetal disposition was characterized by a distribution clearance of 22 mL/h that would be interpreted as a simple elimination clearance using a classical non-compartmental analysis but that actually reflects a step of the futile recirculation of BPAG that is then back converted into BPA and reentry the fetal circulation. BPAG hydrolysis from the central and peripheral fetal compartments may represent by far the main route of definitive BPAG elimination from the fetus since BPAG fetal-to-maternal transfer was estimated at only 17 % of the total BPAG outputs from the central fetal BPAG compartment.

Human modeling

Adult human parameterization

With the BPAG central volume set to sheep corresponding value and the BPA clearance to theoretical estimate from an allometric model (1.536 L/kg.h), the goodness of fit plots (fig.5) shows that raw data of BPA-d6 and BPAG-d6 plasma concentrations obtained after oral BPA-d6 administration in human were adequately modeled using the structural model developed in adult sheep.

BSV was modeled for all the structural parameters except the conjugation rate and the BPAG central volume. The associated CV and eta shrinkages are described in supplementary data. The additive errors were lower than corresponding limit of detections (0.004 nM (BPA-d6) and 2 nM (BPAG-d6), see supplementary data).

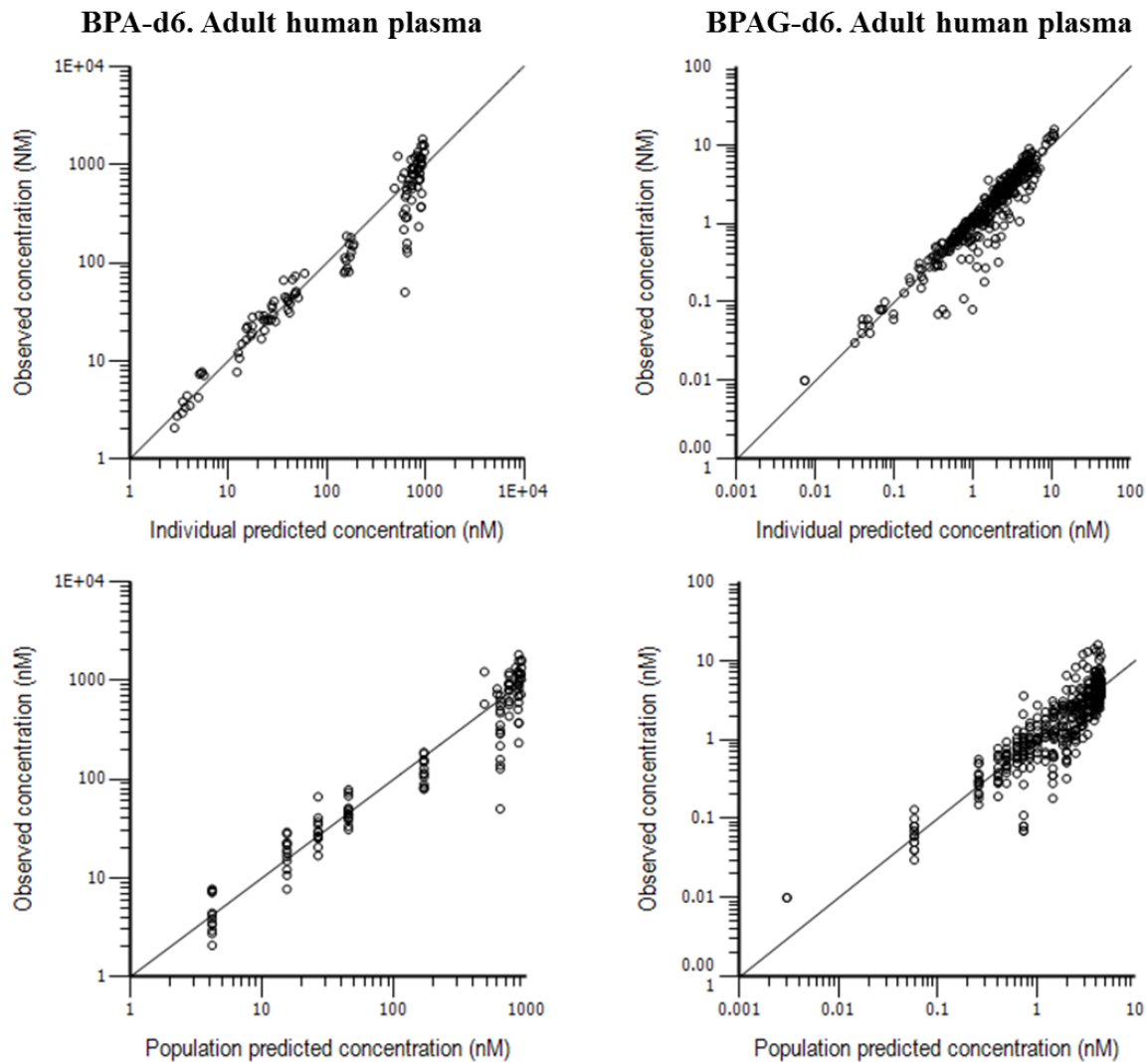


Figure 5: Diagnostic plots for the adult human PK model obtained after simultaneous fitting of BPA-6 and BPAG-6 plasma concentrations following a BPA-d6 oral administration (Thayer et al. 2015). Individual (top panels) and population (bottom panels) predictions of BPA-6 (left panels) and BPAG-6 (right panels) plasma concentrations are presented.

The estimated human and ovine parameters were of the same order of magnitude (see supplementary data). The central volume of distribution of BPA was higher in humans than in sheep (2.8 L/kg vs 0.815 L/kg) while the BPAG clearance was lower (0.18 vs 0.30 L/(h.kg)).

Considering the a priori fixed BPA clearance, 92.7 % of the BPA-d6 dose was estimated to be glucuronoconjugated by a first-pass effect prior reaching the systemic circulation, meaning that the BPA bioavailability can be estimated at 7.3 % when BPA is administered through the dietary route.

Comparison between simulated and observed data

A schematic representation of the final parent-metabolite PK model used to predict human prenatal exposure to BPA and BPAG is described in figure 6. The final humanized model included the adult human model on which has been grafted the ovine maternal-to-fetal clearances and the full ovine fetal model.

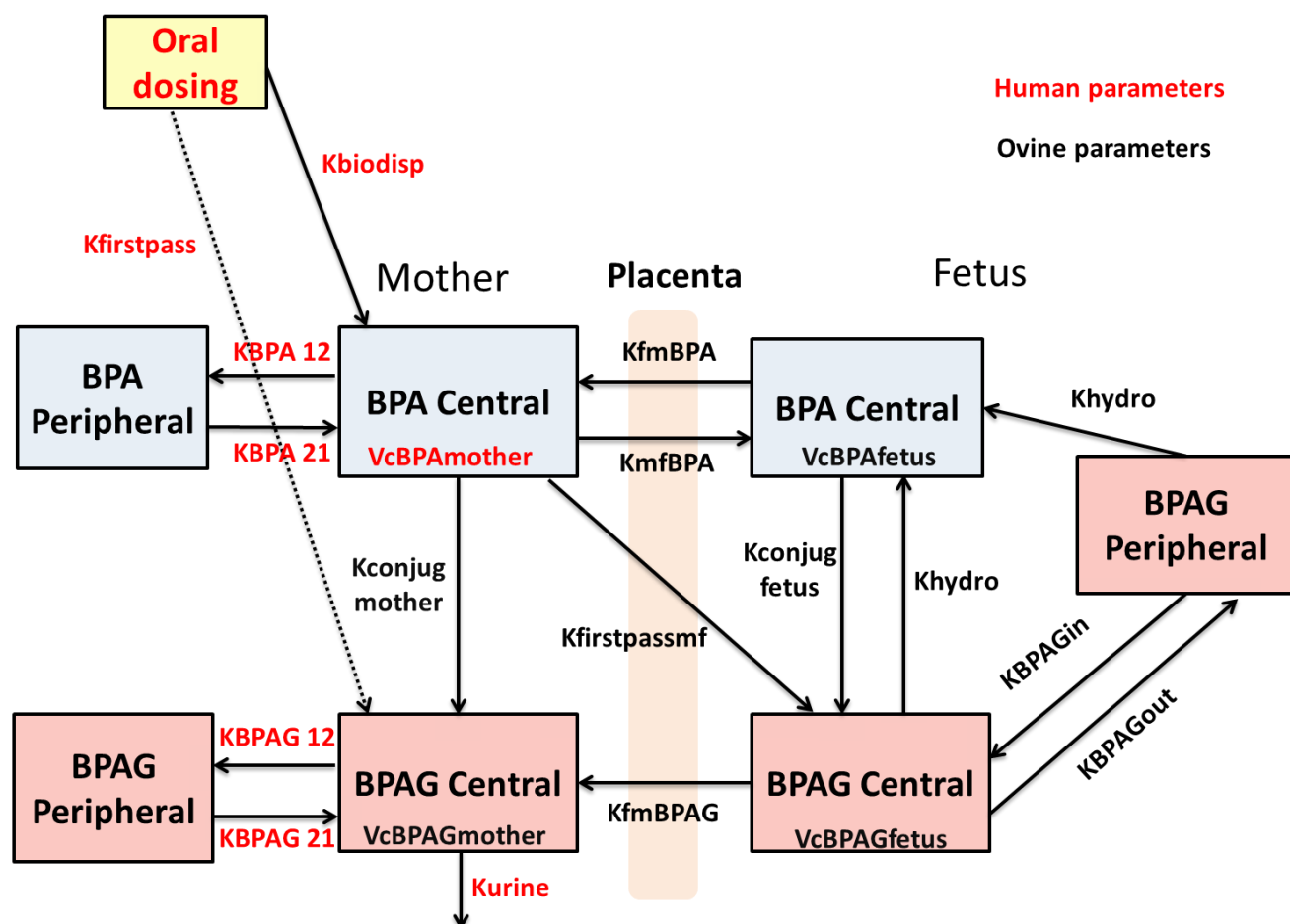


Figure 6: Schematic compartmental representation of the final feto-maternal humanized model. Human and sheep TK parameters are indicated in red and black respectively. Arrows represent transfer rates. Compartments captioned with “Vc” are central compartments for which volumes are attributed.

Figure 7 shows the model predicted and observed aglycone and conjugated BPA concentrations in the fetal and maternal BPA plasma of rhesus monkey after maternal 100 $\mu\text{g/kg}$ IV BPA dosing (Patterson et al. (2013)).

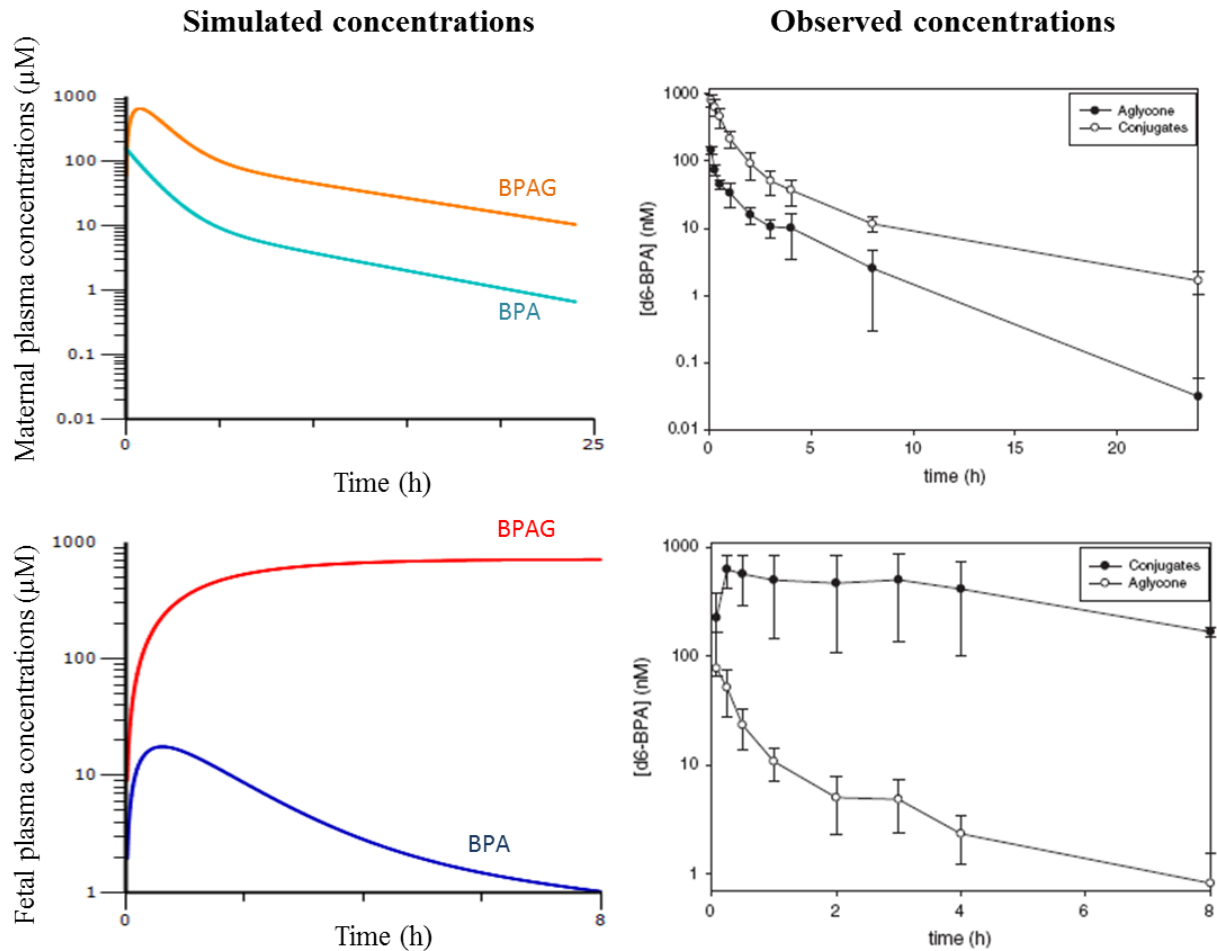


Figure 7: Semilogarithmic plots of BPA and BPAG concentrations in maternal (top panels) and fetal (bottom panels) plasma after a maternal BPA-d6 IV dosing of 100 $\mu\text{g/kg}$. Left panels are simulated data using the final humanized model developed in the present study and corresponding right panels are data observed in rhesus monkeys (Patterson et al. 2013).

Apart from the first 30min following maternal BPA dosing where BPA concentrations observed in the fetal plasma decreased while the simulated data increased to reach a peak value 30 min after BPA dosing, the time course of fetal and maternal BPA and BPAG concentrations predicted with the humanized model well fitted the decay of published PK data (Patterson et al. (2013). Both the shape of the curves and the order of magnitude of the concentrations were accurately predicted.

Human BPA and BPAG exposure predictions

Figure 8 shows the simulated BPA and BPAG concentrations in human maternal and fetal plasma during a 4 weeks period of daily BPA oral dosing at a level equivalent to the mean daily EFSA's exposure estimate and during which a high unique dose corresponding to the EFSA 95th percentile estimate was applied.

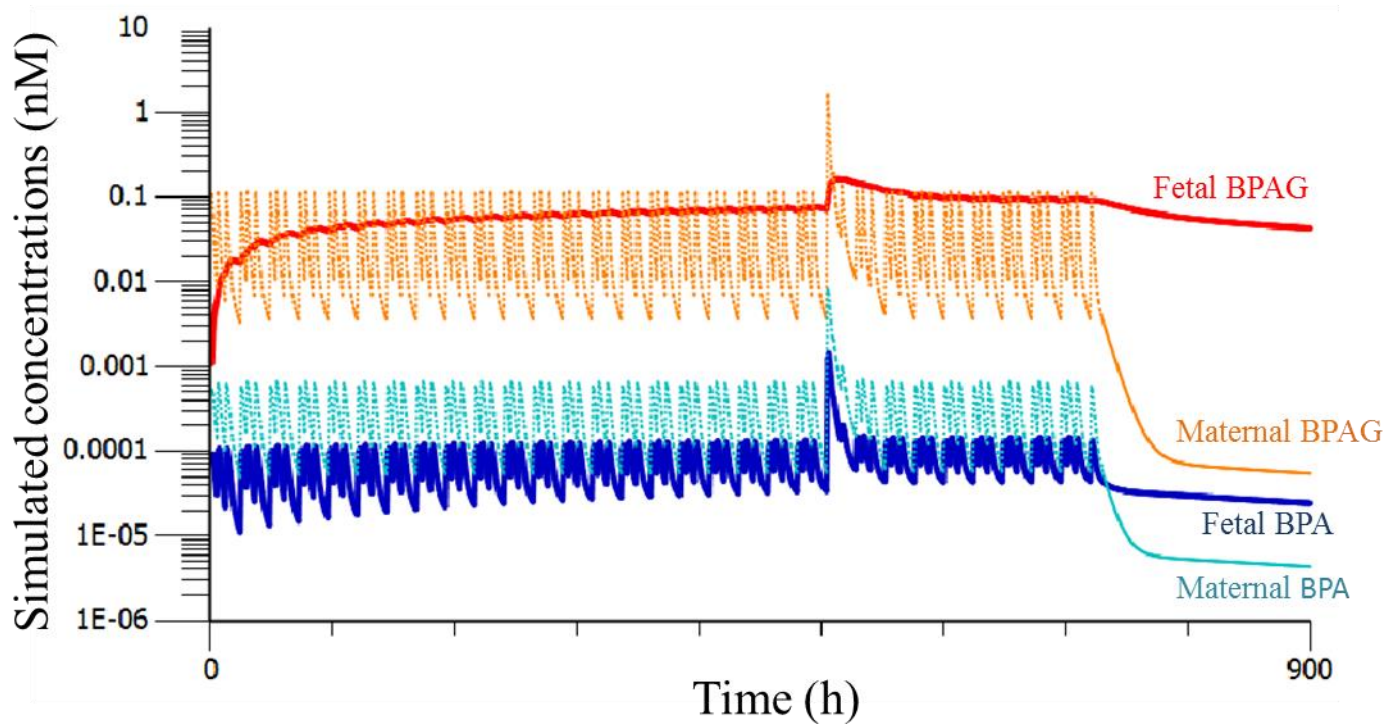


Figure 8: Model predicted BPA (cold colors) and BPAG (warm colors) concentrations (nM) in fetal (thick solid lines) and maternal plasma (thin dotted lines) under a maternal exposure scenario corresponding to the average daily EFSA's exposure estimates for women of childbearing age (11.05 nmol/d for the selected 70 kg body weight) distributed in 3 times a day. A unique high exposure dose corresponding to a BPA dose of 55.85 nmol was applied after 3 weeks of exposure.

The model predicted a substantial accumulation of BPAG (about 20 times) in fetal plasma leading to relatively steady BPAG concentrations that reached 29 ng/L after 3 weeks of BPA exposure while corresponding values in maternal plasma fluctuated between 1.6 and 40 ng/L. Peak BPA concentrations associated to BPA intake did not increase over time, exhibiting 6 times higher values in maternal (0.14 ng/L) than in fetal plasma (0.023 ng/L), while BPAG accumulation and subsequent hydrolysis led to an increase of BPA trough concentrations in fetal plasma over the exposure events.

The delivery of a unique 15 times higher maternal BPA dose had a long term effects on fetal BPAG and BPA basal exposure while it only induced a transient increase of maternal concentrations. After this dose, BPAG fetal plasma concentrations peaked at 64 ng/L and decreased slowly to reach 44 ng/L one week later. After the last administration, sustained BPA and BPAG concentrations were respectively 5 and 780 times higher in fetal plasma (4.3 pg/L and 14 ng/L) than in maternal plasma (0.8 pg/L and 0.018 ng/L).

Discussion

In the present article, a semi-physiological model was built to characterize both BPA and BPAG pharmacokinetics in the feto-maternal unit. So far, this is the first study providing an estimation of BPA and BPAG plasma concentrations in human fetuses. Our approach was based on a compartmental modeling of feto-maternal toxicokinetic data of BPA and BPAG in sheep. The model developed in sheep was then translated to predict human fetal exposure by parameterizing the maternal part of the model using published oral PK data in humans (Thayer et al. 2015). Since high BPA and BPAG doses were required to develop the sheep feto-maternal model, its reliability for predicting fetal plasma concentrations associated to much lower typical environmental BPA exposures was first checked through the assessment of the dose-linearity/proportionality of fetal BPA and BPAG TK.

We have thus demonstrated the dose-proportionality of fetal BPA and BPAG TK for BPA doses ranging from about 10 times the highest aggregate environmental exposures in human i.e. 10 µg/kg.d, to 100 mg/kg.d and for BPAG doses ranging from 18 µg/kg.d to 18 mg/kg.d. The dose-proportionality of fetal BPA and BPAG TK was also supported by the fact that the fetal plasma concentrations associated to these different BPA and BPAG doses were adequately adjusted using our linear compartmental model.

The IV administrations of BPAG-d6 to the fetus allowed us to monitor BPA-d6 fetal plasma concentrations and confirm the previously demonstrated occurrence of fetal BPAG hydrolysis (Gauderat et al. 2016) through the measurement of deuterated BPA concentrations that cannot be attributed to contaminations. The simultaneous maternal BPA administration enabled us to evaluate the conjugation rate of BPA transferred from the mother to the fetus and improve the framework of the model.

The development of the present population model using animal data-sets permitted to get a comprehensive model reflecting the main steps involved in fetal exposure to BPA and BPAG. Indeed, the model enabled us to show that the first pass conjugation of BPA from the umbilical vein to the fetus leads to a 69 % higher fetal exposure to BPAG than resulting from a direct fetal IV BPA administration of the same dose. This first pass conjugation effect that is explained by the fact that in sheep, 30 to 70 % of the umbilical blood flow reaches the fetal liver before joining the systemic fetal circulation (Edelstone et al. 1978), may also occur in humans since this fraction has been estimated in the same range (median 79 %, 10th and 90th percentiles of 66.4 and 92.2 %) (Haugen et al. 2004)). The model also permitted to show that

the fetal clearance of BPAG across the placenta is negligible, BPAG being mainly eliminated through fetal to maternal transfer of BPA resulting from BPAG hydrolysis.

The validity of such a model for predicting human BPA and BPAG fetal exposures relies on the similarities of the mechanisms of the materno-fetal and feto-maternal BPAG clearances in human and sheep. We cannot exclude that the fetal to maternal transfer of BPAG evidenced from the human placental perfusion system, even if limited (half that of BPA, Corbel et al. 2014), may contribute to a higher extent to the removal of BPAG from human fetal plasma. We cannot also rule out that placental BPAG transfer in humans may involve placental transporters specific to humans that may impact the fetal clearance of BPAG. However, the consistency of model predicted with observed BPA and BPAG concentrations in fetal/maternal rhesus monkey after intravenous maternal BPA dosing indicates that the developed model is very likely appropriate for predicting BPA and BPAG fetal exposure in a relevant animal model for human in terms of placental structure (Grigsby 2016) and metabolic pattern (Barbier and Bélanger 2003). This latter observation suggests that the fetal conjugation clearance has been accurately extrapolated in monkeys from fetal sheep clearance values.

Our results also showed that the BPA conjugation clearance of fetal sheep (7 L/h or 2.8 L/h.kg) is close to the fetal hepatic blood flow coming from the fetal circulation (5.1 L/h from the portal vein and the hepatic arteries combined (Edelstone et al. 1978)) and higher than the adult BPA clearance (1.75 L/h.kg) when reported to its bodyweight despite the about 2 times lower hepatic glucuronidation intrinsic clearance of late fetal sheep compared to adult (Corbel et al. 2015). This observation in sheep strongly suggests that although the fetal expression of UGT isoform involved in BPA glucuronidation is reduced in the human fetus compared to adults (Divakaran et al. 2014), the human fetal glucuronoconjugation clearance in late pregnancy is limited by the hepatic fetal blood flow and may not be scaled to account for the relative immaturity of the metabolic systems. Very similar findings were drawn for morphine, for which despite reports of diminished enzyme activity, the intrinsic hepatic clearance is sufficient for the fetal metabolic clearance to be flow-limited during late pregnancy in baboons (Garland et al. 2006).

Considering the BPA clearance of 1.536 L/kg.h in human estimated through allometric scaling in Collet et al. (2015), that is close to the EFSA estimation using a similar approach (1.43 L/kg.h (EFSA 2015) and to the physiologically based pharmacokinetic estimations

(1.26L/kg.h (Edginton and Ritter 2009)), the analysis performed on human raw data published by Thayer et al. (2015) permitted us to estimate the bioavailability of orally ingested BPA at 7.3 % in humans. This bioavailability was similar to that estimated after BPA administration in a piece of fruit to rhesus monkeys (7.3 %, (Vom Saal et al. 2014)), but much higher than the 0.2 % estimated after BPA administration by gavage in the same animal model (Doerge et al. 2010). In accordance with what was found in sheep (Guignard et al. 2016), this result, together with the 2.3 fold higher BPAG/BPA AUCs ratio observed in humans following oral intake of BPA contained in soup vs in a cookie (417 vs 179 respectively (Teeguarden et al. 2015; Thayer et al. 2015)), strongly suggest that buccal absorption may represent an important route by which BPA contained in food can gain access to the blood, the extent of which depending on the kind of ingested food. Therefore, our results suggest that oral gavage cannot be longer considered as valid route of administration for food contaminants safety evaluation and that the influence of buccal absorption on bioavailability cannot be discarded on the basis of an elevated metabolite/parent ratio in plasma as claimed in Teeguarden et al. (2015). The highlighted variability in bioavailability related to the type food ingested puts forward another limit in our modeling predictions that were done considering only the BPA bioavailability resulting from a cookie ingestion which does not necessarily reflect the bioavailability associated with many other possible regimens.

The use of our humanized model to predict plasma concentrations of BPA and BPAG in the late pregnancy human fetus and its mother under a relevant scheme of BPA dietary exposure for 4 weeks allowed us to predict major differences between the shapes of the fetal and maternal BPA and BPAG concentration-time profiles, in agreement with our previous predictions made from a simplified TK model in fetal sheep (Gauderat et al. 2016). BPAG concentrations in fetal plasma are predicted to increase over time to reach relatively steady values around 40 ng/L while values in matching maternal plasma may exhibit successive peaks associated to BPA intakes. The expected BPAG plasma concentrations in late pregnancy fetuses are of the same order of magnitude than BPAG levels in cord serum measured in few studies that used a method enabling to directly assay glucuronoconjugated BPA without recourse to an hydrolysis step in second trimester pregnancy terminations (Gerona et al. 2013) and at term (Veiga-Lopez et al. 2015). In these studies, the percentage of umbilical cord serum samples in which BPAG was detected was respectively 76 and 92% with median vs maximal concentrations of 120 and 190 ng/L vs 960 and 4850 ng/L in second trimester vs at term. Our results indicates that for a repeated maternal exposure with a given

BPA dose, BPAG levels in maternal plasma may be highly variable according to the time after dosing while BPAG levels in cord serum are expected to remain at relatively steady values that may reflect the cumulative dose received by the fetus across late pregnancy.

BPA concentrations are predicted higher in maternal (14-140 pg/L) than in fetal plasma (11-23 pg/L) due to the efficient fetal to maternal clearance of BPA previously shown in sheep (Gauderat et al. 2016) and humans (Corbel et al. 2014). The high BPA fetal and maternal clearances prevented an increase of peak BPA levels over time while the near constant BPA re-entry from BPAG hydrolysis in the fetal compartment is responsible for the increase of basal BPA concentrations in fetal plasma. These predicted values are much lower than some BPA levels in cord serum reported to be highly variable in the abovementioned studies, ranging from undetectable values to 52260 ng/L in second trimester pregnancy terminations (Gerona et al. 2013) and 41830 ng/L at term (Veiga-Lopez et al. 2015). Gerona et al. (2013) have suggested that the immaturity of UGT system during the second trimester of pregnancy may explain the high levels of BPA encountered in some samples (0.06 and 9.91ng/mL for the 75th and the 95th percentiles). However, the high prevalence of BPAG (76 %) and of BPA sulfate (96%) in cord blood samples suggests that fetal metabolism is active in the mid-term human fetus. The fact that BPA levels were not correlated with its metabolite levels questioned the plausibility of those BPA measurements in cord blood.

It should be noticed that our predictions were done according to the average exposure estimates and did not account for the high interindividual and day-to-day variability in exposure that is reflected in urinary concentrations in humans (EFSA 2015). Higher BPA and BPAG concentrations in cord serum than predicted in the current study can be expected in specific subpopulations depending on the dose and the routes of exposures that may be associated to higher BPA bioavailabilities. Furthermore, we have shown that although punctual, a high level of BPA maternal intake can have a great and extended impact on both BPAG and basal BPA concentrations in fetal blood while the elevation of maternal BPA and BPAG concentrations is expected to be transient.

Conclusion

This study provides critical information about the extent of fetal exposure to BPA and BPAG to assess the risks posed by prenatal exposure to this chemical. Our model simulations predicted steady BPAG concentrations in late gestation fetuses in the range of quantifiable values by current analytical methods (40 ng/L) from daily EFSA's exposure estimates. It

should be emphasized that BPAG measurement in cord blood, which is not matter of controversy due to contamination issues and may not fluctuate as much as in maternal plasma according to episodic BPA intakes, may represent a relevant marker of fetal exposure to BPA during the last months of pregnancy. The health implications of the sustained fetal exposure to BPAG should be addressed, especially when considering the possible overexposure of some specific fetal tissues resulting from local hydrolysis of BPAG into BPA.

References

- Barbier O, Bélanger A. 2003. The cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) is the best animal model for the study of steroid glucuronidation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85: 235–245.
- Barry JS, Anthony RV. 2008. The Pregnant Sheep as a Model for Human Pregnancy. *Theriogenology* 69:55–67; doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.021.
- Bazer FW, Spencer TE, Thatcher WW. 2012. Growth and development of the ovine conceptus. *J. Anim. Sci.* 90:159–170; doi:10.2527/jas.2011-4180.
- Beal SL. 2001. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 28: 481–504.
- Bonate PL. 2011. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*. Springer Science & Business Media.
- Boucher JG, Boudreau A, Ahmed S, Atlas E. 2015. In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environ. Health Perspect.* 123:1287–1293; doi:10.1289/ehp.1409143.
- Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, et al. 2011. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* 119:547–552; doi:10.1289/ehp.1002559.
- Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116:39–44; doi:10.1289/ehp.10753.
- Chou W-C, Chen J-L, Lin C-F, Chen Y-C, Shih F-C, Chuang C-Y. 2011. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 10:94; doi:10.1186/1476-069X-10-94.
- Collet SH, Picard-Hagen N, Lacroix MZ, Puel S, Viguié C, Bousquet-Melou A, et al. 2015. Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284:323–329; doi:10.1016/j.taap.2015.02.024.
- Collet SH, Picard-Hagen N, Viguié C, Lacroix MZ, Toutain P-L, Gayrard V. 2010. Estrogenicity of bisphenol a: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 117:54–62; doi:10.1093/toxsci/kfq186.
- Corbel T, Gayrard V, Puel S, Lacroix MZ, Berrebi A, Gil S, et al. 2014. Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reprod. Toxicol.* 47:51–58; doi:10.1016/j.reprotox.2014.06.001.

- Corbel T, Gayrard V, Viguié C, Puel S, Lacroix MZ, Toutain P-L, et al. 2013. Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol. Reprod.* 89:11; doi:10.1095/biolreprod.112.106369.
- Corbel T, Perdu E, Gayrard V, Puel S, Lacroix MZ, Viguié C, et al. 2015. Conjugation and deconjugation reactions within the fetoplacental compartment in a sheep model: a key factor determining bisphenol A fetal exposure. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 43:467–476; doi:10.1124/dmd.114.061291.
- Covaci A, Den Hond E, Geens T, Govarts E, Koppen G, Frederiksen H, et al. 2015. Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. *Environ. Res.* 141:77–85; doi:10.1016/j.envres.2014.08.008.
- Dekant W, Völkel W. 2008. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228:114–134; doi:10.1016/j.taap.2007.12.008.
- Divakaran K, Hines RN, McCarver DG. 2014. Human Hepatic UGT2B15 Developmental Expression. *Toxicol. Sci.* 141:292–299; doi:10.1093/toxsci/kfu126.
- Doerge DR, Twaddle NC, Woodling KA, Fisher JW. 2010. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248:1–11; doi:10.1016/j.taap.2010.07.009.
- Edelstone DI, Rudolph AM, Heymann MA. 1978. Liver and ductus venosus blood flows in fetal lambs in utero. *Circ. Res.* 42:426–433; doi:10.1161/01.RES.42.3.426.
- Edginton AN, Ritter L. 2009. Predicting Plasma Concentrations of Bisphenol A in Children Younger Than 2 Years of Age after Typical Feeding Schedules, using a Physiologically Based Toxicokinetic Model. *Environ. Health Perspect.* 117:645–652; doi:10.1289/ehp.0800073.
- EFSA E Flavourings and Processing Aids (CEF). 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J.* 13:n/a-n/a; doi:10.2903/j.efsa.2015.3978.
- Fénichel P, Déchaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, et al. 2012. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27:983–990; doi:10.1093/humrep/der451.
- Garland M, Abildskov KM, Taylor S, Benzeroual K, Caspersen CS, Arroyo SE, et al. 2006. Fetal Morphine Metabolism and Clearance Are Constant During Late Gestation. *Drug Metab. Dispos.* 34:636–646; doi:10.1124/dmd.105.007567.
- Gauderat G, Picard-Hagen N, Toutain P-L, Corbel T, Viguié C, Puel S, et al. 2016. Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environ. Int.* 86:52–59; doi:10.1016/j.envint.2015.10.006.
- Gerona RR, Woodruff TJ, Dickenson CA, Pan J, Schwartz JM, Sen S, et al. 2013. Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in

- a northern and central California population. *Environ. Sci. Technol.* 47:12477–12485; doi:10.1021/es402764d.
- Gibaldi M, Perrier D. 1982. *Pharmacokinetics, Second Edition*. Taylor & Francis.
- Grigsby PL. 2016. Animal Models to Study Placental Development and Function throughout Normal and Dysfunctional Human Pregnancy. *Semin. Reprod. Med.* 34:11–16; doi:10.1055/s-0035-1570031.
- Guignard D, Gauderat G, Gayraud V, Lacroix MZ, Picard-Hagen N, Puel S, et al. 2016. Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 93:82–88; doi:10.1016/j.fct.2016.04.004.
- Haines DA, Murray J. 2012. Human biomonitoring of environmental chemicals--early results of the 2007-2009 Canadian Health Measures Survey for males and females. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 215:133–137; doi:10.1016/j.ijheh.2011.09.008.
- Haugen G, Kiserud T, Godfrey K, Crozier S, Hanson M. 2004. Portal and umbilical venous blood supply to the liver in the human fetus near term. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 24:599–605; doi:10.1002/uog.1744.
- Kumar S, Tonn GR, Kwan E, Hall C, Riggs KW, Axelson JE, et al. 1997. Estimation of transplacental and nonplacental diphenhydramine clearances in the fetal lamb: the impact of fetal first-pass hepatic drug uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 617–632.
- Lacroix MZ, Puel S, Collet SH, Corbel T, Picard-Hagen N, Toutain PL, et al. 2011. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85:2053–2059; doi:10.1016/j.talanta.2011.07.040.
- Ngamprasertwong P, Dong M, Niu J, Venkatasubramanian R, Vinks AA, Sadhasivam S. 2016. Propofol Pharmacokinetics and Estimation of Fetal Propofol Exposure during Mid-Gestational Fetal Surgery: A Maternal-Fetal Sheep Model. *PloS One* 11:e0146563; doi:10.1371/journal.pone.0146563.
- Patterson TA, Twaddle NC, Roegge CS, Callicott RJ, Fisher JW, Doerge DR. 2013. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267:41–48; doi:10.1016/j.taap.2012.12.006.
- Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. 2002. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* 110: A703-707.
- Smith BP, Vandenhende FR, DeSante KA, Farid NA, Welch PA, Callaghan JT, et al. 2000. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality. *Pharm. Res.* 17: 1278–1283.
- Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Yang X, Fisher JW, Seryak LM, et al. 2015. 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual

- absorption following ingestion in soup. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 288:131–142; doi:10.1016/j.taap.2015.01.009.
- Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI, et al. 2015. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ. Int.* 83:107–115; doi:10.1016/j.envint.2015.06.008.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, Rubin BS, et al. 2008. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 26:210–219; doi:10.1016/j.reprotox.2008.09.015.
- Veiga-Lopez A, Kannan K, Liao C, Ye W, Domino SE, Padmanabhan V. 2015. Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100:E1394-1403; doi:10.1210/jc.2015-1724.
- Viguié C, Collet SH, Gayrard V, Picard-Hagen N, Puel S, Roques BB, et al. 2013. Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 154:521–528; doi:10.1210/en.2012-1401.
- Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1281–1287.
- Vom Saal F, Prins GS, Welshons WV. 2012. Report of Very Low Real-World Exposure to Bisphenol A is Unwarranted Based on a Lack of Data and Flawed Assumptions. *Toxicol. Sci.* 125:318–320; doi:10.1093/toxsci/kfr273.
- Vom Saal FS, VandeVoort CA, Taylor JA, Welshons WV, Toutain P-L, Hunt PA. 2014. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 45:105–116; doi:10.1016/j.reprotox.2014.01.007.
- Zhang T, Sun H, Kannan K. 2013. Blood and urinary bisphenol A concentrations in children, adults, and pregnant women from china: partitioning between blood and urine and maternal and fetal cord blood. *Environ. Sci. Technol.* 47:4686–4694; doi:10.1021/es303808b.

A. Conclusions

Cette étude a permis :

- De montrer la proportionnalité de la TK fœtale du BPA et du BPAG pour des doses de BPA comprises entre 0.01 et 100 mg.kg⁻¹.j⁻¹ et des doses molaires équivalentes de BPAG.
- De mettre en évidence un effet de premier passage materno-fœtal du BPA qui triple les concentrations plasmatiques fœtales en BPAG par rapport à celles observées suite à une administration intraveineuse fœtale directe de BPA.
- D'établir que l'hydrolyse est la voie principale d'élimination du BPAG par le fœtus (83%), la clairance placentaire fœto-maternelle du BPAG représentant 17% de l'élimination.
- D'établir que la biodisponibilité du BPA apporté par voie alimentaire chez l'Homme est de 7.3% Cette valeur est plus de deux fois supérieure aux estimations actuelles des agences réglementaires (3% EFSA, 1% FDA) établies sur la base d'une absorption intestinale.
- De prédire des concentrations plasmatiques fœtales moyennes chez l'homme très faibles pour le BPA (fluctuant entre 11 et 23 pg.L⁻¹) mais beaucoup plus importantes pour le BPAG (maintenues autour de 40 ng.L⁻¹) pour un schéma d'exposition maternelle par voie alimentaire à des doses de BPA correspondantes aux estimations moyennes de l'EFSA.

Les valeurs prédites des concentrations plasmatiques fœtales en BPAG chez le fœtus sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans le sang de cordon par les études qui utilisent un dosage direct du BPAG (valeurs médianes de 140 et 190 ng.L⁻¹ (169,172)). A l'opposé, les concentrations plasmatiques en BPA prédites par le modèle sont très inférieures à certaines valeurs atteignant plusieurs dizaines de µg.L⁻¹ rapportées dans le sang de cordon par les études de biosurveillance (voir chapitre I. C.2).

Nos résultats suggèrent que dans un contexte d'exposition maternelle répétée mimant les modalités d'exposition alimentaire, les concentrations attendues en fin de grossesse dans le plasma maternel fluctuent en fonction du délai qui sépare l'ingestion de BPA et le prélèvement sanguin alors que celles attendues dans le sang de cordon sont maintenues à un niveau relativement stable qui reflète le niveau d'exposition du fœtus en termes de dose au cours des derniers mois de grossesse.

Nous avons également montré qu'une exposition momentanée à une dose unique élevée correspondant au 95e centile de l'exposition humaine (EFSA) augmentait durablement le

niveau des concentrations plasmatiques fœtales en BPAG et les concentrations basales en BPA. Il est à noter que cette dose élevée correspond également à la dose d'exposition au BPA estimée à partir des données urinaires chez 2 des 30 femmes enceintes suivies dans une étude récente (55). Contrairement à l'adulte, ces événements même ponctuels d'exposition à des niveaux élevés de BPA, bien que se produisant probablement à une fréquence faible, auraient une contribution importante à l'exposition du fœtus au BPA en termes de concentrations plasmatiques en BPA et BPAG.

Au vu de ces résultats, les possibles répercussions sur la santé humaine d'une exposition fœtale soutenue au BPAG doivent être évaluées, en raison en particulier de la possible surexposition de tissus fœtaux au BPA résultant de l'hydrolyse locale du BPAG.

III. Comparaison des altérations du protéome fœtal induites par une exposition fœtale équimolaire au BPA et au BPAG

A. Contexte et objectifs

Le modèle TK développé a permis de prédire qu'en fin de gestation, le fœtus humain peut être exposé de façon soutenue au BPAG.

Le BPAG n'est pas pris en compte dans l'évaluation du risque car il est considéré comme un métabolite inactif et est rapidement éliminé dans les urines. Cependant, nous avons montré que le BPAG peut être réactivé par les glucuronidases fœtales et que l'hydrolyse du BPAG constitue un facteur déterminant de l'exposition fœtale au BPA. Parallèlement à son impact sur l'exposition fœtale au BPA en termes de concentrations plasmatiques, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle l'hydrolyse locale du BPAG pourrait surexposer les tissus fœtaux au BPA alors que les concentrations plasmatiques sont faibles. Cette hypothèse est confortée par l'observation *ex vivo* d'un cycle de conjugaison-déconjugaison du BPA au niveau des gonades du fœtus ovin avec prédominance de l'hydrolyse du BPAG (76).

Afin de mettre à l'épreuve cette hypothèse, l'objectif de cette étude était de comparer les effets d'une exposition fœtale équimolaire au BPA ou au BPAG sur des biomarqueurs plasmatiques et/ou tissulaires fœtaux.

Les biomarqueurs d'effet du BPA et du BPAG sur le fœtus ont été identifiés à l'aide d'une approche sans *a priori* basée sur l'évaluation des altérations du protéome par l'analyse de l'empreinte de masse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du professeur Paul Fowler de l'Institute of Medical Sciences dans le cadre d'un projet financé par la Royal Society.

Nous avons comparé les altérations des profils protéiques plasmatiques et tissulaires fœtaux induites par une exposition fœtale au BPAG et au BPA. Les tissus examinés ont été le foie en raison de son rôle clé dans le métabolisme, la glande mammaire et les ovaires pour leur sensibilité aux effets œstrogéniques (Figure 13).

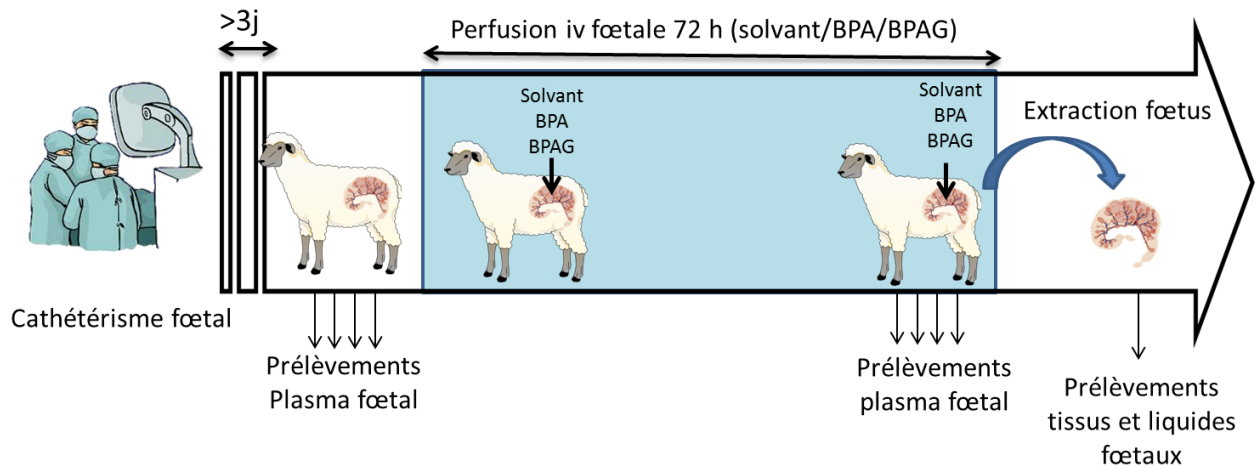


Figure 13. Protocole expérimental de l'étude protéomique pour la comparaison des effets d'une exposition fœtale au BPA et au BPAG

Plusieurs comparaisons des profils protéiques obtenus pour les différents groupes de traitement et les différents tissus ont permis l'étude de l'effet du BPAG sur le fœtus (Figure 14).

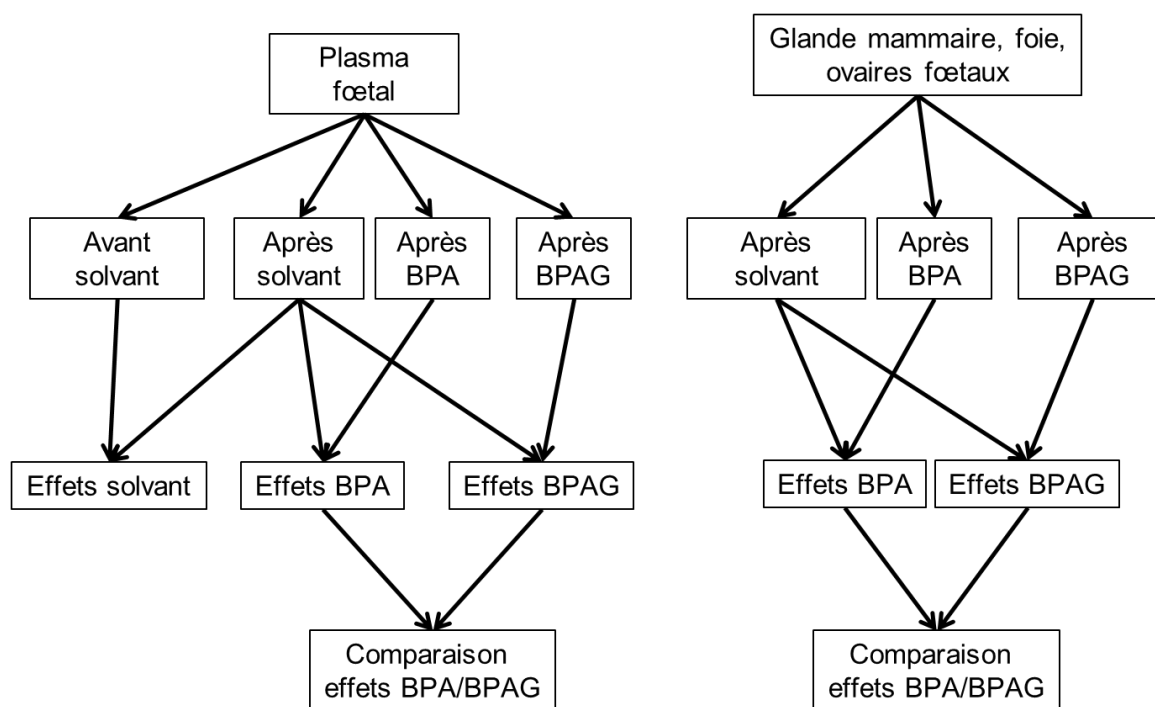


Figure 14. Comparaisons des profils protéomiques réalisées afin de déterminer les effets d'une exposition fœtale au BPAG

La comparaison des profils protéomiques du plasma obtenus avant et après perfusion fœtale de solvant a été réalisée dans un premier temps afin de vérifier l'absence d'effet du solvant sur le protéome plasmatique. La comparaison des profils obtenus après exposition au BPA ou au BPAG au groupe solvant, en tant que contrôle négatif devait permettre l'identification des effets du BPAG et du BPA. Enfin, la comparaison des effets du BPAG à ceux du BPA, en tant que contrôle positif avait pour but de déterminer si les effets du BPAG sont des effets propres ou dépendants de sa réactivation.

Cette étude qui inclut également une analyse des voies de signalisations altérées par le BPA et le BPAG, fera l'objet d'une publication scientifique. Les données complémentaires sont présentées en annexe de cette thèse.

B. Article 3

Comparison of biomarkers of exposure to Bisphenol A and Bisphenol A glucuronide during fetal life using a proteomic approach

Glenn Gauderat^{1,2}, Panagiotis Filis³, Nicole Picard-Hagen¹, Paul Fowler³, Patrick Tardivel¹, Pierre-Louis Toutain¹, Catherine Viguié¹, Sylvie Puel¹, Marlène Z. Lacroix¹ and Véronique Gayrard¹.

¹Toxalim, Université de Toulouse, INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), INP (Institut National Polytechnique de Toulouse) –ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), Toulouse, France

²Agreenium's International Research School (EIR-A), Paris, France

³Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, UK

Corresponding author : Véronique Gayrard, UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Laboratoire de Physiologie, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France, Tel. : 33 (0)5 61 19 39 18, Fax. : 33 (0)5 61 19 39 17, E-mail : v.gayrard@envt.fr

Running title: label free proteomics for the investigation of fetal Bisphenol-A glucuronide effects.

Acknowledgments: The authors thank C. Lacassagne, JP Gau, and Deschamp N. for their assistance and involvement in the animal care. This study was supported by the French Region Midi-Pyrénées (31000642) and by government funds: French National Research Agency (ANR-13-CESA0007-1).

Competing financial interests: The authors declare no conflicts of interest.

Abstract

Background: Although bisphenol A glucuronide (BPAG) is considered an inactive metabolite, the gradual re-entry of bisphenol A (BPA) into the fetal circulation resulting from BPAG hydrolysis indicate that fetal exposure to BPAG may be of concern.

Objective: To test the hypothesis that BPAG back-conversion to active BPA leads to disturbed biological processes in sensitive fetal tissues through the comparison of proteomic signatures of controlled fetal exposure to equimolar doses of BPA or BPAG in the fetal-maternal sheep model.

Methods: Nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry based label-free shotgun proteomics was applied to protein extracts from sensitive target tissues (liver, mammary gland, ovary) and plasma from ovine fetuses following a 3 day controlled exposure to either BPA (4.4 μmol or 1 mg/(kg.d), BPAG (4.4 μmol or 1.8 mg/(kg.d)) or a matching vehicle (propylene glycol). Differentially regulated proteins between BPA or BPAG exposed fetuses and control fetuses were determined using empirical Bayes moderated test statistics and analyzed using Ingenuity Pathways Analysis.

Results: A similar number of proteins were found differentially expressed ($P < 0.05$) in both BPA and BPAG treated fetuses compared to vehicle in mammary gland (45 vs 47) and less plasma proteins were affected by BPAG compared to BPA treatment (7 vs 14). Although BPA plasma concentration of BPA-treated fetuses (3.2 ng/mL) was higher than that of BPAG-treated fetuses (undetectable, predicted at 0.5 ng/mL), more proteins were differentially expressed on the liver (101 vs 49) and ovaries (54 vs 36) of BPAG treated fetuses compared to BPA. About 17 % of the changes were common between BPA and BPAG treatments. Activation of the LXR/RXR pathway and inhibition of the acute phase response represented the two main pathways affected by both BPA and BPAG treatments.

Conclusions: BPAG can exert effects similar to those induced by BPA on fetal immunity and metabolism. The greater impact of BPAG treatment on fetal liver proteome suggested that some effects are either directly driven by BPAG or that local hydrolysis of BPAG may overexpose this tissue to BPA. Whatever the involved mechanism, BPAG can no longer be considered as an inactive metabolite and must be taken into consideration for risk assessment.

Introduction

Bisphenol A (BPA) is a high production volume chemical present in many consumer products. Its ubiquitous presence in the environment results in a widespread human exposure (Calafat et al. 2008; Covaci et al. 2015), including pregnant women (Huo et al. 2015; Teeguarden et al. 2016). The exposure of human fetus to BPA is of special concern due to the broad range of adverse effects reported from studies of developmental exposures to BPA in experimental species (Cabaton et al. 2011; Vandenberg et al. 2008; Wadia et al. 2013).

Current uncertainty about the level of human exposure to BPA during prenatal life prevents a full evaluation of the potential human health implications of these animal studies. Previous studies of bisphenol A (BPA) toxicokinetics (TK) in fetal sheep and rhesus monkeys have shown that BPA can reach the fetal circulation and that substantial fetal metabolism leads to the production of conjugates, mainly BPA glucuronide (BPAG), which accumulate in the fetal circulation owing to their inability to cross the placenta (Corbel et al. 2013; Patterson et al. 2013; Viguié et al. 2013; Vom Saal et al. 2014).

BPA conjugated metabolites are generally not taken into account in evaluating BPA effects as they are assumed to be inactive in terms of estrogenicity (Matthews et al. 2001) and rapidly eliminated by renal excretion. However, recent investigation of BPAG TK in fetal sheep enabled us to demonstrate that BPAG trapped in the fetal compartment is slowly eliminated through its back conversion into BPA, indicating that fetal exposure to BPAG is a determinant of fetal exposure to BPA (Gauderat et al. 2016). Although this BPA re-entry in fetal blood leads to low basal BPA concentrations in fetal plasma, it cannot be excluded that the recycling of BPAG to its biologically active parent compound through the action of tissue glucuronidases may overexpose some specific tissues to BPA, even when BPA concentrations in the fetal plasma have dropped to insignificant levels. The plausibility of such a local pharmacokinetic mechanism for BPA is supported by the results of a recent *ex vivo* study showing that BPAG is readily converted back to free BPA in ovine gonads, BPA conjugation-deconjugation cycling being in favor of BPAG hydrolysis (Corbel et al. 2015).

The use of a TK modelling approach enabled us to predict that under a scheme of repeated maternal BPA dosing, BPAG plasma concentrations in the late pregnancy human fetus are expected to be sustained at a level reflecting the cumulative BPA dose, while maternal plasma concentrations may be highly variable depending on the interval between the sampling time and the last BPA intake (Gauderat et al. Unpublished data). The relevance of these predictions

for the human fetus is comforted by the high prevalence of BPAG detection in human cord blood at term (92 % (Veiga-Lopez et al. 2015)) and the high level of reported values with median and maximal concentrations of 0.96 and 4.85 ng/mL. The high and sustained BPAG exposure during prenatal life emphasizes the need for addressing BPAG safety. In a recent *in vitro* study, Boucher et al. (2015) have shown that BPAG can develop effects of its own in adipocytes, but the actual mechanisms remain unclear due to the high level of BPAG concentrations and the possible back conversion of BPAG to its unconjugated form in the cell system (Gayraud et al. 2015).

All those recent findings emphasize the need for *in vivo* assessment of BPAG safety during prenatal life in an animal model that account for BPA recycling. In this study, we took advantage of the chronically catheterized fetal sheep model enabling to selectively treat fetuses with BPAG and evaluated its effect on biomarkers of fetal exposure to BPA. Using quantitative label free shotgun proteomics on fetal tissues and plasma, our approach was to explore in a non-targeted way the shift in protein abundance triggered by fetal exposure to BPA or BPAG at an equimolar dose. The fetal liver was selected as a sensitive target tissue due to its key role in hormone metabolism and many other functions directly related to endocrine homeostasis such as the synthesis of specific binding proteins and lipid metabolism. The minimally invasive sampling of fetal plasma enabled to compare plasma proteome before and after vehicle treatment and check for the lack of vehicle effects. Finally, fetal tissues often described as preferential targets of BPA (mammary gland and ovaries) were also investigated. Differentially expressed proteins were then used to identify signature pathways involved in physiological shifts triggered by fetal exposure to BPA or BPAG.

Materials and methods

Animals

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of human animal care under agreement number 31-1155545 from the French Ministry of Agriculture.

The experiment was carried out on 18 pregnant Lacaune ewes with a mean ($\pm$ SD) bodyweight of 72 ± 8.9 kg. All animals received two commercial pelleted rations daily, and hay and water were given *ad libitum*. For each experiment, one fetus per ewe was chronically catheterized between 103 and 118 days of gestation (pregnancy length 147 days) as previously described (Corbel et al. 2013). The vascular chronic indwelling catheters were

daily rinsed with 1.5 mL of sterile normal saline and 1 mL of sterile heparin-saline solution (100 UI heparin/mL) until the end of the experiments.

Experimental design

Fetuses were randomly assigned to receive three days intravenous infusion of BPA (n=6) or BPAG (n=6) at nominal doses of 4.4 μ moles/(kg.d) corresponding to BPA and BPAG doses of 1 and 1.8 mg/(kg.d), respectively. Nominal fetal body weight was arbitrarily fixed at 2.5 kg (Bazer et al. 2012). Control fetuses (n =6) received vehicle. Only female fetuses were included in the study to avoid the sex-related variability for proteomic analyses. These animals are a subset of the same cohort used in our earlier study (Gauderat et al. Unpublished).

Serial blood samples were taken for 4-6 h before and about three days after the beginning of the infusions for hormonal measurements (results not shown).

Supplemental blood samples (1.5mL) were drawn before the infusions in 5 control fetuses and 3 days after the beginning of all BPA, BPAG and vehicle infusions. At the end of the infusion, exsanguinated fetuses were extracted by caesarean section after euthanizing the dam using pentobarbital (3.6 mg/20 mL Dolethal R). The fetuses were weighted and fetal tissue samples (liver, mammary gland and ovary) rapidly collected and dissected on ice were immersed in liquid nitrogen and kept at -80°C.

Test material and treatments

All materials for the preparation of solutions including materials used for sampling, processing and analysis were in glass or in BPA-free plastic (polypropylene).

BPA (purity 99 %) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The fractions of BPA-G purified (75-86 %) as previously described (Lacroix et al. 2011) were used for 2 fetal administrations. These fractions did not contain detectable BPA (less than 0.2 %). Synthetic BPAG (purity 98 %) purchased from Toronto Research Chemicals was used for the other fetal administrations. BPA and BPAG were extemporaneously dissolved in ethanol/propylene glycol (1/49, vol/vol) at concentrations of 0.35 and 0.63 mg/mL, respectively.

Administrations

Intravenous infusions were performed into the jugular vein via an indwelling catheter connected to a portable syringe pump (Graseby® MS 32) placed in a back pack on the dam. The syringe pump was fitted with a 20 mL Luer-Lock syringe connected to a polyethylene extension (Vygon, Ecouen, France) and infusions were carried out at a flow rate of 0.3 mL/h. The absence of BPA monomers leaching from the infusion material was previously checked.

Sample collection and preparation

Fetal arterial blood samples were collected via the indwelling catheter chronically implanted into the fetal carotid. Samples were collected in heparinized polypropylene tubes. All samples were immediately chilled in ice and centrifuged for 20 min at 3000 *g* at 4°C, after which the plasma was decanted. Plasma samples were kept at -20°C and -80°C until processed for BPA and BPAG assay and protein extraction, respectively.

Proteins were extracted from tissue samples with Qiagen AllPrep DNA/RNA/Protein mini kit (Qiagen Ltd., Crawley, UK; cat. no. 80004) as previously described (Bellingham et al. 2013; Filis et al. 2015).

Sample analysis

BPA and BPAG measurement in plasma

BPA and BPAG were measured in two to three of the serial plasma samples obtained three days after the beginning of the IV infusions as previously described to determine steady state BPA and BPAG fetal plasma concentrations (Gauderat et al. 2016). BPA and BPAG were also measured in one sample per fetus obtained before dosing to check for the lack of contamination during sample collection, storage and processing. The limits of quantification (LOQ) were 1 ng/mL (BPA) and 5 ng/mL (BPAG).

Proteomic analysis

Protein concentrations were quantified in plasma and protein extracts using a modified Lowry assay (Biorad Ltd., Hertfordshire, UK, cat.no. 500-0122).

Ten µg of proteins from tissue extracts and plasma were diluted to a final volume of 100 µl of 50 mM NH₄HCO₃. Proteins were then digested by sequencing-grade modified trypsin (Promega, Southampton, UK, cat.no. V5117) at a ratio of 1:10 trypsin:proteins overnight at 37°C, followed by vacuum drying, reduction and alkylation, and freezing at -80°C. Samples were then thawed and the equivalent of 2 µg of peptides were separated in an acetonitrile-

formic acid 15 cm LC column gradient and injected in a Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Tandem Mass Spectrometer (Thermo Scientific). Two technical replicates per tissues and per treatment were used to inform on the normalization method.

Obtained RAW files were simultaneously processed by MaxQuant version 1.5.3.30 (Cox and Mann 2008) for protein identification and quantification. MaxQuant runs were performed under the default parameters except that trypsin was set as the digestion enzyme, the protein intensities were normalized (LFQ intensities) using the MaxLFQ algorithm (without the fast LFQ option) and the match between run options was enabled.

MS/MS spectra were searched using the Andromeda search engine integrated in MaxQuant (Cox et al. 2011) against a custom build proteome (source NCBI) containing all known sheep proteins with additional proteins from pig, cow and goat that were not available in sheep. Peptide and protein identifications were filtered at a 1 % false discover rate (FDR) threshold. The MaxLFQ algorithm of MaxQuant was applied for each type of biological matrices separately. Each replication was quantified separately to check the normalization. Afterwards, replicates were combined for the final quantification run in order to automatically average duplicate intensities.

Data analysis

The individual fetal plasma concentrations considered were the mean of 2 to 3 concentrations measured in samples collected about 3 days after the beginning of the infusions.

MaxLFQ-normalised protein intensities were used for the between groups comparisons and the fold changes estimations. Proteomic data were processed using the Perseus software version 1.5.5.3 (Tyanova et al. 2016) and R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) for Mann Withney tests and empirical Bayes moderated tests (limma package).

Data were filtered to ensure that at least 4 out of 6 intensity values for each protein were present in each treatment group prior to comparison. Protein intensities were then log2 transformed and compared. The comparisons included vehicle vs BPA and vehicle vs BPAG treatments. For plasma, data obtained before and at the end of vehicle treatment were also compared in order to check for the lack of vehicle effect on plasma proteome. Classical t-tests, Mann Withney tests and empirical Bayes moderated tests were performed to compare P-value distributions.

Proteins were identified as differentially expressed when P-values were below a 0.05 cutoff considering only the results obtained with the empirical Bayes moderated test.

After conversion of the protein names into gene symbols, the differentially expressed proteins and their corresponding fold changes based on LFQ intensities were used to perform pathway analyses with the IPA software (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>). One canonical pathway analysis was done per tissue and per treatment condition. An additional canonical pathway as well as an upstream and a toxicity analysis were performed for each treatment condition using the whole differentially expressed proteins dataset obtained by combining the plasma, mammary gland, liver and ovary differentially expressed proteins in order to get an overview of BPA and BPAG effects.

Impacted pathways were identified with the Fisher's exact tests considering a threshold of $P < 0.05$ for canonical pathways and $P < 0.01$ for upstream regulators and toxicity functions. Z-scores were used to determine the activation state of a given pathway and were considered significant when above 2 or below -2.

Results

All results are presented as mean $\pm$ SD. BPA was not detected in any of the control samples drawn before the infusions. The mean ($\pm$ SD) fetal body weight at the end of the experiment was 2.3 ± 0.6 kg.

BPA and BPAG fetal exposures

BPA concentrations were measurable in fetal plasma for 4 out of 6 fetuses at the end of the BPA fetal infusions and were of 3.2 ± 1.7 ng/mL. Corresponding mean BPAG concentrations were 1300 ± 970 ng/mL.

Mean BPAG concentration reached in fetal plasma 3 days after the beginning of BPAG infusion was about 4 times higher (4850 ± 3150 ng/mL) than values observed after BPA infusion. BPA was only measurable in one of the samples taken from 2 BPAG treated fetuses out of 6 (1.6 and 1.4 ng/mL).

Differentially expressed proteins

About 1300, 1800, 2000, and 300 proteins were quantified in mammary gland, ovary, liver and plasma respectively.

Figure 1 illustrates the distribution of P-value determined for the comparison of protein levels in the fetal liver of vehicle vs BPA treated fetuses using an empirical Bayes moderated test, the Student's test and the Mann Withney test. The shape of the histogram indicates that fewer proteins were found differentially expressed than expected by chance under the null hypothesis according to which no difference exists between the treatment groups, and that the use of a non-parametric test (Mann Withney) and a classical t-test does not give the expected distribution of P values either. When comparing fetal plasma proteins before and at the end of vehicle treatment, we found that only one protein out of 275 had a P-value below 0.05 while the number of false positives was expected to be 14 (5 %) for a P threshold value of 0.05.

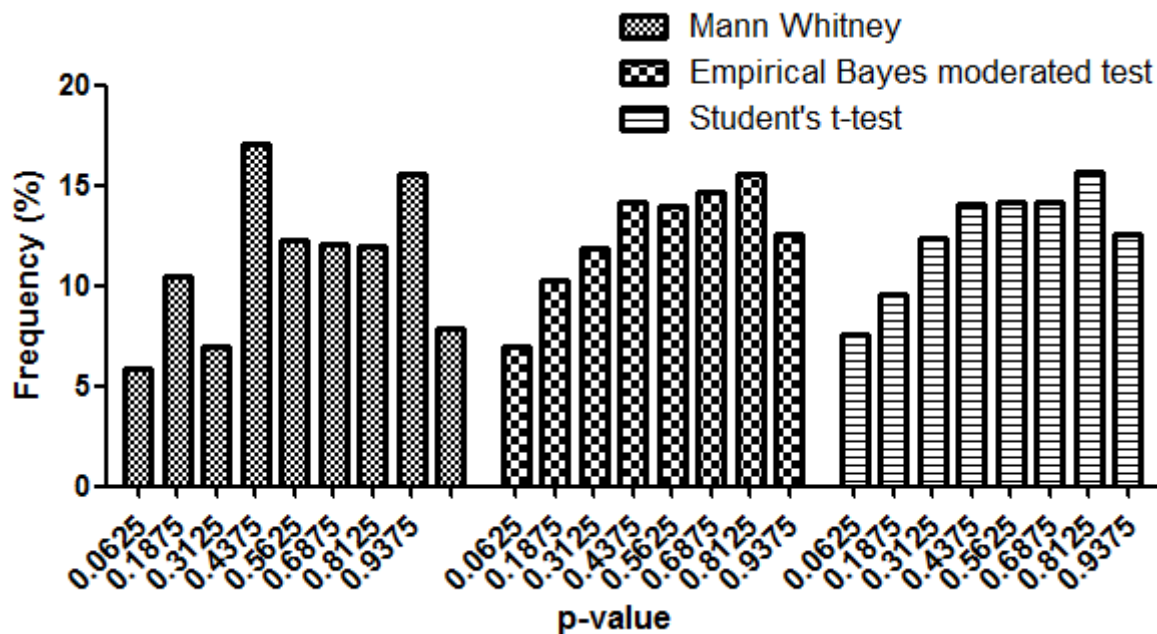


Figure 1: Distribution of P-values across proteins obtained when comparing protein intensities between liver extracts of fetuses treated with vehicle versus BPA. The two groups were compared with the classical Student's test, the non-parametric Mann Withney test and an empirical Bayes moderated test.

For each treatment group comparison and for each tissue, the top 5 proteins based on lowest P-values computed with the empirical Bayes moderated test, corresponding fold changes as well as a brief description of molecular functions are given in Table 1. The full list of proteins regulated by either BPA or BPAG ($P < 0.05$) in each tissues is available in supplementary data.

Similar proportions of proteins were differentially expressed ($P < 0.05$) in both BPA and BPAG treated fetuses compared to vehicle in mammary gland (45 out of 1290 vs 47 out of 1361). More proteins were differentially expressed with the BPA treatment in fetal plasma (14 out of 295 vs 7 out of 282) while the opposite was found in ovaries (BPA : 36 out of 1768 vs BPAG : 54 out of 1728) and in an even more pronounced way in fetal liver, where twice as

many proteins were found affected with the BPAG treatment (BPA : 49 out of 2002 vs BPAG : 101 out of 2012). Interestingly, the abundancy of four immunoglobulin components was found to be decreased by the BPA treatment, all of them with a large effect size (-4.4 to -80 fold changes).

Table 1: Top 5 differentially expressed proteins sorted by P-values for each treatment group comparison and for each fetal tissue.

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Plasma	Vehicle vs BPA	2.2	hepatocyte growth factor activator	5.4E-03	Growth factor
		-9.3	immunoglobulin V lambda chain, partial	7.3E-03	Adaptive immune defense
		-50.0	Ig heavy chain C region - sheep (fragment)	1.4E-02	Adaptive immune defense
		-4.4	mannose-binding protein C	1.6E-02	Innate immune defense
		-13.1	primary amine oxidase, lung isozyme	2.1E-02	Catalytic activity
	Vehicle vs BPAG	3.1	apolipoprotein A-IV	2.8E-03	Lipid transport
		-2.6	hemopexin	1.0E-02	Binds and transport heme to the liver
		3.7	alpha-1-antitrypsin transcript variant 1	1.2E-02	Serine protease inhibitor
		2.3	serpin A3-7-like	1.8E-02	Serine protease inhibitor
		2.2	telomere-associated protein RIF1	2.6E-02	Cell cycle checkpoint
	Before vs after Vehicle	-6.4	serpin A3-8	6.2E-03	Serine protease inhibitor
Liver	Vehicle vs BPA	-3.5	mannose-binding protein C	3.6E-03	Innate immune defense
		1.8	ATPase family AAA domain-containing protein 1	5.0E-03	Catalytic activity
		1.5	estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-B-like	5.3E-03	Catalytic activity
		1.6	fibulin-1	6.6E-03	Cell adhesion and migration
		-1.5	thioredoxin reductase 2, mitochondrial	6.6E-03	Catalytic activity
	Vehicle vs BPAG	-5.0	lactoferrin precursor	1.0E-04	Innate immune defense
		1.8	prenylcysteine oxidase 1	1.3E-04	Catalytic activity
		2.3	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	2.0E-04	Catalytic activity
		-4.1	azurocidin	4.3E-04	Innate immune defense
		-2.6	cathelin-related peptide SC5 precursor	6.6E-04	Innate immune defense
Mammary gland	Vehicle vs BPA	2.2	complement factor I	1.4E-03	Innate immune defense
		-3.4	glutathione S-transferase kappa 1	2.3E-03	Catalytic activity
		-2.6	60S acidic ribosomal protein P2	3.1E-03	Elongation step of protein synthesis
		2.2	tetranectin	3.4E-03	Exocytosis
		-2.3	dynamin-23	3.6E-03	Microtubule bundle production
	Vehicle vs BPAG	3.0	fibromodulin	7.3E-04	Affects the rate of fibrils formation
		3.1	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	8.5E-04	Integral component of basement membrane
		-2.2	60S ribosomal protein L36	2.1E-03	Structural constituent of ribosome
		3.4	monoglyceride lipase	5.1E-03	Catalytic activity
		-2.3	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	7.4E-03	Catalytic activity
Ovary	Vehicle vs BPA	3.2	thrombomodulin	7.3E-04	Hemostasis
		-2.2	glutathione peroxidase 1	1.1E-03	Protects hemoglobin from oxidative breakdown
		-2.8	regulator of microtubule dynamics protein 3	3.7E-03	Calcium homeostasis regulation
		-3.9	nodal modulator 1	8.2E-03	Nodal signaling
		-1.7	glycine--tRNA ligase	8.7E-03	Catalytic activity
	Vehicle vs BPAG	1.8	mannosyl-oligosaccharide glucosidase	2.5E-04	Catalytic activity
		-20.0	hemopexin	4.1E-03	Binds and transport heme to the liver
		-2.2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5	6.0E-03	Serine protease inhibitor
		-1.5	coronin-1C	8.1E-03	Cytokinesis, motility, and signal transduction
		-2.0	flotillin-2	9.9E-03	Scaffolding protein

Twenty nine proteins were affected the same way by both the BPA and BPAG treatments indicating that about 17 % of the changes were common between BPA and BPAG treatments (Table 2), half of these common effects being observed in the liver. Among these proteins, 8 are involved in immunity. Another noticeable common effect between BPA and BPAG was the increase of 17-beta-dehydrogenase 12-B in fetal liver.

Table 2: List of proteins differentially expressed in both BPA and BPAG treated fetuses compared to vehicle.

Name	Regulation	Tissue	Function
immunoglobulin V lambda chain	down	Plasma	Adaptive immune defense
Calponin-1	up	Mammary gland	Smooth muscle contraction
copper chaperone of superoxide dismutase 1	down	Liver	Catalytic activity
serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	up	Liver	Catalytic activity
lactoferrin precursor	down	Liver	Innate immune defense
cathelicidin	down	Liver	Innate immune defense
decorin	up	Mammary gland	Fibrils formation
serpin A3-7-like	up	Plasma	Serine protease inhibitor
vacuolar protein sorting-associated protein 29	down	Ovary	Endosomal multivesicular bodies pathway
azurocidin	down	Liver	Innate immune defense
phosphoribosylformylglycinamide synthase	down	Ovary	Catalytic activity
peptidoglycan recognition protein 1	down	Liver	Innate immune defense
coiled-coil domain-containing protein 47	down	Liver	Calcium ion homeostasis
protein S100-A8	down	Liver	Innate immune defense
ethanolamine-phosphate phospho-lyase	down	Liver	Catalytic activity
Golgi SNAP receptor complex member 1	down	Liver	Transport from the ER to the Golgi apparatus
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	down	Ovary	Participates in pre-mRNA splicing
membrane primary amine oxidase	up	Liver	Catalytic activity
olfactomedin-like protein 1	up	Mammary gland	Cell proliferation
estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-B-like	up	Liver	Catalytic activity
phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	up	Liver	Catalytic activity
histidine-rich glycoprotein	up	Mammary gland	Immune system, angiogenesis, coagulation
methylosome protein 50	down	Ovary	Cell proliferation, stimulates proliferation and invasion in ovarian cancer cells in the presence of estrogen or androgen
neutrophil gelatinase-associated lipocalin	down	Liver	apoptosis, innate immunity and renal development
mannosyl-oligosaccharide glucosidase	up	Ovary	Catalytic activity
flotillin-2	up	Liver	Scaffolding protein
thrombomodulin	up	Ovary	Hemostasis
glutathione peroxidase 1	down	Ovary	Protects hemoglobin from oxidative breakdown
nodal modulator 1	down	Ovary	Nodal signaling

Pathway analysis

The full lists of identified canonical pathways, upstream regulators and toxicological functions are available in supplementary data.

More canonical pathways were found impacted by BPAG treatment compared to BPA in liver (54 vs 3), ovaries (14 vs 3), and plasma (7 vs 1) while the opposite was found for the mammary gland (11 vs 25). From the analysis that combined the expression dataset of all tissues, 22 and 59 canonical pathways were identified as affected by the BPA and BPAG treatments respectively. Among them, 13 were affected by both BPA and BPAG. Four pathways out of the 5 most significantly affected by BPA or BPAG are shared between BPA and BPAG treatments, namely the acute phase response signaling, LXR/RXR activation, FXR/RXR activation and intrinsic prothrombin activation pathway (Table 3).

While most Z-scores could not be computed or were not significant (> -2 or < 2), some canonical pathways showed a significant spatial pattern (see supplemental data). Among them, the LXR/RXR activation pathway was found activated by the BPA treatment in mammary gland (Z-score = 2.4), this change being also evidenced by the combined analysis (Z-score = 3.0) while it was inhibited in ovaries with the BPAG treatment (Z-score = -2.0). The acute phase response signaling pathway was found decreased in liver, ovary and in the combined analysis with the BPAG treatment (Z-scores of -3.0, -2.6, and -2.9), while no significant activation state have been found with the BPA treatment.

Table 3: Top 5 canonical pathways affected by BPA or BPAG treatment based on P-values.

Tissue	Treatment	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Number of proteins
Plasma	BPA	Acute Phase Response Signaling	2.6E-03	2
	BPAG	LXR/RXR Activation	3.6E-08	4
		FXR/RXR Activation	4.8E-08	4
		Acute Phase Response Signaling	1.2E-07	4
		Atherosclerosis Signaling	6.5E-04	2
		IL-12 Signaling and Production in Macrophages	7.8E-04	2
Ovary	BPA	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	9.55E-04	2
		Coagulation System	1.3E-03	2
		Systemic Lupus Erythematosus Signaling	4.5E-03	3
	BPAG	Acute Phase Response Signaling	1.5E-10	9
		Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	6.8E-08	4
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	6.0E-07	4
		Coagulation System	1.2E-06	4
Mammary gland	BPA	Virus Entry via Endocytic Pathways	6.3E-05	4
		FXR/RXR Activation	1.1E-08	7
		Acute Phase Response Signaling	5.1E-08	7
		LXR/RXR Activation	2.2E-07	6
		p70S6K Signaling	1.2E-04	4
		Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	6.0E-04	2
	BPAG	Acute Phase Response Signaling	1.1E-08	4
		Calcium Signaling	5.1E-08	4
		Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.2E-07	4
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	1.2E-04	2
		ILK Signaling	6.0E-04	3
Liver	BPA	Acute Phase Response Signaling	6.5E-03	3
		IL-12 Signaling and Production in Macrophages	3.7E-02	2
		Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	4.4E-02	2
	BPAG	Acute Phase Response Signaling	4.7E-04	12
		LXR/RXR Activation	6.5E-04	9
		Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	6.6E-04	9
		Xenobiotic Metabolism Signaling	1.9E-03	8
All combined	BPA	FXR/RXR Activation	7.2E-03	6
		Coagulation System	5.5E-05	4
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	2.9E-05	4
		FXR/RXR Activation	1.4E-07	9
		Acute Phase Response Signaling	7.9E-08	10
	BPAG	LXR/RXR Activation	7.4E-08	9
		Acute Phase Response Signaling	5.0E-15	18
		LXR/RXR Activation	6.3E-11	13
		Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	5.6E-08	12
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	1.6E-07	6
		FXR/RXR Activation	2.3E-07	10

The upstream regulator analysis performed on the combined expression data from all the different tissues allowed identifying 27 and 175 upstream regulators for BPA and BPAG treatments respectively, among which 17 were shared between the BPAG and the BPA treatments (Table 4). Notably, myocardin like proteins 1 and 2 were predicted to be activated by both BPA and BPAG. Although the direction of variation was not significantly identified as reflected by the Z-score, beta estradiol was predicted to be inhibited by both BPA and BPAG. Dexamethasone was predicted to be activated by BPA while liposaccharide and oncostatin M were predicted to be inhibited by BPAG.

Table 4: List of upstream regulators identified from the analysis of combined expression dataset from all examined fetal tissues for BPA and BPAG treatments.

Upstream Regulator	Molecule Type	Treatment	Z-score	P-value of overlap	Number of proteins
beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	BPA	-1.5	2.8E-05	24
		BPAG	-1.4	3.5E-11	42
dexamethasone	chemical drug	BPA	2.8	1.5E-05	24
		BPAG	-0.2	1.6E-15	48
fluticasone	chemical drug	BPA	-0.9	4.1E-04	6
		BPAG	-1.2	4.3E-04	7
hemin	chemical - endogenous mammalian	BPA	NA	3.1E-04	4
		BPAG	0.0	9.3E-05	5
Hepatocyte nuclear factor 1-alpha	transcription regulator	BPA	0.4	5.6E-06	12
		BPAG	1.1	8.7E-06	14
Hepatocyte nuclear factor 4-alpha	transcription regulator	BPA	0.0	1.2E-10	36
		BPAG	1.5	6.9E-08	39
Huntington Disease Protein	transcription regulator	BPA	0.6	4.8E-04	12
		BPAG	-1.0	1.2E-07	21
Interleukin 3	cytokine	BPA	NA	4.9E-04	8
		BPAG	NA	1.8E-04	5
lipopolysaccharide	chemical drug	BPA	-1.2	9.6E-06	24
		BPAG	-4.3	4.5E-12	42
methylprednisolone	chemical drug	BPA	0.4	3.9E-05	12
		BPAG	-1.9	9.4E-07	17
MKL/myocardin-like protein 1	transcription regulator	BPA	2.4	8.9E-05	6
		BPAG	2.3	8.2E-08	10
MKL/myocardin-like protein 2	transcription regulator	BPA	2.2	9.4E-05	5
		BPAG	2.1	1.6E-08	9
Oncostatin M	cytokine	BPA	-0.2	6.3E-04	10
		BPAG	-2.8	5.2E-14	26
Transforming growth factor beta-1	growth factor	BPA	-1.4	5.5E-04	20
		BPAG	-0.9	1.2E-11	41
Tumor necrosis factor	cytokine	BPA	-1.8	2.9E-05	23
		BPAG	-1.6	2.4E-13	44
tumor protein p53	transcription regulator	BPA	-0.1	6.0E-04	18
		BPAG	0.7	1.4E-10	36
Versican	proteoglycan	BPA	-0.3	4.5E-08	9
		BPAG	1.7	8.5E-07	9

Twenty and 35 toxicity functions were respectively identified with the BPA and the BPAG treatments among which 7 were common to both treatments. The toxicity functions identified were mainly related to the renal function and the second most confidently identified function was related to the liver function for both BPA and BPAG treatments (Table 5).

Table 5: Top 5 toxicity functions identified with the BPA or the BPAG treatment based on P-values.

Treatment	Categories	Diseases or Functions Annotation	P-Value	Number of proteins
BPA	Kidney Failure	failure of kidney	4.5E-04	8
	Liver Fibrosis	mitogenesis of hepatic stellate cells	9.6E-04	2
	Kidney Failure	chronic renal failure	1.2E-03	6
	Renal Proliferation	proliferation of kidney cells	1.6E-03	4
	Kidney Failure	end stage renal disease	2.4E-03	5
BPAG	Renal Damage, Renal Tubule Injury	proximal tubular toxicity	1.4E-05	7
	Liver Necrosis/Cell Death	focal necrosis of liver	1.7E-05	4
	Renal Inflammation, Renal Nephritis	Fechtner syndrome	6.9E-05	2
	Renal Inflammation, Renal Nephritis	epstein syndrome	6.9E-05	2
	Glomerular Injury	glomerulosclerosis	2.8E-04	7

Discussion

In the present study, we used the fetal sheep model to test the hypothesis that BPA reactivation from BPAG at the level of the fetal compartment overexposes fetal tissues to BPA through the comparison of the effects of controlled fetal exposure to equimolar doses of BPAG and BPA. To our knowledge, this is the first *in vivo* study to address the safety of fetal exposure to BPAG.

A non-targeted mass spectrometry based label free proteomic approach was used to identify firstly the changes in protein abundance with the BPA and BPAG treatments in plasma and fetal tissues compared to vehicle, and secondly, the proteins that were affected both by BPA and BPAG. The tissues analyzed were the mammary glands and ovaries as potential target for BPA estrogenic driven effects and the liver for its key role in metabolism.

When comparing proteins abundancies according to treatments, the distribution of P-values shifted towards high P-values, indicating that fewer proteins were found differentially expressed with the BPA and the BPAG treatment than expected by chance under our null hypothesis. The use of a non-parametric ranked test (Mann Whitney) did not change the shape of the P-value distributions, suggesting that the lower than expected frequency of significant changes was not due to a violation of the assumptions made on protein intensities distribution, but rather to a lack of independence between protein levels. When comparing protein abundancy before and after vehicle treatment in control fetuses, only one protein among 275 (i.e. 0.36 %) was identified as differentially expressed with a P-value of 0.05. This is also much lower than the frequency of false positives (5 %, 14 among 275) expected under the null hypothesis according to which the vehicle does not affect the plasma proteome. Together, those results suggest not only a lack of effects related to the vehicle, but also that the use of a 0.05 P-value threshold leads to a negligible proportion of false positives (0.36%) in the list of proteins considered differentially expressed in plasma. Therefore, we were not able to apply a false discovery rate correction as often used in multiple testing and we rather considered a classical 0.05 P-value threshold for inclusion in the pathway analysis.

Using this approach, we have shown that although BPA plasma concentrations of BPA-treated fetuses (3 ng/mL) were higher than that of BPAG-treated fetuses (undetectable, predicted at 0.5 ng/mL), more proteins were differentially expressed in the liver and ovaries of BPAG treated fetuses compared to BPA, twice as many proteins being differentially expressed in the liver of the BPAG treated fetuses. In the mammary gland, the proportion of

proteins affected by BPA and BPAG was similar while the BPA treatment was associated to a higher percentage of changes in the plasma. Overall, the abundancy of 29 proteins was changed in the same way by BPA and BPAG treatments, indicating that about 17 % of the proteome changes were common between BPA and BPAG, half of these common effects being observed in the liver. Many of the proteins affected both by BPA and BPAG are involved in immunity. The other noticeable shared BPA and BPAG effects was the increase of 17-beta-dehydrogenase 12-B in the fetal liver. This enzyme plays a role in steroid metabolism, converting estradiol into the less estrogenic estrone, but it is also involved in fatty acid synthesis (Sakurai et al. 2006). Accordingly, although its orientation was not significantly identified (Z scores -1.47 and -1.40), the upstream analysis revealed that both BPA and BPAG actually tend to decrease what would be the outcomes of an estrogenic stimulation with beta estradiol in the treated fetuses.

The functional significance was examined through the analysis of the pathways affected by BPA and BPAG. The analysis showed that much more canonical pathways were affected by BPAG compared to BPA, mostly in the liver but also in ovaries and plasma, while fewer pathways were affected in the mammary gland of BPAG treated fetuses compared to BPA. The pathway analysis that combined the proteome changes from all tissues enabled us to identify 3 times more pathways affected by BPAG compared to BPA. About one half and one fifth of the pathways respectively affected by BPA and BPAG were shared between the two treatments. These shared pathways included the acute phase response signaling, LXR/RXR activation, FXR/RXR activation and the intrinsic prothrombin activation pathways that were in the top 5 of the most significantly affected pathways by both BPA and BPAG treatments.

The LXR/RXR pathway is related to the liver X receptor, a transcription factor that regulates lipid and carbohydrate metabolism (Baranowski 2008). This pathway was found affected in all the analyzed tissues by the BPAG treatment and in the mammary gland with BPA. This pathway is closely related to the FXR/RXR pathway (Kalaany and Mangelsdorf 2006), which was found affected as well in the present study. In accordance with previous studies showing the influence of BPA on this particular pathway (Marmugi et al. 2012) or related outcomes in the liver (Rönn et al. 2013), these results indicate once more that BPA may affect metabolism through mechanisms that remain to be clarified.

The acute phase response signaling pathway has been found affected in all the tissues by both BPAG and BPA treatments, except in ovary of BPA treated fetuses. Our results suggest a

decrease in immune defense components as reflected by the large decreases in plasma immunoglobulins with BPA and the inhibition of the acute phase response signaling by BPAG in liver and ovaries. This tendency was also reflected by the results of the upstream analysis, indicating that antigens that would induce immune response (lipopolysaccharide) and that the mediators of acute phase response (namely cytokines (oncostatin M)), were predicted to be decreased with BPAG, while an anti-inflammatory and immunosuppressant drug was predicted to be increased with BPA (Dexamethasone). BPA effects on the immune system were evidenced under developmental exposure (Hessel et al. 2016; Ménard et al. 2014) in rodents but this is the first study highlighting such a large effect size on plasma immunoglobulins only after 3 days of fetal exposure to BPA. Interestingly, the observed immuno suppressor effect of BPA could actually be driven by the LXR/RXR activation (Zelcer and Tontonoz 2006).

Finally, the intrinsic prothrombin activation pathway, as well as the related coagulation system and the extrinsic prothrombin activation pathways, have been found affected both by BPA and BPAG in most of the analyzed tissues. Although none of the associated Z-scores were significant all of them were negative and the fibrinogen intensities were found decreased; suggesting that the treatments were associated to a decrease of the hemostasis ability. This affected pathway can be related to the damage of the renal and/or the hepatic function identified as the main toxicity pathways.

This experiment enabled us to evidence that BPAG can exert effects similar to those induced by BPA on fetal immunity and metabolism. These shared effects of BPA and BPAG suggests that BPAG can be readily reactivated at the level of fetal tissues. The stronger impact of BPAG treatment on the fetal liver proteome despite the much lower associated BPA plasma levels suggest that a sustained exposure to BPAG may overexpose the liver to BPA through the action of glucuronidases. This hypothesis is also supported by the high glucuronidase activity of the fetal liver (Sperker et al. 1997) and the high hepatic flow carrying highly concentrated BPAG in fetal blood. This assumption should be assessed through the comparison of BPA concentrations in the fetal liver of BPAG and BPA treated fetuses. However, we cannot exclude that some effects can be directly driven by BPAG, whose plasma concentrations were about 4 times higher in the BPAG treated fetus compared to BPA.

Biomonitoring studies based on the direct measurement of BPAG concentrations in cord blood that cannot be attributed to post-exposure sample contamination have reported median

vs maximal BPAG concentrations of 120 and 190 ng/L vs 960 and 4850 ng/L in second trimester and at term (Gerona et al. 2016). In our study, the tested concentrations of BPAG were about 600 times higher than the maximal BPAG concentration values reported in cord blood in these studies. The selected BPA dose was the minimal dose that was associated to measurable BPA fetal concentrations (in the ng/mL range). According to our previous BPA and BPAG fetal TK, the equivalent molar BPAG dose was expected to reproduce a similar fetal exposure to BPA in terms of dose while associated BPA plasma levels were predicted to be about 10 times lower. Although the tested dose is high, the previously demonstrated dose-proportionality of fetal BPA and BPAG TK for a large range of doses encompassing the tested doses (from 10 µg/(kg.d) to 100 mg/(kg.d) for BPA and from 18 µg/(kg.d) to 18 mg/(kg.d) (Gauderat et al. unpublished data), indicates that our findings can be extrapolated to much lower BPAG doses in terms of systemic fetal exposure to BPA and BPAG. Therefore, further studies are required to evaluate the effects of systemic fetal exposure to BPAG in the range of values reported in cord blood.

In conclusion, our results support the reactivation of BPAG at the level of fetal tissues and suggest that systemic exposure of the fetus to BPAG might be a better predictor of BPA fetal tissue concentrations than BPA plasma levels. These results indicate that human fetal exposure to BPAG may be of concern and should be considered for risk assessment.

References

- Baranowski M. 2008. Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 59 Suppl 7: 31–55.
- Bazer FW, Spencer TE, Thatcher WW. 2012. Growth and development of the ovine conceptus. *J. Anim. Sci.* 90:159–170; doi:10.2527/jas.2011-4180.
- Bellingham M, Amezcaga MR, Mandon-Pepin B, Speers CJB, Kyle CE, Evans NP, et al. 2013. Exposure to chemical cocktails before or after conception--- the effect of timing on ovarian development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 376:156–172; doi:10.1016/j.mce.2013.06.016.
- Boucher JG, Boudreau A, Ahmed S, Atlas E. 2015. In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environ. Health Perspect.* 123:1287–1293; doi:10.1289/ehp.1409143.
- Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, et al. 2011. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* 119:547–552; doi:10.1289/ehp.1002559.
- Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116:39–44; doi:10.1289/ehp.10753.
- Corbel T, Gayrard V, Viguié C, Puel S, Lacroix MZ, Toutain P-L, et al. 2013. Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol. Reprod.* 89:11; doi:10.1095/biolreprod.112.106369.
- Corbel T, Perdu E, Gayrard V, Puel S, Lacroix MZ, Viguié C, et al. 2015. Conjugation and deconjugation reactions within the fetoplacental compartment in a sheep model: a key factor determining bisphenol A fetal exposure. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 43:467–476; doi:10.1124/dmd.114.061291.
- Covaci A, Den Hond E, Geens T, Govarts E, Koppen G, Frederiksen H, et al. 2015. Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. *Environ. Res.* 141:77–85; doi:10.1016/j.envres.2014.08.008.
- Cox J, Mann M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26:1367–1372; doi:10.1038/nbt.1511.
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. 2011. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* 10:1794–1805; doi:10.1021/pr101065j.
- Filis P, Nagraath N, Fraser M, Hay DC, Iredale JP, O'Shaughnessy P, et al. 2015. Maternal Smoking Dysregulates Protein Expression in Second Trimester Human Fetal Livers in a Sex-Specific Manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100:E861-870; doi:10.1210/jc.2014-3941.
- Gauderat G, Picard-Hagen N, Toutain P-L, Corbel T, Viguié C, Puel S, et al. 2016. Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environ. Int.* 86:52–59; doi:10.1016/j.envint.2015.10.006.
- Gayrard V, Gauderat G, Lacroix MZ, Viguié C, Bousquet-Melou A, Toutain P-L, et al. 2015. Comment on “In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in

- Human and Murine Preadipocytes.” *Environ. Health Perspect.* 123:A289; doi:10.1289/ehp.1510315.
- Hessel EVS, Ezendam J, Broekhuizen FA van, Hakkert B, DeWitt J, Granum B, et al. 2016. Assessment of recent developmental immunotoxicity studies with bisphenol A in the context of the 2015 EFSA t-TDI. *Reprod. Toxicol.* Elmsford N; doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.020.
- Huo W, Xia W, Wan Y, Zhang B, Zhou A, Zhang Y, et al. 2015. Maternal urinary bisphenol A levels and infant low birth weight: A nested case-control study of the Health Baby Cohort in China. *Environ. Int.* 85:96–103; doi:10.1016/j.envint.2015.09.005.
- Kalaany NY, Mangelsdorf DJ. 2006. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 68:159–191; doi:10.1146/annurev.physiol.68.033104.152158.
- Lacroix MZ, Puel S, Collet SH, Corbel T, Picard-Hagen N, Toutain PL, et al. 2011. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85:2053–2059; doi:10.1016/j.talanta.2011.07.040.
- Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, et al. 2012. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatol. Baltim. Md* 55:395–407; doi:10.1002/hep.24685.
- Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 149–157.
- Ménard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C, Leveque M, Naturel M, Sekkal S, et al. 2014. Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PloS One* 9:e112752; doi:10.1371/journal.pone.0112752.
- Patterson TA, Twaddle NC, Roegge CS, Callicott RJ, Fisher JW, Doerge DR. 2013. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267:41–48; doi:10.1016/j.taap.2012.12.006.
- Rönn M, Kullberg J, Karlsson H, Berglund J, Malmberg F, Orberg J, et al. 2013. Bisphenol A exposure increases liver fat in juvenile fructose-fed Fischer 344 rats. *Toxicology* 303:125–132; doi:10.1016/j.tox.2012.09.013.
- Sakurai N, Miki Y, Suzuki T, Watanabe K, Narita T, Ando K, et al. 2006. Systemic distribution and tissue localizations of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99:174–181; doi:10.1016/j.jsbmb.2006.01.010.
- Sperker B, Backman JT, Kroemer HK. 1997. The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin. Pharmacokinet.* 33: 18–31.
- Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Doerge DR. 2016. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 92:129–142; doi:10.1016/j.fct.2016.03.023.
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods*; doi:10.1038/nmeth.3901.

- Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, Rubin BS, et al. 2008. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 26:210–219; doi:10.1016/j.reprotox.2008.09.015.
- Veiga-Lopez A, Kannan K, Liao C, Ye W, Domino SE, Padmanabhan V. 2015. Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100:E1394-1403; doi:10.1210/jc.2015-1724.
- Viguié C, Collet SH, Gayrard V, Picard-Hagen N, Puel S, Roques BB, et al. 2013. Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 154:521–528; doi:10.1210/en.2012-1401.
- Vom Saal FS, VandeVoort CA, Taylor JA, Welshons WV, Toutain P-L, Hunt PA. 2014. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 45:105–116; doi:10.1016/j.reprotox.2014.01.007.
- Wadia PR, Cabaton NJ, Borrero MD, Rubin BS, Sonnenschein C, Shioda T, et al. 2013. Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PloS One* 8:e63902; doi:10.1371/journal.pone.0063902.
- Zelcer N, Tontonoz P. 2006. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* 116:607–614; doi:10.1172/JCI27883.

C. Conclusions

L'analyse de l'empreinte de masse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a permis de mettre en évidence une similarité importante des voies signalétiques altérées par le BPA et le BPAG. Les principaux effets mis en évidence à la fois pour le BPA et le BPAG sont une activation de la voie LXR/RXR ainsi qu'une diminution de la réponse immunitaire en phase aiguë.

Les récepteurs des oxystérols (ou liver X receptor (LXR)) activés par le BPA et le BPAG sont des facteurs de transcription dont les oxystérols sont les ligands endogènes. La forme active est un hétérodimère formé par association avec le Récepteur des rétinoïdes (RXR). Les études récentes montrent que ces récepteurs jouent des rôles importants, notamment dans le métabolisme des lipides et des glucides. Chez le rongeur adulte, l'activation de ces récepteurs inhibe le développement de l'athérosclérose, limite l'inflammation, augmente la tolérance au glucose et les concentrations plasmatiques en triglycérides et est favorable au développement de la stéatose hépatique (174,175). Quelques études chez le rongeur suggèrent un rôle similaire de ce récepteur chez le fœtus (176,177). Il est également intéressant de noter que l'activation de ces récepteurs induit une diminution de la réponse inflammatoire en accord avec la diminution de la réponse immunitaire en phase aiguë rapportée dans cette étude (174).

Les effets les plus marqués en termes de proportion de protéines différenciellement exprimées ont été observés dans le foie des fœtus traités au BPAG. De plus la voie de signalisation LXR/RXR, une voie initiée par l'activation de récepteurs fortement exprimés dans le foie, fait partie des voies les plus significativement affectées à la fois par le BPA et le BPAG. Ces effets communs du BPA et du BPAG majoritairement observés au niveau hépatique suggèrent fortement que le BPAG a pu être réactivé au travers d'une hydrolyse hépatique locale du BPAG, qui serait favorisée par un flux élevé de sang très concentré en BPAG et l'expression particulièrement élevée des glucuronidases dans cet organe (141,178). Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que certains des effets observés chez les fœtus traités au BPAG résultent d'un effet direct du BPAG dont les concentrations plasmatiques sont 4 fois supérieures que celles des fœtus traités au BPA.

L'activation de cette voie de signalisation par le BPA a déjà été observée chez la souris adulte (179). Il serait intéressant d'évaluer la liaison du BPA et du BPAG à cette famille de récepteurs et ces conséquences pour le fœtus. Enfin, d'autres études avec un plus grand nombre d'animaux sont nécessaires afin de valider les effets d'une exposition fœtale au BPAG. Des études ciblées de dosage de molécules impliquées dans l'immunité ou la voie LXR/RXR permettrait notamment de valider nos résultats. Il est également nécessaire

d'évaluer l'effet du BPAG pour des expositions de l'ordre de grandeur de l'exposition attendue chez l'Homme (quelques dizaines/centaines de ng.L^{-1} dans le plasma fœtal).

Ces résultats suggèrent que le maintien de concentrations plasmatiques fœtales élevées en BPAG associé à une capacité importante d'hydrolyse pourrait surexposer le foie au BPA, conduisant à un découplage entre des concentrations circulantes en BPA, maintenues à des valeurs faibles en raison de l'importance de la clairance placentaire fœto-maternelle, et des concentrations hépatiques en BPA plus élevées.

Pour tester cette hypothèse, il serait important de déterminer la contribution des concentrations plasmatiques en BPAG aux concentrations tissulaires en BPA, spécialement au niveau du foie, à travers la comparaison des concentrations en BPA du foie de fœtus traités au BPAG ou au BPA. En accord avec cette hypothèse, des résultats préliminaires de concentrations de BPA dans des tissus de fœtus ayant subi des perfusions intraveineuses de BPAG ou BPA, montrent que les concentrations tissulaires fœtales en BPA obtenues au cours des perfusions de BPAG sont équivalentes à celles obtenues au cours des perfusions de doses équimolaires de BPA. En particulier, les concentrations molaires en BPA normalisées par la dose sont plus importantes dans le foie fœtal suite à la perfusion de BPAG qu'à l'issue d'une perfusion de BPA (Figure 15).

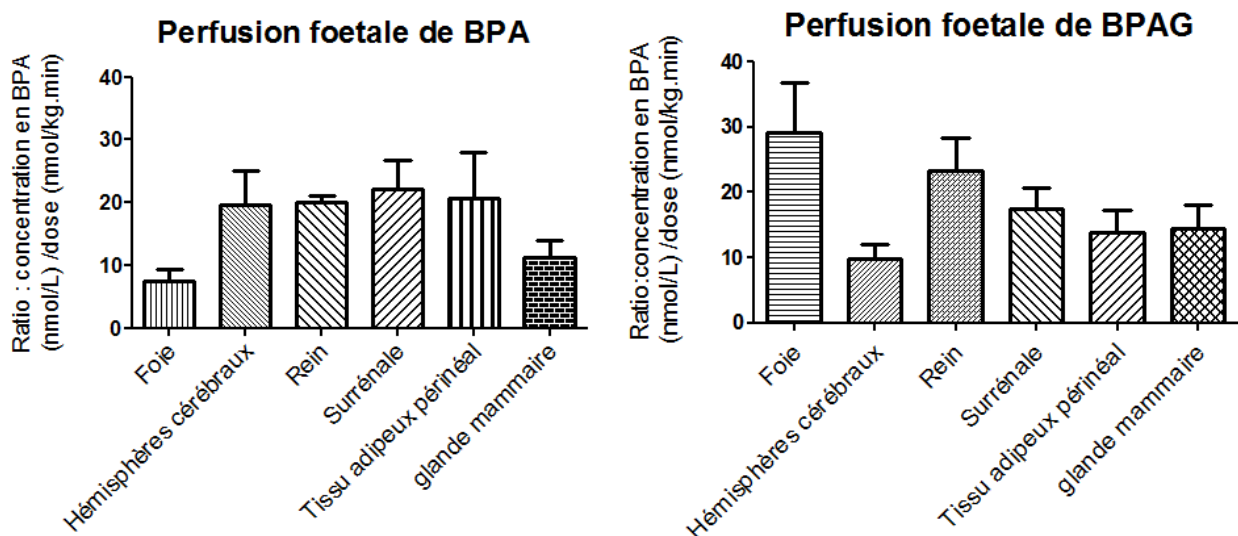


Figure 15. Distribution tissulaire fœtale en BPA après perfusion IV fœtale de BPA ou BPAG

Les homogénats tissulaires ont été préparés en présence de méthanol (1mL/g de tissu) avec un homogénéiseur Ultra-Turrax, une extraction à l'acétonitrile a ensuite été réalisée avant quantification du BPA par UPLC-MS/MS comme décrit précédemment (180).

Les résultats de concentrations tissulaires sont présentés sous forme de ratio moyen ($\pm$ écart type) de concentrations molaires en BPA par la dose molaire de perfusion fœtale. Les résultats ont été obtenus

pour 5 fœtus traités au BPA (dont 2 fœtus ont reçu une dose de $0.9 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et 3 fœtus ont reçu des doses de 3.6, 5.7 et $31.3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), et 5 fœtus traités au BPAG (dont 2 fœtus ont reçu une dose de $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et 3 fœtus ont reçu des doses de 1.8, 8 et $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

Ces résultats sont préliminaires et doivent être confirmés par l'utilisation d'un plus grand nombre de fœtus et d'une méthode de dosage validée.

Discussion générale et perspectives

Parmi les perturbateurs endocriniens connus, le BPA est probablement le plus massivement produit de par le monde (23). La présence désormais ubiquitaire du BPA dans l'environnement et le fait que ses métabolites soient détectés dans une vaste majorité des prélèvements urinaires humains rendent nécessaire une évaluation approfondie de sa toxicité pour l'Homme et l'environnement. Cependant, malgré les milliers d'études réalisées, le niveau de l'exposition humaine au BPA et son impact sur la santé humaine font toujours l'objet de controverses importantes au sein de la communauté scientifique qui peuvent expliquer les divergences des avis émis par agences réglementaires (11,12,24).

Parmi les préoccupations liées à la présence de BPA dans l'environnement, l'exposition prénatale humaine est probablement la plus importante car de grandes incertitudes subsistent sur les effets sanitaires potentiels d'une exposition prénatale au BPA sur la glande mammaire ainsi que sur les systèmes reproductif, métabolique, neurocomportemental et immunitaire. Ces incertitudes sont liées au fait que les résultats des études *in vivo* montrant les effets néfastes d'une faible exposition *in utero* (98,99,181) sont difficilement extrapolables à l'homme pour plusieurs raisons :

- Il existe une incohérence entre les quantités de BPA absorbées évaluées chez l'Homme à partir des données urinaires, et certaines données des concentrations plasmatiques en BPA, de l'ordre du ng.mL^{-1} , soit près de 100 à 1000 fois supérieures aux valeurs prédites par les modèles PK. Par conséquent, une controverse subsiste concernant les concentrations plasmatiques en BPA non-conjugué représentatives de l'exposition chez l'Homme adulte. Or ces concentrations sont déterminantes de l'exposition fœtale.
- Les différences interspécifiques de disposition du BPA dans l'unité fœto-maternelle peuvent entraîner des différences importantes d'exposition fœtales pour une même dose externe maternelle. Par conséquent, une dose externe maternelle pertinente vis-à-vis de l'exposition externe humaine, appliquée sur un modèle animal, n'est pas forcément associée à une exposition prénatale représentative de l'exposition prénatale humaine.
- Il n'existe pas à l'heure actuelle de données qui permettent d'attester que la mesure des concentrations en BPA dans les fluides d'origine maternelle constitue un critère pour caractériser l'exposition fœtale. De plus, le caractère valide des données de BPA non-conjugué dans le sang de cordon ne peut pas être attesté en vue de la controverse liée à la mesure de BPA non-conjugué dans le plasma. Par conséquent l'exposition humaine prénatale est inconnue.

L'objectif principal des travaux présentés dans ce manuscrit était de développer un modèle TK qui permette de prédire l'exposition du fœtus humain au BPA.

La réalisation des études TK du BPA et du BPAG sur le modèle du fœtus ovin instrumenté a dans un premier temps permis la quantification des principaux processus de clairance et de distribution du BPA et du BPAG au sein de l'unité fœto-maternelle, et la détermination de la fraction de la dose de BPA reçue par la mère qui atteint la circulation générale fœtale.

Ces données TK ont ensuite servies au développement d'un modèle ovin dont la composante maternelle a été calibrée à l'aide de données humaines obtenues suite à une administration orale de BPA (33). Le modèle fœto-maternel humanisé développé a finalement permis de prédire l'exposition humaine fœtale pour un scénario d'exposition maternelle au BPA qui s'appuie sur les estimations moyennes de l'EFSA.

Détermination de la fraction de la dose de BPA reçue par la mère qui atteint la circulation générale fœtale

La Figure 16 décrit le devenir d'une quantité donnée de BPA dans l'unité fœto-maternelle suite à une exposition maternelle par voie alimentaire tel que prédit par le modèle TK.

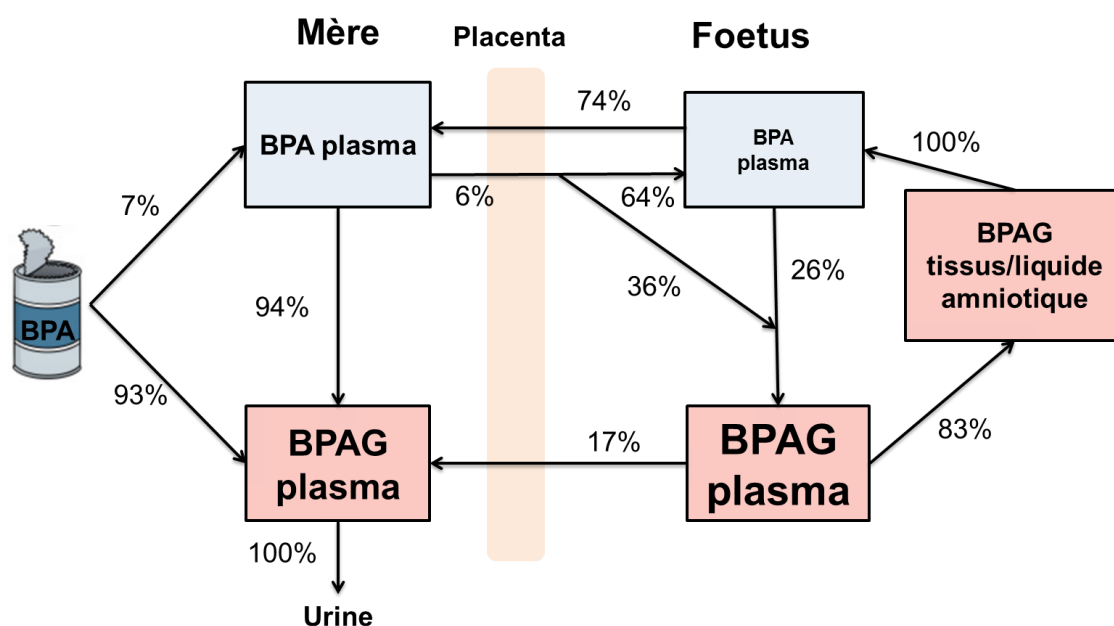


Figure 16. Devenir d'une dose externe de BPA dans l'unité fœto-maternelle lors d'une exposition maternelle au BPA d'origine alimentaire.

Les fractions indiquées représentent la contribution des flux (représentés par des flèches) à l'élimination totale de la molécule (BPA ou BPAG) depuis le compartiment en question. La taille des caractères dans les compartiments représente les niveaux relatifs des concentrations observées dans le cadre d'une exposition maternelle au BPA.

Dans un contexte d'exposition via l'alimentation, notre approche modélisatrice a permis d'estimer que 7% de la dose externe maternelle atteignent la circulation systémique sous forme de BPA, la fraction restante de la dose absorbée étant glucuronoconjuguée par le foie avant d'atteindre la circulation générale. La quasi-totalité du BPA apportée par voie orale étant absorbée, la dose interne maternelle est équivalente à la dose externe, i.e. la dose reçue par voie alimentaire. Quatre-vingt-quatorze % du BPA ayant atteint la circulation systémique maternelle sous forme inchangée est glucuronoconjugué puis éliminé sous forme de BPAG dans les urines, tandis que **6% de cette dose de BPA maternelle biodisponible traversent le placenta**, et correspondent donc à la dose interne fœtale. **Une fraction de 36% de cette dose interne fœtale est glucuronoconjuguée avant d'atteindre la circulation fœtale et les 64% restant atteignent la circulation fœtale systémique sous forme native.** Cela signifie que la dose interne fœtale de BPA correspond à 6% de la dose maternelle biodisponible (7% de la dose externe), soit 0.42% de la dose interne maternelle, et que la dose fœtale de BPA biodisponible correspond à 64% de cette même fraction de 0.42%, soit 0.27% de la dose interne maternelle.

Considérant une mère de 70 kg et un fœtus de 2 kg, rapportée au poids corporel, la dose interne fœtale (0.42% rapportés à 2 kg) est donc environ 7 fois inférieure à la dose interne maternelle (100% rapportés à 70kg), soit 0.21% vs 1.4% par kg de poids corporel. Cependant, **en termes de dose biodisponible, la dose fœtale (0.27% rapportés à 2kg) est équivalente à la dose maternelle (7% rapportés à 70kg), soit 0.10 vs 0.13% par kg de poids corporel.** **Vingt-six% de la dose biodisponible fœtale est glucuronoconjuguée tandis que 74% de la dose est transférée du fœtus à la mère par passage transplacentaire.** **Le BPAG formé par le fœtus est ensuite majoritairement éliminé sous forme de BPA (83%) via un cycle futile de conjugaison-déconjugaison, la fraction restante de BPAG (17%) est éliminée via la clairance placentaire fœto-maternelle.**

Détermination des concentrations moyennes en BPA attendues dans le plasma fœtal chez l'Homme

Pour un schéma d'exposition maternelle répétée au BPA qui mime l'exposition par voie alimentaire à la dose moyenne estimée par l'EFSA, le modèle TK développé nous a permis de prédire des **concentrations plasmatiques humaines moyennes en BPA non-conjugué fluctuant entre 14 et 140 pg.L⁻¹ chez l'adulte et entre 11 et 23 pg.L⁻¹ chez le fœtus**, soit des valeurs bien en dessous des limites de détection des techniques analytiques actuelles qui sont de quelques dizaines de ng.L⁻¹. Ces valeurs prédites sont bien inférieures à certaines des valeurs très élevées (plusieurs centaines de ng.L⁻¹) des concentrations en

BPA non-conjuguée dans le sang de cordon rapportées dans des études de biosurveillance humaine.

Des auteurs suggèrent que les valeurs élevées des concentrations en BPA dans le sang de cordon peuvent être expliquées par l'immaturité des systèmes métaboliques fœtaux (138,169). Nos données TK indiquent qu'il est cependant peu probable que l'immaturité des systèmes métaboliques fœtaux humains en fin de grossesse entraîne une diminution significative de la clairance fœtale et une augmentation de l'exposition fœtale au BPA comparativement à l'adulte, et ce pour deux raisons:

- La première raison est que même si la clairance intrinsèque fœtale du BPA est inférieure à celle de l'adulte, la clairance hépatique fœtale rapportée au poids du fœtus est deux fois plus élevée que celle de l'adulte chez le mouton. Cette différence s'explique par le fait que la clairance de glucuronoconjugaison du fœtus comme celle de l'adulte est équivalente au débit sanguin hépatique qui est 2 fois plus élevé chez le fœtus.
- La deuxième raison est que, contrairement à l'adulte, la glucuronoconjugaison du BPA par le fœtus n'a pas une contribution majeure à sa clairance qui est majoritairement placentaire. Chez le fœtus ovin, une inhibition totale de la clairance métabolique fœtale du BPA aurait un impact mineur sur sa clairance totale et résulterait en une clairance fœtale du BPA toujours 4 fois supérieure à celle de l'adulte.

Nos résultats suggèrent donc que les concentrations élevées en BPA non conjugué rapportées dans certaines études ne sont pas représentatives de l'exposition humaine au BPA et que la maîtrise des contaminations lors de la mesure des concentrations plasmatiques en BPA représente un challenge.

Alors que chez l'adulte la glucuronoconjugaison représente un mécanisme de detoxification permettant l'élimination des métabolites dans les urines, nous avons montré que la clairance de glucuronoconjugaison fœtale ne fait en réalité qu'augmenter l'exposition du fœtus au BPA au travers du cycle futile de conjugaison-déconjugaison.

Les concentrations plasmatiques maternelles en BPAG prédites par notre modèle TK fluctuent de façon très importante (entre 1.6 et 40 ng.L⁻¹) en fonction du délai qui sépare les mesures de l'ingestion de BPA alors que **les concentrations moyennes en BPAG attendues dans le plasma du fœtus humain sont elles relativement stables et de l'ordre de 40 ng.L⁻¹**. Les concentrations moyennes en BPAG dans le sang du fœtus à la fin

de la gestation sont ainsi prédites à une valeur moyenne légèrement au-dessus ou proche des limites de quantification actuelles des méthodes analytiques (55,169,172). Ce résultat suggère que la mesure des concentrations en BPAG dans le sang de cordon, qui ne peut pas être entachée d'erreur liée à une possible contamination des échantillons contrairement à celle des concentrations plasmatiques en BPA, constitue un marqueur pertinent de l'exposition fœtale au BPA au cours des derniers mois de grossesse. En particulier, les concentrations plasmatiques en BPAG du sang de cordon pourraient servir d'indicateur fiable de la dose cumulée de BPA à laquelle la mère a été exposée au cours des derniers mois de grossesse.

Le modèle TK a également permis de montrer **qu'une exposition maternelle ponctuelle à une dose élevée de BPA (correspondant au 95^e centile) avait un impact important sur le profil temporel des concentrations plasmatiques fœtales en BPA et BPAG qui restent plus élevées pendant plusieurs semaines**. Il est donc important de prendre en considération ces événements d'exposition même ponctuels pour l'évaluation de l'exposition fœtale au BPA. Cependant, les connaissances quant à la fréquence de ces événements d'exposition au sein de la population et pour une personne donnée au cours des derniers mois de la grossesse sont limitées. Par ailleurs, les simulations que nous avons réalisées ne correspondent pas au pire scénario envisageable mais plutôt à un profil moyen attendu selon les estimations des valeurs moyennes d'expositions de l'EFSA. Des concentrations plasmatiques plus de cinq fois plus élevées devraient être observées pour les 5% de la population les plus exposés au BPA sur la base des données urinaires (11). Contrairement à ce qui est pratiqué dans l'évaluation de la sécurité d'un médicament où la dose est maîtrisée et où une balance bénéfice/risque est considérée, les effets néfastes d'un contaminant environnemental ne peuvent être considérés comme acceptables même si ils ne concernent qu'une fraction infime de la population correspondant à celle qui est la plus exposée. Ceci est d'autant plus vrai en ce qui concerne le BPA car des millions de personnes sont potentiellement exposés quotidiennement dans le monde.

Notre approche modélisatrice TK qui a permis une première estimation de l'exposition fœtale au BPA et au BPAG chez l'Homme, pourrait permettre l'établissement de valeurs de référence qui pourraient servir de guide pour l'interprétation des données de biosurveillance humaine. De plus, les connaissances mécanistiques apportées par notre approche ne sont pas applicables uniquement au BPA et le modèle générique développé pour le bisphénol A pourrait être appliqué à l'avenir pour d'autres xénobiotiques, en particulier les molécules de substitution du BPA comme les bisphénols F et S.

Les prédictions réalisées par l'approche modélisatrice présentées dans ce manuscrit doivent être confirmées par un plus grand nombre d'études de biosurveillance avec des mesures des concentrations en BPAG et BPA dans le sang de cordon. En particulier, la valeur prédictive des concentrations en BPAG du sang de cordon, à partir de l'exposition maternelle cumulée au BPA au cours de la grossesse doit être vérifiée en mettant en relation l'exposition maternelle au BPA en termes de dose évaluée au travers des bilans urinaires maternels, et les concentrations en BPAG du sang de cordon correspondantes (étude en cours).

Notre approche TK présente des limites inhérentes au modèle animal et à l'approche TK compartimentale qu'il convient d'analyser.

Limites liées au modèle du fœtus ovin

Une première limite de notre approche TK est que, **le modèle animal utilisé au laboratoire permet la réalisation de TK fœtale uniquement à partir du troisième tiers de la gestation**. La question de l'exposition fœtale au BPA à des stades plus précoces du développement, qui représentent une période critique, reste sans réponse. L'extrapolation des expositions fœtales à des stades de gestation plus précoces nécessite de prendre en compte l'évolution au cours de la gestation des processus de transfert placentaire et des processus métaboliques.

L'analyse des variations de ces processus physiologiques au cours de la gestation indique que l'exposition fœtale au BPA en termes de dose devrait être maximale à la fin de la gestation comparativement aux périodes plus précoces du développement :

- Au cours de la grossesse, la surface d'échange placentaire augmente (de 3.4 à 12.6 m² entre le 7^{ème} mois de gestation et le terme) ainsi que le débit sanguin utérin (de 50 mL.min⁻¹ au stade 10 semaines de grossesse à 600 mL.min⁻¹ au moment du terme) (182) alors que la distance qui sépare les circulations maternelle et fœtale est réduite (de 50-100µm au 2^{ème} mois à 4-5µm au moment du terme).
- Il a été montré que le BPA pouvait être le substrat de protéines d'efflux (P-gp) qui pourraient réduire le passage du BPA de la mère au fœtus (183,184). La diminution de l'expression de ces protéines d'efflux à la fin de la gestation (Chapitre I. IV. A. 2) pourrait également accroître l'exposition du fœtus au BPA.

En ce qui concerne le devenir du BPA transféré au fœtus à des stades plus précoces de la gestation, l'ontogénie des systèmes métaboliques suggère que la faible activité de glucuronidation du BPA montrée chez le fœtus ovin (76) et humain (110,111,138) en début de gestation pourrait être en partie compensée par les activités précoces de

sulfoconjugaison, les capacités du sulfoconjugaison étant supérieures à celles de glucuronoconjugaison jusqu'à la moitié de la grossesse (chapitre I. IV.A.1).

Limites de l'approche toxicocinétique compartimentale

Une deuxième limite de notre approche est inhérente à l'approche compartimentale qui ne peut pas apporter d'informations sur les cinétiques locales (tissulaires) car les modèles compartimentaux sont définis mathématiquement à partir des données plasmatiques et non à partir de considérations anatomiques, physiologiques, biochimiques. En conséquence, bien que notre approche nous ait permis de décrire le cycle futile de conjugaison-déconjugaison du BPA d'un point de vue TK, **les sites d'hydrolyse du BPAG n'ont pas été identifiés.**

De tels cycles de conjugaison-réactivation des métabolites glucuronoconjugué ont déjà été révélés comme responsables d'une augmentation de l'exposition pour certains composés, et spécialement dans notre cas, lorsque le conjugué s'accumule (141,178,185).

Par conséquent, bien que la contribution de l'hydrolyse du BPAG à l'exposition fœtale au BPA non-conjugué ait été déterminée comme faible au niveau plasmatique, sa contribution aux concentrations en BPA non-conjugué au niveau des tissus fœtaux reste à évaluer, en particulier pour les tissus sensibles aux effets du BPA. Il n'existe à notre connaissance à l'heure actuelle aucune donnée expérimentale qui permet de démontrer ou de rejeter l'hypothèse selon laquelle l'hydrolyse des métabolites conjugués du BPA au niveau tissulaire pourrait conduire à une augmentation des concentrations tissulaires en BPA. Le maintien de niveaux élevés de BPAG associés à la capacité des tissus fœtaux à réactiver le BPAG en BPA pourrait être responsable d'un découplage entre les concentrations circulantes et tissulaires en BPA, résultant en un ratio de concentrations en BPA tissus/plasma plus élevé chez le fœtus que chez l'adulte.

Contribution de l'hydrolyse du BPAG aux concentrations en BPA des tissus fœtaux

La contribution de l'hydrolyse du BPAG aux concentrations en BPA non-conjugué des tissus fœtaux peut être évaluée au travers des concentrations tissulaires fœtales en BPA associée à une exposition fœtale systémique au BPAG. Un essai préliminaire de dosage du BPA dans des tissus de fœtus ayant reçu des perfusions intraveineuses contrôlées de BPAG ou de BPA suggère que les concentrations tissulaires fœtales en BPA obtenues au cours de la perfusion IV de BPAG sont équivalentes à celles obtenues au cours de la perfusion d'une dose molaire équivalente en BPA (Chapitre II. III.D), ce qui suggère qu'à dose molaire

équivalente, le BPAG pourrait exercer des effets similaires à ceux du BPA malgré des concentrations plasmatiques plus faibles.

Alternativement, un biomarqueur fœtal d'effets du BPA pourrait servir de révélateur de l'exposition des tissus fœtaux au BPA associée à une exposition fœtale systémique au BPAG et du degré d'occupation des récepteurs au niveau des tissus cibles. C'est dans cet objectif que nous avons comparé les effets d'une exposition fœtale équimolaire au BPA ou au BPAG sur des biomarqueurs plasmatiques et/ou tissulaires fœtaux, identifiés à l'aide d'une approche sans *a priori* basée sur l'évaluation des altérations du protéome.

Cette étude a montré qu'une exposition fœtale systémique au BPAG peut reproduire des effets d'une exposition systémique à la même dose molaire de BPA sur la réponse immunitaire et le métabolisme. Les altérations du protéome les plus importantes ont été mises en évidence dans le foie des fœtus qui ont reçu du BPAG alors que les concentrations plasmatiques en BPA associées à la perfusion de BPAG sont prédites à des valeurs environ 10 fois inférieures à celles mesurées chez les fœtus qui ont reçu du BPA.

Les glucuronidases responsables de l'hydrolyse du BPAG sont exprimées dans la quasi-totalité des tissus, avec une activité plus élevée au niveau du foie (141). Elles sont principalement situées dans les lysosomes où elles hydrolysent les glucuronides issus de molécules endogènes et de xénobiotiques. L'hydrolyse du BPAG observé chez le fœtus se produit donc probablement au niveau intracellulaire et implique un transport du BPAG via des transporteurs étant donné sa nature hydrophile. L'influence des protéines d'influx comme les OATP (organic anion-transporting polypeptide) sur les propriétés PK de certains médicaments a déjà été démontrée. Les récepteurs OATP1B1 et 1B3 favorisent la clairance métabolique de certains composés en les transportant de la circulation sanguine à l'intérieur des hépatocytes où ils sont ensuite métabolisés (186). En particulier, l'OATP1B1, principalement exprimé au niveau des membranes sinusoïdales hépatiques, est capable de transporter les métabolites glucuronoconjugués et sulfoconjugués de molécules endogènes comme ceux de l'œstradiol et de la bilirubine à l'intérieur des hépatocytes (186), mais est également capable de transporter les métabolites de certaines substances exogènes tels le sorafénib-glucuronide (187). Il n'est donc pas exclu que l'OATP1B1 ou des transporteurs similaires soient impliqués dans le transport du BPAG dans les hépatocytes conduisant à son hydrolyse.

Les résultats préliminaires des dosages de BPA dans le foie des fœtus ovins exposés au BPAG (Chapitre II. III.D), la présence de récepteurs OATP1B1 au niveau du foie fœtal (188) et l'importance du débit sanguin hépatique fœtal et de l'activité des glucuronidases hépatiques (124,141), sont autant d'éléments qui confortent l'hypothèse selon laquelle la

réactivation du BPAG au niveau du foie fœtal serait responsable des effets du BPAG mis en évidence dans notre étude. **De façon plus générale, nos résultats suggèrent que l'exposition fœtale critique au BPA en termes d'effet ne serait pas l'exposition systémique fœtale au BPA mais l'exposition des tissus cibles.**

Dans notre étude protéomique, nous avons réalisé une perfusion aux fœtus à une dose molaire de BPAG qui est environ 1000 fois supérieure à la dose de BPA à laquelle l'homme est exposé. La dose de BPA choisie correspond à la dose minimale qui a été associée à des concentrations mesurables de BPA dans le plasma fœtal (de l'ordre du ng.mL^{-1}). La dose-proportionnalité de la TK fœtal du BPA et du BPAG pour une large gamme de doses englobant les doses testées (article 2) a précédemment été démontrée et indique que l'exposition fœtale au BPA associée à l'hydrolyse du BPAG peut être extrapolée pour des niveaux de dose faibles. Ce mécanisme à l'origine des effets se produisant également à des doses faibles, Il est désormais nécessaire d'évaluer les effets du BPAG mis en évidence via notre approche protéomique pour des niveaux d'exposition systémique fœtale au BPAG plus représentatifs de l'exposition fœtale humaine afin d'évaluer le risque lié à l'exposition fœtale au BPAG.

Nos résultats ne nous permettent cependant pas d'exclure la possibilité d'effets directs du BPAG sur le protéome fœtal étant donné que les deux groupes de fœtus ont été exposés au BPA et au BPAG. Une approche complémentaire *in vitro* sur culture d'hépatocytes basée sur une manipulation pharmacologique de l'activité des glucuronidases pourrait permettre de déterminer si les effets du BPAG sont dépendants ou non de son hydrolyse.

Quel que soit le mécanisme d'action direct ou indirect du BPAG, nos résultats indiquent que le BPAG ne peut pas être considéré comme un métabolite inactif et soulèvent la question du risque lié à l'exposition du fœtus humain au BPAG.

Conclusion

Notre approche modélisatrice TK a permis de prédire que dans un contexte d'exposition maternelle répétée au BPA par voie alimentaire, les concentrations circulantes en BPAG attendues chez le fœtus humain en fin de grossesse sont maintenues à un niveau qui reflète la dose cumulée de BPA à laquelle la mère a été exposée. Contrairement aux concentrations en BPA dans le sang de cordon qui peuvent être biaisées par des contaminations et qui sont très dépendantes du délai entre l'exposition et le prélèvement, les concentrations correspondantes en BPAG, prédites peu fluctuantes et supérieures aux limites de quantification des méthodes analytiques, pourraient ainsi servir de marqueur pertinent de l'exposition fœtale humaine au BPA au cours du dernier tiers de la grossesse.

Notre étude protéomique suggère qu'une exposition du fœtus ovin au BPAG affecte des voies physiologiques similaires à celles influencées par le BPA, notamment au niveau du foie. Les risques liés à la surexposition fœtale au BPAG doivent donc faire l'objet d'études complémentaires qui devraient être pris en compte dans l'évaluation du risque.

Références bibliographiques

1. Guillette LJ, Gunderson MP. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reprod Camb Engl*. 2001 Dec;122(6):857–64.
2. Guillette LJ. Endocrine Disrupting Contaminants—Beyond the Dogma. *Environ Health Perspect*. 2006 Apr;114(Suppl 1):9–12.
3. Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol*. 1998 Jul;28(4):319–61.
4. Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med*. 1971 Apr 15;284(15):878–81.
5. Colborn T, Clement C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. *Adv Mod Environ Toxicol USA* [Internet]. 1992 [cited 2016 Jul 26]; Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9545328>
6. World Health Organization. WHO | Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors [Internet]. WHO. [cited 2016 Aug 19]. Available from: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/
7. 13_substances_chimiques_v3.pdf [Internet]. [cited 2016 Jul 26]. Available from: http://www.sante-environnement-travail.fr/IMG/pdf/13_substances_chimiques_v3.pdf
8. Médecins en guerre contre les perturbateurs endocriniens [Internet]. [cited 2016 Jul 27]. Available from: <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2016/05/12/24962-medecins-guerre-contre-perturbateurs-endocriniens>
9. Foucart S. Bisphénol A, phtalates, pesticides : la Commission européenne condamnée pour son inaction. *Le Monde.fr* [Internet]. 2015 Dec 16 [cited 2016 Jul 27]; Available from: http://www.lemonde.fr/planete/article/2015/12/16/bisphenol-a-phtalates-pesticides-bruxelles-condamnee-pour-son-inaction_4833090_3244.html
10. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health Glob Access Sci Source*. 2015;14:13.
11. EFSA E Flavourings and Processing Aids (CEF). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J*. 2015 Jan 1;13(1):n/a-n/a.
12. Opinion on the assessment of the risks associated with bisphenol A for human health, and on toxicological data and data on the use of bisphenols S, F, M, B,

- AP, AF and BADGE | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. [cited 2016 Jul 17]. Available from: <https://www.anses.fr/en/content/opinion-assessment-risks-associated-bisphenol-human-health-and-toxicological-data-and-data>
13. Cabaton NJ, Canlet C, Wadia PR, Tremblay-Franco M, Gautier R, Molina J, et al. Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ Health Perspect.* 2013 May;121(5):586–93.
14. Wadia PR, Cabaton NJ, Borrero MD, Rubin BS, Sonnenschein C, Shioda T, et al. Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PloS One.* 2013;8(5):e63902.
15. Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, Rubin BS, et al. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2008 Dec;26(3–4):210–9.
16. Acevedo N, Davis B, Schaeberle CM, Sonnenschein C, Soto AM. Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environ Health Perspect.* 2013 Sep;121(9):1040–6.
17. Gauderat G, Picard-Hagen N, Toutain P-L, Corbel T, Viguié C, Puel S, et al. Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Int.* 2016 Jan;86:52–9.
18. L'ECHA adopte la proposition de l'Anses pour un classement plus sévère du bisphénol A en tant que toxique pour la reproduction | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. [cited 2016 Aug 21]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/l%E2%80%99echa-adopte-la-proposition-de-l%E2%80%99anses-pour-un-classement-plus-s%C3%A9v%C3%A8re-du-bisph%C3%A9nol-en-tant>
19. Acconcia F, Pallottini V, Marino M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc.* 2015 Dec;13(4):1559325815610582.
20. N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud'homme SM, et al. Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. *PLOS ONE.* 2012 déc;7(12):e51579.
21. Doherty LF, Bromer JG, Zhou Y, Aldad TS, Taylor HS. In Utero Exposure to Diethylstilbestrol (DES) or Bisphenol-A (BPA) Increases EZH2 Expression in the Mammary Gland: An Epigenetic Mechanism Linking Endocrine Disruptors to Breast Cancer. *Horm Cancer.* 2010 Jun;1(3):146–55.
22. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SAM, Perrotti LI, Mandal SS. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 May;141:160–70.

23. Vogel SA. The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A "Safety." *Am J Public Health*. 2009 Nov;99(Suppl 3):S559–66.
24. Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application [Internet]. [cited 2016 Jul 17]. Available from: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm064437.htm>
25. Global BPA Production to Exceed 5.4 Mln Tonnes by 2015, According to In-demand Report by Merchant Research & Consulting [Internet]. PRWeb. [cited 2016 Aug 23]. Available from: <http://www.prweb.com/releases/2014/04/prweb11761146.htm>
26. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc*. 2015 Sep;13(3):1559325815598308.
27. Heindel JJ, Newbold RR, Bucher JR, Camacho L, Delclos KB, Lewis SM, et al. NIEHS/FDA CLARITY-BPA research program update. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2015 Dec;58:33–44.
28. Yang X, Doerge DR, Teeguarden JG, Fisher JW. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for assessment of human exposure to bisphenol A. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Dec 15;289(3):442–56.
29. vom Saal FS, Welshons WV. Evidence that bisphenol A (BPA) can be accurately measured without contamination in human serum and urine, and that BPA causes numerous hazards from multiple routes of exposure. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Dec;398(1–2):101–13.
30. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*. 2001 Feb;14(2):149–57.
31. Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Apr 1;228(1):114–34.
32. Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Yang X, Fisher JW, Seryak LM, et al. 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Oct 15;288(2):131–42.
33. Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ Int*. 2015 Oct;83:107–15.
34. Geens T, Apelbaum TZ, Goeyens L, Neels H, Covaci A. Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Addit Contam Part Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010 Nov;27(11):1627–37.

35. Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2011 Jan 10;683(2):227–33.
36. Gyllenhammar I, Glynn A, Darnerud PO, Lignell S, van Delft R, Aune M. 4-Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. *Environ Int*. 2012 Aug;43:21–8.
37. Sajiki J, Miyamoto F, Fukata H, Mori C, Yonekubo J, Hayakawa K. Bisphenol A (BPA) and its source in foods in Japanese markets. *Food Addit Contam*. 2007 Jan;24(1):103–12.
38. Wei X, Huang Y, Wong MH, Giesy JP, Wong CKC. Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta, China. *Chemosphere*. 2011 Sep;85(1):122–8.
39. 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 Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2011 May;28(5):676–85.
40. Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam Part Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2009 Jun;26(6):928–37.
41. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett*. 2008 Jan 30;176(2):149–56.
42. Santhi VA, Sakai N, Ahmad ED, Mustafa AM. Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Sci Total Environ*. 2012 Jun 15;427–428:332–8.
43. Dupuis A, Migeot V, Cariot A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S. Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2012 Nov;19(9):4193–205.
44. Rajasärkkä J, Pernica M, Kuta J, Lašňák J, Šimek Z, Bláha L. Drinking water contaminants from epoxy resin-coated pipes: A field study. *Water Res*. 2016 Jul 15;103:133–40.
45. Mendonca K, Hauser R, Calafat AM, Arbuckle TE, Duty SM. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014 Jan;87(1):13–20.
46. Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, et al. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect*. 2009 Sep;117(9):1368–72.

47. Hartle JC, Navas-Acien A, Lawrence RS. The consumption of canned food and beverages and urinary Bisphenol A concentrations in NHANES 2003-2008. *Environ Res.* 2016 Jun 27;150:375–82.
48. Viñas P, López-García I, Campillo N, Rivas RE, Hernández-Córdoba M. Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry using the Taguchi design method for bisphenol migration studies from thermal printer paper, toys and baby utensils. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Aug;404(3):671–8.
49. Zimmerman-Downs JM, Shuman D, Stull SC, Ratzlaff RE. Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. *J Dent Hyg JDH Am Dent Hyg Assoc.* 2010;84(3):145–50.
50. Maserejian NN, Trachtenberg FL, Wheaton OB, Calafat AM, Ranganathan G, Kim H-Y, et al. Changes in urinary bisphenol A concentrations associated with placement of dental composite restorations in children and adolescents. *J Am Dent Assoc* 1939. 2016 Apr 13;
51. Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett.* 2008 Jul 10;179(3):155–62.
52. Matsumoto H, Adachi S, Suzuki Y. Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2005 May;48(4):459–66.
53. Hormann AM, Vom Saal FS, Nagel SC, Stahlhut RW, Moyer CL, Ellersieck MR, et al. Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA). *PloS One.* 2014;9(10):e110509.
54. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Sep;398(1):571–6.
55. Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Doerge DR. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2016 Jun;92:129–42.
56. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol.* 2002 Oct;15(10):1281–7.
57. Becker K, Göen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Müller J, et al. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health.* 2009 Nov;212(6):685–92.
58. Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect.* 2008 Jan;116(1):39–44.

59. Geens T, Bruckers L, Covaci A, Schoeters G, Fierens T, Sioen I, et al. Determinants of bisphenol A and phthalate metabolites in urine of Flemish adolescents. *Environ Res.* 2014 Oct;134:110–7.
60. Provencher G, Bérubé R, Dumas P, Bienvenu J-F, Gaudreau E, Bélanger P, et al. Determination of bisphenol A, triclosan and their metabolites in human urine using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014 Jun 27;1348:97–104.
61. Ndaw S, Remy A, Jargot D, Robert A. Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study. *Int Arch Occup Environ Health.* 2016 Aug;89(6):935–46.
62. Kaddar N, Bendridi N, Harthé C, de Ravel MR, Bienvenu A-L, Cuilleron C-Y, et al. Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Anal Chim Acta.* 2009 Jul 10;645(1–2):1–4.
63. He Y, Miao M, Herrinton LJ, Wu C, Yuan W, Zhou Z, et al. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res.* 2009 Jul;109(5):629–33.
64. Koch HM, Kolossa-Gehring M, Schröter-Kermani C, Angerer J, Brüning T. Bisphenol A in 24 h urine and plasma samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2009: a retrospective exposure evaluation. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2012 Nov;22(6):610–6.
65. Vandenberg LN, Gerona RR, Kannan K, Taylor JA, van Breemen RB, Dickenson CA, et al. A round robin approach to the analysis of bisphenol A (BPA) in human blood samples. *Environ Health Glob Access Sci Source.* 2014;13(1):25.
66. Gayrard V, Lacroix MZ, Collet SH, Viguié C, Bousquet-Melou A, Toutain P-L, et al. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect.* 2013 Aug;121(8):951–6.
67. Yoo SD, Shin BS, Kwack SJ, Lee BM, Park KL, Han SY, et al. Pharmacokinetic disposition and tissue distribution of bisphenol A in rats after intravenous administration. *J Toxicol Environ Health A.* 2000 Sep 29;61(2):131–9.
68. Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, Drury B, Rottinghaus G, Hunt PA, et al. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect.* 2011 Apr;119(4):422–30.
69. Doerge DR, Twaddle NC, Woodling KA, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Oct 1;248(1):1–11.
70. Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno Y. Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 2002 Jul;68(1):32–42.

71. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult CD-1 mice: inter-species comparisons with Sprague-Dawley rats and rhesus monkeys. *Toxicol Lett.* 2011 Dec 15;207(3):298–305.
72. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Sep 1;247(2):158–65.
73. Trdan Lušin T, Roškar R, Mrhar A. Evaluation of bisphenol A glucuronidation according to UGT1A1*28 polymorphism by a new LC-MS/MS assay. *Toxicology.* 2012 Feb 6;292(1):33–41.
74. Mazur CS, Kenneke JF, Hess-Wilson JK, Lipscomb JC. Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2010 Dec;38(12):2232–8.
75. Pritchett JJ, Kuester RK, Sipes IG. Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2002 Nov;30(11):1180–5.
76. Corbel T, Perdu E, Gayrard V, Puel S, Lacroix MZ, Viguié C, et al. Conjugation and deconjugation reactions within the fetoplacental compartment in a sheep model: a key factor determining bisphenol A fetal exposure. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2015 Apr;43(4):467–76.
77. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere.* 2008 Dec;74(1):33–6.
78. Upmeier A, Degen GH, Diel P, Michna H, Bolt HM. Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch Toxicol.* 2000 Oct;74(8):431–6.
79. Sakamoto H, Yokota H, Kibe R, Sayama Y, Yuasa A. Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Nov 14;1573(2):171–6.
80. Collet SH, Picard-Hagen N, Lacroix MZ, Puel S, Viguié C, Bousquet-Melou A, et al. Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015 May 1;284(3):323–9.
81. Edginton AN, Ritter L. Predicting Plasma Concentrations of Bisphenol A in Children Younger Than 2 Years of Age after Typical Feeding Schedules, using a Physiologically Based Toxicokinetic Model. *Environ Health Perspect.* 2009 Apr;117(4):645–52.
82. Arms AD, Travis CC, United States. Environmental Protection Agency. Office of Health and Environmental Assessment. Reference physiological parameters in pharmacokinetic modeling [microform] / Angela D. Arms and Curtis C. Travis.

- Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment; 1988.
83. Collet S. Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A [Internet]. 2012 [cited 2016 Jul 19]. Available from: <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001782/>
 84. Vom Saal FS, VandeVoort CA, Taylor JA, Welshons WV, Toutain P-L, Hunt PA. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2014 Jun;45:105–16.
 85. Guignard D, Gauderat G, Gayrard V, Lacroix MZ, Picard-Hagen N, Puel S, et al. Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2016 Jul;93:82–8.
 86. Sieli PT, Jašarevic´ E, Warzak DA, Mao J, Ellersieck MR, Liao C, et al. Comparison of Serum Bisphenol A Concentrations in Mice Exposed to Bisphenol A through the Diet versus Oral Bolus Exposure. *Environ Health Perspect*. 2011 Sep;119(9):1260–5.
 87. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004 Dec;27(6):441–53.
 88. Fisher JW, Twaddle NC, Vanlandingham M, Doerge DR. Pharmacokinetic modeling: Prediction and evaluation of route dependent dosimetry of bisphenol A in monkeys with extrapolation to humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Nov 15;257(1):122–36.
 89. Gibaldi M, Koup JR. Pharmacokinetic concepts - drug binding, apparent volume of distribution and clearance. *Eur J Clin Pharmacol*. 1981;20(4):299–305.
 90. Csanády GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol*. 2002 Jun;76(5–6):299–305.
 91. Déchaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perrière AB, Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids*. 1999 May;64(5):328–34.
 92. Corbel T, Gayrard V, Viguié C, Puel S, Lacroix MZ, Toutain P-L, et al. Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol Reprod*. 2013 Jul;89(1):11.
 93. Teeguarden JG, Waechter JM, Clewell HJ, Covington TR, Barton HA. Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2005 Jun;85(2):823–38.

94. Paulose T, Speroni L, Sonnenschein C, Soto AM. Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2015 Jul;54:58–65.
95. Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal Á. Prenatal Exposure to BPA and Offspring Outcomes: The Diabesogenic Behavior of BPA. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc.* 2015 Jun;13(2):1559325815590395.
96. Reed CE, Fenton SE. Exposure to Diethylstilbestrol during Sensitive Life Stages: A legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev [Internet].* 2013 Jun [cited 2016 Jul 23];99(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3817964/>
97. Fang F, Gao Y, Wang T, Chen D, Liu J, Qian W, et al. Insulin signaling disruption in male mice due to perinatal bisphenol A exposure: Role of insulin signaling in the brain. *Toxicol Lett.* 2016 Mar 14;245:59–67.
98. Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, et al. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect.* 2011 Apr;119(4):547–52.
99. Jedeon K, De la Dure-Molla M, Brookes SJ, Liodice S, Marciano C, Kirkham J, et al. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol.* 2013 Jul;183(1):108–18.
100. Barry JS, Anthony RV. The Pregnant Sheep as a Model for Human Pregnancy. *Theriogenology.* 2008 Jan 1;69(1):55–67.
101. Moscovitz JE, Aleksunes LM. Establishment of metabolism and transport pathways in the rodent and human fetal liver. *Int J Mol Sci.* 2013;14(12):23801–27.
102. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther.* 1999 Dec;84(3):429–45.
103. Kaddouri M, Brasset N, Alvinerie M, Eeckhoutte C, Bonfils C, Derancourt J, et al. Ontogenic development of liver progesterone metabolism in female sheep. Contribution of cytochrome P4502B and P4503A subfamilies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 Jun;42(5):499–508.
104. Cappiello M, Giuliani L, Rane A, Pacifici GM. Dopamine sulphotransferase is better developed than p-nitrophenol sulphotransferase in the human fetus. *Dev Pharmacol Ther.* 1991;16(2):83–8.
105. Pacifici GM. Sulfation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev.* 2005 Jul;81(7):573–81.
106. Stanley EL, Hume R, Coughtrie MWH. Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Aug 30;240(1–2):32–42.

107. Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, et al. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Dec;87(12):5760–8.
108. Richard K, Hume R, Kaptein E, Stanley EL, Visser TJ, Coughtrie MW. Sulfation of thyroid hormone and dopamine during human development: ontogeny of phenol sulfotransferases and arylsulfatase in liver, lung, and brain. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2734–42.
109. Coughtrie MWH. Sulfation through the looking glass--recent advances in sulfotransferase research for the curious. *Pharmacogenomics J.* 2002;2(5):297–308.
110. Ekström L, Johansson M, Rane A. Tissue Distribution and Relative Gene Expression of UDP-Glucuronosyltransferases (2B7, 2B15, 2B17) in the Human Fetus. *Drug Metab Dispos.* 2013 Feb 1;41(2):291–5.
111. Burchell B, Coughtrie M, Jackson M, Harding D, Fournel-Gigleux S, Leakey J, et al. Development of human liver UDP-glucuronosyltransferases. *Dev Pharmacol Ther.* 1989;13(2–4):70–7.
112. Pretheeban M, Hammond G, Bandiera S, Riggs W, Rurak D. Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2011 Jun;159(2):159–66.
113. Garland M, Abildskov KM, Taylor S, Benzeroual K, Caspersen CS, Arroyo SE, et al. Fetal Morphine Metabolism and Clearance Are Constant During Late Gestation. *Drug Metab Dispos.* 2006 Apr 1;34(4):636–46.
114. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Shulkes A, Smallwood RA, Morgan DJ. Conjugation of para-nitrophenol by isolated perfused fetal sheep liver. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 1996 Dec;24(12):1378–84.
115. Pacifici GM, Kubrich M, Giuliani L, de Vries M, Rane A. Sulphation and glucuronidation of ritodrine in human foetal and adult tissues. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;44(3):259–64.
116. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(8):487–514.
117. Vähäkangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol.* 2009 Oct;158(3):665–78.
118. Prouillac C, Lecoœur S. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2010 Oct;38(10):1623–35.
119. Schwarz UI, Gramatté T, Krappweis J, Oertel R, Kirch W. P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000 Apr;38(4):161–7.

120. Leiser R, Krebs C, Ebert B, Dantzer V. Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans. *Microsc Res Tech.* 1997 Jul 1;38(1–2):76–87.
121. Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D. The ovine placenta and placentitis-A review. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 16;135(1–2):90–7.
122. Pardi G, Cetin I. Human fetal growth and organ development: 50 years of discoveries. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Apr;194(4):1088–99.
123. Edelstone DI, Rudolph AM, Heymann MA. Liver and ductus venosus blood flows in fetal lambs in utero. *Circ Res.* 1978 Mar 1;42(3):426–33.
124. Rudolph AM. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ Res.* 1985 Dec;57(6):811–21.
125. Faber JJ, Green TJ. Foetal placental blood flow in the lamb. *J Physiol.* 1972 Jun;223(2):375–93.
126. Clavero JA, Negueruela J, Ortiz L, De los Heros JA, Modrego SP. Blood flow in the intervillous space and fetal blood flow. I. Normal values in human pregnancies at term. *Am J Obstet Gynecol.* 1973 Jun 1;116(3):340–6.
127. Haugen G, Kiserud T, Godfrey K, Crozier S, Hanson M. Portal and umbilical venous blood supply to the liver in the human fetus near term. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 Nov;24(6):599–605.
128. Bellotti M, Pennati G, De Gasperi C, Bozzo M, Battaglia FC, Ferrazzi E. Simultaneous measurements of umbilical venous, fetal hepatic, and ductus venosus blood flow in growth-restricted human fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 May;190(5):1347–58.
129. Kumar S, Tonn GR, Kwan E, Hall C, Riggs KW, Axelson JE, et al. Estimation of transplacental and nonplacental diphenhydramine clearances in the fetal lamb: the impact of fetal first-pass hepatic drug uptake. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Aug;282(2):617–32.
130. Brace RA, Anderson DF, Cheung CY. Ovine fetal swallowing responses to polyhydramnios. *Physiol Rep [Internet].* 2014 Mar 26 [cited 2014 Jul 24];2(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4002256/>
131. Beall MH, van den Wijngaard JPHM, van Gemert MJC, Ross MG. Amniotic Fluid Water Dynamics. *Placenta.* 2007 Aug;28(8–9):816–23.
132. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *J Perinatol.* 2005 Mar 24;25(5):341–8.
133. Kamarýt J, Matýsek P. beta-Glucuronidase activity in amniotic fluid. *J Clin Chem Clin Biochem Z Für Klin Chem Klin Biochem.* 1980 Oct;18(10):611–4.

134. Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Apr;202(4):393.e1-7.
135. Corbel T, Gayrard V, Puel S, Lacroix MZ, Berrebi A, Gil S, et al. Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reprod Toxicol*. 2014 Aug;47:51–8.
136. Patterson TA, Twaddle NC, Roegge CS, Callicott RJ, Fisher JW, Doerge DR. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Feb 15;267(1):41–8.
137. Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect*. 2010 Sep;118(9):1196–203.
138. Divakaran K, Hines RN, McCarver DG. Human Hepatic UGT2B15 Developmental Expression. *Toxicol Sci*. 2014 Sep 1;141(1):292–9.
139. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Brown RP, Fisher JW. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague–Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Sep 15;255(3):261–70.
140. Nachman RM, Fox SD, Golden WC, Sibinga E, Groopman JD, Lees PSJ. Serial Free Bisphenol A and Bisphenol A Glucuronide Concentrations in Neonates. *J Pediatr*. 2015 Jul;167(1):64–9.
141. Sperker B, Backman JT, Kroemer HK. The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin Pharmacokinet*. 1997 Jul;33(1):18–31.
142. Chevrier J, Gunier RB, Bradman A, Holland NT, Calafat AM, Eskenazi B, et al. Maternal Urinary Bisphenol A during Pregnancy and Maternal and Neonatal Thyroid Function in the CHAMACOS Study. *Environ Health Perspect*. 2013 Jan;121(1):138–44.
143. Casas M, Valvi D, Ballesteros-Gomez A, Gascon M, Fernández MF, Garcia-Esteban R, et al. Exposure to Bisphenol A and Phthalates during Pregnancy and Ultrasound Measures of Fetal Growth in the INMA-Sabadell Cohort. *Environ Health Perspect*. 2016 Apr;124(4):521–8.
144. Cantonwine DE, Ferguson KK, Mukherjee B, McElrath TF, Meeker JD. Urinary Bisphenol A Levels during Pregnancy and Risk of Preterm Birth. *Environ Health Perspect*. 2015 Sep;123(9):895–901.
145. Arbuckle TE, Davis K, Marro L, Fisher M, Legrand M, LeBlanc A, et al. Phthalate and bisphenol A exposure among pregnant women in Canada--results from the MIREC study. *Environ Int*. 2014 Jul;68:55–65.
146. Arbuckle TE, Marro L, Davis K, Fisher M, Ayotte P, Bélanger P, et al. Exposure to free and conjugated forms of bisphenol A and triclosan among

- pregnant women in the MIREC cohort. *Environ Health Perspect.* 2015 Apr;123(4):277–84.
147. Braun JM, Lanphear BP, Calafat AM, Deria S, Khoury J, Howe CJ, et al. Early-life bisphenol a exposure and child body mass index: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect.* 2014 Nov;122(11):1239–45.
148. Callan AC, Hinwood AL, Heffernan A, Eaglesham G, Mueller J, Odland JØ. Urinary bisphenol A concentrations in pregnant women. *Int J Hyg Environ Health.* 2013 Nov;216(6):641–4.
149. Casas M, Valvi D, Luque N, Ballesteros-Gomez A, Carsin A-E, Fernandez MF, et al. Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children. *Environ Int.* 2013 Jun;56:10–8.
150. Gascon M, Casas M, Morales E, Valvi D, Ballesteros-Gómez A, Luque N, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Feb;135(2):370–378.e7.
151. Gerona RR, Pan J, Zota AR, Schwartz JM, Friesen M, Taylor JA, et al. Direct measurement of Bisphenol A (BPA), BPA glucuronide and BPA sulfate in a diverse and low-income population of pregnant women reveals high exposure, with potential implications for previous exposure estimates: a cross-sectional study. *Environ Health Glob Access Sci Source.* 2016;15:50.
152. Lee B-E, Park H, Hong Y-C, Ha M, Kim Y, Chang N, et al. Prenatal bisphenol A and birth outcomes: MOCEH (Mothers and Children’s Environmental Health) study. *Int J Hyg Environ Health.* 2014 Mar;217(2–3):328–34.
153. Meeker JD, Cantonwine DE, Rivera-González LO, Ferguson KK, Mukherjee B, Calafat AM, et al. Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico. *Environ Sci Technol.* 2013 Apr 2;47(7):3439–47.
154. Mortensen ME, Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Wright DJ, Pirkle JL, et al. Urinary Concentrations of Environmental Phenols in Pregnant Women in a Pilot Study of the National Children’s Study. *Environ Res.* 2014 Feb;129:32–8.
155. Myridakis A, Fthenou E, Balaska E, Vakinti M, Kogevinas M, Stephanou EG. Phthalate esters, parabens and bisphenol-A exposure among mothers and their children in Greece (Rhea cohort). *Environ Int.* 2015 Oct;83:1–10.
156. Quirós-Alcalá L, Eskenazi B, Bradman A, Ye X, Calafat AM, Harley K. Determinants of urinary bisphenol A concentrations in Mexican/Mexican--American pregnant women. *Environ Int.* 2013 Sep;59:152–60.
157. Romano ME, Webster GM, Vuong AM, Thomas Zoeller R, Chen A, Hoofnagle AN, et al. Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: the HOME Study. *Environ Res.* 2015 Apr;138:453–60.
158. Vandentorren S, Zeman F, Morin L, Sarter H, Bidondo M-L, Oleko A, et al. Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the

- Elfe pilot study: implications for large-scale biomonitoring studies. *Environ Res.* 2011 Aug;111(6):761–4.
159. Watkins DJ, Ferguson KK, Anzalota Del Toro LV, Alshawabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD. Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. *Int J Hyg Environ Health.* 2015 Mar;218(2):212–9.
160. Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Jun 1;898:90–4.
161. Chou W-C, Chen J-L, Lin C-F, Chen Y-C, Shih F-C, Chuang C-Y. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ Health Glob Access Sci Source.* 2011;10:94.
162. Zhang T, Sun H, Kannan K. Blood and urinary bisphenol A concentrations in children, adults, and pregnant women from china: partitioning between blood and urine and maternal and fetal cord blood. *Environ Sci Technol.* 2013 May 7;47(9):4686–94.
163. Aris A. Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reprod Toxicol.* 2014 Jun;45:8–13.
164. Lee YJ, Ryu H-Y, Kim H-K, Min CS, Lee JH, Kim E, et al. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2008 Aug;25(4):413–9.
165. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect.* 2002 Nov;110(11):A703-707.
166. Yamamoto J, Minatoya M, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Matsumura T, et al. Quantifying bisphenol A in maternal and cord whole blood using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry and maternal characteristics associated with bisphenol A. *Chemosphere.* 2016 Dec;164:25–31.
167. Burstyn I, Martin JW, Beesoon S, Bamforth F, Li Q, Yasui Y, et al. Maternal exposure to bisphenol-A and fetal growth restriction: a case-referent study. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Dec;10(12):7001–14.
168. Fénichel P, Déchaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, et al. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2012 Apr;27(4):983–90.
169. Gerona RR, Woodruff TJ, Dickenson CA, Pan J, Schwartz JM, Sen S, et al. Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical

- cord serum in a northern and central California population. *Environ Sci Technol*. 2013;47(21):12477–85.
170. Guida M, Troisi J, Ciccone C, Granozio G, Cosimato C, Di Spiezio Sardo A, et al. Bisphenol A and congenital developmental defects in humans. *Mutat Res*. 2015 Apr;774:33–9.
171. Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, et al. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc*. 2008 Apr;28(4):258–63.
172. Veiga-Lopez A, Kannan K, Liao C, Ye W, Domino SE, Padmanabhan V. Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Nov;100(11):E1394-1403.
173. Wan Y, Choi K, Kim S, Ji K, Chang H, Wiseman S, et al. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks. *Environ Sci Technol*. 2010 Jul 1;44(13):5233–9.
174. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):607–14.
175. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2008 Dec;59 Suppl 7:31–55.
176. Plosch T, Straten EME van, Huijckman NCA, Baller JFW, Kuipers F. Fetal lipid metabolism is regulated by the Liver X Receptor (LXR) in mice. *FASEB J*. 2009 Apr 1;23(1 Supplement):522.5-522.5.
177. van Straten EME, van Meer H, Huijckman NCA, van Dijk TH, Baller JFW, Verkade HJ, et al. Fetal liver X receptor activation acutely induces lipogenesis but does not affect plasma lipid response to a high-fat diet in adult mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Nov;297(5):E1171-1178.
178. Brunelle FM, Verbeeck RK. Conjugation-deconjugation cycling of diflunisal via beta-glucuronidase catalyzed hydrolysis of its acyl glucuronide in the rat. *Life Sci*. 1997;60(22):2013–21.
179. Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatol Baltim Md*. 2012 Feb;55(2):395–407.
180. Lacroix MZ, Puel S, Collet SH, Corbel T, Picard-Hagen N, Toutain PL, et al. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta*. 2011 Sep 30;85(4):2053–9.

181. Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, et al. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect.* 2010 Sep;118(9):1243–50.
182. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(8):487–514.
183. Jin H, Audus KL. Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. *Placenta.* 2005 Apr;26 Suppl A:S96–103.
184. Mørck TJ, Sorda G, Bechi N, Rasmussen BS, Nielsen JB, Ietta F, et al. Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2010 Aug;30(1):131–7.
185. Sperker B, Mürdter TE, Schick M, Eckhardt K, Bosslet K, Kroemer HK. Interindividual variability in expression and activity of human beta-glucuronidase in liver and kidney: consequences for drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 May;281(2):914–20.
186. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 2009 Oct;158(3):693–705.
187. Zimmerman EI, Hu S, Roberts JL, Gibson AA, Orwick SJ, Li L, et al. Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013 Mar 15;19(6):1458–66.
188. Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The Expression and Function of Organic Anion Transporting Polypeptides in Normal Tissues and in Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012 Feb 10;52:135–51.

Annexe

Données complémentaires de l'article 1**Supplementary data: Model description and degree of exposure enhancement of BPA and BPAG**

The model used for simulations is described in Figure S1.

Fixed parameters were computed using mean parameters (from previously performed non-compartmental analysis) reported for a paired 2-kg BW fetus/75-kg BW dam. The simulation was performed considering that fetal BPAG clearance process is only due to BPAG conversion back to its parent BPA. Fetal BPA elimination (fetal to maternal) clearance and conversion (glucuronoconjugation) clearance were fixed at 70% and 30% of the total fetal BPA clearance, respectively, in accordance with results obtained from noncompartmental analysis. Maternal BPA placental clearance was fixed at 4.5% of total maternal clearance (Corbel et al. 2013).

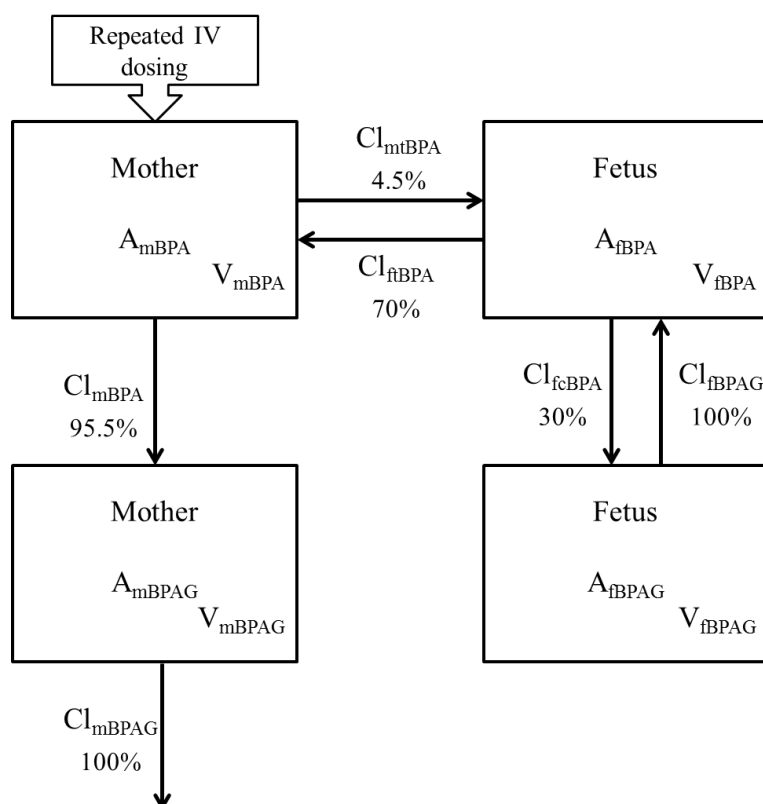


Figure S1: Pharmacokinetic model built on Phoenix® graphical model interface

The model described in figure S1 was defined by the following equations:

$$A_{m_{BPAG}} = -(Cl_{m_{BPAG}} \times C_{m_{BPAG}}) + (Cl_{m_{BPA}} \times C_{m_{BPA}})$$

$$A_{e_{BPAG}} = (Cl_{m_{BPAG}} \times C_{m_{BPAG}})$$

$$A_{m_{BPA}} = -(Cl_{m_{BPA}} \times C_{m_{BPA}}) - (Cl_{mt_{BPA}} \times C_{m_{BPA}}) + (Cl_{ft_{BPA}} \times C_{f_{BPA}})$$

$$A_{f_{BPA}} = -(Cl_{fc_{BPA}} \times C_{f_{BPA}}) + (Cl_{f_{BPAG}} \times C_{f_{BPAG}}) + (Cl_{mt_{BPA}} \times C_{m_{BPA}}) - (Cl_{ft_{BPA}} \times C_{f_{BPA}})$$

$$A_{f_{BPAG}} = (Cl_{fc_{BPA}} \times C_{f_{BPA}}) - (Cl_{f_{BPAG}} \times C_{f_{BPAG}})$$

$$C_{m_{BPAG}} = \frac{A_{m_{BPAG}}}{V_{m_{BPAG}}}$$

$$C_{m_{BPA}} = \frac{A_{m_{BPA}}}{V_{m_{BPA}}}$$

$$C_{f_{BPA}} = \frac{A_{f_{BPA}}}{V_{f_{BPA}}}$$

$$C_{f_{BPAG}} = \frac{A_{f_{BPAG}}}{V_{f_{BPAG}}}$$

Where:

$C_{f_{BPA}}$ is the fetal plasma BPA concentration

$C_{f_{BPAG}}$ is the fetal plasma BPAG concentration

$C_{m_{BPA}}$ is the maternal plasma BPA concentration

$C_{m_{BPAG}}$ is the maternal plasma BPAG concentration

$A_{f_{BPA}}$ is the amount of BPA in the fetal compartment per time

$A_{f_{BPAG}}$ is the amount of BPAG in the fetal compartment per time

$A_{m_{BPA}}$ is the amount of BPA in the maternal compartment per time

$A_{m_{BPAG}}$ is the amount of BPAG in the maternal compartment per time

$A_{e_{BPAG}}$ is the amount of BPAG eliminated from the maternal compartment per time

$V_{f_{BPA}}$ is the volume of the fetal BPA compartment

$V_{f_{BPAG}}$ is the volume of the fetal BPAG compartment

V_{mBPA} is the volume of the maternal BPA compartment

V_{mBPAG} is the volume of the maternal BPAG compartment

Cl_{fCBPA} is the fetal BPA glucuronoconjugation clearance

Cl_{ftBPA} is the fetal to maternal BPA clearance

Cl_{fBPAG} is the fetal clearance of BPAG Cl_{mtBPA} is the maternal placental BPA clearance

Cl_{mBPA} is the maternal BPA clearance

Cl_{mBPAG} is the maternal BPAG clearance

Simulations of maternal and fetal plasma BPA and BPAG concentrations were performed with following estimated macroconstants:

V_{mBPAG} : 24 L

Cl_{mBPAG} : 24.75 L/h

V_{mBPA} : 96 L

Cl_{mBPA} : 131.25 L/h

V_{fBPA} : 10.2 L

V_{fBPAG} : 1.4 L

Cl_{fCBPA} : 8.9 L/h

Cl_{fBPAG} : 0.04 L/h

Cl_{mtBPA} : 6.2 L/h

Cl_{ftBPA} : 20.7 L/h

The degree (EE_{BPA} and EE_{BPAG}) of exposure enhancement of BPA and its metabolite BPAG, respectively, afforded by reversible metabolism was calculated as follows:

$$EE_{BPA} = EE_{BPAG} = 1 + \frac{Cl_{fCBPA} \times Cl_{fBPAG}}{(Cl_{ftBPA} + Cl_{fCBPA}) \times Cl_{fBPAG} - Cl_{fCBPA} \times Cl_{fBPAG}} = 1 + \frac{Cl_{fCBPA}}{Cl_{ftBPA}} = 1.43$$

Données complémentaires de l'article 2

Supplemental Material, Dose linearity assessment

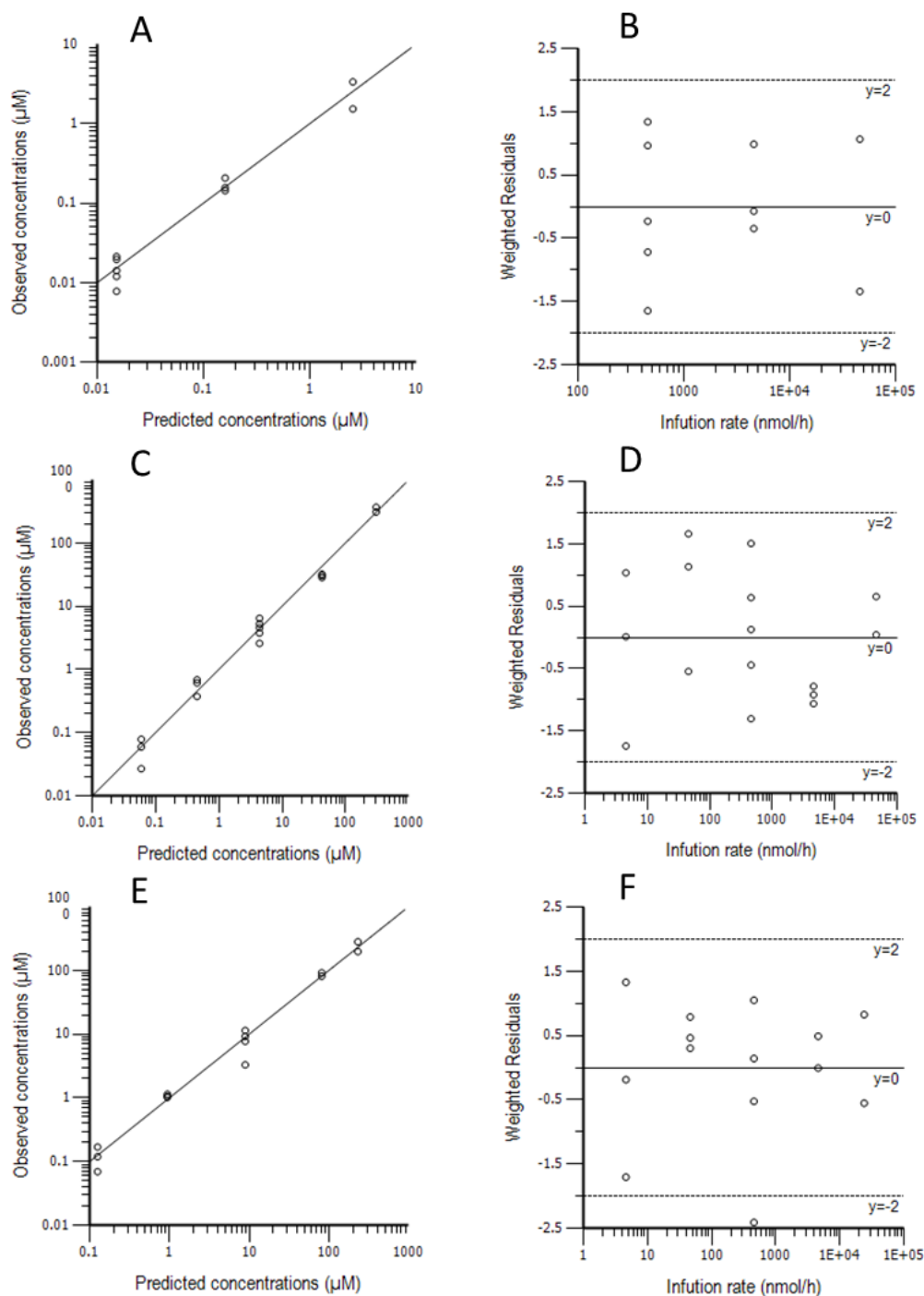
Figure 1 and table 1 show the diagnostic plots and parameter estimates obtained with the quadratic model.

Figure 2 and table 2 show the diagnostic plots and parameter estimates obtained with the simple linear model.

Observed vs predicted concentration plots indicate no departure from the models except for the higher BPAG dose (Figure 2.E). No heteroscedasticity can be evidenced from any of the weighted residual plots presented in figure 1 and 2 showing that the error distribution was appropriately modelled.

Supplemental Material, Table 1. Parameter estimates and associated confidence intervals obtained when fitting fetal plasma concentrations vs fetal infusion rates to a quadratic model.

Adjusted data	Parameter	Estimate	Coefficient of variation (%)	2.5% confidence interval	97.5% confidence interval
BPA fetal plasma concentrations vs BPA fetal infusion rate	α	2.6E-04	1.4E+03	-8.9E-03	9.4E-03
	β_1	3.3E-05	2.1E+01	1.6E-05	5.0E-05
	β_2	5.0E-10	6.2E+01	-2.5E-10	1.2E-09
	SD	3.0E-01	2.4E+01	1.2E-01	4.7E-01
BPAG fetal plasma concentrations vs BPA fetal infusion rate	α	1.6E-02	7.5E+01	-1.0E-02	4.2E-02
	β_1	9.6E-03	9.9E+00	7.5E-03	1.2E-02
	β_2	-6.5E-08	-5.2E+01	-1.4E-07	9.2E-09
	SD	3.1E-01	1.9E+01	1.8E-01	4.5E-01
BPAG fetal plasma concentrations vs BPAG fetal infusion rate	α	3.5E-02	6.0E+01	-1.2E-02	8.2E-02
	β_1	2.0E-02	9.3E+00	1.6E-02	2.4E-02
	β_2	-4.2E-07	-2.5E+01	-6.5E-07	-1.9E-07
	SD	2.6E-01	2.0E+01	1.4E-01	3.8E-01
BPAG fetal plasma concentrations vs BPAG fetal infusion rate without the higher dose	α	3.5E-02	6.6E+01	-1.8E-02	8.7E-02
	β_1	2.0E-02	1.2E+01	1.4E-02	2.5E-02
	β_2	-4.5E-07	-1.9E+02	-2.4E-06	1.5E-06
	SD	2.7E-01	2.2E+01	1.4E-01	4.1E-01

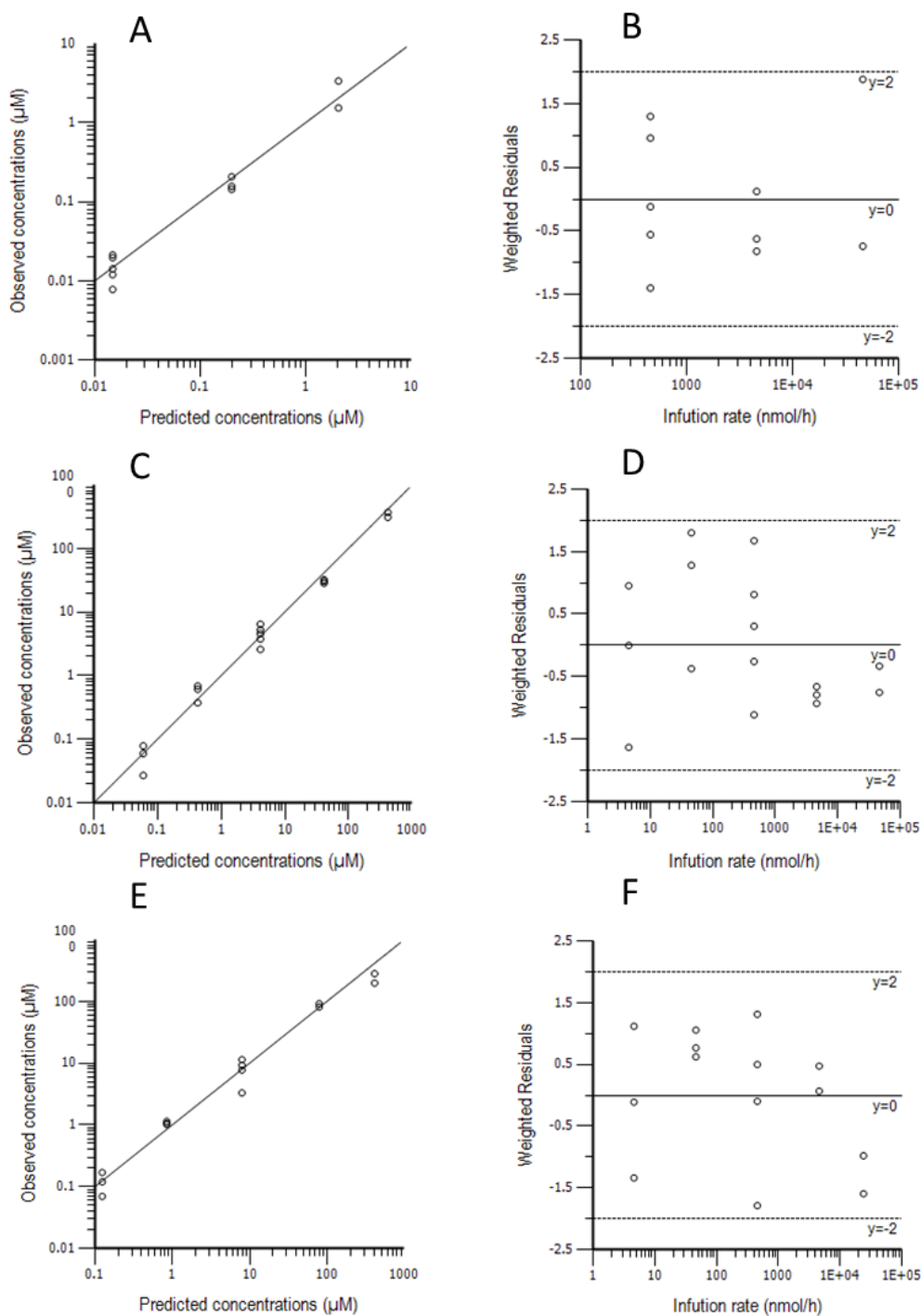


Supplemental Material, Figure 1. Diagnostic plots obtained by fitting fetal plasma concentrations vs infusion rates to a quadratic model.

Observed vs predicted fetal plasma concentrations (left panels) and associated weighted residual vs infusion rate plots (right panels) are presented for BPA infusion vs BPA fetal plasma concentrations (A and B), BPA infusion vs BPAG fetal plasma concentrations (C and D) and BPAG infusion vs BPAG fetal plasma concentrations (E and F).

Supplemental Material, Table 2. Parameter estimates and associated confidence intervals obtained when fitting fetal plasma concentrations vs fetal infusion rates to a simple linear model.

Adjusted data	Parameter	Estimate	Coefficient of variation (%)	2.5% confidence interval	97.5% confidence interval
BPA fetal plasma concentrations vs BPA fetal infusion rate	α	-5.5E-03	-6.4E+01	-1.4E-02	2.9E-03
	β_1	4.5E-05	1.5E+01	2.9E-05	6.0E-05
	SD	3.4E-01	2.5E+01	1.4E-01	5.4E-01
BPAG fetal plasma concentrations vs BPA fetal infusion rate	α	1.9E-02	6.7E+01	-8.6E-03	4.6E-02
	β_1	9.0E-03	9.7E+00	7.1E-03	1.1E-02
	SD	3.4E-01	2.0E+01	1.9E-01	4.8E-01
BPAG fetal plasma concentrations vs BPAG fetal infusion rate	α	4.4E-02	5.6E+01	-1.0E-02	9.9E-02
	β_1	1.7E-02	1.0E+01	1.3E-02	2.1E-02
	SD	3.3E-01	2.1E+01	1.8E-01	4.8E-01



Supplemental Material, Figure 2. Diagnostic plots obtained by fitting fetal plasma concentrations vs infusion rates to a simple linear model.

Observed vs predicted fetal plasma concentrations (left panels) and associated weighted residual vs infusion rate plots (right panels) are presented for BPA infusion vs BPA fetal plasma concentrations (A and B), BPA infusion vs BPAG fetal plasma concentrations (C and D) and BPAG infusion vs BPAG fetal plasma concentrations (E and F).

Supplemental Material, Pharmacokinetic model development

Compartmental representations of each model that have been developed are presented in each section with corresponding parameter estimates indicated in tables.

Supplemental Material, Parameter descriptions

Khydro: the fetal BPAG reactivation rate

VcBP Afetus: the volume of the fetal BPA central compartment

VcBPAGfetus: the volume of the fetal BPAG central compartment

KfmBPA: the fetal-to-maternal BPA transfer rate

Kconjugfetus: the fetal BPA conjugation rate

KmfBPA: the maternal-to-fetal BPA transfer rate

KBPAGin: the fetal BPAG input distribution rate

KBPAGout: the fetal BPAG output distribution rate

Kfirstpassmf: the maternal-to-fetal BPA conjugation rate

KfmBPAG: the fetal-to-maternal BPAG transfer rate

VcBP Amother: the volume of the maternal (or adult) BPA central compartment

VcBPAGmother: the volume of the maternal (or adult) BPAG central compartment

Kurine: the maternal BPAG elimination rate

KBPAG12: the maternal BPAG output distribution rate

KBPAG21: the maternal BPAG input distribution rate

Kconjugmother: the maternal BPA conjugation rate

KBPA12: the maternal BPA output distribution rate

KBPA21: the maternal BPA input distribution rate

BPAMultStdev: the standard deviation of the multiplicative error term for BPA concentrations

BPAGMultStdev: the standard deviation of the multiplicative error term for BPAG concentrations

BPA-d6MultStdev: the standard deviation of the multiplicative error term for BPA-d6 concentrations

BPAG-d6MultStdev: the standard deviation of the multiplicative error term for BPAG-d6 concentrations

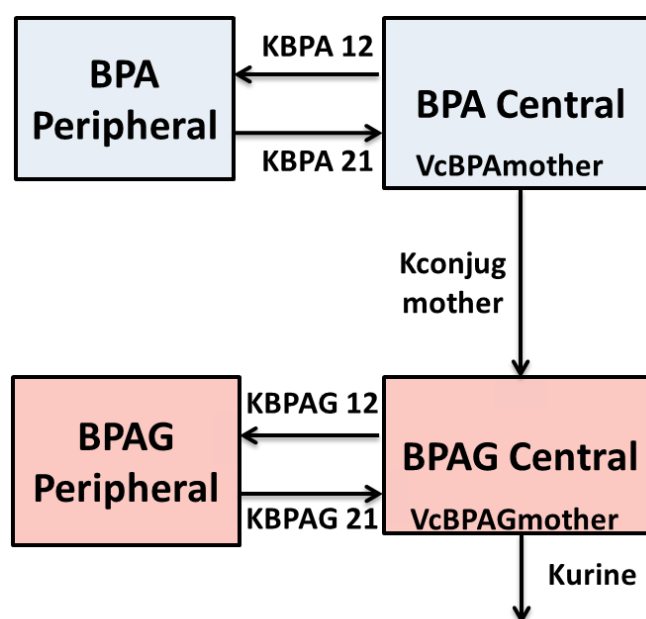
stdevBPA: the standard deviation of the additive error term for BPA concentrations

stdevBPAG: the standard deviation of the additive error term for BPAG concentrations

stdevBPA-d6: the standard deviation of the additive error term for BPA-d6 concentrations

stdevBPAG-d6: the standard deviation of the additive error term for BPAG-6 concentrations

Supplemental Material, Maternal (adult) sheep modeling



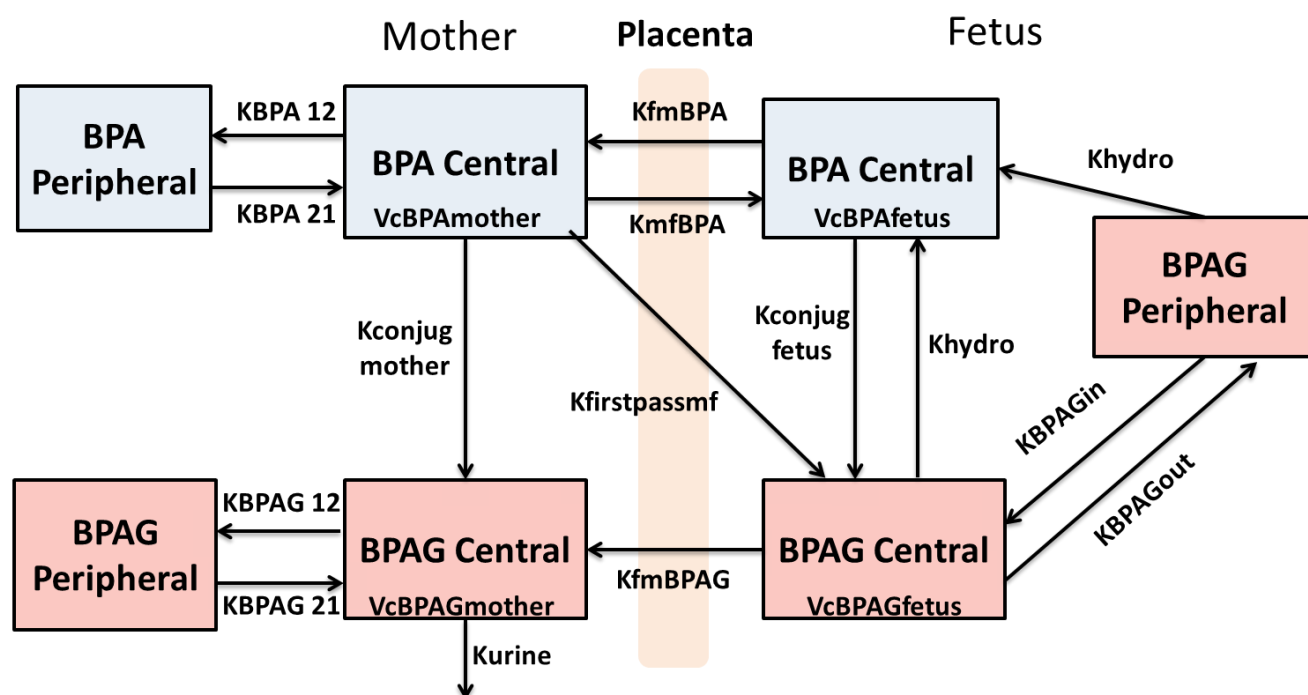
Supplemental Material, Figure 3. Compartmental representation of the model developed in adult sheep. Arrows represent transfer rates. Compartments captioned with “Vc” are central compartments for which volumes are attributed.

Supplemental Material, Table 3. BPA and BPAG TK parameter estimates obtained for adult sheep.

Parameter	Population estimate	Units	Coefficient of variation for BSV (%)	Eta shrinkage
VcBPAmother	814.8	mL/kg	9.9	0.32
VcBPAGmother	94.5	mL/kg	16.6	0.14
Kurine	3.1394	1/h	21.8	0.04
KBPAG12	0.7558	1/h	NA	NA
KBPAG21	0.4253	1/h	NA	NA
Kconjugmother	2.1533	1/h	14.8	0.08
KBPA12	0.3279	1/h	32.7	0.23
KBPA21	0.6051	1/h	15.8	0.18
BPAMultStdev	0.1984			

BPAGMultStdev	0.2061
stdevBPA	0.0017
stdevBPAG	0.1122

Supplemental Material, Ovine fetο-maternal modeling



Supplemental Material, Figure 4. Compartmental representation of the fetο-maternal sheep model.

Arrows represent transfer rates. Compartments captioned with “Vc” are central compartments for which volumes are attributed.

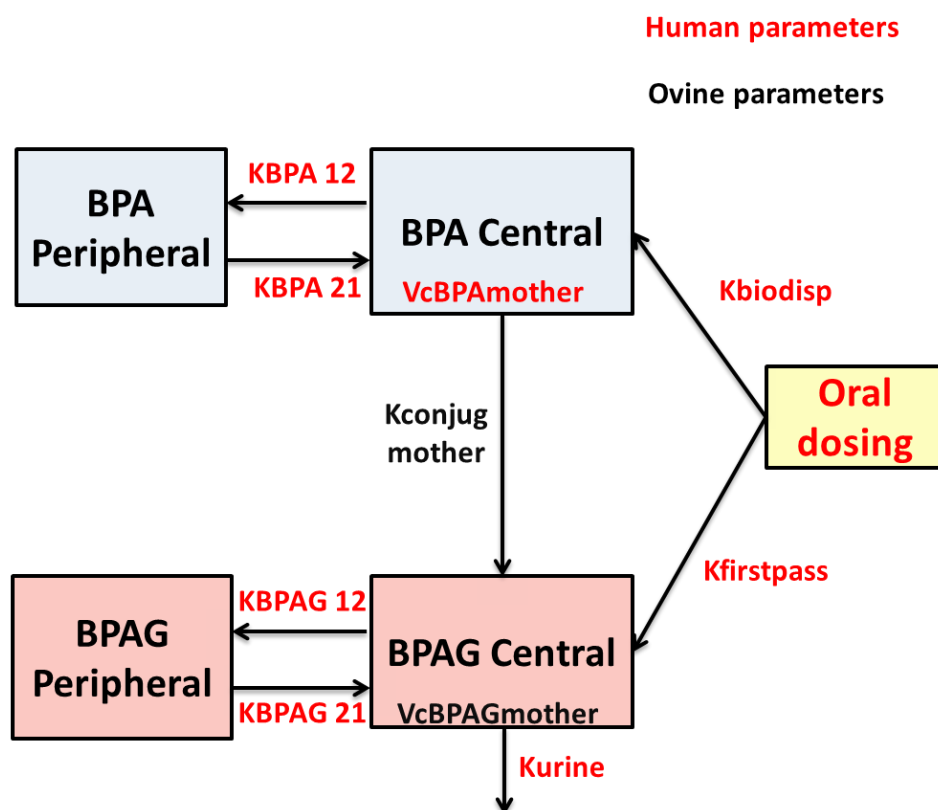
Supplemental Material, Table 4. BPA and BPAG TK parameter estimates obtained for the fetο-maternal sheep unit.

Parameter	Population estimate	Units	Coefficient of variation for BSV (%)	Eta shrinkage
Khydro	0.0019	1/h	NA	NA
VcBPAfetus	9153	mL	81.6	0.348
VcBPAGfetus	1166	mL	53.2	0.170
KfmBPA	2.2218	1/h	NA	NA
Kconjgufetus	0.7637	1/h	NA	NA
KmfBPA	0.0868	1/h	NA	NA
KBPAGin	0.0034	1/h	NA	NA
KBPAGout	0.0190	1/h	76.4	0.324
Kfirstpassmf	0.0491	1/h	NA	NA

KfmBPAG	0.0044	1/h	NA	NA
VcBPAmother (frozen)	814.8	mL/kg	NA	NA
VcBPAGmother (frozen)	94.5	mL/kg	NA	NA
Kurine (frozen)	3.14	1/h	67.0	0.234
KBPAG12 (frozen)	0.76	1/h	NA	NA
KBPAG21 (frozen)	0.43	1/h	NA	NA
Kconjugmother (frozen)	2.15	1/h	68.0	0.286
KBPA12 (frozen)	0.33	1/h	NA	NA
KBPA21 (frozen)	0.61	1/h	NA	NA
BPAMultStdev	0.4004			
BPAGMultStdev	0.3315			
BPA-d6MultStdev	0.0085			
BPAG-d6MultStdev	0.4631			
stdevBPA	0.0040			
stdevBPAG	0.0196			
stdevBPA-d6	0.0011			
stdevBPAG-d6	0.0025			

The population estimates of parameters indicated as “(frozen)” have been fixed to the values obtained with the adult sheep model.

Supplemental Material, Adult human parameterization



Supplemental Material, Figure 5. Compartmental representation of the adult human model.

Arrows represent transfer rates. Compartments captioned with “Vc” are central compartments for which volumes are attributed. red parameters have been estimated from the human data while black parameters have been fixed to theoretical estimates.

Supplemental Material, Table 5. BPA and BPAG TK parameter estimates obtained for adult human.

Parameter	Population estimate	Units	Coefficient of variation for BSV (%)	Eta shrinkage
Kfirstpass	0.826	1/h	7.85	0.537
Kbiodisp	0.065	1/h	33.1	0.0399
VcBPAmother	2.803	L/kg	40.6	0.0589
VcBPAGmother (frozen)	0.095	L/kg	NA	NA
Kurine	1.903	1/h	6.7	0.471
KBPAG12	0.337	1/h	23.6	0.415
KBPAG21	0.129	1/h	20.5	0.538
KBPA12	0.208	1/h	72.8	0.0910
KBPA21	0.184	1/h	5.10	0.752
Kconjmother (frozen)	0.548	1/h	NA	NA
BPA-d6MultStdev	0.357			
BPAG-d6MultStdev	0.423			
stdevBPA-d6	0.001			
stdevBPAG-d6	0.059			

The population estimate of $V_{cBPAGmother}$ has been fixed to the estimation made with the adult sheep model. The parameter $K_{conjugmother}$ has been fixed accordingly to the allometric estimation of the human BPA clearance (Collet et al. 2015) and defined as the ratio of the 1.536 L/kg.h clearance divided by the BPA central volume ($V_{centrBPAmother}$).

Reference

Collet SH, Picard-Hagen N, Lacroix MZ, Puel S, Viguié C, Bousquet-Melou A, et al. 2015. Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284:323–329; doi:10.1016/j.taap.2015.02.024.

Données complémentaires de l'article 3

Supplemental Material, Differentially expressed proteins

Supplemental Material, Table 1. Full list of differentially expressed proteins identified with the vehicle, the BPA or the BPAG treatment for each fetal tissue. A cut-off of 0.05 was applied to P-values obtained with an empirical Bayes moderated test.

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Liver	Vehicle vs BPA	-3.5	mannose-binding protein C	3.6E-03	Innate immune defense
		1.8	ATPase family AAA domain-containing protein 1	5.0E-03	Catalytic activity
		1.5	estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-B-like	5.3E-03	Catalytic activity
		1.6	fibulin-1	6.6E-03	Cell adhesion and migration along protein fibres
		-1.5	thioredoxin reductase 2, mitochondrial	6.6E-03	Catalytic activity
		-2.5	lactoferrin precursor	7.7E-03	Innate immune defense
		-2.6	peptidoglycan recognition protein 1	8.2E-03	Innate immune defense
		-2.1	serine/threonine-protein kinase 25	9.3E-03	Response to environmental stress
		-1.7	Golgi SNAP receptor complex member 1	1.0E-02	Involved in transport from the ER to the Golgi apparatus as well as in intra-Golgi transport
		1.5	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	1.0E-02	Component of the MAP kinase signal transduction pathway
		1.7	calponin-3	1.0E-02	Smooth muscle contraction
		1.3	phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	1.2E-02	Catalytic activity
		1.5	anterior gradient protein 2 homolog	1.6E-02	Required for MUC2 post-transcriptional synthesis and secretion
		-1.5	copper chaperone of superoxide dismutase 1, partial	1.6E-02	Catalytic activity
		-1.9	acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	1.7E-02	Catalytic activity
		-1.8	serpin A3-1-like	2.0E-02	Inhibitor of the serine proteases elastase and trypsin
		-1.5	nucleosome assembly protein 1-like 4	2.1E-02	Histone chaperone
		-1.5	microtubule-associated protein RP/EB family member 1	2.2E-02	Binds to the plus end of microtubules and regulates the dynamics of the microtubule cytoskeleton
		-2.0	cathelicidin, partial	2.3E-02	Innate immune defense
		-1.7	protein S100-A8	2.3E-02	Innate immune defense
		-1.6	coiled-coil domain-containing protein 47	2.3E-02	Calcium ion homeostasis
		1.2	serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	2.4E-02	Catalytic activity
		1.6	signal recognition particle subunit SRP68	2.4E-02	Role in targeting secretory proteins to the rough endoplasmic reticulum membrane

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Liver	Vehicle vs BPA	-1.4	aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	2.6E-02	Catalytic activity
		2.0	lymphocyte-specific protein 1, partial	2.7E-02	Innate immune defense
		-1.4	heme-binding protein 1	3.0E-02	Binds to heme or porphyrins
		-1.5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	3.1E-02	Proteasome assembly
		-2.1	coactosin-like protein	3.2E-02	Acts as a chaperone for ALOX5
		1.3	membrane primary amine oxidase	3.3E-02	Catalytic activity
		1.8	alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4	3.3E-02	Catalytic activity
		2.2	signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	3.4E-02	Catalytic activity
		1.6	flotillin-2	3.5E-02	Scaffolding protein
		-1.5	putative phospholipase B-like 2	3.7E-02	Catalytic activity
		-3.3	ethanolamine-phosphate phospho-lyase	3.7E-02	Catalytic activity
		1.2	cytochrome b5 type B	3.9E-02	Catalytic activity
		-1.8	azurocidin	4.1E-02	Innate immune defense
		-1.3	tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	4.2E-02	Regulator of tubulin stability
		-1.3	alpha-centractin	4.3E-02	Microtubule based vesicle motility
		-1.6	protein Z-dependent protease inhibitor	4.3E-02	Catalytic activity
		1.3	bleomycin hydrolase	4.3E-02	Catalytic activity
		1.3	protein ERGIC-53	4.4E-02	Innate immune defense
		-1.6	transmembrane emp24 domain-containing protein 2	4.4E-02	Involved in vesicular protein trafficking
		-1.5	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	4.4E-02	Initiation of protein synthesis
		1.3	succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	4.5E-02	Catalytic activity
		-1.4	tumor necrosis factor alpha-induced protein 8	4.6E-02	Negative mediator of apoptosis and may play a role in tumor progression
		-2.1	neutrophil gelatinase-associated lipocalin	4.6E-02	Iron-trafficking protein involved in multiple processes such as apoptosis, innate immunity and renal development
		-1.5	replication protein A 32 kDa subunit	4.7E-02	Binds and stabilizes single-stranded DNA intermediates that form during DNA replication or upon DNA stress
		1.3	adenylosuccinate lyase	4.8E-02	Catalytic activity
		1.3	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	4.9E-02	Activates ubiquitin
	Vehicle vs BPAG	-5.0	lactoferrin precursor	1.0E-04	Innate immune defense
		1.8	prenylcysteine oxidase 1	1.3E-04	Catalytic activity
		2.3	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	2.0E-04	Catalytic activity
		-4.1	azurocidin	4.3E-04	Innate immune defense
		-2.6	cathelin-related peptide SC5 precursor	6.6E-04	Innate immune defense
		-3.7	protein S100-A12	1.4E-03	Innate immune defense
		-2.8	cathelicidin, partial	1.5E-03	Innate immune defense
		-3.9	neutrophil gelatinase-associated lipocalin	2.1E-03	Iron-trafficking protein involved in multiple processes such as apoptosis, innate immunity and renal development

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Liver	Vehicle vs BPAG	-2.5	Fibrinogen alpha chain	2.9E-03	Hemostasis
		-3.0	peptidoglycan recognition protein 1	3.3E-03	Innate immune defense
		1.5	carbonyl reductase [NADPH] 1	3.9E-03	Catalytic activity
		-2.8	neutrophil elastase	4.0E-03	Catalytic activity
		-1.7	transcription factor BTF3	4.6E-03	General transcription factor
		-2.5	protein S100-A8	4.6E-03	Innate immune defense
		1.3	serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	5.3E-03	Catalytic activity
		-2.1	fibrinogen gamma chain	5.5E-03	Hemostasis
		2.8	tryptase	7.9E-03	Catalytic activity, may play a role in innate immunity
		-1.6	acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	8.1E-03	Catalytic activity
		-1.7	coiled-coil domain-containing protein 47	8.6E-03	Calcium ion homeostasis
		-2.0	fibrinogen beta chain	8.7E-03	Hemostasis
		-1.5	transcription factor p65	9.9E-03	Inflammation, immunity, differentiation, cell growth, tumorigenesis and apoptosis
		-2.0	fibrinogen alpha chain	1.0E-02	Hemostasis
		1.7	transcription elongation factor A protein-like 4, partial	1.1E-02	Transcriptional regulation
		-3.1	15 kDa protein B-like	1.2E-02	Unknown
		-2.0	serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	1.3E-02	Catalytic activity
		2.7	SPARC	1.3E-02	Cell growth regulation
		-1.4	grpE protein homolog 1, mitochondrial	1.3E-02	Component of the PAM complex
		1.3	phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	1.3E-02	Catalytic activity
		1.7	glycogen phosphorylase, brain form	1.4E-02	Catalytic activity
		1.5	cysteine sulfinic acid decarboxylase	1.4E-02	Catalytic activity
		-2.3	myeloperoxidase	1.4E-02	Catalytic activity
		-1.7	Golgi SNAP receptor complex member 1	1.4E-02	Involved in transport from the ER to the Golgi apparatus as well as in intra-Golgi transport
		-71.3	ceruloplasmin	1.6E-02	Iron transport across the cell membrane
		-3.9	ethanolamine-phosphate phosphatase	1.6E-02	Catalytic activity
		1.5	microsomal glutathione S-transferase 1	1.6E-02	Catalytic activity
		1.4	cocaine esterase	1.6E-02	Catalytic activity
		-2.0	zyxin	1.7E-02	Adhesion plaque protein.
		1.4	quinone oxidoreductase	1.7E-02	Catalytic activity
		-1.7	2-5-oligoadenylate synthase 1	1.7E-02	Catalytic activity
		-1.5	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	1.7E-02	Catalytic activity
		-3.0	protein S100-A9	1.8E-02	Innate immune defense
		1.5	mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	1.8E-02	Catalytic activity
		1.4	serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	1.8E-02	Catalytic activity

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Liver	Vehicle vs BPAG	1.3	estrogen sulfotransferase	1.8E-02	Catalytic activity
		-1.9	leukocyte elastase inhibitor	1.8E-02	Catalytic activity, Innate immune defense
		1.5	peroxisomal bifunctional enzyme	1.9E-02	Bifunctional enzyme acting on the peroxisomal beta-oxidation pathway for fatty acids
		1.6	dipeptidyl peptidase 4	1.9E-02	Catalytic activity
		1.4	serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	1.9E-02	Catalytic activity
		-1.4	complement C1r subcomponent	1.9E-02	Innate immune defense
		-1.4	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	1.9E-02	Initiation of protein synthesis
		1.7	calmin	2.00E-02	Regulation of cell proliferation
		-4.3	tubulin beta-1 chain;	2.1E-02	Constituent of microtubules
		1.5	triokinase/FMN cyclase	2.1E-02	Catalytic activity
		1.3	lamin	2.1E-02	Component of the nuclear lamina
		1.3	dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 3	2.2E-02	Catalytic activity
		1.6	solute carrier family 22 member 18	2.2E-02	May act as a transporter of organic cations based on a proton efflux antiport mechanism
		3.3	dehydrogenase/reductase SDR family member 7	2.3E-02	Catalytic activity
		-1.6	splicing factor 3B subunit 1	2.4E-02	Required for 'A' complex assembly
		-2.5	mitogen-activated protein kinase 14	2.5E-02	MAP kinase signal transduction pathway
		-1.5	copper chaperone of superoxide dismutase 1, partial	2.5E-02	Catalytic activity
		-6.3	arginase-2, mitochondrial	2.6E-02	Regulation of extra-urea cycle arginine metabolism and nitric oxide synthesis
		2.5	arylamine N-acetyltransferase 1	2.8E-02	Catalytic activity
		1.5	membrane primary amine oxidase	2.9E-02	Catalytic activity
		-3.2	resistin precursor	3.0E-02	Suppress insulin ability to stimulate glucose uptake into adipose cells
		2.5	pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	3.0E-02	Regulator of pre-B-cell leukemia transcription factors
		-1.6	ras-related protein Rap-1b	3.0E-02	GTP-binding protein that possesses intrinsic GTPase activity
		1.4	L-gulonolactone oxidase	3.1E-02	Catalytic activity
		1.3	glycine amidinotransferase, mitochondrial	3.1E-02	Catalytic activity
		-1.5	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B;gi	3.2E-02	Diverse cellular processes
		2.0	flotillin-2	3.2E-02	Scaffolding protein
		1.8	enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	3.3E-02	Catalytic activity
		-1.5	thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	3.3E-02	Catalytic activity
		1.3	peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	3.4E-02	Catalytic activity
		-2.9	hemopexin	3.5E-02	Binds and transport heme to the liver

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Liver	Vehicle vs BPAG	-2.1	DNA replication licensing factor MCM5	3.7E-02	DNA replication initiation
		1.7	beta-2-glycoprotein 1	3.7E-02	May prevent activation of the intrinsic blood coagulation cascade by binding to phospholipids on the surface of damaged cells
		-3.0	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	3.7E-02	Catalytic activity
		-1.8	superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	3.7E-02	Catalytic activity
		1.8	UDP-glucuronosyltransferase 1-1 precursor	3.7E-02	Catalytic activity
		-1.4	histone-binding protein RBBP7	3.8E-02	Chromatin metabolism
		-1.7	insulin-degrading enzyme	3.8E-02	Catalytic activity
		2.2	MIP18 family protein FAM96A	3.9E-02	Chromosome segregation
		-1.4	nuclear autoantigenic sperm protein	3.9E-02	Required for DNA replication, normal cell cycle progression and cell proliferation
		-1.6	lambda-crystallin homolog	3.9E-02	Catalytic activity
		1.4	phenazine biosynthesis-like domain-containing protein	4.1E-02	Catalytic activity
		1.7	estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-B-like	4.1E-02	Catalytic activity
		-3.5	C4b-binding protein alpha chain	4.2E-02	Innate immune defense
		-1.6	stathmin	4.2E-02	Involved in the regulation of the microtubule (MT) filament system by destabilizing microtubules
		1.6	retinol-binding protein 4	4.3E-02	Delivers retinol from the liver stores to the peripheral tissues
		-1.3	calreticulin	4.4E-02	Calcium-binding chaperone
		-1.3	splicing factor 3B subunit 2	4.5E-02	Required for 'A' complex assembly
		-1.4	coatamer subunit epsilon	4.5E-02	Biosynthetic protein transport from the ER, via the Golgi up to the trans Golgi network
		1.5	fatty acid synthase, partial	4.7E-02	Catalytic activity
		1.9	aldehyde oxidase	4.7E-02	Catalytic activity
		-3.0	complement factor H-related protein 2	4.8E-02	Innate immune defense
		1.4	guanidinoacetate N-methyltransferase	4.8E-02	Catalytic activity
		1.7	selenocysteine lyase	4.8E-02	Catalytic activity
		1.9	cytosolic beta-glucosidase	4.9E-02	Catalytic activity
		-1.3	chromobox protein homolog 3	4.9E-02	Transcriptional silencing in heterochromatin-like complexes
		-1.7	alpha-hemoglobin-stabilizing protein	5.0E-02	Act as a chaperone to prevent the harmful aggregation of alpha-hemoglobin
		1.4	acetolactate synthase-like protein	5.0E-02	Catalytic activity
Mammary gland	Vehicle vs BPAG	2.2	complement factor I	1.4E-03	Innate immune defense
		-3.4	glutathione S-transferase kappa 1	2.3E-03	Catalytic activity
		-2.6	60S acidic ribosomal protein P2	3.1E-03	Elongation step of protein synthesis
		2.2	tetranectin	3.4E-03	Exocytosis
		-2.3	dynamin-23	3.6E-03	Microtubule bundle production
		1.8	prothrombin precursor	6.6E-03	Hemostasis

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Mammary gland	Vehicle vs BPA	-3.1	serum paraoxonase/arylesterase 2 precursor	7.3E-03	Catalytic activity
		-2.1	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	8.8E-03	Nuclear receptor corepressor, repress glucocorticoid (GR), androgen (AR), thyroid (TR) and VDR-mediated transactivation
		2.1	glutathione S-transferase Mu 1	1.1E-02	Catalytic activity
		2.9	succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial	1.3E-02	Catalytic activity
		2.0	olfactomedin-like protein 1	1.3E-02	Cell proliferation
		4.1	histidine-rich glycoprotein	1.5E-02	Immune complex and pathogen clearance, cell chemotaxis, cell adhesion, angiogenesis, coagulation and fibrinolysis
		1.6	alpha-1B-glycoprotein	1.6E-02	Unknown
		1.6	vitamin D-binding protein	1.6E-02	Vitamin D transport and storage
		1.9	beta-glucuronidase-like, partial	1.7E-02	Catalytic activity
		1.8	F-actin-capping protein subunit alpha-2	1.8E-02	Block the exchange of subunits at the ends of actin filaments
		1.8	uncharacterized protein LOC101104536	2.1E-02	Unknown
		2.0	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1;	2.4E-02	Serine protease inhibitor
		1.6	dermatopontin	3.E-02	Inhibits cell proliferation, accelerates collagen fibril formation
		-2.1	cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog	3.2E-02	Catalytic activity
		1.7	pigment epithelium-derived factor precursor;	3.3E-02	Inhibitor of angiogenesis
		1.7	protein AMBP	3.3E-02	Inhibits trypsin, plasmin, and lysosomal granulocytic elastase
		2.4	ketimine reductase mu-crystallin	3.4E-02	Catalytic activity
		1.8	fetuin-B	3.4E-02	Protease inhibitor required for egg fertilization
		1.7	60S ribosomal protein L35a	3.5E-02	Required for the proliferation and viability of hematopoietic cells
		1.6	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	3.6E-02	Serine protease inhibitor
		1.7	angiotensinogen	3.6E-02	Regulator of blood pressure, body fluid and electrolyte homeostasis
		1.6	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3A	3.7E-02	Catalytic activity
		-2.3	very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	3.8E-02	Catalytic activity
		-2.8	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	3.9E-02	Cellular substrate for protein kinase C
		1.5	eukaryotic initiation factor 4A-III	3.9E-02	ATP-dependent RNA helicase
		1.9	decorin	4.0E-02	Fibrils formation
		-1.6	B-cell receptor-associated protein 31	4.0E-02	Chaperone protein
		5.3	Calponin-1	4.2E-02	Smooth muscle contraction
		1.6	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	4.3E-02	Catalytic activity

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Mammary gland	Vehicle vs BPA	1.7	Y-box-binding protein 3	4.3E-02	Binds to the GM-CSF promoter. Seems to act as a repressor
		1.7	beta-2-glycoprotein 1	4.4E-02	May prevent activation of the intrinsic blood coagulation cascade by binding to phospholipids on the surface of damaged cells
		-2.3	myosin light chain 6B	4.6E-02	Regulatory light chain of myosin
		-1.6	guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	4.6E-02	Transducers downstream of G protein-coupled receptors (GPCRs) in numerous signaling cascades
		1.6	antithrombin-III precursor;	4.6E-02	Hemostasis
		1.9	small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	4.83E-02	Core component of the spliceosome
		2.4	myosin-1	4.9E-02	Organization of the actin cytoskeleton
		1.8	prolargin	5.0E-02	May anchor basement membranes to the underlying connective tissue
		-4.5	phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 gamma	5.0E-02	Production of Phosphatidylinositol biphosphate
		-1.6	sorbitol dehydrogenase	5.0E-02	Catalytic activity
	Vehicle vs BPAG	3.0	fibromodulin	7.3E-04	Affects the rate of fibrils formation
		3.1	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	8.5E-04	Integral component of basement membrane
		-2.2	60S ribosomal protein L36	2.1E-03	Structural constituent of ribosome
		3.4	monoglyceride lipase	5.1E-03	Catalytic activity
		-2.3	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	7.4E-03	Catalytic activity
		2.8	mid1-interacting protein 1	1.1E-02	Regulation of lipogenesis in liver
		-1.9	xaa-Pro dipeptidase	1.1E-02	Catalytic activity
		2.0	olfactomedin-like protein 3	1.1E-02	Dorsoventral patterning during early development
		1.6	calpain small subunit 1	1.2E-02	Catalytic activity
		2.3	cystatin C precursor	1.2E-02	Inhibitor of cysteine proteinases
		-2.1	mitochondrial fission 1 protein	1.3E-02	Fragmentation of the mitochondrial network
		-11.2	myosin-10	1.4E-02	Involved with LARP6 in the stabilization of type I collagen mRNAs for CO1A1 and CO1A2
		-5.3	signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	1.5E-02	Cellular responses to interferons (IFNs), cytokine KITLG/SCF and other cytokines and other growth factors
		-2.3	succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	1.6E-02	Catalytic activity
		-1.9	cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial	1.8E-02	Catalytic activity
		1.9	collagen alpha-2(I) chain	1.9E-02	Fibrillar forming collagen
		1.6	cell surface glycoprotein MUC18	2.0E-02	Cell adhesion, cohesion of the endothelial monolayer at intercellular junctions in vascular tissue
		3.1	Calponin-1	2.0E-02	Smooth muscle contraction

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Mammary gland	Vehicle vs BPAG	-2.4	myosin-9	2.1E-02	Play a role in cytokinesis, cell shape, and specialized functions such as secretion and capping
		-2.3	coagulation factor XIII A chain	2.2E-02	Hemostasis
		-2.3	dihydrodiol dehydrogenase 3	2.2E-02	Catalytic activity
		2.1	histidine-rich glycoprotein	2.4E-02	Immune complex and pathogen clearance, cell chemotaxis, cell adhesion, angiogenesis, coagulation and fibrinolysis
		14.2	myelin protein P0	2.5E-02	Creation of an extracellular membrane face which guides the wrapping process and ultimately compacts adjacent lamellae
		1.5	beta-2-glycoprotein 1	2.5E-02	May prevent activation of the intrinsic blood coagulation cascade by binding to phospholipids on the surface of damaged cells
		-1.6	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	2.7E-02	Catalytic activity
		3.1	epiplakin	2.7E-02	Cytoskeletal architecture
		1.8	alpha-parvin	3.0E-02	Plays a role in the reorganization of the actin cytoskeleton, formation of lamellipodia and ciliogenesis
		1.5	olfactomedin-like protein 1	3.1E-02	Cell proliferation
		-2.5	tropomyosin alpha-4 chain	3.2E-02	Striated muscle contraction
		2.4	protocadherin-16	3.2E-02	Calcium-dependent cell-adhesion protein
		-2.6	carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	3.5E-02	Catalytic activity
		-1.8	mitochondrial amidoxime reducing component 2	3.5E-02	Reduce N-hydroxylated prodrugs
		-1.7	heat shock protein HSP 90-beta	3.6E-02	Chaperone
		1.5	aminopeptidase N	3.6E-02	Catalytic activity
		1.5	copine-3	4.0E-02	Calcium-dependent phospholipid-binding protein that plays a role in ERBB2-mediated tumor cell migration in response to growth factor heregulin stimulation
		-2.0	AFG3-like protein 2	4.0E-02	Protease, Axonal development
		-6.9	hemopexin	4.1E-02	Binds and transport heme to the liver
		-3.6	serpin A3-8	4.1E-02	Serine protease inhibitor
		-1.6	unconventional myosin-VI	4.1E-02	Intracellular movements
		-1.8	sorting nexin-6	4.2E-02	Intracellular trafficking
		1.8	decorin	4.4E-02	Fibrils formation
		-1.4	hyaluronan synthase 1	4.5E-02	Catalytic activity
		1.6	ras GTPase-activating protein 4	4.5E-02	Inhibitory regulator of the Ras-cyclic AMP pathway
		-1.7	calreticulin	4.9E-02	Calcium-binding chaperone
		-1.7	ras-related protein Rab-6A	5.0E-02	Protein transport
		-1.8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	5.0E-02	Proteasome assembly
		-2.4	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	5.0E-02	Catalytic activity
Ovary	Vehicle vs BPA	3.2	thrombomodulin	7.3E-04	Hemostasis
		-2.2	glutathione peroxidase 1	1.1E-03	Protects hemoglobin from oxidative breakdown
		-2.8	regulator of microtubule dynamics protein 3	3.7E-03	Calcium homeostasis regulation

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Ovary	Vehicle vs BPA	-3.9	nodal modulator 1	8.2E-03	Nodal signaling
		-1.7	glycine--tRNA ligase	8.7E-03	Catalytic activity
		-1.8	insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	1.E-02	IGF2 translation regulation
		-1.7	methylosome protein 50	1.4E-02	Modifies specific arginines to dimethylarginines in several spliceosomal Sm proteins and histones
		-1.6	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	1.4E-02	Condense and stabilize the transcripts
		2.1	laminin subunit alpha-4	1.4E-02	Mediate the attachment, migration and organization of cells into tissues during embryonic development
		-1.7	phosphoribosylformylglycinamide synthase	1.8E-02	Catalytic activity
		-1.5	tubulin-specific chaperone A	2.3E-02	Tubulin folding
		-1.5	versican core protein [Capra hircus]	2.3E-02	Intercellular signaling
		-2.0	mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	2.3E-02	Catalytic activity
		-1.7	ribonuclease 4	2.4E-02	Catalytic activity
		-1.4	mitochondrial import receptor subunit TOM70	2.4E-02	Import mitochondrial precursor proteins
		-1.4	60S ribosomal protein L7	2.5E-02	Translation apparatus
		-2.3	vacuolar protein sorting-associated protein 29	2.6E-02	Endosomal multivesicular bodies pathway
		-1.9	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	2.7E-02	Ribosome biogenesis and telomere maintenance
		1.7	ras-related protein Rab-6A	2.7E-02	Protein transport
		-2.0	ubiquitin-fold modifier 1	2.8E-02	Post-translational modification on lysine residues
		-1.8	alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	2.9E-02	Heparin and lipase binding
		1.6	calmegin	3.0E-02	Chaperone involved in spermatogenesis
		-1.9	transcriptional activator protein Pur-beta	3.1E-02	Bind repeated elements in single-stranded DNA such as the purine-rich single strand
		-1.5	protein RCC2	3.1E-02	Mitosis and cytokinesis
		-1.7	2-deoxynucleoside 5-phosphate N-hydrolase 1	3.3E-02	Catalytic activity
		-3.1	flavin reductase (NADPH)	3.4E-02	Catalytic activity
		-3.9	guanylate-binding protein 6-like	3.4E-02	Hydrolyzes GTP to GMP
		-1.4	fibulin-1	3.5E-02	Cell adhesion and migration along protein fibres
		1.5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6	3.6E-02	Catalytic activity
		-1.5	tetranectin;	4.0E-02	Exocytosis
		1.5	kininogen-1	4.0E-02	Inhibitor of thiol proteases
		-1.4	histamine N-methyltransferase	4.1E-02	Catalytic activity
		1.4	mannosyl-oligosaccharide glucosidase	4.1E-02	Catalytic activity
		-1.9	hematopoietic lineage cell-specific protein	4.4E-02	Substrate of the antigen receptor-coupled tyrosine kinase
		-1.4	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	4.4E-02	Participates in pre-mRNA splicing

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Ovary	Vehicle vs BPA	-4.1	beta-B globin chain	4.9E-02	Heme binding
	Vehicle vs BPAG	1.8	mannosyl-oligosaccharide glucosidase	2.5E-04	Catalytic activity
		-20.0	hemopexin	4.1E-03	Binds and transport heme to the liver
		-2.2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5	6.0E-03	Serine protease inhibitor
		-1.5	coronin-1C	8.1E-03	Cytokinesis, motility, and signal transduction
		-2.0	flotillin-2	9.9E-03	Scaffolding protein
		-2.0	complement C4-A	1.2E-02	Innate immune defense
		-1.5	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	1.3E-02	Transport between endoplasmic reticulum and Golgi
		-2.3	transmembrane 9 superfamily member 3	1.4E-02	Component of membrane
		1.7	tensin-1;gi	1.5E-02	Fibrillar adhesion formation
		1.8	transferrin receptor protein 1	1.5E-02	Cellular uptake of Iron
		-2.8	sorting nexin-12	1.6E-02	Intracellular trafficking
		-2.5	fibrinogen gamma chain	1.7E-02	Hemostasis
		-1.7	vigilin	1.9E-02	Sterol metabolism
		-1.7	KDEL motif-containing protein 2	2.0E-02	Glucosyltransferase activity
		-1.7	adenosylhomocysteinase 2	2.0E-02	Catalytic activity
		-1.4	glycogen phosphorylase, brain form	2.1E-02	Catalytic activity
		-2.5	dynamin-23	2.1E-02	Microtubule bundle production
		2.3	utrophin	2.1E-02	Anchoring cytoskeleton to plasma membrane
		-1.6	dihydrofolate reductase	2.2E-02	Catalytic activity
		-1.5	diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	2.3E-02	Catalytic activity
		1.5	receptor expression-enhancing protein 5 [Capra hircus]	2.3E-02	Olfactory receptor expression
		-1.8	glutathione peroxidase 1	2.5E-02	Protects hemoglobin from oxidative breakdown
		1.4	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	2.7E-02	Catalytic activity
		1.7	thrombomodulin	2.7E-02	Hemostasis
		-2.9	nodal modulator 1	2.8E-02	Nodal signaling
		-2.1	complement C3	2.9E-02	Innate immune defense
		-2.1	plasma protease C1 inhibitor;	2.9E-02	Catalytic activity , Innate immune defense
		-1.9	beta-2-microglobulin	2.9E-02	Innate immune defense
		1.5	ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	2.9E-02	Biosynthesis of coenzyme Q
		-1.8	serine/arginine-rich splicing factor 10	3.4E-02	Pre-mRNA splicing
		-2.5	fibrinogen beta chain	3.5E-02	Hemostasis
		-1.8	lysosomal protective protein	3.6E-02	Protect beta-galactosidase and neuraminidase
		1.3	myosin light polypeptide 6	3.8E-02	Light chain of myosin
		2.0	alanyl-tRNA editing protein Aarsd1	4.0E-02	Edit the amino acid moiety from incorrectly charged tRNA(Ala)

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Ovary	Vehicle vs BPAG	-1.4	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	4.0E-02	Participates in pre-mRNA splicing
		-1.6	phosphoribosylformylglycinamidine synthase	4.1E-02	Catalytic activity
		-1.6	COP9 signalosome complex subunit 2	4.2E-02	Photomorphogenesis, auxin and jasmonate responses
		-5.6	lysosome-associated membrane glycoprotein 2	4.3E-02	Implicated in tumor cell metastasis
		-1.4	methylosome protein 50	4.4E-02	Modifies specific arginines to dimethylarginines in several spliceosomal Sm proteins and histones
		-71.9	ceruloplasmin	4.4E-02	Iron transport across the cell membrane
		-2.1	collagen alpha-2(IV) chain	4.4E-02	Fibrillar forming collagen
		-1.6	cysteine sulfinic acid decarboxylase	4.5E-02	Catalytic activity
		-2.2	serpin A3-1-like	4.5E-02	Inhibitor of the serine proteases elastase and trypsin
		-2.4	fibrinogen alpha chain	4.6E-02	Hemostasis
		-2.0	translational activator GCN1	4.6E-02	Chaperone involved in delivery of uncharged tRNAs
		1.6	tropomyosin alpha-1 chain	4.6E-02	Smooth muscle contraction
		-1.6	la-related protein 1	4.63E-02	Translation of specific classes of mRNAs downstream of the mTORC1 complex
		-2.1	vacuolar protein sorting-associated protein 29	4.7E-02	Endosomal multivesicular bodies pathway
		-1.6	chloride intracellular channel protein 1	4.8E-02	Form chloride ion channels
		-1.4	signal recognition particle 54 kDa protein	4.8E-02	Translocating chain-associating membrane protein
		-2.2	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	4.8E-02	Initiation of protein synthesis
		1.4	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	4.9E-02	Catalytic activity
		-2.2	dynamin-1	5.0E-02	Mitochondrial and peroxisomal division
		-2.0	small nuclear ribonucleoprotein G	5.0E-02	Core component of the spliceosome
Plasma	Vehicle vs BPA	2.2	hepatocyte growth factor activator	5.4E-03	Growth factor
		-9.3	immunoglobulin V lambda chain, partial	7.3E-03	Adaptive immune defense
		-50.0	Ig heavy chain C region - sheep (fragment)	1.4E-02	Adaptive immune defense
		-4.4	mannose-binding protein C	1.6E-02	Innate immune defense
		-13.1	primary amine oxidase, lung isozyme	2.1E-02	Catalytic activity
		-81.6	Ig lambda chain C region - sheep (fragment)	2.5E-02	Adaptive immune defense
		-2.1	hemoglobin subunit alpha-1/2	2.8E-02	Oxygen transport
		-2.1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	2.8E-02	Catalytic activity
		2.7	ubiquitin-2	3.4E-02	Regulation of histone gene transcription

Tissue	Treatment	Fold change	Name	P-value	Function
Plasma	Vehicle vs BPA	1.8	uncharacterized protein LOC105610965	3.6E-02	Unknown
		1.9	apolipoprotein D	4.0E-02	Lipid transport
		-4.7	immunoglobulin lambda-2b light chain variable region, partial	4.1E-02	Adaptive immune defense
		2.4	serpin A3-7-like	4.5E-02	Serine protease inhibitor
		-1.8	attractin	4.7E-02	Innate immune defense
	Vehicle vs BPAG	3.1	apolipoprotein A-IV	2.8E-03	Lipid transport
		-2.6	hemopexin	1.0E-02	Binds and transport heme to the liver
		3.7	alpha-1-antitrypsin transcript variant 1	1.2E-02	Serine protease inhibitor
		2.3	serpin A3-7-like	1.8E-02	Serine protease inhibitor
		2.2	telomere-associated protein RIF1	2.6E-02	Cell cycle checkpoint
		1.5	beta-2-glycoprotein 1	3.4E-02	May prevent activation of the intrinsic blood coagulation cascade by binding to phospholipids on the surface of damaged cells
		-6.6	immunoglobulin V lambda chain, partial	3.6E-02	Adaptive immune defense
	Before vs after Vehicle	-6.4	serpin A3-8	6.2E-03	Serine protease inhibitor

Supplemental Material, Pathway analysis

Supplemental Material, Table 2. Full list of canonical pathways identified with the BPA or the BPAG treatment for each fetal tissue and with the combination of the plasma, mammary gland, liver and ovary datasets. A cut-off of 0.05 was applied.

Tissue	Treatment	Ingenuity Canonical Pathways	z-score	P-value	Number of proteins
All combined	BPA	LXR/RXR Activation	3	7.4E-08	9
		Acute Phase Response Signaling	0.45	7.9E-08	10
		FXR/RXR Activation	NA	1.3E-07	9
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	2.9E-05	4
		Coagulation System	0	5.5E-05	4
		Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	1.6E-04	3
		p70S6K Signaling	0.45	9.1E-04	5
		EIF2 Signaling	0	9.1E-04	6
		Actin Cytoskeleton Signaling	0.45	2.1E-03	6
		Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	NA	2.6E-03	3
		Systemic Lupus Erythematosus Signaling	NA	1.0E-02	5
		Glutathione Redox Reactions I	NA	1.0E-02	2
		Tight Junction Signaling	NA	1.8E-02	4
		Complement System	NA	2.1E-02	2
		Glutathione-mediated Detoxification	NA	2.3E-02	2
		Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	NA	2.5E-02	2
		Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	NA	2.6E-02	4

Tissue	Treatment	Ingenuity Canonical Pathways	z-score	P-value	Number of proteins
All combined	BPA	Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	NA	2.7E-02	4
		Thrombin Signaling	0	3.0E-02	4
		Gα12/13 Signaling	NA	3.4E-02	3
		GNRH Signaling	NA	4.7E-02	3
		IL-12 Signaling and Production in Macrophages	NA	4.9E-02	3
	BPAG	Acute Phase Response Signaling	-2.9	5.0E-15	18
		LXR/RXR Activation	0.6	6.3E-11	13
		Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	0	5.6E-08	12
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	-1.3	1.5E-07	6
		FXR/RXR Activation	NA	2.3E-07	10
		Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	-1	3.0E-07	5
		Coagulation System	-1.6	4.2E-07	6
		Atherosclerosis Signaling	NA	1.0E-05	8
		Complement System	-0.45	1.5E-05	5
		IL-12 Signaling and Production in Macrophages	NA	2.0E-05	8
		Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	NA	3.0E-05	9
		Xenobiotic Metabolism Signaling	NA	5.4E-04	9
		phagosome maturation	NA	6.9E-04	6
		Calcium Signaling	NA	9.8E-04	7
		Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	NA	1.0E-03	7
		Fatty Acid β-oxidation III (Unsaturated, Odd Number)	NA	1.0E-03	2
		Epithelial Adherens Junction Signaling	NA	1.5E-03	6
		Glycine Degradation (Creatine Biosynthesis)	NA	2.4E-03	2
		Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	NA	2.5E-03	4
		Tight Junction Signaling	NA	2.8E-03	6
		IL-17A Signaling in Fibroblasts	NA	3.1E-03	3
		Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	NA	3.2E-03	4
		Interferon Signaling	NA	3.3E-03	3
		NRF2-mediated Oxidative Stress Response	0	4.1E-03	6
		Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	NA	4.5E-03	3
		ILK Signaling	-0.82	4.9E-03	6
		Role of IL-17A in Psoriasis	NA	5.1E-03	2
		dTMP De Novo Biosynthesis	NA	5.9E-03	2
		iNOS Signaling	NA	7.1E-03	3
		Virus Entry via Endocytic Pathways	NA	8.3E-03	4
		Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	NA	1.1E-02	2
		Urea Cycle	NA	1.2E-02	2
		Role of Tissue Factor in Cancer	NA	1.4E-02	4
		IL-22 Signaling	NA	1.7E-02	2
		Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	NA	1.7E-02	2
		Dendritic Cell Maturation	-1.3	1.7E-02	5
		IL-17A Signaling in Gastric Cells	NA	1.8E-02	2

Tissue	Treatment	Ingenuity Canonical Pathways	z-score	P-value	Number of proteins
All combined	BPAG	Role of JAK family kinases in IL-6-type Cytokine Signaling	NA	1.8E-02	2
		Lipid Antigen Presentation by CD1	NA	1.9E-02	2
		Glutathione Redox Reactions I	NA	1.9E-02	2
		IL-15 Production	NA	2.1E-02	2
		PXR/RXR Activation	NA	2.1E-02	3
		PEDF Signaling	NA	2.1E-02	3
		IL-10 Signaling	NA	2.2E-02	3
		Nicotine Degradation II	NA	2.3E-02	3
		GNRH Signaling	-1	2.7E-02	4
		4-1BB Signaling in T Lymphocytes	NA	2.8E-02	2
		VDR/RXR Activation	NA	2.8E-02	3
		IL-9 Signaling	NA	3.2E-02	2
		Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	NA	3.4E-02	4
		Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	NA	3.7E-02	4
		Antigen Presentation Pathway	NA	3.8E-02	2
		Apoptosis Signaling	NA	3.9E-02	3
		April Mediated Signaling	NA	4.0E-02	2
		Superpathway of Citrulline Metabolism	NA	4.0E-02	2
		Inhibition of Angiogenesis by TSP1	NA	4.2E-02	2
		TR/RXR Activation	NA	4.2E-02	3
		B Cell Activating Factor Signaling	NA	4.4E-02	2
		Glutathione-mediated Detoxification	NA	4.4E-02	2
Liver	BPA	Acute Phase Response Signaling	NA	6.5E-03	3
		IL-12 Signaling and Production in Macrophages	NA	3.7E-02	2
		Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	NA	4.4E-02	2
	BPAG	Acute Phase Response Signaling	-3	1.3E-11	12
		LXR/RXR Activation	0.71	5.0E-09	9
		Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	-0.38	1.3E-07	9
		Xenobiotic Metabolism Signaling	NA	2.9E-05	8
		FXR/RXR Activation	NA	3.1E-05	6
		Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	6.3E-05	3
		NRF2-mediated Oxidative Stress Response	0	1.4E-04	6
		Atherosclerosis Signaling	NA	2.2E-04	5
		Fatty Acid β -oxidation III (Unsaturated, Odd Number)	NA	2.8E-04	2
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	3.0E-04	3
		IL-12 Signaling and Production in Macrophages	NA	3.4E-04	5
		Coagulation System	NA	4.8E-04	3
		IL-17A Signaling in Fibroblasts	NA	4.8E-04	3
		Glycine Degradation (Creatine Biosynthesis)	NA	6.6E-04	2
		Role of IL-17A in Psoriasis	NA	1.4E-03	2
		Role of Tissue Factor in Cancer	NA	1.5E-03	4
		phagosome maturation	NA	2.3E-03	4

Tissue	Treatment	Ingenuity Canonical Pathways	z-score	P-value	Number of proteins
Liver	BPAG	PXR/RXR Activation	NA	3.7E-03	3
		PEDF Signaling	NA	3.7E-03	3
		IL-10 Signaling	NA	3.9E-03	3
		Nicotine Degradation II	NA	4.1E-03	3
		IL-17A Signaling in Gastric Cells	NA	5.4E-03	2
		4-1BB Signaling in T Lymphocytes	NA	8.1E-03	2
		Interferon Signaling	NA	1.1E-02	2
		Antioxidant Action of Vitamin C	NA	1.1E-02	3
		April Mediated Signaling	NA	1.2E-02	2
		Complement System	NA	1.2E-02	2
		Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	NA	1.3E-02	2
		B Cell Activating Factor Signaling	NA	1.3E-02	2
		HMGB1 Signaling	NA	1.6E-02	3
		Fatty Acid β -oxidation I	NA	1.7E-02	2
		LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	NA	1.7E-02	4
		iNOS Signaling	NA	1.8E-02	2
		Stearate Biosynthesis I (Animals)	NA	2.0E-02	2
		Role of IL-17A in Arthritis	NA	2.5E-02	2
		Epithelial Adherens Junction Signaling	NA	2.7E-02	3
		Nicotine Degradation III	NA	2.8E-02	2
		Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	NA	2.8E-02	3
		IL-15 Signaling	NA	3.2E-02	2
		CD40 Signaling	NA	3.3E-02	2
		IL-17A Signaling in Airway Cells	NA	3.4E-02	2
		Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	NA	3.5E-02	2
		Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	NA	3.5E-02	3
		Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	NA	3.5E-02	2
		Tight Junction Signaling	NA	3.7E-02	3
		IL-17 Signaling	NA	4.0E-02	2
		Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	NA	4.1E-02	2
		LPS-stimulated MAPK Signaling	NA	4.1E-02	2
		Toll-like Receptor Signaling	NA	4.2E-02	2
		TREM1 Signaling	NA	4.4E-02	2
		B Cell Receptor Signaling	NA	4.4E-02	3
		BMP signaling pathway	NA	4.5E-02	2
		PPAR α /RXR α Activation	NA	4.6E-02	3
		VDR/RXR Activation	NA	4.7E-02	2
Mammary gland	BPA	FXR/RXR Activation	NA	1.1E-08	7
		Acute Phase Response Signaling	NA	5.1E-08	7
		LXR/RXR Activation	2.5	2.2E-07	6
		p70S6K Signaling	0	1.2E-04	4
		Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	6.0E-04	2

Tissue	Treatment	Ingenuity Canonical Pathways	z-score	P-value	Number of proteins
Mammary gland	BPA	Actin Cytoskeleton Signaling	0	1.0E-03	4
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	1.7E-03	2
		Coagulation System	NA	2.3E-03	2
		Glutathione-mediated Detoxification	NA	3.0E-03	2
		Tight Junction Signaling	NA	4.7E-03	3
		RhoGDI Signaling	NA	5.8E-03	3
		Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	NA	6.5E-03	3
		EIF2 Signaling	NA	6.5E-03	3
		Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	NA	6.8E-03	3
		Thrombin Signaling	NA	7.4E-03	3
		Signaling by Rho Family GTPases	NA	1.2E-02	3
		Regulation of Actin-based Motility by Rho	NA	1.5E-02	2
		G Beta Gamma Signaling	NA	1.7E-02	2
		Gα12/13 Signaling	NA	2.4E-02	2
		RhoA Signaling	NA	2.6E-02	2
		GNRH Signaling	NA	3.1E-02	2
		Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	NA	3.4E-02	2
		Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	NA	3.5E-02	2
		Epithelial Adherens Junction Signaling	NA	3.6E-02	2
		CXCR4 Signaling	NA	4.2E-02	2
	BPAG	Acute Phase Response Signaling	NA	4.7E-04	4
		Calcium Signaling	NA	6.5E-04	4
		Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	NA	6.6E-04	4
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	1.9E-03	2
		ILK Signaling	NA	7.2E-03	3
		Neuregulin Signaling	NA	1.7E-02	2
		LXR/RXR Activation	NA	3.0E-02	2
		FXR/RXR Activation	NA	3.4E-02	2
		Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	NA	3.6E-02	2
		Epithelial Adherens Junction Signaling	NA	3.9E-02	2
Ovary	BPA	Tight Junction Signaling	NA	4.9E-02	2
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	9.5E-04	2
		Coagulation System	NA	1.3E-03	2
	BPAG	Systemic Lupus Erythematosus Signaling	NA	4.5E-03	3
		Acute Phase Response Signaling	-2.7	1.5E-10	9
		Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	-1	6.8E-08	4
		Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	NA	6.0E-07	4
		Coagulation System	-1	1.1E-06	4
		Virus Entry via Endocytic Pathways	NA	6.3E-05	4
		Complement System	NA	8.5E-05	3
		LXR/RXR Activation	-2	2.0E-04	4
		FXR/RXR Activation	NA	2.6E-04	4
		Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	NA	6.0E-04	3

Tissue	Treatment	Ingenuity Canonical Pathways	z-score	P-value	Number of proteins
Ovary	BPAG	Role of Tissue Factor in Cancer	NA	2.1E-03	3
		Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	NA	8.7E-03	3
		Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	NA	1.0E-02	2
		phagosome maturation	NA	3.3E-02	2
		GNRH Signaling	NA	3.7E-02	2
Plasma	BPA	Acute Phase Response Signaling	NA	2.6E-03	2
	BPAG	LXR/RXR Activation	1	3.6E-08	4
		FXR/RXR Activation	NA	4.8E-08	4
		Acute Phase Response Signaling	0	1.2E-07	4
		Atherosclerosis Signaling	NA	6.5E-04	2
		IL-12 Signaling and Production in Macrophages	NA	7.8E-04	2
		Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	NA	1.4E-03	2
		Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	NA	1.4E-03	2

Supplemental Material, Table 3. Full list of upstream regulators identified with the BPA or the BPAG treatment for the combination of the plasma, mammary gland, liver and ovary datasets. A cut-off of 0.01 was applied.

Treatment	Upstream Regulator	Molecule Type	Activation z-score	P-value of overlap	number of proteins
BPA	HNF4A	transcription regulator	0.0	1.2E-10	36
	VCAN	other	-0.3	4.5E-08	9
	HNF1A	transcription regulator	0.4	5.6E-06	12
	lipopolysaccharide	chemical drug	-1.2	9.6E-06	24
	dexamethasone	chemical drug	2.8	1.5E-05	24
	beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	-1.5	2.8E-05	24
	TNF	cytokine	-1.8	2.9E-05	23
	methylprednisolone	chemical drug	0.4	3.9E-05	12
	NKX2-1	transcription regulator	NA	5.6E-05	7
	MKL1	transcription regulator	2.4	8.9E-05	6
	MKL2	transcription regulator	2.2	9.4E-05	5
	5-fluorouracil	chemical drug	-0.4	2.4E-04	7
	ITIH2	other	NA	2.9E-04	2
	hemin	chemical - endogenous mammalian	NA	3.1E-04	4
	ADCYAP1	other	-0.4	3.2E-04	7
	fluticasone	chemical drug	-0.9	4.1E-04	6
	Tcf 1/3/4	group	NA	4.4E-04	2
	TNFAIP6	other	NA	4.4E-04	2
	HTT	transcription regulator	0.6	4.8E-04	12
	IL3	cytokine	NA	4.9E-04	8
	HNRNPK	transcription regulator	NA	5.3E-04	3
	TGFB1	growth factor	-1.4	5.5E-04	20

Treatment	Upstream Regulator	Molecule Type	Activation z-score	P-value of overlap	number of proteins
BPA	TP53	transcription regulator	-0.1	6.0E-04	18
	OSM	cytokine	-0.2	6.3E-04	10
	ONECUT1	transcription regulator	NA	8.5E-04	7
	IL17A	cytokine	-1.5	8.8E-04	6
	CD 437	chemical drug	1.6	9.2E-04	6
BPAG	dexamethasone	chemical drug	-0.2	1.6E-15	48
	OSM	cytokine	-2.8	5.2E-14	26
	TNF	cytokine	-1.6	2.4E-13	44
	lipopolysaccharide	chemical drug	-4.3	4.5E-12	42
	TGFB1	growth factor	-0.9	1.2E-11	41
	beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	-1.4	3.5E-11	42
	CEBPA	transcription regulator	-2.0	9.4E-11	20
	TP53	transcription regulator	0.7	1.4E-10	36
	NFE2L2	transcription regulator	0.4	2.8E-10	19
	PPARA	ligand-dependent nuclear receptor	3.4	6.0E-10	19
	nitrofurantoin	chemical drug	1.6	6.8E-09	12
	1,2-dithiol-3-thione	chemical reagent	-0.5	9.2E-09	13
	IL1B	cytokine	-2.9	1.0E-08	25
	IFNG	cytokine	-2.8	1.1E-08	31
	MKL2	transcription regulator	2.1	1.6E-08	9
	HNF4A	transcription regulator	1.5	6.9E-08	39
	MKL1	transcription regulator	2.3	8.2E-08	10
	IL6	cytokine	-2.5	1.2E-07	21
	STAT3	transcription regulator	-1.4	1.2E-07	18
	HTT	transcription regulator	-1.0	1.2E-07	21
	methapyrilene	chemical drug	1.1	1.3E-07	10
	IL1A	cytokine	-0.8	1.4E-07	12
	ciprofibrate	chemical drug	0.3	2.1E-07	10
	MYC	transcription regulator	0.1	3.0E-07	25
	vancomycin	biologic drug	-1.3	3.5E-07	8
	hydrogen peroxide	chemical - endogenous mammalian	-0.1	3.8E-07	16
	calcitriol	chemical drug	-0.3	5.4E-07	16
	PIAS3	transcription regulator	1.2	7.0E-07	4
	SB203580	chemical - kinase inhibitor	2.6	7.2E-07	14
	VCAN	other	1.7	8.5E-07	9
	RXRA	ligand-dependent nuclear receptor	1.0	8.8E-07	12
	methylprednisolone	chemical drug	-1.9	9.4E-07	17
	rosiglitazone	chemical drug	0.5	9.7E-07	15
	Stat3-Stat3	complex	-2.2	9.8E-07	5
	TO-901317	chemical reagent	0.3	1.5E-06	11
	fenofibrate	chemical drug	1.9	3.3E-06	11

Treatment	Upstream Regulator	Molecule Type	Activation z-score	P-value of overlap	number of proteins
BPAG	KRAS	enzyme	0.5	3.5E-06	13
	progesterone	chemical - endogenous mammalian	0.7	3.5E-06	17
	miR-146a-5p (and other miRNAs w/seed GAGAACU)	mature microrna	1.9	4.3E-06	7
	VHL	transcription regulator	-1.2	6.3E-06	8
	PDGF BB	complex	-0.7	7.3E-06	12
	LY294002	chemical - kinase inhibitor	-0.4	7.4E-06	15
	sirolimus	chemical drug	1.1	7.8E-06	14
	GFI1	transcription regulator	1.1	7.9E-06	7
	PRL	cytokine	-0.3	8.4E-06	11
	HNF1A	transcription regulator	1.1	8.7E-06	14
	SRF	transcription regulator	2.3	1.0E-05	12
	arsenic trioxide	chemical drug	0.1	1.0E-05	8
	HOXA10	transcription regulator	0.3	1.1E-05	9
	APOE	transporter	NA	1.1E-05	10
	ethionine	chemical toxicant	-2.2	1.2E-05	5
	ACOX1	enzyme	0.0	1.7E-05	8
	ESR1	ligand-dependent nuclear receptor	0.5	1.9E-05	25
	gentamicin	chemical drug	-2.5	2.2E-05	10
	JUN	transcription regulator	-1.5	2.3E-05	13
	isotretinoin	biologic drug	-1.7	2.3E-05	6
	PAX3	transcription regulator	NA	2.4E-05	9
	captopril	chemical drug	-0.8	2.5E-05	6
	FAS	transmembrane receptor	0.9	3.0E-05	12
	cisplatin	chemical drug	-1.4	3.6E-05	16
	tretinoin	chemical - endogenous mammalian	-1.2	3.7E-05	26
	pirinixic acid	chemical toxicant	1.1	3.8E-05	13
	APP	other	-1.8	3.8E-05	19
	ADAMTS12	peptidase	2.0	4.5E-05	4
	inosine	chemical - endogenous mammalian	-1.1	4.6E-05	5
	LMNB1	other	NA	4.6E-05	5
	allopurinol	chemical drug	-1.6	4.8E-05	6
	PPARG	ligand-dependent nuclear receptor	1.8	5.1E-05	13
	TP73	transcription regulator	2.2	5.4E-05	11
	Col17a1	other	NA	5.9E-05	2
	dextran sulfate	chemical drug	NA	6.2E-05	9
	EHF	transcription regulator	-1.6	6.3E-05	6
	CEBPB	transcription regulator	-0.9	6.3E-05	12
	phorbol myristate acetate	chemical drug	-2.3	6.7E-05	21
	FOS	transcription regulator	0.7	6.8E-05	14
	dihydrotestosterone	chemical - endogenous mammalian	1.6	7.0E-05	14

Treatment	Upstream Regulator	Molecule Type	Activation z-score	P-value of overlap	number of proteins
BPAG	KITLG	growth factor	NA	7.1E-05	9
	IL22	cytokine	-2.4	7.6E-05	6
	hexachlorobenzene	chemical toxicant	-2.2	7.9E-05	5
	paclitaxel	chemical drug	-0.6	7.9E-05	10
	GATA2	transcription regulator	1.0	9.1E-05	10
	hemin	chemical - endogenous mammalian	0.0	9.3E-05	5
	bezafibrate	chemical drug	2.2	1.0E-04	6
	indomethacin	chemical drug	-1.8	1.1E-04	9
	EGF	growth factor	0.3	1.1E-04	13
	BDNF	growth factor	-0.2	1.1E-04	10
	methotrexate	chemical drug	-1.9	1.1E-04	9
	ethanol	chemical - endogenous mammalian	0.1	1.1E-04	11
	ESR2	ligand-dependent nuclear receptor	0.2	1.1E-04	12
	GNA15	enzyme	NA	1.1E-04	6
	HDAC1	transcription regulator	1.9	1.2E-04	9
	IL4	cytokine	-0.1	1.2E-04	17
	miR-29b-3p (and other miRNAs w/seed AGCACCA)	mature microrna	0.4	1.2E-04	5
	DUSP1	phosphatase	1.6	1.2E-04	6
	gentamicin C	chemical drug	-2.2	1.3E-04	5
	Cdc42	enzyme	-2.0	1.3E-04	4
	thioacetamide	chemical toxicant	-0.2	1.4E-04	9
	lomustine	chemical drug	-2.2	1.4E-04	5
	NR1I2	ligand-dependent nuclear receptor	1.1	1.4E-04	7
	cyclosporin A	biologic drug	-0.5	1.6E-04	12
	triamterene	chemical drug	-2.2	1.6E-04	5
	AGT	growth factor	-0.1	1.6E-04	12
	gefitinib	chemical drug	NA	1.7E-04	7
	tamoxifen	chemical drug	-1.1	1.7E-04	9
	Ins1	other	-1.0	1.7E-04	10
	trogliatzone	chemical drug	0.9	1.7E-04	11
	N4BP2L2	other	NA	1.8E-04	2
	Il3	cytokine	NA	1.8E-04	5
	XBP1	transcription regulator	-0.1	1.9E-04	8
	fenamic acid	chemical reagent	-2.2	2.0E-04	5
	carbon tetrachloride	chemical toxicant	0.6	2.0E-04	8
	CREBBP	transcription regulator	0.1	2.0E-04	11
	MTOR	kinase	0.4	2.2E-04	9
	AHR	ligand-dependent nuclear receptor	0.3	2.3E-04	10
	CFB	peptidase	NA	2.4E-04	3
	TEK	kinase	NA	2.4E-04	3

Treatment	Upstream Regulator	Molecule Type	Activation z-score	P-value of overlap	number of proteins
BPAG	cigarette smoke	chemical toxicant	-2.0	2.5E-04	8
	4-phenylbutyric acid	chemical - endogenous mammalian	1.0	2.6E-04	5
	SP1	transcription regulator	-0.3	2.7E-04	13
	IL1	group	-1.6	2.8E-04	10
	RCE1	peptidase	NA	2.8E-04	4
	IFI16	transcription regulator	-0.4	2.9E-04	5
	phenacetin	chemical drug	-2.0	3.1E-04	4
	PRDM1	transcription regulator	-1.4	3.1E-04	8
	SMARCB1	transcription regulator	0.0	3.2E-04	7
	leukotriene B4	chemical - endogenous mammalian	NA	3.4E-04	3
	TFEC	transcription regulator	NA	3.4E-04	3
	CSF3	cytokine	-2.0	3.4E-04	7
	EPO	cytokine	NA	3.7E-04	9
	interferon beta-1a	biologic drug	NA	3.8E-04	6
	sulforafan	chemical drug	0.4	4.1E-04	6
	tert-butyl-hydroquinone	chemical reagent	-0.3	4.1E-04	5
	HDAC2	transcription regulator	1.4	4.3E-04	6
	fluticasone	chemical drug	-1.2	4.3E-04	7
	MTPN	transcription regulator	-0.6	4.4E-04	5
	CD3	complex	2.1	4.5E-04	14
	chenodeoxycholic acid	chemical - endogenous mammalian	-2.0	4.6E-04	5
	OSMR	transmembrane receptor	NA	4.7E-04	3
	NS-398	chemical reagent	0.2	4.9E-04	5
	FGF19	growth factor	NA	4.9E-04	5
	Immunoglobulin	complex	2.2	5.2E-04	8
	POR	enzyme	NA	5.3E-04	7
	LEP	growth factor	-1.1	5.3E-04	11
	GW9662	chemical reagent	-0.8	5.5E-04	5
	CEBPE	transcription regulator	-2.0	5.6E-04	4
	ZFP36	transcription regulator	NA	5.6E-04	4
	NFKBIA	transcription regulator	0.4	5.7E-04	11
	nitrate	chemical - endogenous mammalian	NA	5.8E-04	2
	carboplatin	chemical drug	-2.0	6.0E-04	4
	NOS2	enzyme	-1.9	6.0E-04	7
	IPMK	kinase	NA	6.3E-04	3
	MYCN	transcription regulator	0.4	6.6E-04	8
	wortmannin	chemical - kinase inhibitor	-1.1	6.6E-04	7
	ATF4	transcription regulator	1.1	6.7E-04	6
	enalapril	chemical drug	-1.0	7.0E-04	4
	FAM3B	cytokine	NA	7.2E-04	3
	doxorubicin	chemical drug	-1.3	7.8E-04	10

Treatment	Upstream Regulator	Molecule Type	Activation z-score	P-value of overlap	number of proteins
BPAG	D-glucose	chemical - endogenous mammalian	1.4	7.8E-04	12
	F2	peptidase	-1.2	7.9E-04	8
	NFkB (complex)	complex	-1.8	8.0E-04	13
	miR-1-3p (and other miRNAs w/seed GGAAUGU)	mature microrna	0.4	8.0E-04	7
	EDN1	cytokine	NA	8.0E-04	7
	COL4A3	other	NA	8.1E-04	3
	IKBKB	kinase	-1.9	8.3E-04	8
	HNRNPA2B1	other	NA	8.4E-04	6
	4-hydroxytamoxifen	chemical drug	-0.1	8.7E-04	6
	adenosine dialdehyde	chemical reagent	NA	8.7E-04	2
	FANCD2	other	NA	8.7E-04	2
	RNF17	other	NA	8.7E-04	2
	SF1	transcription regulator	NA	8.7E-04	2
	lestaurtinib	chemical drug	NA	8.7E-04	2
	VEGFA	growth factor	0.8	9.0E-04	8
	NCOR-LXR-Oxysterol-RXR-9 cis RA	complex	NA	9.2E-04	3
	olanzapine	chemical drug	0.4	9.4E-04	5
	simvastatin	chemical drug	2.4	9.8E-04	7

Supplemental Material, Table 4. Full list of toxicological functions identified with the BPA or the BPAG treatment for the combination of the plasma, mammary gland, liver and ovary datasets. A cutoff of 0.01 was applied.

Treatment	Categories	Diseases or Functions Annotation	P-Value	Number of Molecules
BPA	Kidney Failure	failure of kidney	4.5E-04	8
	Liver Fibrosis	mitogenesis of hepatic stellate cells	9.6E-04	2
	Kidney Failure	chronic renal failure	1.2E-03	6
	Renal Proliferation	proliferation of kidney cells	1.6E-03	4
	Kidney Failure	end stage renal disease	2.4E-03	5
	Renal Necrosis/Cell Death	apoptosis of tubular cells	2.6E-03	3
	Renal Damage	injury of kidney	3.3E-03	4
	Renal Damage	damage of kidney	3.3E-03	5
	Renal Proliferation	proliferation of mesangial cells	3.3E-03	3
	Glomerular Injury, Kidney Failure, Renal Fibrosis	interstitial fibrosis of kidney	3.9E-03	3
	Cardiac Infarction	acute myocardial infarction	4.5E-03	4
	Renal Proliferation	proliferation of tubular cells	5.1E-03	2
	Glomerular Injury	hypertension of renal glomerulus	6.0E-03	1

Treatment	Categories	Diseases or Functions Annotation	P-Value	Number of Molecules
BPA	Cardiac Pulmonary Embolism	recurrent pulmonary embolism	6.0E-03	1
	Kidney Failure	septic acute kidney injury	6.0E-03	1
	Kidney Failure, Renal Inflammation, Renal Nephritis	susceptibility to progression to renal failure in IgA nephropathy	6.0E-03	1
	Cardiac Infarction	myocardial infarction	6.8E-03	6
	Renal Atrophy	atrophy of renal tubule	6.9E-03	2
	Cardiac Fibrosis	fibrosis of left ventricle	8.2E-03	2
	Renal Necrosis/Cell Death	apoptosis of renal tubular epithelial cells	8.9E-03	2
BPAG	Renal Damage, Renal Tubule Injury	proximal tubular toxicity	1.4E-05	7
	Liver Necrosis/Cell Death	focal necrosis of liver	1.7E-05	4
	Renal Inflammation, Renal Nephritis	Fechtner syndrome	6.9E-05	2
	Renal Inflammation, Renal Nephritis	epstein syndrome	6.9E-05	2
	Glomerular Injury	glomerulosclerosis	2.8E-04	7
	Cardiac Necrosis/Cell Death	cell death of cardiomyocytes	4.2E-04	9
	Cardiac Dilation	dilation of left ventricle	4.9E-04	4
	Renal Proliferation	proliferation of kidney cells	6.9E-04	5
	Liver Hyperbilirubinemia	hyperbilirubinemia	8.9E-04	3
	Renal Proliferation	proliferation of renal tubular epithelial cells	1.4E-03	2
	Renal Necrosis/Cell Death	apoptosis of kidney cells	1.7E-03	5
	Kidney Failure	acute tubular necrosis	1.9E-03	2
	Liver Fibrosis	fibrosis of liver	1.9E-03	6
	Renal Damage	damage of kidney	2.8E-03	6
	Cardiac Necrosis/Cell Death	apoptosis of cardiomyocytes	3.0E-03	7
	Congenital Heart Anomaly	congenital heart block	3.6E-03	2
	Kidney Failure	failure of kidney	3.9E-03	8
	Cardiac Arrhythmia, Tachycardia	catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia type 1	4.3E-03	2
	Cardiac Damage	damage of myocardium	5.1E-03	2
	Congenital Heart Anomaly	congenital heart disease	5.5E-03	7
	Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	liver cancer	6.1E-03	70
	Renal Necrosis/Cell Death	cell death of kidney cells	6.4E-03	10
	Renal Necrosis/Cell Death	apoptosis of tubular cells	6.7E-03	3
	Renal Proliferation	cell proliferation of kidney cell lines	8.0E-03	6
	Liver Hyperbilirubinemia	Crigler-Najjar syndrome type 2	8.3E-03	1
	Liver Hyperbilirubinemia	Lucey-Driscoll syndrome	8.3E-03	1
	Liver Cirrhosis	alpha-1 antitrypsin deficiency related emphysema-cirrhosis	8.3E-03	1
	Congenital Heart Anomaly	cardiac valvular form autosomal recessive Ehlers-Danlos syndrome	8.3E-03	1

Treatment	Categories	Diseases or Functions Annotation	P-Value	Number of Molecules
BPAG	Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	delay in hyperplasia of hepatocytes	8.3E-03	1
	Kidney Failure	nondiabetic end-stage renal disease	8.3E-03	1
	Kidney Failure	septic acute kidney injury	8.3E-03	1
	Liver Hyperbilirubinemia	severe hyperbilirubinemia	8.3E-03	1
	Renal Proliferation	proliferation of mesangial cells	8.4E-03	3
	Renal Damage, Renal Tubule Injury	damage of renal tubule	9.4E-03	3
	Cardiac Infarction	myocardial infarction	9.5E-03	7

TITLE: Impact of feto-placental metabolic processes on fetal exposure to bisphenol A

SUMMARY: Prenatal exposure to bisphenol A (BPA) is suspected to induce adverse effects later in life. In this context, the goal of this thesis was to evaluate the human fetal exposure to BPA. Using a pharmacokinetic (PK) approach, we showed that BPA glucuronide (BPAG), the main metabolite of BPA that remains trapped in the fetal compartment, is slowly eliminated through its back conversion into BPA. A humanized PK model developed from these data predicted steady BPAG fetal plasma concentrations of 40ng/L in late pregnancy, i.e. about 1000 folds higher than corresponding BPA concentrations. A proteomic analysis of fetal tissues has shown that equimolar BPAG or BPA fetal exposures trigger similar physiological shifts in the ovine model, suggesting that BPAG hydrolysis might expose fetal tissues to BPA at levels of functional significance. It is concluded that BPAG levels in human cord blood are relevant indicators of fetal exposure to BPA during late pregnancy and should be taken into account for risk assessment.

KEYWORDS: Bisphenol A, Bisphenol A glucuronide, fetal exposure, pharmacokinetic modeling, metabolism, hydrolysis, toxicokinetic.

AUTEUR : Glenn Gauderat

TITRE : Impact des processus métaboliques fœto-placentaires sur l'exposition fœtale au bisphénol A

DIRECTEUR DE THESE : Madame le Professeur Véronique Gayraud

CO-DIRECTEUR DE THESE : Madame le Professeur Nicole Picard-Hagen

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : École nationale vétérinaire de Toulouse, le 04 novembre 2016

RESUME : L'exposition au bisphénol A (BPA) au cours du développement fœtal est suspectée d'être impliquée dans l'initiation d'effets biologiques. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'évaluer l'exposition humaine fœtale au BPA. Une étude pharmacocinétique (PK) réalisée sur le modèle du fœtus ovin a montré que le BPA glucuronide (BPAG), métabolite majeur du BPA piégé dans le compartiment fœtal, est lentement éliminé via sa réactivation en BPA. A partir de ces données PK, le développement d'un modèle PK humanisé a permis de prédire des concentrations plasmatiques fœtales de BPAG maintenues autour de 40ng/L chez le fœtus humain en fin de grossesse, soit environ 1000 fois supérieures aux concentrations en BPA correspondantes. Une analyse protéomique de tissus fœtaux ovins a montré qu'une même dose molaire de BPAG ou de BPA affecte des voies physiologiques similaires, suggérant que l'hydrolyse du BPAG pourrait exposer les tissus à des concentrations en BPA compatibles avec l'expression d'un effet biologique. L'ensemble de ces résultats indique que les concentrations de BPAG dans le sang de cordon constituent un marqueur pertinent de l'exposition fœtale au BPA et qu'elles doivent être prises en compte dans l'évaluation du risque.

MOTS-CLES : Bisphénol A, Bisphénol A glucuronide, exposition fœtale, modélisation pharmacocinétique, métabolisme, hydrolyse, toxicocinétique

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR 1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA/INPT/UPS
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23, Chemin des Capelles - BP 87614
31076 TOULOUSE Cedex 3
