



HAL
open science

Toxicocinétique comparée du bisphénol A chez cinq espèces et extrapolation de l'animal à l'homme

Marion Farbos

► **To cite this version:**

Marion Farbos. Toxicocinétique comparée du bisphénol A chez cinq espèces et extrapolation de l'animal à l'homme. Médecine vétérinaire et santé animale. 2012. dumas-04551329

HAL Id: dumas-04551329

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04551329>

Submitted on 18 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 6254](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/6254)

To cite this version :

Farbos, Marion. *Toxicocinétique comparée du bisphénol A chez cinq espèces et extrapolation de l'animal à l'homme*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2012, 101 p.

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

TOXICOCINÉTIQUE COMPARÉE DU BISPHÉNOL A CHEZ CINQ ESPÈCES ET EXTRAPOLATION DE L'ANIMAL A L'HOMME

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

FARBOS Marion

Née, le 16 Septembre 1987 à CONDOM (32)

Directeur de thèse : Mme Nicole HAGEN-PICARD

JURY

PRESIDENT :

M. Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Nicole HAGEN-PICARD

Mme Véronique GAYRARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mme Catherine VIGUIE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

NEGRE	M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES
	M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
	M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
	M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
	M. A. RICO	M. CABANIE	
	M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
	Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*

- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

N. PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE
--

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

O. MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE
--

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)
--

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

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

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

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

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A Monsieur le Professeur Jean PARINAUD

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Biologie de la reproduction

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

Hommage respectueux.

A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui m'a fait l'honneur de diriger et d'encadrer ma thèse.

Sincères remerciements pour le temps et les conseils si précieux que vous m'avez accordés tout au long de l'élaboration de cette thèse.

A Madame le Professeur Véronique GAYRARD

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et thérapeutique

Qui m'a fait l'honneur de m'aider dans ce projet et de participer à mon jury de thèse.

Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Catherine VIGUIE

Docteur Vétérinaire

Chargée de recherches UMR 181 INRA ENVT

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant que membre invité.

Sincères remerciements.

A Séverine,

Un grand merci pour ta gentillesse, ta patience, ton aide et tes explications qui m'ont été précieuses pour la rédaction de cette thèse.

A tout le service de physiologie de l'ENVT,

Un grand merci de m'avoir si gentiment accueillie dans votre équipe et de m'avoir permise de participer à un si beau projet de recherche.

A mes parents, ma famille et mes amis, pour leur soutien durant toutes ces années d'étude.

Table des matières

1.	Introduction	17
2.	Etude bibliographique	18
2.1	Le Bisphénol A, un perturbateur endocrinien très répandu	18
2.1.1	<i>Présentation de la molécule</i>	18
2.1.2	<i>Marché du polycarbonate et des résines époxy</i>	19
2.1.3	<i>Effets du BPA</i>	21
2.2	La DJA/NOAEL est-elle pertinente ?	22
2.2.1	<i>DJA/NOAEL du BPA</i>	22
2.2.2	<i>Exposition externe de l'Homme au BPA</i>	23
2.2.3	<i>La remise en cause de la DJA/NOAEL par les études scientifiques</i>	26
2.2.4	<i>Réactions des agences réglementaires et des politiques face à ces études</i>	27
2.3	La pharmacocinétique du BPA, un outil essentiel pour évaluer l'impact réel de l'exposition au BPA sur la santé humaine	31
2.3.1	<i>Exposition externe vs exposition interne</i>	31
2.3.2	<i>L'exposition interne du BPA chez l'Homme : encore beaucoup d'inconnues</i>	31
2.3.3	<i>Les connaissances actuelles sur la toxicocinétique du BPA chez l'Homme et les animaux</i>	36
2.3.4	<i>Incohérence bibliographique</i>	41
2.4	Objectifs de l'étude	44
3.	Matériels et méthodes	45
3.1	Identification du matériel test	45
3.2	Préparation du matériel test	45
3.2.1	<i>Préparation du BPA pour l'administration intraveineuse (IV)</i>	45
3.2.2	<i>Préparation du BPA pour l'administration orale (PO)</i>	46
3.3	Animaux	46
3.3.1	<i>Description des animaux</i>	46
3.3.2	<i>Hébergement des animaux</i>	47

3.4	Plan expérimental	47
3.4.1	<i>Plan en cross Over</i>	47
3.4.2	<i>Plan en parallèle</i>	48
3.5	Modalités d'administration et de prélèvement	49
3.5.1	<i>Modalités d'administration</i>	49
3.5.2	<i>Prélèvements sanguins</i>	50
3.5.3	<i>Prélèvements urinaires</i>	51
3.6	Traitements et dosage des prélèvements	54
3.6.1	<i>Traitement des prélèvements</i>	54
3.6.2	<i>Dosage du BPA et du BPA-G</i>	54
3.6.3	<i>Les limites de quantification (LOQ)</i>	56
3.7	Analyse des données.....	57
3.7.1	<i>Analyse non compartimentale des données plasmatiques</i>	57
3.7.2	<i>Ajustement des données plasmatiques et urinaires par une approche modélisatrice chez la brebis, le porc et le chien</i>	57
3.7.3	<i>Chez les rongeurs</i>	62
3.7.4	<i>Approche allométrique</i>	63
4.	Résultats	64
4.1	Description par espèce de l'évolution des concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G au cours du temps.....	64
4.1.1	<i>Administration IV de 5 mg/kg de BPA</i>	64
4.1.2	<i>Administration orale de 100 mg/kg de BPA</i>	67
4.2	Comparaison interspécifique des concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G	71
4.3	Analyse non compartimentale des données plasmatiques : paramètres pharmacocinétiques	72
4.4	Analyse compartimentale des données plasmatiques et urinaires chez les brebis, les porcs et les chiens.....	73
4.4.1	<i>Ajustement des données plasmatiques et urinaires par le modèle</i>	73
4.4.2	<i>Détermination des paramètres primaires du modèle</i>	78

4.5	Comparaison interspécifique des mécanismes d'absorption, de métabolisation et d'élimination du BPA et du BPA-G.....	78
4.5.1	<i>Absorption, biodisponibilité systémique et effet de premier passage hépatique.....</i>	79
4.5.2	<i>Métabolisation du BPA et élimination du BPA-G et du BPA.....</i>	80
4.6	Relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids vif.....	81
5.	Discussion.....	82
5.1	Comparaison interspécifique de l'exposition interne au BPA et BPA-G.....	82
5.1.1	<i>Après une administration orale.....</i>	82
5.1.2	<i>Après une administration IV.....</i>	83
5.2	Métabolisation du BPA.....	84
5.3	Comparaison interspécifique de l'absorption, de la distribution et des voies d'élimination du BPA.....	84
5.3.1	<i>Absorption, distribution et élimination du BPA.....</i>	84
5.3.2	<i>Élimination du BPA-G.....</i>	86
5.4	Intérêts de l'étude pour l'extrapolation à l'homme.....	87
5.4.1	<i>Détermination de la Clairance plasmatique du BPA chez l'Homme.....</i>	87
5.4.2	<i>Quel risque pour la santé humaine ?.....</i>	89
6.	Conclusion.....	93
7.	Bibliographie.....	95

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Formule semi-développée du BPA	18
Figure 2 : Les différentes applications du BPA.....	19
Figure 3 : Répartition des domaines d'utilisation du polycarbonate.....	20
Figure 4 : Répartition des domaines d'utilisation des résines époxy.....	20
Figure 5 : Métabolisation du BPA en BPA-Glucuronide par l'UDP-glucuronyltransferase	28
Figure 6 : Loi n°2010-729 votée le 30 Juin 2010	29
Figure 7 : Projet de loi voté le 12 Octobre 2011	31
Figure 8 : Métabolisation du BPA en BPA-Sulfate chez le fœtus.	36
Figure 9 : Plan expérimental en "Cross Over" (brebis, porcs, chiens)	48
Figure 10: Plan expérimental en parallèle pour les souris	49
Figure 11 : Schématisation du tripode de quadripôles.....	56
Figure 12 : Modèle semi-physiologique	58
Figure 13 : Evolution des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G au cours du temps suite à l'administration IV de 5 mg/kg de BPA à cinq espèces animales (brebis, porc, chien, rat, souris).	66
Figure 14 : Evolution des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G au cours du temps suite à l'administration orale de 100mg/kg de BPA à cinq espèces animales (brebis, porc, chien, rat, souris).	70
Figure 15 : Comparaison interspécifique de l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes en BPA et BPA-G suite à l'administration orale (100mg/kg) et IV (5mg/kg) de BPA.....	71
Figure 16 : Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques et des quantités cumulées urinaires de BPA et BPA-G après administration IV de BPA (5 mg/kg).....	75
Figure 17 : Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques et des quantités cumulées urinaires de BPA et BPA-G après administration orale de BPA (100 mg/kg).	77

Figure 18 : Relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA (L/min) et le poids vif (kg).....	81
Figure 19 : Relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA (L/min) et le poids vif de l'espèce considérée (kg).....	88

Tableaux

Tableau 1 : Propriétés physiques et chimiques du BPA.....	18
Tableau 2 : NOAEL et DJA du BPA déterminées par les agences réglementaires européennes.....	22
Tableau 3 : Niveau d'exposition alimentaire au BPA en fonction de l'âge et des habitudes alimentaires.....	24
Tableau 4: Niveaux d'exposition externe au BPA calculés à partir des concentrations urinaires observationnelles en BPA et ses métabolites.	25
Tableau 5 : Concentrations sériques ou plasmatiques de BPA observées chez des individus soumis à des conditions naturelles d'exposition au BPA. Ces données proviennent d'études de biosurveillance.....	32
Tableau 6 : Association des paramètres pharmacocinétiques aux processus physiologiques impliqués.....	37
Tableau 7 : Paramètres pharmacocinétiques du BPA évalués chez l'Homme.	39
Tableau 8 : Paramètres pharmacocinétiques du BPA estimés chez différentes espèces animales suite à l'administration intraveineuse d'une dose de BPA comprise entre 0.1 et 10mg/kg.....	41
Tableau 9 : Modalités de préparation des solutions de BPA administrées en IV.....	45
Tableau 10 : Modalités de préparation des solutions de BPA administrées par voie orale.....	46
Tableau 11 : Race, sexe, âge, poids moyen et nombre des animaux utilisés	47
Tableau 12 : Temps et volumes de prélèvement par espèce	50
Tableau 13 : Temps des prélèvements sanguins selon la voie d'administration chez le rat.....	50
Tableau 14 : Récapitulatif des plans expérimentaux par espèce.....	52
Tableau 15 : Présentation des LOQ's par espèce et par matrice en µg/mL puis en µmol/L.....	56
Tableau 16 : Définition des constantes de transfert du modèle	59

Tableau 17 : Paramètres pharmacocinétiques du BPA (analyse non compartimentale).....	72
Tableau 18 : Paramètres primaires	78
Tableau 19 : Absorption, biodisponibilité systémique et effet de premier passage hépatique du BPA.....	79
Tableau 20 : Métabolisation du BPA et élimination du BPA et du BPA-G	80

1. Introduction

Le Bisphénol A (BPA) constitue l'une des préoccupations sanitaires importantes et fait actuellement l'objet de polémique qui inquiète les Français. Le Bisphénol A est un perturbateur endocrinien, c'est-à-dire une substance exogène capable d'altérer les équilibres hormonaux. Pourrait-il être responsable d'effets néfastes sur la santé humaine aux niveaux d'exposition auxquels nous sommes soumis ?

Afin de répondre à cette problématique, de nombreux scientifiques ont étudié cette molécule durant les dix dernières années. Notre travail s'inscrit dans ce contexte et a pour objectif de documenter la toxicocinétique du BPA chez l'Homme afin de décrire de manière qualitative et quantitative le devenir du BPA au sein de notre organisme. En effet, la toxicité d'une substance est déterminée par les concentrations au site d'action (exposition interne) et non pas par la dose (exposition externe).

La première partie de ce manuscrit fera une synthèse des connaissances bibliographiques relatives au Bisphénol A. Puis, nous présenterons les objectifs de notre travail ainsi que la méthode expérimentale que nous avons choisie pour documenter la toxicocinétique du BPA chez l'Homme. Nos résultats seront ensuite présentés et discutés.

2. Etude bibliographique

2.1 Le Bisphénol A, un perturbateur endocrinien très répandu

2.1.1 Présentation de la molécule

Le Bisphénol A (BPA), découvert à la fin du XIXème siècle, est composé de deux cycles aromatiques reliés par un pont carbone. Il est issu de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone. Sa formule semi-développée ainsi que ses propriétés physiques et chimiques sont présentées dans la figure 1 et le tableau 1.

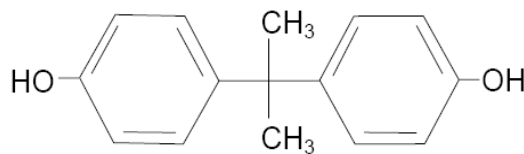


Figure 1 : Formule semi-développée du BPA

Tableau 1 : Propriétés physiques et chimiques du BPA (STAPLES CA, 2000)

Propriétés chimiques	
Formule brute	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$
Masse molaire	228,29 g.mol ⁻¹
Propriétés physiques	
Température de fusion	150 à 157 °C
Température d'ébullition	220° Celsius (°C) sous 4 millimètres de mercure (mm Hg) ; 398°C sous 760mm Hg
Solubilité dans l'eau	120 à 300 mg/l à 20-25°C
Masse volumique	1.2 g/cm ³

Le BPA est utilisé principalement comme monomère dans la polymérisation de deux matières plastiques : le polycarbonate et les résines époxy (figure 2).

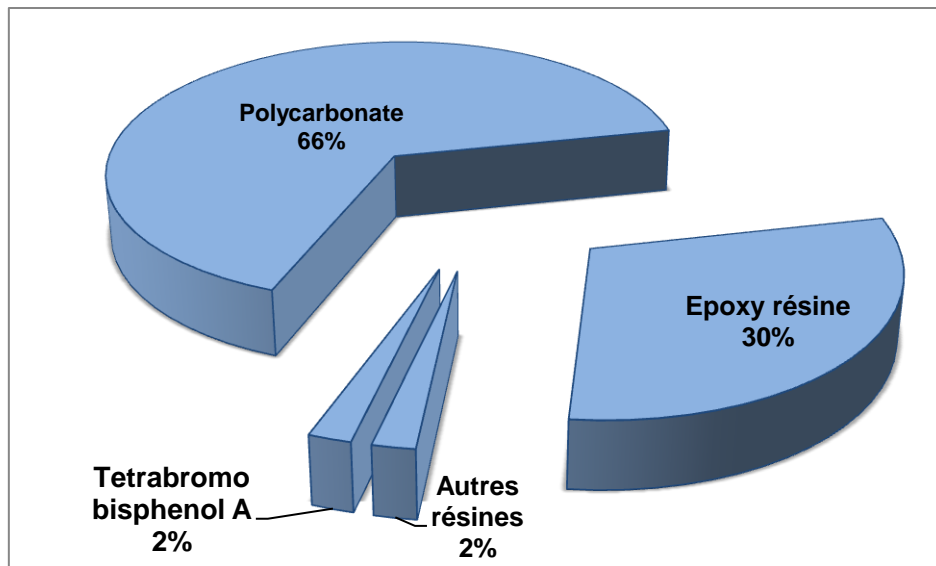


Figure 2 : Les différentes applications du BPA (PLASTICS EUROPE, 2007)

Le polycarbonate et les résines époxy disposent de remarquables propriétés : transparence, solidité, résistance à la chaleur, bonne stabilité dimensionnelle, bonnes propriétés d'isolation électrique, inertie biologique et facilité de recyclage.

2.1.2 Marché du polycarbonate et des résines époxy

Grâce à leurs propriétés, ces deux matériaux ont été utilisés dans les emballages de l'industrie agro-alimentaire ainsi que dans les revêtements intérieurs des canettes, des boîtes de conserve et des couvercles métalliques.

Leur production et leur utilisation n'ont cessé de croître d'année en année. Entre 2003 et 2006, la consommation de BPA a augmenté chaque année d'environ 10% (ANSES, 27 Septembre 2011). Actuellement, les polycarbonates sont très largement utilisés dans des produits de consommation courants depuis les lunettes de soleil et les CD jusqu'aux récipients pour l'eau et la nourriture. L'utilisation des résines époxy est également très répandue : on en retrouve dans les résines composites d'obturation utilisées pour les soins dentaires, dans le revêtement des boîtes de conserve... (INSERM, 2 Juin 2010). Les figures 3 et 4 présentent les différents domaines qui utilisent le polycarbonate et les résines époxy.

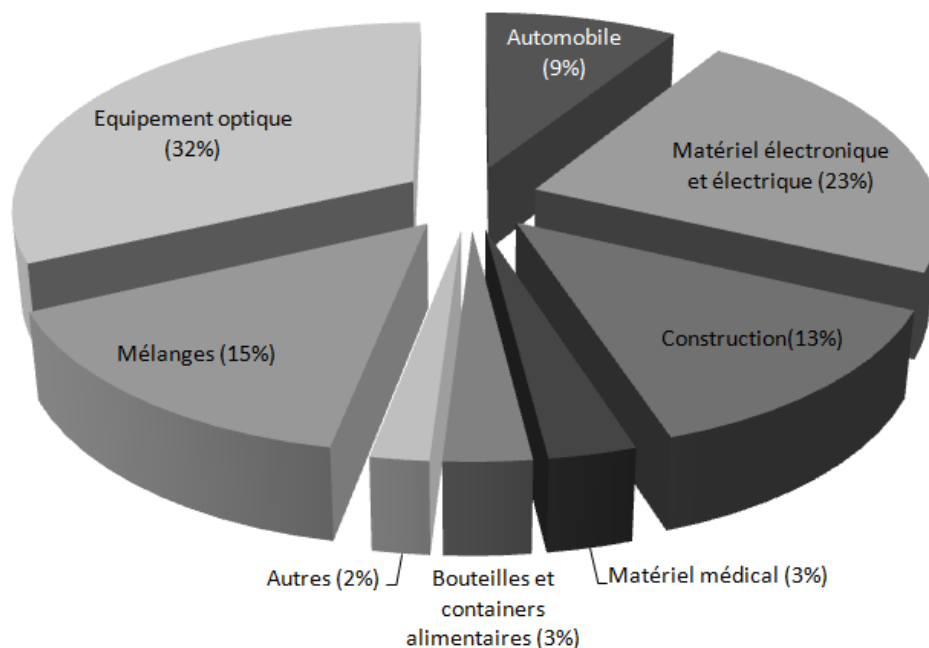


Figure 3 : Répartition des domaines d'utilisation du polycarbonate (PLASTICS EUROPE, 2007)

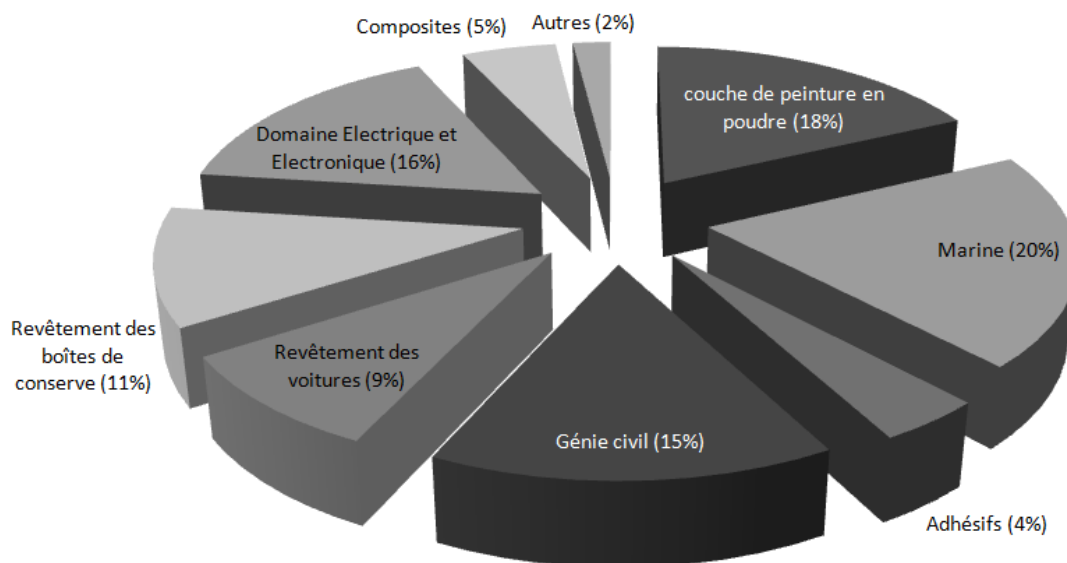


Figure 4 : Répartition des domaines d'utilisation des résines époxy (PLASTICS EUROPE, 2007)

Par conséquent, le BPA est l'une des substances chimiques la plus fabriquée dans le monde. Selon l'industrie « Plastic Europe » la production annuelle mondiale est supérieure à 3 millions de tonnes. Au sein de l'Union Européenne, 1,15 millions de tonnes de BPA sont utilisés annuellement (INSERM, 2 Juin 2010). Aucune production de BPA n'est répertoriée en France (ANSES, 27 Septembre 2011).

2.1.3 Effets du BPA

Le BPA est un xéno-œstrogène, c'est-à-dire une substance exogène capable d'exercer une activité œstrogénique. Le BPA est par conséquent un perturbateur endocrinien. Il se lie aux récepteurs aux œstrogènes avec une affinité relative 7 fois supérieure pour les ER β que pour les ER α (MATTHEWS JB, 2001). Cette liaison est génératrice de modifications cellulaires mises en évidence dans des études *in vitro*. Par exemple, sur des cellules de type PR1 (une lignée de cellules hypophysaires du rat) il induit une prolifération des cellules et il stimule la sécrétion de prolactine (CHUN TY, 2000).

Certains auteurs suggèrent l'implication du BPA dans l'apparition de cancers du tractus génital (testicules, prostate, utérus, ovaires...) et de problèmes de fertilité (RICHTER CA, 2007). Une population serait particulièrement à risque : il s'agit des fœtus et des nouveaux nés. En effet, les organismes en développement sont très sensibles aux modifications induites par les perturbateurs endocriniens. Cette sensibilité accrue pourrait s'expliquer par l'inefficacité des mécanismes de réparation de l'ADN, l'immaturation des systèmes immunitaires et du métabolisme, une barrière hémato-méningée plus perméable...(NEWBOLD RR, 2006). Les études sur les rongeurs suggèrent que les conséquences d'une exposition *in utero* au BPA ne s'expriment pas forcément à la naissance. Il peut exister un décalage entre l'exposition et l'apparition des premiers signes cliniques (RICHTER CA, 2007). De plus, sachant que les œstrogènes causent des altérations génétiques et épigénétiques au niveau de leurs tissus cibles, il est possible que l'exposition à des xéno-œstrogènes *in utero* soit génératrice d'anomalies transmissibles à la descendance (NEWBOLD RR, 2006).

Malgré tous ces faits, il est difficile à l'heure actuelle de déterminer le rôle exact du BPA sur la santé humaine. Les connaissances actuelles ne permettent pas de démontrer une relation de cause à effet entre l'exposition au BPA et l'apparition d'un processus pathologique. Les publications existantes ne sont pas représentatives : le nombre d'individus est limité, les critères de sélection non détaillés... De plus, il s'agit généralement d'études observationnelles. Or les hommes sont exposés à divers xéno-œstrogènes en même temps. Il est donc difficile d'attribuer au BPA un rôle spécifique dans un contexte où plusieurs molécules sont capables d'induire différents

effets. La présence d'autres xéno-œstrogènes pourrait également interférer avec les mécanismes d'action du BPA *in vivo*.

D'après les Saisines « 2009-SA-0331 » et « 2010-SA-0197 » publiées par l'ANSES¹, le BPA est « *suspecté d'avoir des effets sur la maturation ovocytaire chez la femme dans un contexte de procréation médicalement assistée ainsi que sur les pathologies cardiovasculaires (maladies coronariennes) et le diabète* ». De nouvelles études doivent donc être menées afin de mieux comprendre l'impact du BPA sur la santé humaine.

2.2 La DJA/NOAEL est-elle pertinente ?

2.2.1 DJA/NOAEL du BPA

Les agences réglementaires (ANSES et EFSA²) ont défini des doses en deçà desquelles le BPA n'aurait pas d'effet néfaste chez l'homme, à partir d'études expérimentales réalisées chez les rongeurs.

La Dose Journalière Admissible (DJA) est une estimation de la quantité par kg de poids vif qui peut être consommée quotidiennement et à vie sans risque pour la santé. Cette valeur est obtenue en divisant la plus forte dose sans effet délétère observable (NOAEL) par un facteur de sécurité (SF = Safety Factor) de 100 qui prend en compte des différences interspécifiques et interindividuelles de pharmacocinétique ou de pharmacodynamie (tableau 2).

Tableau 2 : NOAEL et DJA du BPA déterminées par les agences réglementaires européennes

Doses de référence pour le BPA		
Abréviation	DJA	NOAEL
Signification	Dose Journalière Admissible	Plus forte dose sans effet délétère observé
Calcul	NOAEL/100	Suite à des expérimentations
Valeur pour le BPA	50µg/kg/jour	5 mg/kg/jour

Dans le cas du BPA, la NOAEL a été estimée suite à des études menées sur deux ou trois générations de rats (TYL RW, 2002) (TYL RW, 2008). Ces derniers reçurent par voie orale différentes doses de BPA de 0, 0.001, 0.003, 0.02, 0.03, 0.3, 5, 50 et

¹ ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

² EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

600mg/kg/j. Comme la toxicité systémique du BPA n'a été mise en évidence que pour des doses supérieures à 5mg/kg/j, une NOAEL de 5mg/kg/jour a été déterminée. La DJA actuelle pour le BPA est donc de 50µg/kg/jour.

2.2.2 Exposition externe de l'Homme au BPA

De nombreuses études de biosurveillance ont mis en évidence des niveaux détectables de BPA dans les urines et le sang. Elles suggèrent une exposition ubiquitaire au BPA (VOLKEL W, 2008) (DEKANT W, 2008).

2.2.2.1 Les voies d'exposition

La principale voie d'exposition au BPA pour l'Homme est la voie alimentaire. Deux sources ont été identifiées : les aliments/boissons en contact avec du polycarbonate ou des résines epoxy et les résines d'obturation dentaires (VANDENBERG LN, 2007). La contamination des denrées alimentaires est due à la migration dans les aliments de monomères de BPA résiduels ou libérés par hydrolyse du polymère (INSERM, 2 Juin 2010). Cette hydrolyse survient dans des conditions particulières telles que le chauffage ou la présence d'huile (VANDENBERG LN, 2007). Concernant les résines d'obturation dentaires, des études ont montré la présence de BPA dans la salive durant les quelques heures suivant la pose (VANDENBERG LN, 2007). Les quantités de BPA retrouvées varient en fonction de la composition de la résine.

Il existe d'autres modalités d'exposition par voie aérienne ou transcutanée telles que la manipulation de papiers thermosensibles ou l'inhalation de poussières contaminées. Ces voies d'exposition sont considérées à l'heure actuelle comme négligeables (EFSA, 2006).

2.2.2.2 Détermination des doses d'exposition

Deux techniques peuvent être utilisées pour calculer le niveau d'exposition de la population humaine au BPA.

La première consiste à l'estimer à partir des quantités retrouvées dans les aliments/boissons et l'environnement. Les chercheurs ont essayé d'évaluer la quantité de BPA présente dans les denrées contenues dans des récipients estimés à risques tels que les bouteilles en plastique, les Tupperware, les boîtes de conserve

recouvertes intérieurement de résine époxy et les biberons en polycarbonate. La plupart des études ont mis en évidence des niveaux détectables de BPA dans les aliments de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'aliment (VANDENBERG LN, 2007). D'autres auteurs ont estimé le niveau de contamination de l'environnement. Sur 12 maisons testées, Volkel et al. (VOLKEL W, 2008) trouvèrent du BPA dans 100% des échantillons de poussière prélevés à une concentration allant de 117 à 1486 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cette contamination peut s'expliquer par un recyclage limité des matières plastiques et l'intégration du BPA au sein des particules de l'air au cours de la production de polycarbonate ou résine époxy étant donné le large volume annuel produit (VANDENBERG LN, 2007). Etant donné que la voie orale est la principale voie d'exposition au BPA, l'EFSA a estimé des niveaux d'exposition alimentaire au BPA compris entre 1 et 13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$. Le tableau 3 les présente en fonction de l'âge et des habitudes alimentaires.

Tableau 3 : Niveau d'exposition alimentaire au BPA en fonction de l'âge et des habitudes alimentaires (EFSA, 2006)

Age	Aliments et boissons consommés	Exposition alimentaire au BPA ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$)
3 mois	Lait maternel	0.2
3 mois	Lait industriel contenu dans des biberons qui ne contiennent pas de polycarbonate	2.3
3 mois	Lait industriel contenu dans des biberons en polycarbonate	11
6 mois	Lait industriel contenu dans des biberons en polycarbonate + aliments/ boissons industriels	13
1.5 ans	2kg aliments/boissons industriels	5.3
Adulte	3kg aliments/boissons industriels	1.5

Une deuxième technique vise à déterminer le niveau d'exposition externe au BPA à partir des quantités urinaires évaluées sur un échantillon représentatif de la population humaine. Trente heures après l'ingestion orale de 5 mg de BPA marqué au deutérium chez 3 femmes et 3 hommes en bonne santé, la totalité de la dose administrée est retrouvée dans les urines (VOLKEL W, 2002). Ces données suggèrent une élimination rapide et totale du BPA par voie rénale. L'urine est donc le fluide corporel le plus pertinent pour estimer le niveau d'exposition. Elle présente l'avantage d'être facile à collecter (DEKANT W, 2008).

Le prélèvement isolé d'une miction urinaire d'un individu ne donne aucune information sur le niveau d'exposition à long terme. Les concentrations urinaires en BPA et ses métabolites varient selon la fréquence des repas, le temps écoulé depuis la dernière collation et la dernière miction, la production urinaire... Pour calculer des niveaux d'exposition représentatifs, il faut soit plusieurs prélèvements urinaires d'une seule personne sur 24 heures, soit plusieurs échantillons individuels (DEKANT W, 2008).

Le tableau 4 présente les niveaux d'exposition au BPA calculés à partir de données urinaires de plusieurs individus.

Tableau 4: Niveaux d'exposition externe au BPA calculés à partir des concentrations urinaires observationnelles en BPA et ses métabolites (VOLKEL W, 2008).

Urine concentration [$\mu\text{g}/\text{l}$]		Calculated intake ^a [$\mu\text{g}/\text{kg b.w.}$]		Factor below TDI		Sampling site and year	Reference
Median	Range	Median	Maximum	Median	Maximum		
Total BPA							
1.2	0.3-9.3	0.030	0.233	1 667	215	Germany 2007	This study
1.8	<0.3 ^f -54.3	0.030 ^b	0.905 ^b	1 667 ^b	55 ^b	USA, 2004-05	Wolff et al. (2007)
2.7	0.5-15.9 ^c	0.068	0.398	735	125	USA, NHANES, 2003-04	Calafat et al. (2008)
2.1	<0.3 ^f -19.8	0.053	0.495	943	101	USA, 2000-04	Ye et al. (2005)
1.3	0.2-5.2 ^c	0.033	0.130	1 515	385	USA, NHANES III, 1988-94	Calafat et al. (2005)
0.6	0.2-2.0	0.015	0.050	3 333	1000	Japan, n.d.	Tsukioka et al. (2004)
Free BPA							
<0.3	<0.3 ^f -2.5	<0.008	0.063	>6250	794	Germany 2007	This study
<0.3	<0.3 ^f -0.6	<0.001	0.015	>50 000	3333	USA, 2000-04	Ye et al. (2005)
n.d.	0.01-0.3	n.d.	0.008	n.d.	6667	Japan, n.d.	Tsukioka et al. (2004)

Volkel et son équipe se basent sur le fait que l'Homme adulte dont le poids moyen est 60 kg produit 1.5 litre d'urines par jour. Dans le cas des enfants, le poids moyen est 36 kg et la production d'urines 0.6 litre par jour.

Les niveaux d'exposition calculés montrent que les enfants (entre 6 et 8 ans) sont les plus exposés (VOLKEL W, 2008). Aucune étude sur le niveau d'exposition des bébés ou des très jeunes enfants âgés de moins de 6 ans n'est disponible. Or cette

population est peut être plus à risque que les adultes compte tenu de leur moindre poids vif et de leur comportement infantile : consommation d'aliments à risque, déplacements au ras du sol en contact avec les poussières, grignotage de nombreux objets en plastique ... (VANDENBERG LN, 2007).

D'après l'EFSA, la moyenne d'exposition externe quotidienne au BPA chez l'Homme est inférieure à 13µg/kg/j. Cette valeur est inférieure à la DJA établie par l'EFSA (50µg/kg PV/j). Si la NOAEL est bien estimée, ce niveau d'exposition externe ne devrait donc pas avoir d'effet néfaste sur la santé humaine.

2.2.3 La remise en cause de la DJA/NOAEL par les études scientifiques

Plusieurs centaines d'études sur les rongeurs ont montré que l'exposition à des doses inférieures à la DJA est délétère. Les effets néfastes décrits dépendent du moment de l'exposition.

Si elle a lieu au cours du développement, des anomalies dans l'organisation de l'organisme surviennent de manière irréversible. De nombreux organes peuvent être altérés (RICHTER CA, 2007) :

- La structure et le fonctionnement du cerveau,
- L'appareil génital mâle avec pour conséquence après la puberté une diminution quantitative de la production de sperme,
- Les activités enzymatiques aboutissant à des processus métaboliques anormaux.

Si elle a lieu à l'âge adulte, les effets sont souvent réversibles et concernent la partie fonctionnelle de l'organisme (RICHTER CA, 2007).

Pour illustrer cette partie, nous proposons de détailler une étude de Cabaton et son équipe (CABATON NJ, 2011). Des souris femelles CD-1 ont été exposées au BPA aux doses de 0, 25ng, 250ng ou 25µg/kg/j par le biais d'une pompe sous cutanée à partir du 8^{ème} jour de gestation et jusqu'au 16^{ème} jour de lactation. La mise à la reproduction des femelles exposées durant la période périnatale au BPA a mis en évidence une diminution du nombre cumulé de souriceaux et une réduction de la fécondité et de la fertilité lors d'exposition périnatale au BPA à des doses inférieures à la DJA.

2.2.4 Réactions des agences réglementaires et des politiques face à ces études

2.2.4.1 Dans le courant de l'année 2010

Dans un premier temps, les agences réglementaires n'ont pas pris en compte ces études. Elles ont avancé principalement deux arguments pour se justifier.

- **1^{er} argument**

Les agences réglementaires ne se basent que sur des études réalisées selon les bonnes pratiques de laboratoire. Dans le cas du BPA, elles se sont appuyées essentiellement sur deux expérimentations (TYL RW, 2008)(TYL RW, 2002) pour montrer l'absence d'effet néfaste du BPA à faibles doses. Ces recherches ont consisté en l'administration continue via l'alimentation de différentes doses de BPA à 3 générations de rats. Les niveaux d'exposition étaient les suivants : 0 ; 0.001 ; 0.003 ; 0.02 ; 0.03 ; 0.3 ; 5 ; 50 et 600mg/kg/j. Ces études ont montré une toxicité systémique du BPA pour des doses supérieures à 5mg/kg/j. Les premiers effets néfastes du BPA sur l'appareil reproducteur ne surviennent que pour des expositions supérieures à 600mg/kg/j. Cependant, compte tenu des fortes doses d'œstradiol nécessaires pour induire des effets chez le témoin positif, la souche de rat utilisée (CD 1) paraît relativement insensible aux œstrogènes exogènes et donc peu appropriée pour étudier les effets induits par le BPA suite à une exposition à faible dose. De plus, les méthodes utilisées sont anciennes et peu sensibles. Elles consistent à des évaluations macroscopiques de l'évolution du poids corporel, du poids des organes et de la cyclicité ovarienne appréciée par l'examen de la composition de frottis vaginaux. Elles ne sont donc pas capables de mettre en évidence la plupart des effets néfastes et plus subtiles reportés par des études qui mettent en œuvre des méthodes sophistiquées et plus sensibles (MYERS JP, 2009).

- **2^e argument**

La toxicocinétique du BPA est différente entre l'Homme et les rongeurs.

Chez les rongeurs et les primates, suite à une administration orale, le BPA est transformé majoritairement en BPA glucuronide (BPA-G) par l'UDP-glucuronosyl transférase présente dans la paroi intestinale et le foie (figure 5).

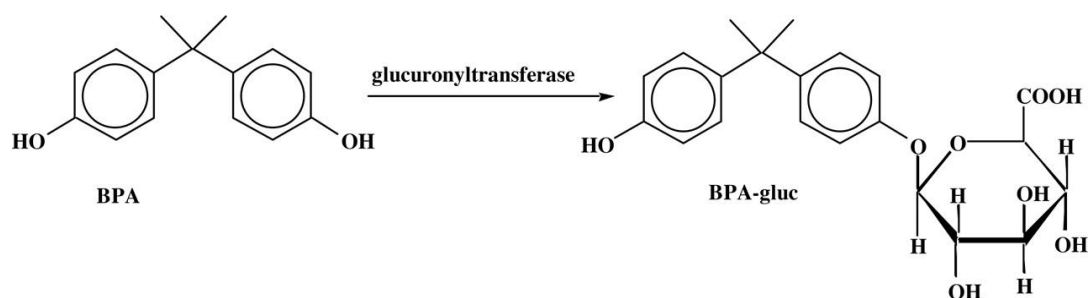


Figure 5 : Métabolisation du BPA en BPA-Glucuronide par l'UDP-glucuronyltransferase

Il s'agit de la principale voie de détoxification du BPA étant donné que le BPA-G ne peut pas se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes (MATTHEWS JB, 2001). Cette transformation est très efficace chez les deux espèces (DOERGE DR, 2010a) et explique les concentrations plasmatiques peu élevées en BPA suite à une administration orale. En effet, 90% du BPA retrouvé dans le sérum est sous forme de BPA-G alors que moins d'1% est sous forme de BPA non conjugué (DOERGE DR, 2010a).

Une fois formé, le BPA-G est éliminé de manière différente chez les rongeurs et les primates. Il est préférentiellement excrété par voie biliaire chez le rat et par voie urinaire chez l'homme. Cette différence interspécifique s'explique par la capacité du rat à éliminer par voie biliaire des substances dont le poids moléculaire est supérieur à 350 daltons alors que le seuil est de 500 daltons chez l'homme (DEKANT W, 2008) (TOUTAIN PL, 2010). Les bactéries ainsi que les β -glucuronidases intestinales des rongeurs déconjuguent le BPA-G qui peut être ensuite réabsorbé. La présence d'un cycle entéro-hépatique (DOERGE DR, 2010a) serait responsable d'une exposition interne plus longue chez les rongeurs que chez les primates suite à une même administration (même dose, même voie). Cet argument avancé par les autorités réglementaires pour réfuter les études scientifiques n'est pas tout à fait satisfaisant. Chez les mammifères, la β -glucuronidase est présente dans un grand nombre de tissus. Il est donc très probable qu'il existe localement dans certains tissus des cycles de conjugaison/déconjugaison du BPA-G chez l'homme mimant le cycle entéro-hépatique des rongeurs (GINSBERG G, 2009).

Dans un premier temps, pour l'ANSES, le BPA a été considéré comme une préoccupation plutôt qu'une urgence sanitaire. En Avril 2010, elle a demandé aux industriels d'étiqueter les produits contenant du BPA afin d'informer au mieux le

consommateur. L'agence a alors estimé que des données supplémentaires étaient nécessaires pour évaluer le risque lié à l'exposition humaine au BPA.

Les politiques n'ont pas réagi tout à fait de la même manière et ont appliqué le principe de précaution. Depuis plus de deux ans, l'exposition au BPA préoccupe les esprits. L'inquiétude des Français a commencé en Octobre 2008, date où les biberons en plastique ont été retirés du marché canadien. Une loi a été votée le 30 Juin 2010 (LOI n° 2010-729) tendant à suspendre la commercialisation de biberons produits à base de bisphénol A (figure 6).

Article 1 : La fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de biberons produits à base de bisphénol A sont suspendues jusqu'à l'adoption, par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, d'un avis motivé autorisant à nouveau ces opérations.

Article 2 : dans les deux mois qui suivent la publication par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale de son expertise collective sur les perturbateurs endocriniens et au plus tard le 1er janvier 2011, un rapport présentant les mesures déjà prises et celles envisagées pour diminuer l'exposition humaine à ces produits est adressé par le Gouvernement au Parlement.

Figure 6 : Loi n°2010-729 votée le 30 Juin 2010 (LEGIFRANCE)

2.2.4.2 En 2011

Dans un deuxième temps, l'ANSES est revenue sur sa position.

Le 4 Juin 2009, la Direction Générale de la Santé a saisi l'ANSES en vue de demander une expertise sur les risques sanitaires liés à l'exposition au BPA du consommateur. Le 18 Février 2010, la Direction Générale de la Prévention de Risques a précisé de prendre en compte dans le cadre de cette expertise tous les types d'effets toxiques et de ne pas se cantonner aux effets reprotoxiques. En réponse à ces demandes, le 27 Septembre 2011, l'ANSES a publié deux rapports : l'un relatif aux effets sanitaires du BPA, l'autre à ses usages. Ils se sont fondés sur les publications pré-existantes pour lesquelles le niveau de fiabilité était le plus satisfaisant. Ce travail a mis en évidence des effets délétères suspectés chez l'Homme (ANSES, 27 Septembre 2011) et avérés chez les animaux (effets sur la

reproduction, effets sur la glande mammaire, effets sur le métabolisme, le cerveau et le comportement) pour des niveaux d'exposition inférieurs à la DJA. D'après l'ANSES, ces informations sont suffisantes pour limiter dès à présent l'exposition au BPA des populations les plus à risque (nourrissons, jeunes enfants et femmes enceintes). La voie d'exposition majeure étant la voie orale, l'ANSES lance un appel à contribution pour recueillir toutes les données relatives à des produits de substitution au BPA afin de réduire au maximum la contamination des denrées alimentaires.

Suite à ces rapports, l'assemblée nationale a voté le 12 Octobre 2011 un projet de loi *visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A* (figure 7).

La loi n° 2010-729 du 30 juin 2010 tendant à suspendre la commercialisation de biberons produits à base de bisphénol A est ainsi modifiée :

1° À l'intitulé, les mots : « biberons produits à base de bisphénol A » sont remplacés par les mots : « tout conditionnement comportant du bisphénol A et destiné à recevoir des produits alimentaires » ;

2° L'article 1er est ainsi rédigé :

« Art. 1er. - La fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux pour un usage alimentaire de tout conditionnement, contenant ou ustensile comportant du bisphénol A sont suspendues à compter du 1er janvier 2014 jusqu'à ce qu'un avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail autorise la reprise de ces opérations. Si ces conditionnements, contenants ou ustensiles sont destinés à recevoir des produits alimentaires pour les nourrissons et enfants en bas âge au sens des a et b de l'article 2 de la directive 2006/141/CE de la Commission, du 22 décembre 2006, concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite et modifiant la directive 1999/21/CE, cette suspension prend effet à compter du 1er janvier 2013. » ;

3° L'article 2 est ainsi rédigé :

« Tout conditionnement comportant du bisphénol A et destiné à recevoir des produits alimentaires doit comporter un avertissement sanitaire déconseillant son usage aux femmes enceintes et aux enfants de moins de trois ans du fait de la présence de bisphénol A.

« Un rapport d'étape élaboré par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail sur les substituts au bisphénol A ainsi que leur innocuité et leur adaptation pour l'utilisation dans la fabrication des plastiques et résines à usage alimentaire est communiqué par le Gouvernement au Parlement au plus tard le 31 octobre 2012. »

Figure 7 : Projet de loi voté le 12 Octobre 2011 (LEGIFRANCE)

2.3 La pharmacocinétique du BPA, un outil essentiel pour évaluer l'impact réel de l'exposition au BPA sur la santé humaine

2.3.1 Exposition externe vs exposition interne

L'exposition externe, autrement dit la dose, comprend une composante pharmacocinétique qui détermine le profil des concentrations plasmatiques (exposition interne) et une composante pharmacodynamique qui étudie l'action de ces concentrations sur l'organisme. Il existe deux types de raisonnement pour expliquer les effets biologiques observés : établissement d'une relation dose-effet ou d'une relation concentration plasmatique-effet. Cette dernière permet de s'affranchir des différences interspécifiques de pharmacocinétique. L'extrapolation des données animales à l'Homme n'est donc limitée que par les différences interspécifiques relatives à la pharmacodynamie.

2.3.2 L'exposition interne du BPA chez l'Homme : encore beaucoup d'inconnues

Le tableau 5 présente l'exposition interne humaine dans des conditions d'exposition naturelle, selon plusieurs études de biosurveillance.

Tableau 5 : Concentrations sériques ou plasmatiques de BPA observées chez des individus soumis à des conditions naturelles d'exposition au BPA. Ces données proviennent d'études de biosurveillance.

Référence	Individus prélevés	Méthode analytique	Concentrations en BPA non conjugué																				
Ikezuki et al, 2002	Femmes enceintes ou non + foetus (n entre 32 et 38)	ELISA, résultats comparés à ceux obtenus avec HPLC LOQ : 0.5ng/ml	BPA détecté dans le sérum maternel, sérum foetal, liquide folliculaire ovarien à des niveaux similaires (de l'ordre de 1 à 2 ng/ml, rang : 0.5 à 5ng/ml) BPA dans le liquide amniotique 5 fois plus concentré en début de grossesse que dans les autres fluides, pas le cas en fin de gestation																				
Schonfelder et al, 2002	Femmes enceintes (n=37, entre la 32 ^{ème} et la 41 ^{ème} semaine de grossesse) Dosage des concentrations en BPA non conjugué	GC/MS LOQ : 0.1ng/ml LOD : 0.01ng/ml	placenta (moyenne ± écart-type : 11.2 +/- 9.1 ng/g) > plasma maternel (4.4 +/- 3.9 ng/ml) > plasma foetal (2.9 +/- 2.5 ng/ml) <table border="1" data-bbox="1220 726 2072 1029"> <thead> <tr> <th></th> <th>rang</th> <th>médiane</th> <th>1er quartile</th> <th>3ème quartile</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>placenta</td> <td>1 à 104.9 ng/g</td> <td>12.7 ng/g</td> <td>3.6 ng/g</td> <td>22.5 ng/g</td> </tr> <tr> <td>plasma maternel</td> <td>0.3 à 18.9 ng/ml</td> <td>3.1ng/ml</td> <td>1.8 ng/mL</td> <td>7.1 ng/mL</td> </tr> <tr> <td>plasma foetal</td> <td>0.2 à 9.2 ng/ml,</td> <td>2.3 ng/mL</td> <td>1.1 ng/mL</td> <td>5.2 ng/mL</td> </tr> </tbody> </table> plasma foetal > plasma maternel pour n = 14 avec foetus mâles > foetus femelles dans ce cas		rang	médiane	1er quartile	3ème quartile	placenta	1 à 104.9 ng/g	12.7 ng/g	3.6 ng/g	22.5 ng/g	plasma maternel	0.3 à 18.9 ng/ml	3.1ng/ml	1.8 ng/mL	7.1 ng/mL	plasma foetal	0.2 à 9.2 ng/ml,	2.3 ng/mL	1.1 ng/mL	5.2 ng/mL
	rang	médiane	1er quartile	3ème quartile																			
placenta	1 à 104.9 ng/g	12.7 ng/g	3.6 ng/g	22.5 ng/g																			
plasma maternel	0.3 à 18.9 ng/ml	3.1ng/ml	1.8 ng/mL	7.1 ng/mL																			
plasma foetal	0.2 à 9.2 ng/ml,	2.3 ng/mL	1.1 ng/mL	5.2 ng/mL																			
Volkel et al, 2005	Femmes (n=12) et Hommes (n=7)	LC/MS-MS avant et après le traitement à la β -glucuronidase LOD : 0.5ng/ml	Concentration inférieure à la LOD pour tous les prélèvements																				

Sajiki et al, 1999	Femmes (n=12) et Hommes (n=9)	HPLC avec détection électrochimique LOD : 0.2 ng/ml	0.33 +/- 0.54 ng/ml pour les femmes (rang : 0-1.6 ng/ml) 0.59 +/- 0.21 ng/ml pour les hommes (rang : 0.38 à 1 ng/ml)
Inoue et al, 2000	Individus en bonne santé (n=5)	HPLC avec détection électrochimique LOD : 0.01 ng/ml	0.32 ng/ml (moyenne des 5 mesures)
Kaddara et al, 2009	Patients d'un hôpital français (n=207)	RIA LOD : 0.08 ng/ml	Inférieure à la LOD dans 17% des cas, entre 0.08 et 1ng/ml dans 58% cas, entre 1 et 2 ng/ml dans 13% des cas et supérieure à 2 ng/ml dans 12 % des cas.

Avant de commenter les valeurs observationnelles, il est important d'avoir un avis critique sur les modalités de dosage. En effet, compte tenu des faibles concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G, leur dosage nécessite des méthodes précises et robustes.

Une technique de dosage est pertinente si elle présente une bonne sensibilité et spécificité. Un standard interne sous forme d'un isotope stable capable d'être ajouté directement dans les échantillons sanguins permet d'évaluer le pourcentage d'extraction du BPA (DEKANT W, 2008).

La spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) est la technique qui répond au mieux à ces exigences (DEKANT W, 2008) et présente plusieurs avantages : la détection des molécules d'intérêt est très sélective, le standard interne est sous forme d'un isotope stable et les LOD³ et LOQ⁴ sont faibles (Cf 3.6.2). Une autre méthode de dosage qui possède une bonne sensibilité est la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur électrochimique (DEKANT W, 2008). La chromatographie en phase liquide est une technique de séparation. Elle est dite à haute performance à cause de sa rapidité et de sa très bonne résolution. Au sein du détecteur électrochimique, il se produit des réactions d'oxydoréduction produisant un courant proportionnel à la concentration du soluté.

Les autres méthodes sont moins performantes. Parmi elles, se trouve la méthode ELISA. Il s'agit d'un dosage immuno-enzymatique sur support solide. Elle présente deux principaux désavantages : les réactions croisées et l'absence de standard interne. Cette technique met en évidence des concentrations plasmatiques ou sériques plus élevées : jusqu'à 10ng/ml avec des moyennes aux alentours de 2 ou 3 ng/ml (DEKANT W, 2008).

Compte tenu de ces observations, quelques commentaires peuvent être réalisés sur le tableau 5. Les concentrations plasmatiques en BPA pourraient être influencées par le sexe et le statut hormonal de l'individu prélevé. En effet, il semble que les concentrations plus élevées soient retrouvées dans les organes ou fluides biologiques provenant de femmes enceintes. Par ailleurs, l'homme paraît plus exposé au BPA libre que la femme.

³ LOD (en anglais, Limit of detection) : Limite de détection

⁴ LOQ (en anglais, Limit of Quantitation) : Limite de quantification

Les concentrations sériques ou plasmatiques en BPA chez la femme enceinte sont particulièrement élevées (VANDENBERG LN, 2007). Lors de la grossesse, de nombreux mécanismes physiologiques sont modifiés et interfèrent avec le métabolisme des xénobiotiques. Par exemple, chez les rongeurs, la glucuronidation hépatique du BPA est moins intense durant la gestation. Elle pourrait être associée à une réduction de l'expression des gènes codant pour les glucuronyltransférases hépatiques (INOUE H, 2005). Par analogie aux rongeurs, la réduction de la glucuronidation hépatique pourrait être à l'origine des concentrations plasmatiques de BPA plus élevées chez la femme enceinte.

Diverses études ont comparé les concentrations en BPA du placenta, du plasma/sérum maternel et du plasma/sérum fœtal. Le placenta présente les concentrations les plus élevées. Il possède une activité β -glucuronidase et une activité Aryl sulfatase (COLLIER AC, 2009) qui pourraient être à l'origine de la déconjugaison des métabolites inactifs en BPA.

Le BPA passe à travers la barrière placentaire (TAKAHASHI O, 2000). Il n'existe que peu de données concernant la toxicocinétique du BPA chez le fœtus. Une étude menée par Ikezuki (IKEZUKI Y, 2002) suggère une maturation du métabolisme hépatique du fœtus au cours de la grossesse. Le liquide amniotique prélevé en début de gestation est 5 fois plus concentré en BPA que d'autres liquides biologiques tels que le sérum maternel, le liquide folliculaire ovarien... Or ces différences de concentrations ne se retrouvent pas durant les 4 mois précédant l'accouchement. Ceci peut s'expliquer par l'acquisition de la déglutition et le développement fonctionnel du système hépatique du fœtus durant la deuxième partie de grossesse. La plupart des systèmes enzymatiques à l'origine de la détoxification des xénooestrogènes chez l'adulte ne fonctionnent pas bien chez le fœtus. Il existe cependant une exception : la sulfatation. En effet, Richard et son équipe ont mis en évidence l'activité de certaines enzymes de la famille des sulfotransférases (SULT1A1 et SULT1A3) à partir de 32 jours post ovulation (RICHARD K, 2001). Il semblerait donc que chez le fœtus, le BPA soit transformé en BPA-sulfate plutôt qu'en BPA-G (figure 8).

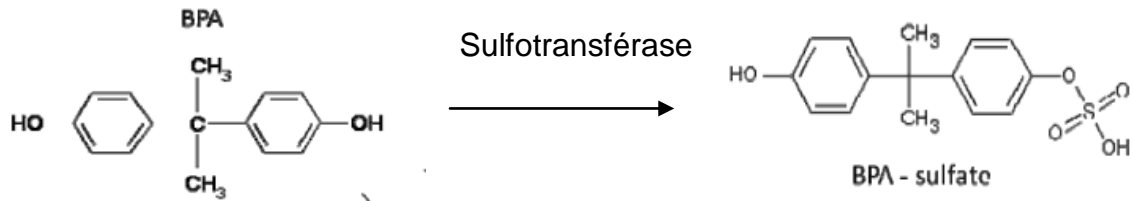


Figure 8 : Métabolisation du BPA en BPA-Sulfate chez le fœtus.

La sulfatation n'est pas considérée comme un mécanisme de détoxification définitive. Le BPA-sulfate est un réservoir circulant de BPA étant donné la présence d'arylsulfatases effectives dans de nombreux tissus fœtaux (GINSBERG G, 2009). De plus, le fœtus présente des β glucuronidases qui seraient responsables localement de la déconjugaison du BPA-G en BPA actif.

2.3.3 Les connaissances actuelles sur la toxicocinétique du BPA chez l'Homme et les animaux

2.3.3.1 Définition des paramètres pharmacocinétiques

La toxicocinétique a pour but de déterminer le devenir du BPA au sein d'un organisme. Elle étudie l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du BPA. L'absorption est l'ensemble des étapes qui conduisent le BPA de l'endroit où il est administré jusqu'à la circulation générale. La distribution est la manière dont le BPA administré se répartit dans tous les tissus de l'organisme une fois qu'il a atteint la circulation générale. Le métabolisme est la transformation du BPA en ses métabolites généralement inactifs. L'élimination englobe tous les processus qui entraînent la disparition de l'activité du BPA. Elle peut avoir lieu de 2 manières : la métabolisation et l'excrétion. Lors de la métabolisation, le BPA est toujours dans l'organisme mais son activité oestrogénique a disparu (exemple : transformation du BPA en BPA-G). Lors de l'excrétion, le BPA a quitté anatomiquement l'organisme (excrétions urinaire et fécale par exemple).

Ces différents processus physiologiques sont évalués au travers des paramètres pharmacocinétiques (tableau 6).

Tableau 6 : Association des paramètres pharmacocinétiques aux processus physiologiques impliqués.

Paramètres Pharmacocinétiques	
Action de l'organisme sur le toxique	Paramètre pharmacocinétique
Absorption	Biodisponibilité
Distribution	Volume de distribution
Métabolisme	Clairance
Élimination	Temps de demi-vie

La biodisponibilité du BPA notée F est le pourcentage de la dose donnée qui atteint la circulation générale et sa vitesse d'accès au secteur vasculaire. La vitesse d'absorption est objectivée par la concentration plasmatique maximale (C_{max}) de BPA et le temps, T_{max} , auquel cette concentration est atteinte.

Le volume de distribution (V_d) du BPA est une constante de proportionnalité entre la quantité de BPA présente dans l'organisme et sa concentration plasmatique. Il s'agit d'un volume virtuel exprimé en litres.

La clairance du BPA se définit par la mesure de la capacité de l'organisme ou d'un organe à éliminer le BPA après qu'il ait atteint la circulation générale.

Le temps de demi-vie d'élimination du BPA est le temps nécessaire pour diviser les concentrations plasmatiques de BPA par 2 lorsque l'équilibre de distribution est atteint.

La pharmacocinétique est indispensable pour évaluer l'éventuelle toxicité du BPA et pour extrapoler les données toxicologiques de l'animal à l'Homme. Les paragraphes ci-dessous exposent les connaissances actuelles en matière de toxicocinétique du BPA chez l'Homme et les animaux.

2.3.3.2 La toxicocinétique du BPA chez l'Homme

Suite à une administration orale, le BPA est rapidement absorbé et métabolisé en BPA-G par des enzymes de biotransformation présentes dans le foie et la paroi intestinale. Il s'agit d'une voie d'inactivation du BPA étant donné que le BPA-G est dépourvu d'activité œstrogénique (MATTHEWS JB, 2001). Volkel et son équipe ont administré 5 mg de BPA marqué au deutérium par voie orale à 4 adultes volontaires en bonne santé. Les échantillons sanguins prélevés à différents temps post administration ont été analysés en LC-MS/MS⁵ et GC-MS⁶ après hydrolyse à la β -glucuronidase. Les concentrations plasmatiques totales (BPA et ses métabolites) ont atteint leur maximum (environ 800 nmol/L) 80 minutes après l'administration. Le BPA circulant était principalement sous forme de BPA-G (VOLKEL W, 2002) suggérant que les concentrations plasmatiques en BPA non conjugué sont peu élevées suite à une administration orale à cause de l'effet de premier passage hépatique.

L'élimination du BPA et du BPA-G est rapide, presque totale et se fait par voie urinaire. Chez 6 sujets volontaires, entre 75% et 85 % de la dose administrée (25 μ g/personne dans 50 ml d'eau, voie orale) sont retrouvés sous forme de BPA-G dans les urines en moins de 5 heures (VOLKEL W, 2005).

Les études pharmacocinétiques ont permis d'évaluer quelques paramètres pharmacocinétiques du BPA chez l'Homme (Tableau 7).

⁵ LC-MS/MS : Chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse en tandem

⁶ GC-MS : Chromatographie gazeuse associée à la spectrométrie de masse

Tableau 7 : Paramètres pharmacocinétiques du BPA évalués chez l'Homme.

Paramètre	Valeur (unités)	Références
Temps de demi-vie du BPA	4 (heures)	(VOLKEL W, 2002) (VOLKEL W, 2005)
	1.5 (heure)	(TSUKIOKA T, 2004)
Volume de distribution du BPA	5.2 (L/kg)	(YOO SD, 2000)
	0.6 (L/kg)	(UPMEIER A, 2000)
Clairance plasmatique du BPA	30 (mL/kg/min)	(CHO CY, 2002)
	28 (mL/kg/min)	(SHIN BS, 2004)
Débit sanguin hépatique	35 (mL/kg/min)	(BOXENBAUM, 1980)

Le débit sanguin hépatique a été estimé à l'aide de l'équation allométrique de Boxenbaum (BOXENBAUM, 1980) suivante : $Q_h = 0.0555 \cdot P^{0.894}$ avec P en kg et Q_h en L/min.

Afin de quantifier l'effet de premier passage hépatique, le coefficient d'extraction hépatique (E_h) a été calculé à l'aide de la clairance hépatique du BPA (Cl_h) et du débit sanguin hépatique (Q_h) selon l'équation suivante :

$$E_h = \frac{Cl_h}{Q_h} \quad \text{Équation 1}$$

La clairance plasmatique du BPA est proche de la clairance hépatique étant donné que le BPA est majoritairement métabolisé par le foie (VOLKEL W, 2002). Le coefficient d'extraction hépatique pour l'homme est donc compris entre 0.8 et 0.85 ce qui signifie que 80 à 85 % du BPA qui arrivent au foie sont métabolisés par ce dernier. Le temps de demi vie rapporté par Volkel est peut être surestimé. Il a été calculé à partir d'une administration orale de 5 mg/personne de BPA. L'élimination de la molécule pourrait être limitée par son absorption gastro-intestinale. Ce phénomène appelé flip-flop pourrait être à l'origine d'une augmentation artefactuelle du temps de demi-vie. Les différences des valeurs du volume de distribution observées entre les études sont inexplicables.

2.3.3.3 La toxicocinétique du BPA chez les animaux

La toxicocinétique du BPA a été essentiellement étudiée chez les rongeurs (rat, souris) et les primates non humains.

Suite à une administration orale, le BPA est rapidement absorbé et métabolisé par le foie chez toutes les espèces. Doerge et son équipe ont administré 100µg/kg de BPA par voie orale à des rats femelles Sprague Dawley et des singes adultes (DOERGE DR, 2010b) (DOERGE DR, 2010a). Les concentrations plasmatiques maximales de BPA non conjugué ont été atteintes durant les premières minutes suivant l'administration orale, suggérant une absorption intestinale rapide. La biodisponibilité du BPA calculée (0.028% chez le singe et 0.77% chez la ratte) a mis en évidence un effet de premier passage hépatique intense. Le principal métabolite du BPA est le BPA-G chez le singe (KUREBAYASHI H, 2002) et le rat (POTTENGER LH, 2000).

Les modalités d'élimination du BPA et de ses métabolites présentent des différences interspécifiques. Chez le rat, la dose administrée a été majoritairement retrouvée dans les fèces (52% à 83%) sous la forme de BPA non conjugué. L'excrétion urinaire de BPA-G a été limitée (13% et 34%) (POTTENGER LH, 2000). Au contraire chez le singe, l'excrétion rénale a contribué de manière plus importante (79 et 86%) à l'élimination du BPA que l'excrétion fécale (1.8% et 3.1%) (KUREBAYASHI H, 2002). Cette différence s'explique par la présence d'un cycle entéro-hépatique chez les rongeurs qui n'existe pas chez les primates non humains. En effet, le poids moléculaire seuil à partir duquel l'élimination biliaire est possible dépend des espèces. Il est de l'ordre de 200-300g/mol chez le rat et de 500-600g/mol chez l'homme. Le principal métabolite du BPA, le BPA-G de poids moléculaire 404g/mol, est donc préférentiellement éliminé dans la bile chez le rat et par les urines chez les primates (SHIN BS, 2010).

Le tableau 8 présente les paramètres pharmacocinétiques du BPA estimés dans différentes espèces suite à l'administration intraveineuse de BPA à des doses comprises entre 0.1 et 10 mg/kg.

Tableau 8 : Paramètres pharmacocinétiques du BPA estimés chez différentes espèces animales suite à l'administration intraveineuse d'une dose de BPA comprise entre 0.1 et 10mg/kg.

Espèce (Référence)		Dose	Clairance plasmatique du BPA	Temps de demi-vie du BPA	Volume de distribution du BPA	Débit hépatique	Coefficient d'extraction hépatique
		<i>mg/kg</i>	<i>ml/kg/min</i>	<i>h</i>	<i>L</i>	<i>ml/kg/min</i>	
Singe rhésus (DOERGE DR, 2010a)		0.1	7.6	3.6	2.3	45	0.16
Rat	(CHO CY, 2002)	1	109	0.62	1.3	64	1.7
	(DOERGE DR, 2010b)	0.1	75	0.66	1.1		1.1
	(UPMEIER A, 2000)	10	10	38.5	Non évalué		0.15
Souris (CHO CY, 2002)		2	208	0.67	0.1	107	1.94

Le débit sanguin hépatique a été estimé à l'aide de l'équation allométrique de Boxenbaum (BOXENBAUM, 1980) suivante : $Q_h = 0.0555 \cdot P^{0.894}$ avec P en kg et Qh en L/min et le coefficient d'extraction hépatique avec l'équation 1.

Chez les rongeurs, il existe un autre métabolisme du BPA que le métabolisme hépatique comme en témoignent les coefficients d'extraction hépatique supérieurs à 1. Le temps de demi-vie du BPA est relativement court dans la plupart des études (entre 0.6 et 3.6h) excepté dans une étude sur les rats où il a été estimé à 38.5 heures.

2.3.4 Incohérence bibliographique

Comme nous l'avons vu précédemment, la clairance plasmatique du BPA se définit comme la capacité de l'organisme à éliminer le BPA après qu'il ait atteint la circulation générale. Elle se calcule en divisant la dose administrée par les concentrations plasmatiques de BPA à l'état d'équilibre (équation 2). Il s'agit donc d'un paramètre qui permet de relier un niveau d'exposition externe à un niveau d'exposition interne, correspondant au véritable marqueur du niveau de risque.

$$\text{Clairance plasmatique} = \frac{\text{Dose administrée}}{\text{Concentrations plasmatiques à l'équilibre}}$$

Équation 2 : La clairance plasmatique, un paramètre qui relie un niveau d'exposition externe au BPA à un niveau d'exposition interne, le véritable marqueur du niveau de risque.

Selon la littérature, la clairance plasmatique du BPA de l'Homme est d'environ 30ml/kg.min (MIELKE H, 2009) (CHO CY, 2002) et l'exposition externe au BPA est comprise entre 1 et 13µg/kg/j (EFSA, 2006). A l'aide de l'équation 2, les concentrations plasmatiques de BPA sont de l'ordre du pg/ml. La comparaison de cette valeur estimée à celles observées chez l'Homme dans des études de biosurveillance (tableau 5) montre une incohérence. Diverses hypothèses ont été émises pour l'expliquer.

- **Hypothèse 1 : L'exposition externe au BPA de l'homme serait bien plus importante que la DJA**

Des études ont mis en évidence que la voie alimentaire est la voie d'exposition majeure au BPA. Parmi elles, une étude menée sur 257 enfants non scolarisés a montré que 99% de l'exposition au BPA provenait de sources alimentaires (WILSON NK, 2007). Cependant, certains auteurs supposent qu'il existe d'autres sources d'exposition non négligeables telles que l'inhalation de poussières contaminées ou l'absorption transcutanée de BPA. Les concentrations de BPA relevées dans les échantillons de poussière ménagère sont peu élevées (Cf 2.2.2.2) et ne peuvent pas être à l'origine de niveaux d'exposition supérieurs à la DJA. L'exposition au BPA par contact via les papiers thermiques a été envisagée. Zalko et son équipe ont montré à l'aide d'un modèle de peau d'oreille de porc que le BPA est très bien absorbé et métabolisé par la peau. La biodisponibilité du BPA après application cutanée serait comprise entre 10% et 60% mais cette voie d'exposition contribuerait de façon mineure à l'exposition humaine (ZALKO D, 2011) (MIELKE H, 2011).

- **Hypothèse 2 : Les concentrations sanguines de BPA rapportées par les études de biosurveillance sont surestimées.**

Suite à une administration orale de BPA et de BPA marqué au deutérium chez un Homme sain (5µg/personne/molécule), Volkel a retrouvé dans les urines des niveaux faibles de BPA (<LOQ) alors qu'aucune trace de BPA marqué au deutérium n'a été détectée (VOLKEL W, 2008). Cette observation suggère qu'une contamination des

échantillons par l'environnement est possible. Elle peut avoir lieu pendant le prélèvement, le stockage ou le dosage. Les concentrations de BPA non négligeables retrouvées dans la poussière (VOLKEL W, 2008) et le système capillaire de l'HPLC (VOLKEL W, 2005) sont en faveur de cette hypothèse. Cependant, selon Ginsberg et Rice, la plupart des études de biosurveillance ont maîtrisé ces risques de contamination (GINSBERG G, 2009).

Plusieurs chercheurs ont évalué la stabilité des métabolites du BPA dans les urines humaines. A température ambiante (YE X, 2007), ils s'hydrolysent en très peu de temps en BPA. Il est probable que ce phénomène survienne également dans le plasma ou le sérum conduisant à une surestimation des concentrations en BPA. Le maintien des échantillons à 4°C après leur collecte garantit la stabilité des conjugués. La validation des conditions pré-analytiques permet également de s'affranchir de certaines contaminations.

La surestimation des concentrations plasmatiques de BPA pourrait être également due au manque de spécificité de la méthode analytique utilisée. En effet, les réactions croisées, par exemple pour le dosage ELISA (DEKANT W, 2008) ou la présence dans les échantillons à analyser de molécules exogènes dont le poids moléculaire et le comportement biochimique sont proches de celui du BPA (resveratrol,(VOLKEL W, 2005)) pourraient entraîner des biais dans les méthodes de dosage.

- **Hypothèse 3 : L'estimation actuelle de la clairance plasmatique du BPA chez l'homme est insuffisante**

Les données pharmacocinétiques du BPA sont limitées et éparses chez l'Homme. La clairance plasmatique du BPA a été évaluée à 30ml/kg.min (MIELKE H, 2009) (CHO CY, 2002). En utilisant une valeur de clairance plasmatique du BPA du même ordre de grandeur et les données urinaires des études de biosurveillance, Mielke et Gundert-Rémy (MIELKE H, 2009) ont calculé des concentrations plasmatiques de BPA à l'équilibre de l'ordre de 2.6pg/ml. Cette valeur est près de 1000 fois inférieure aux valeurs mesurées dans les études de biosurveillance. La clairance plasmatique du BPA serait peut être soumise à des facteurs de variation inconnus à ce jour qui pourraient expliquer la différence entre les concentrations plasmatiques observées et celles estimées à partir de modèles pharmacocinétiques.

2.4 Objectifs de l'étude

Le BPA étant un perturbateur endocrinien, nous proposons d'utiliser 5 espèces animales (la brebis, le porc, le chien, le rat et la souris) pour évaluer les similarités ou les différences interspécifiques dans les processus de distribution/élimination afin de documenter la toxicocinétique du BPA chez l'Homme.

Pour chaque espèce, nous avons évalué :

- Les paramètres pharmacocinétiques du BPA après une administration orale (PO) et intraveineuse (IV) de BPA
- La biodisponibilité, la fraction absorbée et l'effet de premier passage hépatique
- L'excrétion urinaire du BPA et du BPA-G

A partir de ces données, nous avons dans un premier temps comparé ces 5 espèces en termes d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination du BPA afin de dégager les mécanismes toxicocinétiques communs à différentes espèces et ceux sujets à des variations interspécifiques.

Dans un second temps, nous avons utilisé ces données pour déterminer la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme par une relation allométrique.

3. Matériels et méthodes

3.1 Identification du matériel test

Le matériel test utilisé $[(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2]$, le Bisphénol A, est sous forme de poudre blanche. Son poids moléculaire est d'environ 228.29 g/mol et sa pureté supérieure à 99 %. Il provient du fournisseur Sigma-Aldrich (Saint Quentin, Fallaires, France).

3.2 Préparation du matériel test

3.2.1 Préparation du BPA pour l'administration intraveineuse (IV)

Pour toutes les espèces, la dose de BPA, administrée sous forme de bolus IV, est de **5mg/kg**. Compte tenu des variations de poids vif entre les espèces, différentes dilutions ont été réalisées afin d'obtenir des volumes d'administration adéquats (Tableau 9).

Tableau 9 : Modalités de préparation des solutions de BPA administrées en IV

Espèce	Brebis	Porcs	Chiens	Rats	Souris
Dose	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg
Concentration de la solution administrée	50mg/ml	50mg/ml	50mg/ml	5mg/ml	1mg/ml
Milieu de dilution	EtOH/PEG (1 :49)	EtOH/PEG (1 :49)	EtOH/PEG (1 :49)	EtOH/PEG (1 :49)	DMSO/ Sérum φ (1 :49)
Ordre de grandeur du poids vif	60kg	20 kg	10 kg	300g	22-24 g
Ordre de grandeur du volume administré *	6 ml	2 ml	1ml	0.3 ml	230 µl

* Le volume administré est ajusté au poids de l'animal déterminé dans les deux jours précédant l'administration IV du BPA

EtOH : éthanol, PEG : propylène glycol, DMSO : diméthylsulfoxyde, Serum φ : sérum physiologique.

La préparation de la solution de BPA a été réalisée juste avant les expérimentations. Un aliquot de 500µl de la solution préparée a été stocké à -20°C pour tester sa stabilité.

3.2.2 Préparation du BPA pour l'administration orale (PO)

Pour toutes les espèces, la dose en BPA, administrée par voie orale, est de **100mg/kg**. Compte tenu des variations de poids vif entre les espèces, différentes dilutions ont été réalisées afin d'obtenir des volumes d'administration adéquats (tableau 10).

Tableau 10 : Modalités de préparation des solutions de BPA administrées par voie orale

Espèce	Brebis	Porcs	Chiens	Rats	Souris
Dose	100mg/kg	100mg/kg	100mg/kg	100mg/kg	100mg/kg
Concentration de la solution administrée	100mg/ml	100mg/ml	100mg/ml	60mg/ml	10mg/ml
Milieu de dilution	EtOH/ huile de maïs (1:9)	EtOH/ huile de maïs (1:9)	EtOH/ huile de maïs (1:9)	EtOH/ huile de maïs (1:9)	EtOH/ huile de maïs (1:9)
Ordre de grandeur du poids moyen	60kg	20 kg	10 kg	300g	22-24 g
Ordre de grandeur du volume administré *	60 ml	20ml	10ml	0.5ml	0.23ml

* Le volume administré est ajusté au poids de l'animal déterminé dans les deux jours précédant l'administration orale du BPA
EtOH : éthanol

La préparation des solutions de BPA et leur mise en solution dans le solvant (éthanol : huile de maïs (1 :9)) ont été réalisées juste avant les expérimentations. Un aliquot de 500µl de la solution préparée a été stocké à -20°C pour vérifier la dose et tester sa stabilité.

3.3 Animaux

3.3.1 Description des animaux

Les caractéristiques des animaux utilisés lors de nos expérimentations sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Race, sexe, âge, poids moyen et nombre des animaux utilisés

Espèce	Brebis	Porc	Chien	Rat	Souris
Race	Lacaune	Génétic Pic	Beagle	Wistar	CD-1
Sexe	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
Poids moyen \pm SD	61.7 \pm 5.2 kg	22.4 \pm 3.4 kg	10.2 \pm 0.6 kg	300 \pm 13 g	22.7 \pm 1.3 g
Nombre d'animaux	8	8	6	12	99

3.3.2 Hébergement des animaux

Les souris servant à la collecte des urines ainsi que les brebis, les porcs, les chiens et les rats ont été placés individuellement dans des boxes (brebis) ou des cages à métabolisme. Les souris destinées au prélèvement des échantillons sanguins ont été placées par 4 dans des cages à métabolisme.

Les animaux ont été nourris avec une alimentation conventionnelle et abreuvés ad libitum.

3.4 Plan expérimental

3.4.1 Plan en cross Over

Trois espèces animales ont été utilisées dans le protocole expérimental de type cross over : la brebis, le porc et le chien.

La moitié des animaux de chaque espèce (n= 4 pour le porc et la brebis et 3 pour le chien) a reçu une administration de BPA par voie orale puis par voie IV. L'ordre des administrations a été inversé pour l'autre moitié des animaux. L'intervalle de temps entre les deux administrations a été de 7 jours, soit, une période supérieure à 10 fois le temps de demi-vie du BPA, estimé à quelques heures dans une étude préliminaire chez la brebis. Ce délai de « wash out » doit être respecté afin de ne pas retrouver de niveaux résiduels de BPA ou de ses métabolites avant la deuxième administration de BPA (SCHONFELDER G, 2002) (figure 9).

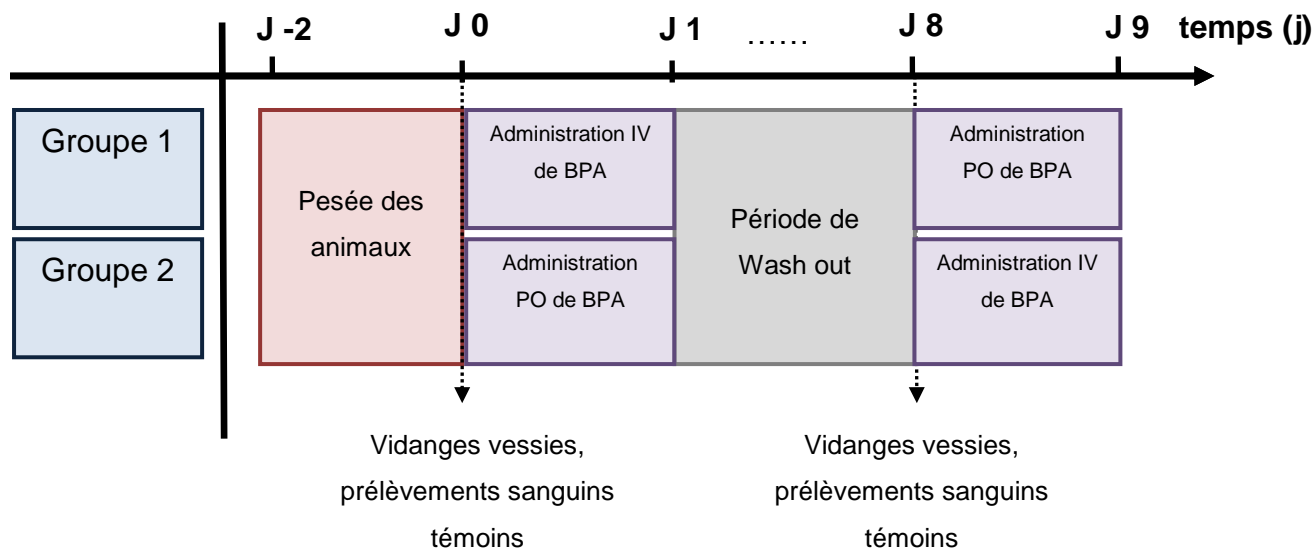


Figure 9 : Plan expérimental en "Cross Over" (brebis, porcs, chiens)

3.4.2 Plan en parallèle

Les rats et les souris ont été utilisés dans un protocole selon un plan parallèle.

3.4.2.1 Les rats

Un cathéter a été mis en place dans la veine fémorale de chacun des rats sous anesthésie générale. Un premier groupe (n=6) a reçu une administration orale et le deuxième (n=6) une administration IV. A la fin de l'étude, les rats ont été sacrifiés par exsanguination sous anesthésie gazeuse.

3.4.2.2 Les souris

Le lot de 99 souris a été divisé en 4 groupes.

Le premier et le deuxième groupes comportaient 40 animaux chacun et ont reçu respectivement l'administration IV et orale. Une fois les administrations réalisées, les deux groupes ont été divisés en 10 groupes de 4 souris. Chaque groupe de 4 souris était associé à un temps de prélèvement sanguin.

Le troisième groupe comportait 16 souris. Ces dernières servaient à la collecte des urines. La première moitié (sous groupe numéro 1, n=8) a reçu une administration par voie orale et la deuxième (sous groupe numéro 2, n=8) par voie IV.

Le quatrième groupe comportait 3 souris témoins.

A la fin de l'étude, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale après exsanguination.

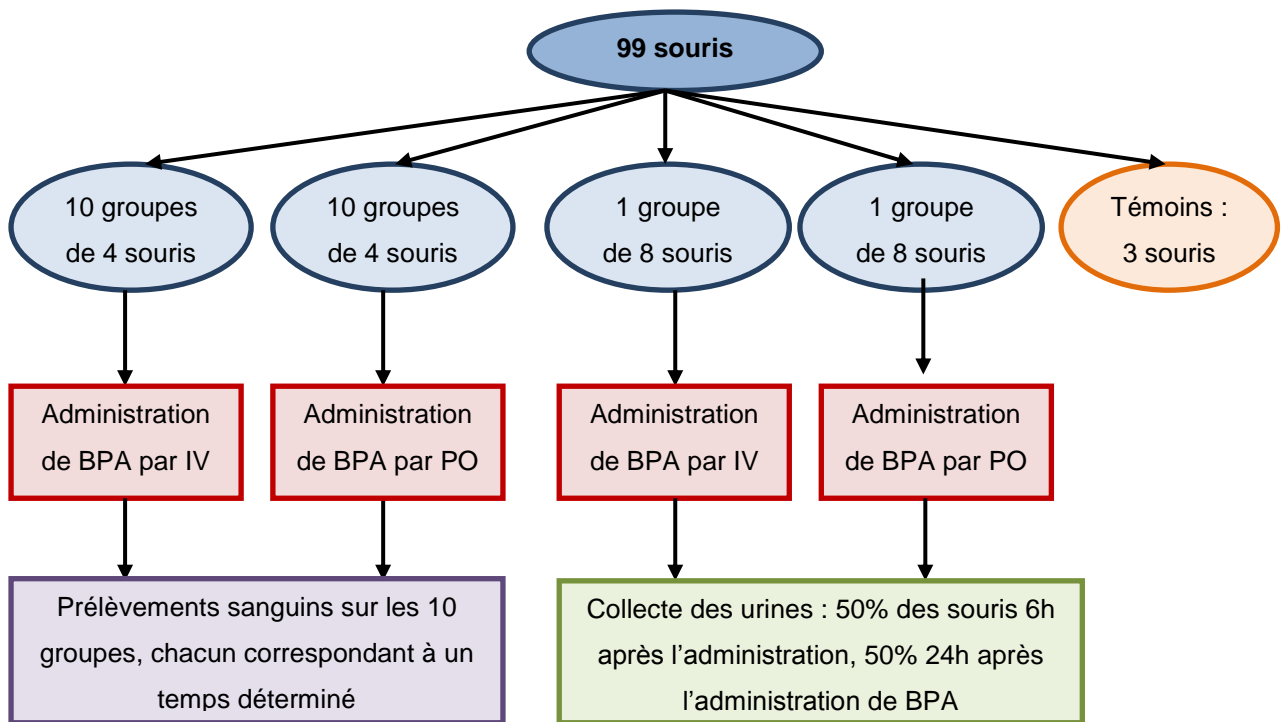


Figure 10: Plan expérimental en parallèle pour les souris

3.5 Modalités d'administration et de prélèvement

3.5.1 Modalités d'administration

3.5.1.1 Voie orale

Une sonde naso-gastrique a été mise en place chez la brebis et le chien et une sonde stomacale chez le porc. Après l'administration de la solution de BPA, la sonde a été rincée à l'eau et retirée.

L'administration orale chez les rongeurs a été effectuée à l'aide d'une canule métallique de gavage montée sur une seringue de 1ml.

3.5.1.2 Voie IV

Un cathéter a été mis en place extemporanément dans la veine jugulaire gauche chez la brebis, dans une veine auriculaire chez le porc, dans la veine céphalique chez le chien et dans l'une des veines latérales de la queue chez les rongeurs. Après l'administration de la solution de BPA, le cathéter a été rincé avec du sérum

physiologique et retiré. L'administration chez le rat s'est faite sous anesthésie générale alors que pour les autres espèces, les animaux étaient vigiles.

3.5.2 Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau des veines jugulaires droite et gauche chez la brebis, le porc et le chien à différents temps définis par le protocole expérimental (tableau 12).

Tableau 12 : Temps et volumes de prélèvement par espèce

Espèce	Brebis	Porc/chien
Temps de prélèvement sanguins suite à l'administration PO	Avant l'administration (t=0) et 10, 20, 30, 60, 90 minutes, puis 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48 heures post administration	Avant l'administration (t=0) et 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24 heures post administration
Temps de prélèvement sanguins suite à l'administration IV	Avant l'administration (t=0) et 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90 minutes, puis 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48 heures post administration	Avant l'administration (t=0) et 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24 heures post administration
Volume prélevé	2 ml	4ml (porc) / 2ml (chien)

Chez le rat, les prélèvements de sang ont été réalisés sur l'animal vigile à des temps déterminés selon la voie d'administration via le cathéter mis en place dans la veine fémorale 2 à 5 jours avant le début des expériences (tableau 13). Un volume de sérum physiologique équivalent au volume de sang prélevé a été administré au rat après le prélèvement et le cathéter a été rempli avec 200µL de sérum physiologique hépariné.

Tableau 13 : Temps des prélèvements sanguins selon la voie d'administration chez le rat.

Voie d'administration	Administration orale	Administration IV
Temps de prélèvement sanguins	Avant l'administration (t=0) et 10, 30, 45, 60, 90 minutes, puis 2, 4, 8, 12, 24, 36 et 48 heures après l'administration	Avant l'administration (t=0) et 10, 30, 40, 60, 90 minutes, puis 2, 4, 8, 12 et 24 heures après l'administration

Pour des raisons physiologiques, il est déconseillé de prélever plus de 3 ml de sang sur un rat de 300 grammes sur 24 heures. En effet, la quantité totale de sang prélevée sur 24 heures ne doit pas excéder 10% de la volémie de l'animal. Les animaux n'ont donc été prélevés que 6 fois sur 24 heures afin qu'il y ait au moins 3 mesures par temps de prélèvement (OFFICE VETERINAIRE FEDERAL OVF (SUISSE)).

Chez la souris, les prélèvements sanguins ont été réalisés 30, 45, 60 et 90 minutes puis 2, 6, 10, 12 et 24 heures après l'administration pour les deux voies et au temps supplémentaire de 15 minutes uniquement pour la voie IV. Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (1.5 à 3 % dans l'O₂). Après rasage, nettoyage et désinfection chirurgicale, une laparotomie sur la ligne blanche a été réalisée. Les parois abdominales ont été maintenues écartées. La veine cave a été mise en évidence puis ponctionnée avec une aiguille montée sur une seringue de 1ml préalablement héparinée.

3.5.3 Prélèvements urinaires

Les urines ont été collectées par un cathéter urétral laissé en place pendant 24 heures chez la brebis et après miction spontanée dans les cages à métabolisme pour les autres espèces. La collecte a été effectuée à des temps définis par le protocole expérimental (1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 heures après l'administration de BPA) pour la brebis et suite aux mictions spontanées pour le porc et le chien. Chez le rat, les urines ont été récoltées toutes les 3 heures durant 12 heures puis toutes les 12 heures jusqu'à 48 heures post administration. Chez la souris, la collecte a eu lieu 6 heures après l'administration pour 4 souris d'un même sous groupe et 24 heures après l'administration pour les autres.

Le tableau 14 récapitule l'ensemble des conditions expérimentales pour les 5 espèces.

Tableau 14 : Récapitulatif des plans expérimentaux par espèce

Espèce	Moutons	Porcs	Chiens	Rats	Souris
Race	Lacaune	Génétic Pic	Beagle	Wistar (HSDHan:WIST), non consanguins, Harlan	CD1 (CrI:CD1(ICR)), non consanguines, Charles River
Sexe	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
Nombre animaux	8	8	6	12	99
Type de protocole	Cross over Wash out 1 semaine	Cross over Wash out 1 semaine	Cross over Wash out 1 semaine	parallèle	parallèle
Administration IV	Veine jugulaire gauche (cathéter)	Veine auriculaire (cathéter)	Veine céphalique (cathéter)	Veine de la queue (cathéter ou seringue)	Veine de la queue (seringue)
Administration PO	Gavage (sondage naso-gastrique)	Gavage (sondage oro-gastrique)	Gavage (sondage naso-oesophagien)	Gavage (canule)	Gavage (canule)
Prélèvements sanguins	Ponction à la veine jugulaire droite	Ponction aux veines jugulaires droite et gauche	Ponction aux veines jugulaires droite et gauche	Cathéter posé dans la veine fémorale	Prélèvement terminal à la veine cave
Prélèvements urinaires	Sonde de Foley (Charrière 12)	Miction spontanée (cage)	Miction spontanée (cage)	Miction spontanée (cage)	Miction spontanée (cage)

Temps des prélèvements sanguins	PO : avant l'administration et 10, 20, 30, 60, 90 minutes, puis 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48 heures post administration	PO : avant l'administration et 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24 heures post administration		PO : avant l'administration et 10, 30, 40, 60, 90 minutes, puis 2, 4, 8, 12, 24, 36 et 48 heures après la première et la dernière administration	PO/IV : avant l'administration et 15, 30, 45, 60 et 90 minutes puis 2, 6, 10, 12 et 24 heures après l'administration.
	IV : avant l'administration et 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90 minutes, puis 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48 heures post administration	IV : avant l'administration et 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24 heures post administration		IV : avant l'administration et 10, 30, 40, 60, 90 minutes, puis 2, 4, 8, 12 et 24 heures après l'administration	
Temps des prélèvements urinaires	Lors de la pose de la sonde et 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 et 36 heures après l'administration	Collecte des urines après miction spontanée	Collecte des urines après miction spontanée	Collecte des urines toutes les 3 heures pendant 12 heures puis toutes les 12 heures jusqu'à 48h post administration	Collecte des urines 6 heures et 24 heures après l'administration

3.6 Traitements et dosage des prélèvements

3.6.1 Traitement des prélèvements

Les échantillons sanguins ont été recueillis dans des tubes en polypropylène héparinés et les urines dans des récipients en verre placés sur la glace et munis d'un filtre (pore 0.5mm) pour le chien et le porc. A chaque prélèvement urinaire, le volume total d'urine récolté et l'heure de collecte ont été enregistrés. Les échantillons d'urine et de sang ont été maintenus à 0°C et centrifugés pendant 10 minutes à 3000*g à 4°C dans l'heure suivant le prélèvement. Le plasma et l'urine ont été aliquotés en plusieurs fractions et congelés à -20°C dans des tubes en polypropylène jusqu'au dosage du BPA et BPA-G.

3.6.2 Dosage du BPA et du BPA-G

3.6.2.1 Purification du BPA-G

Une nouvelle méthode d'isolation et de purification du BPA-G a été développée au laboratoire afin de permettre le dosage simultané du BPA et du BPA-G dans les échantillons urinaires et sanguins. Le BPA-G présent dans les urines récoltées suite à une administration orale de BPA à des brebis a été purifié par flash chromatographie⁷, évaporé sous flux d'air et lyophilisé. Un gramme de BPA-G a ainsi été purifié sous forme de poudre. Sa caractérisation en UHPLC-MS/MS et en RMN⁸ a permis la réalisation de la courbe d'étalonnage pour le BPA-G (LACROIX MZ, 2011).

3.6.2.2 Principe du dosage du BPA et BPA-G par UPLC-MS/MS

Les concentrations plasmatiques et urinaires en BPA et BPA-G ont été évaluées simultanément par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS).

Les échantillons (100µL) ont été précipités avec 150µL d'Acétonitrile et 50 µL de standard interne (BPA marqué au deutérium soit BPA-d₁₆) puis centrifugés

⁷ Chromatographie utilisant une silice plus fine (phase solide) permettant une meilleure séparation et l'accélération de la migration de la phase liquide suite à l'application de pressions autres que la pression atmosphérique

⁸ RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

(20 000xg) pendant 10 minutes. 5 μ L de surnageant ont été prélevés et injectés sur une chaîne Acquity UPLC couplée à un spectromètre de masse triple quadripôles.

Le BPA et le BPA-d₁₆ ont été dans un premier temps séparés du BPA-G par chromatographie liquide. Le prélèvement a été injecté à l'entrée d'une colonne contenant des billes de silice. Il a été dilué dans une phase mobile liquide qui l'a entraîné à travers la colonne. Compte tenu de leur affinité pour les billes de silice et la phase liquide, le BPA et le BPA-d₁₆ ont présenté des vitesses de migration quasiment identiques entre elles mais inférieures à celle du BPA-G. Ainsi il y a eu une première séparation des molécules qui sont arrivées séquentiellement dans le spectromètre de masse. Elles se sont dirigées ensuite vers la source electrospray dite ESI pour passer de l'état liquide à gazeux sous forme d'un spray et subir une ionisation négative (OH transformé en O⁻). A ce stade, les molécules neutres ou positives ont été éliminées du circuit. Les ions négatifs sont passés alors dans trois quadripôles. Chaque quadripôle contenait 4 électrodes (2 positives et 2 négatives).

Le premier quadripôle a sélectionné séquentiellement le BPA (227g/mol), le BPA-d₁₆ (241g/mol) et le BPA-G (403g/mol). Pour cela, différents potentiels ont été appliqués sur les électrodes de telle sorte que les éléments sélectionnés soient les seuls à ne pas rentrer en contact avec les électrodes. En effet, la collision entre un ion et une électrode neutralise l'ion qui est ensuite éliminé du circuit.

Le deuxième quadripôle a fragmenté les molécules à l'aide d'un gaz, l'argon.

- BPA a donné les ions de poids moléculaire de 212g/mol et de 113g/mol.
- BPA-d₁₆ a donné les ions de poids moléculaire de 222g/mol et de 142g/mol
- BPA-G a donné les ions de poids moléculaire de 112g/mol et de 227g/mol

Le troisième quadripôle a sélectionné par un jeu de potentiels identique à celui du premier quadripôle les ions issus de la fragmentation de la molécule mère.

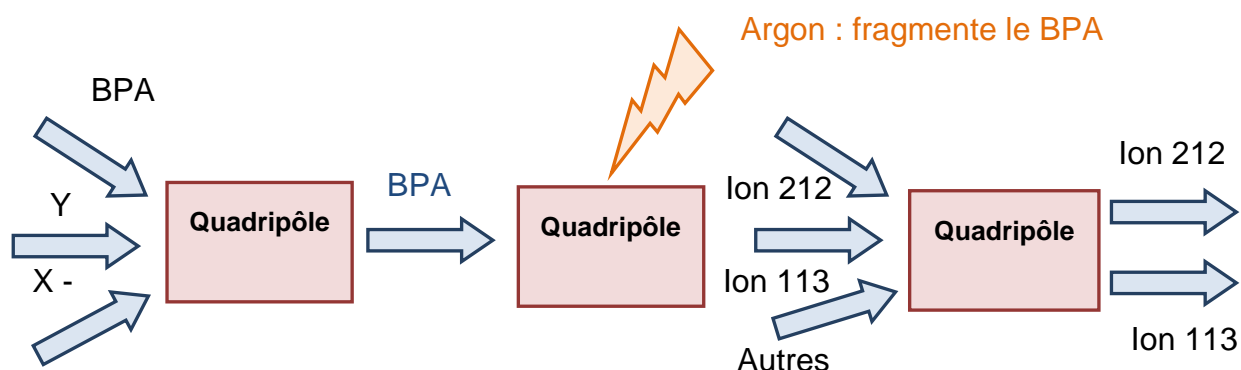


Figure 11 : Schématisation du tripode de quadripôles

Un quadripôle contient 4 électrodes (2 positives et 2 négatives). Le premier quadripôle a permis de maintenir dans le circuit uniquement les molécules d'intérêt comme par exemple le BPA. Pour cela, différents potentiels ont été appliqués sur les électrodes de telle sorte que les éléments à sélectionner soient les seuls à ne pas rentrer en contact avec les électrodes. En effet, la collision entre un ion et une électrode neutralise l'ion qui est ensuite éliminé du circuit. La deuxième électrode a permis la fragmentation du BPA par un gaz (l'argon) en deux ions distincts (ion 113 et ion 212). Le troisième quadripôle a sélectionné par un jeu de potentiels identique à celui du premier quadripôle les deux ions issus de la fragmentation du BPA.

Les concentrations en ng/ml de BPA ou de BPA-G des échantillons initiaux, ont été évaluées par régression non linéaire.

3.6.3 Les limites de quantification (LOQ)

Les limites de quantification (LOQ) des matrices urines et plasmas varient selon les espèces. Le tableau 15 présente les LOQ's validées pour le BPA et le BPA-G.

Tableau 15 : Présentation des LOQ's par espèce et par matrice en µg/mL puis en µmol/L

Matrice	Molécule	Brebis	Porc	Chien	Rat	Souris
LOQ (en µg/mL)						
Plasma	<i>BPA</i>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.01
	<i>BPA-G</i>	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05
Urine	<i>BPA</i>	0.025	0.025	0.025	0.010	0.010
	<i>BPA-G</i>	1	1	1	1	1
LOQ (µmol/L)						
Plasma	<i>BPA</i>	0.004	0.004	0.004	0.004	0.044
	<i>BPA-G</i>	0.049	0.049	0.049	0.124	0.124
Urine	<i>BPA</i>	0.110	0.110	0.110	0.044	0.044
	<i>BPA-G</i>	2.474	2.474	2.474	2.474	2.474

3.7 Analyse des données

3.7.1 Analyse non compartimentale des données plasmatiques

Les concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G ont été analysées à l'aide d'un modèle non compartimental dans WinNonlin. Pour les données relatives au BPA-G, la dose nominale administrée a été calculée en équivalents BPA c'est-à-dire en faisant l'hypothèse que tout le BPA est transformé en BPA-G. Etant donné l'impossibilité d'analyser les données animal par animal pour les rongeurs (un prélèvement par animal pour les souris), les données ont été analysées ensemble (option « Sparse sampling » dans WinNonlin) afin d'obtenir une erreur standard (SE) pour chaque paramètre.

L'aire sous la courbe (AUC) de t_0 à t_{last} avec t_{last} , temps de la dernière concentration quantifiable a été calculée avec la méthode des trapèzes arithmétiques.

La clairance du BPA (Cl_{BPA}) et la clairance apparente du BPA-G (Cl/F_{BPA-G}) ont été calculées selon les équations suivantes.

$$\frac{Dose\ BPA\ IV}{AUC_{BPA,IV}} = Cl_{BPA} \qquad \frac{Dose\ BPA\ IV}{AUC_{BPA-G,IV}} = Cl/F_{BPA-G}$$

Les temps de demi vie du BPA ($t_{1/2, BPA}$) et du BPA-G ($t_{1/2, BPA-G}$) ont été déterminés à partir des données plasmatiques obtenues suite à l'administration IV en divisant le logarithme népérien de 2 par β avec β la pente de la phase terminale.

3.7.2 Ajustement des données plasmatiques et urinaires par une approche modélisatrice chez la brebis, le porc et le chien

Afin de décrire la disposition du BPA et du BPA-G après une administration IV et orale, un modèle compartimental a été utilisé chez la brebis, le porc et le chien. Ce modèle est une simplification de la réalité qui permet de décrire le comportement d'un système biologique. Il se compose d'un modèle semi-physiologique associé à un modèle mathématique.

Le modèle semi-physiologique

Le *modèle semi-physiologique* représente l'organisme sous la forme de plusieurs compartiments reliés entre eux par des constantes de transfert (figure 12). Un *compartiment* est un ensemble homogène de molécules sur le plan cinétique. Il en existe de deux types : les compartiments centraux tels que le plasma ou les organes très vascularisés et les compartiments périphériques tels que les tissus. Une *constante de transfert* est un paramètre de structure du modèle, c'est-à-dire une grandeur dont la valeur est fixée par ce modèle. Il s'agit d'une constante de temps (dimension t^{-1}) symbolisant les échanges entre compartiments qu'ils soient réversibles ou pas (élimination de la substance). Elle exprime des réactions d'ordre 1 car la vitesse de transfert d'un compartiment à un autre est proportionnelle à la concentration en amont.

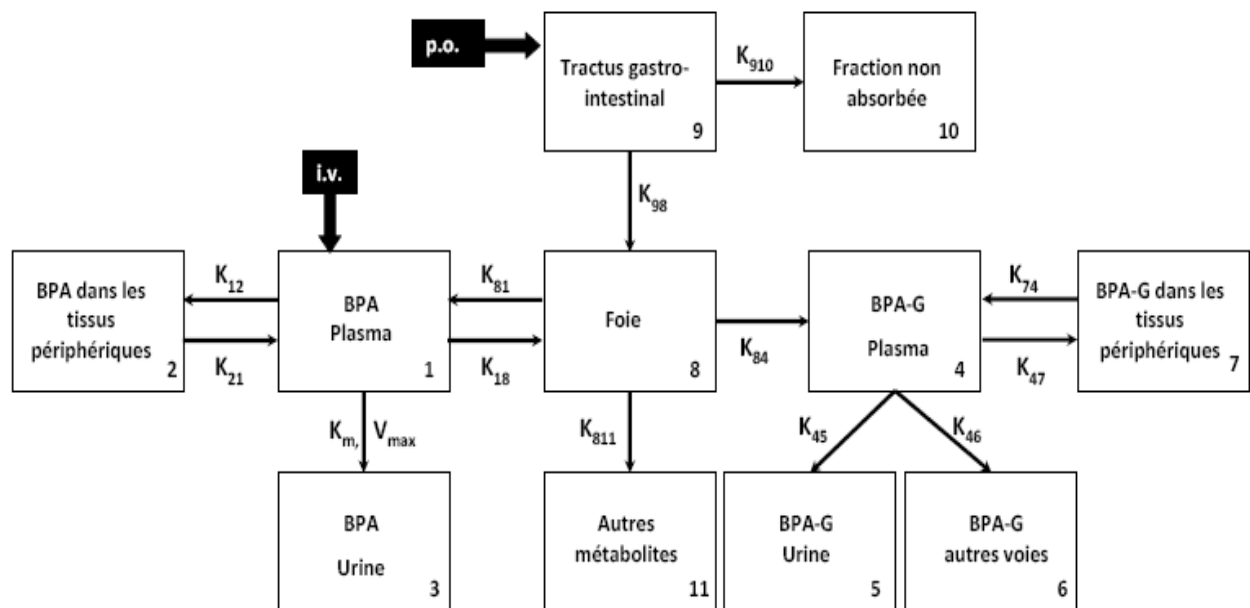


Figure 12 : Modèle semi-physiologique

Présentation du modèle semi-physiologique permettant d'établir les paramètres toxicocinétiques du BPA et du BPA-G chez trois espèces de mammifères.

Les doses IV (5mg/kg) et PO (100mg/kg) ont été administrées respectivement dans le compartiment plasmatique du BPA (compartiment 1) et dans le compartiment représentant le tractus gastro-intestinal (compartiment 9).

La constante de transfert K_{ij} représente les échanges réalisés du compartiment i vers le compartiment j . La signification des constantes de notre modèle est présentée dans le tableau 16.

Tableau 16 : Définition des constantes de transfert du modèle

Constantes	Signification
K_{12}, K_{21}	Constantes de transfert du BPA entre le plasma et les tissus périphériques
K_{74}, K_{47}	Constantes de transfert du BPA-G entre le plasma et les tissus périphériques
K_{81}, K_{18}	Constantes de transfert du BPA entre le foie et le plasma
K_{84}	Constante de transfert du BPA-G du foie vers le plasma
K_m, V_{max}	K_m : constante de Michaelis Menten, concentration plasmatique en BPA correspondant à un taux d'excrétion rénale du BPA de $V_{max}/2$ V_{max} : valeur maximale du taux d'excrétion rénale du BPA
K_{811}	Formation et élimination des métabolites du BPA autres que le BPA-G
K_{45}	Élimination du BPA-G dans les urines à partir du plasma
K_{46}	Élimination du BPA-G par une autre voie que la voie urinaire
K_{98}	Fraction de la dose administrée absorbée par le tractus gastro-intestinal
K_{910}	Fraction de la dose administrée non absorbée par le tractus gastro-intestinal

Le modèle mathématique

Le modèle mathématique est un système d'équations différentielles qui définit pour chaque compartiment la quantité $X(t)$ de substance présente en fonction de la quantité entrée et de la quantité sortie. Pour étudier la variation des quantités $X(t)$ de chaque compartiment, la dérivée de cette fonction est utilisée.

Les équations ci-après définissent le modèle :

$$Cp_{BPA} = \frac{X_1}{V_1} \quad \text{Équation 3}$$

$$Cp_{BPA-G} = \frac{X_4}{V_4} \quad \text{Équation 4}$$

$$K_m = \frac{X_m}{V_1} \quad \text{Équation 5}$$

$$\frac{dX_1}{dt} = K_{21} \times X_2 + K_{81} \times X_8 - \left(K_{12} + K_{18} + \frac{V_{max}}{K_m + X_1} \right) \times X_1 \quad \text{Équation 6}$$

$$\frac{dX_2}{dt} = K_{12} \times X_1 - K_{21} \times X_2 \quad \text{Équation 7}$$

$$\frac{dX_3}{dt} = \frac{V_{max}}{K_m + X_1} \times X_1 \quad \text{Équation 8}$$

$$\frac{dX_4}{dt} = K_{84} \times X_8 + K_{74} \times X_7 - (K_{46} + K_{45} + K_{47}) \times X_4 \quad \text{Équation 9}$$

$$\frac{dX_5}{dt} = K_{45} \times X_4 \quad \text{Équation 10}$$

$$\frac{dX_6}{dt} = K_{46} \times X_4 \quad \text{Équation 11}$$

$$\frac{dX_7}{dt} = K_{47} \times X_4 - K_{74} \times X_7 \quad \text{Équation 12}$$

$$\frac{dX_8}{dt} = K_{18} \times X_1 + K_{98} \times X_9 - (K_{81} + K_{84} + K_{811}) \times X_8 \quad \text{Équation 13}$$

$$\frac{dX_9}{dt} = - (K_{98} + K_{910}) \times X_9 \quad \text{Équation 14}$$

$$\frac{dX_{10}}{dt} = K_{910} \times X_9 \quad \text{Équation 15}$$

$$\frac{dX_{11}}{dt} = K_{811} \times X_8 \quad \text{Équation 16}$$

Cp_{BPA} et Cp_{BPA-G} : concentrations plasmatiques respectivement en BPA (compartiment 1) et en BPA-G (Compartiment 4), X_m : la quantité de BPA éliminée dans les urines, K_m : la concentration plasmatique de BPA pour laquelle la vitesse d'élimination du BPA dans les urines est égale à $V_{max}/2$, X_i : quantité en BPA ou BPA-G dans le compartiment i et K_{ij} : constante de transfert de premier ordre du compartiment i vers le compartiment j .

Les concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G ont été exprimées en $\mu\text{mol/L}$ pour tenir compte de la différence de poids moléculaire entre le BPA (228.115g/mol) et le BPA-G (404.147g/mol). La quantité urinaire cumulée en BPA et BPA-G a été calculée en $\mu\text{mol/L}$. A partir de ces deux types de données (urinaires et plasmatiques), les équations du modèle mathématique ont pu être résolues. La

recherche des solutions s'est faite en deux temps : la simulation et l'optimisation. La simulation consiste en la résolution des équations quand les constantes de transfert sont fixées. Elle permet de savoir si le modèle fonctionne. L'optimisation permet la détermination des constantes de transfert en ajustant au mieux les données expérimentales.

A partir des constantes de transfert calculées, certains paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés :

- Pourcentage de la dose administrée par voie orale absorbé par le tractus digestif :

$$F_{abs} = \frac{K_{98}}{K_{98}+K_{910}} \times 100 \quad \text{Équation 17}$$

- Pourcentage de la dose administrée ayant échappé à l'effet de premier passage hépatique

$$F_h = \frac{K_{81}}{K_{81}+K_{84}+K_{811}} \times 100 \quad \text{Équation 18}$$

- Biodisponibilité du BPA suite à une administration orale :

$$F = F_{abs} \times F_h \quad \text{Équation 19}$$

- Coefficient d'extraction hépatique traduisant l'intensité de l'effet du premier passage hépatique :

$$E_h = 1 - F_h \quad \text{Équation 20}$$

- Pourcentage de la dose administrée métabolisé en BPA-G

$$F_{BPA-BPA-G} = F_{abs} \times \frac{K_{84}}{K_{84}+K_{81}+K_{811}} \times 100 \quad \text{Équation 21}$$

- Pourcentage de la dose administrée éliminé sous forme de BPA-G dans les urines :

$$F_{BPA-G-urine} = F_{BPA-BPA-G} \times \frac{K_{45}}{K_{45}+K_{46}} \times 100 \quad \text{Équation 22}$$

- Pourcentage de la dose administrée éliminé par une autre voie que la voie urinaire sous forme de BPA-G

$$F_{BPA-G-autres} = F_{BPA-BPA-G} \times \frac{K_{46}}{K_{46}+K_{45}} \times 100 \quad \text{Équation 23}$$

- Pourcentage de la dose administrée métabolisé en un autre métabolite que le BPA-G :

$$F_{BPA-autres} = F_{abs} \times \frac{K_{811}}{K_{811}+K_{81}+K_{84}} \times 100 \quad \text{Équation 24}$$

3.7.3 Chez les rongeurs

Le modèle n'a pas permis l'ajustement des données expérimentales des rats et des souris. La fraction de la dose absorbée dans la veine porte (F_{abs}) et la biodisponibilité du BPA (F) ont été calculées respectivement par les équations 25 et 26.

$$F_{abs} = \frac{AUC_{BPA-G,PO}}{AUC_{BPA-G,IV}} \times \frac{Dose_{IV}}{Dose_{PO}} \times 100 \quad \text{Équation 25}$$

$$F = \frac{AUC_{BPA,PO}}{AUC_{BPA,IV}} \times \frac{Dose_{IV}}{Dose_{PO}} \times 100 \quad \text{Équation 26}$$

La fraction de la dose qui échappe à l'effet de premier passage hépatique (F_h) a été estimée par l'équation 19 et le coefficient d'extraction hépatique (E_h) par l'équation 20. Le pourcentage de la dose éliminée dans les urines sous forme de BPA-G a été évalué à partir de la quantité totale de BPA-G éliminée dans les urines chez le rat et la souris.

3.7.4 Approche allométrique

Une relation allométrique a été utilisée pour corrélérer le poids vif à la clairance plasmatique du BPA. Elle s'exprime sous forme de fonction puissance :

$$Cl_{BPA} = a \times P^b \quad \text{Équation 27}$$

Avec a le coefficient allométrique, b l'exposant allométrique, P le poids en kg et Cl_{BPA} la clairance plasmatique du BPA en L/min.

Afin d'obtenir une représentation graphique sur laquelle toutes les espèces étudiées soient représentées, une double transformation logarithmique a été appliquée à la relation allométrique et a permis sa linéarisation. Ainsi, l'équation 27 devient l'équation 28 :

$$\text{Log } Cl_{BPA} = \log a + (b \log P) \quad \text{Équation 28}$$

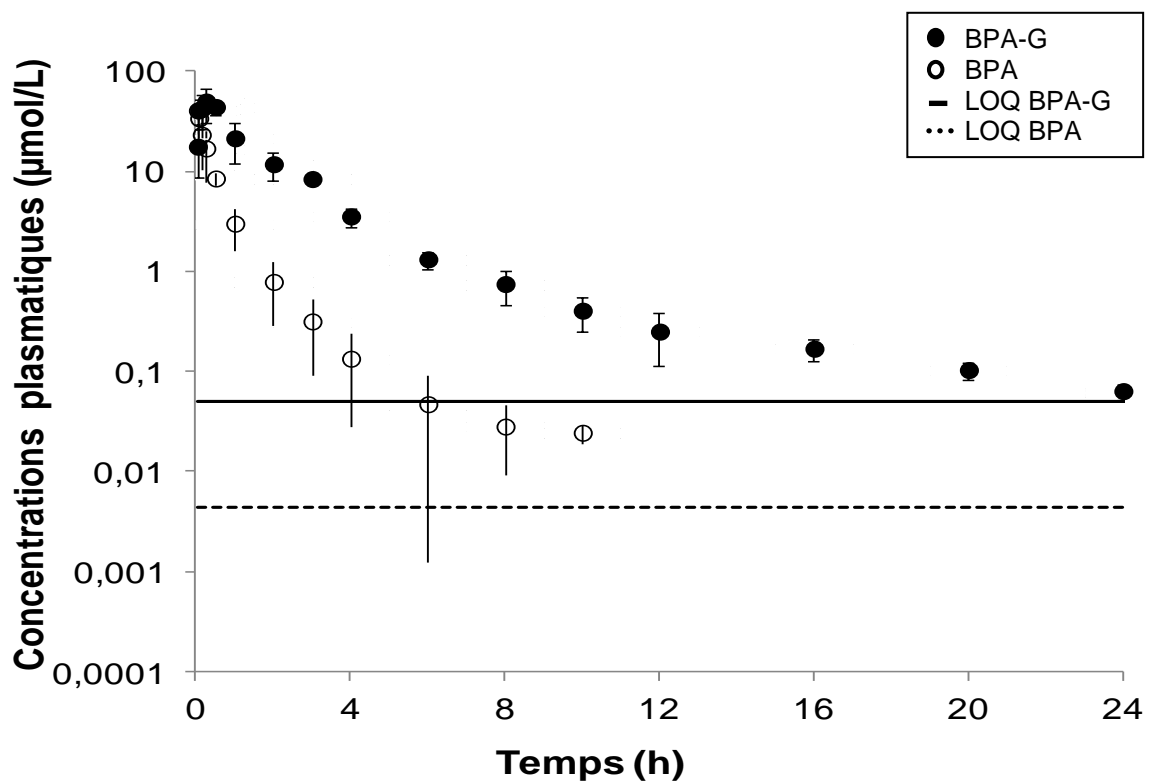
Le coefficient directeur de la droite de régression correspond à b , l'exposant allométrique et l'ordonnée à l'origine à $\log a$.

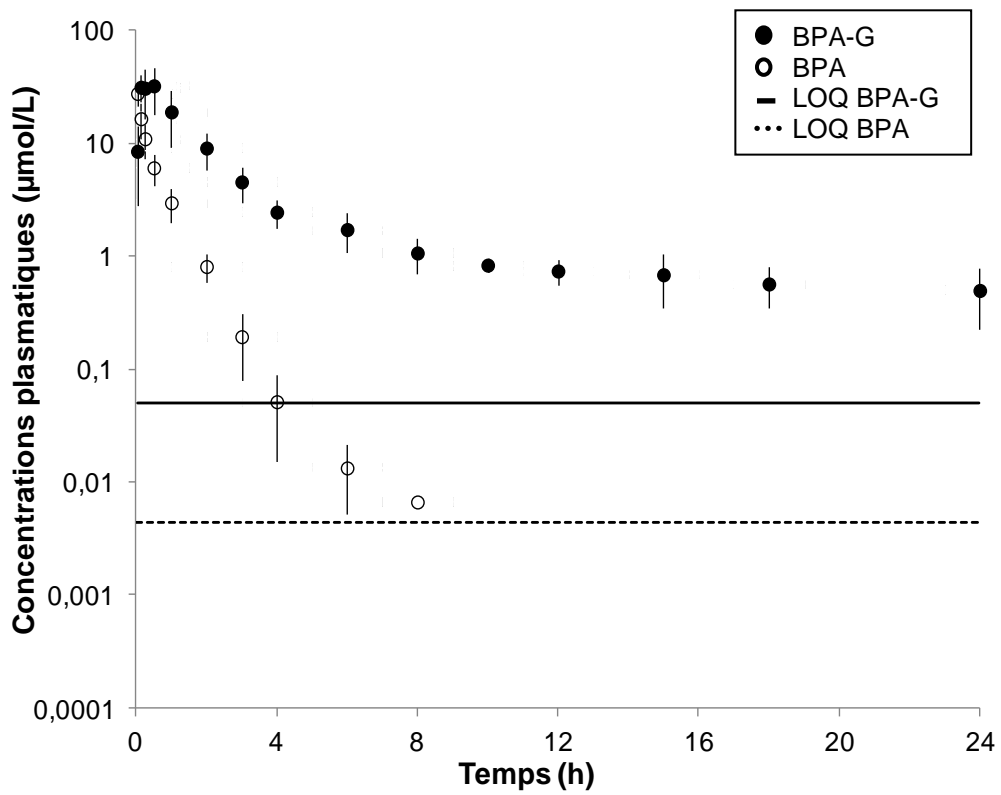
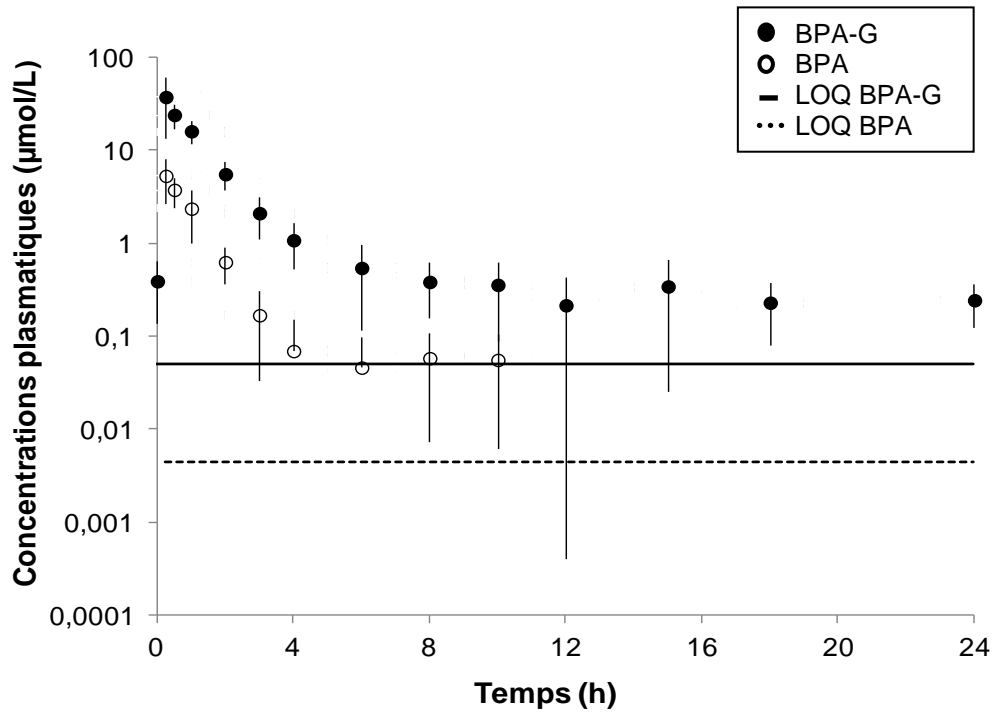
4. Résultats

4.1 Description par espèce de l'évolution des concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G au cours du temps

4.1.1 Administration IV de 5 mg/kg de BPA

L'évolution des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G au cours du temps suite à une administration IV de BPA à la dose de 5mg/kg est représentée par espèce sur la figure 13.





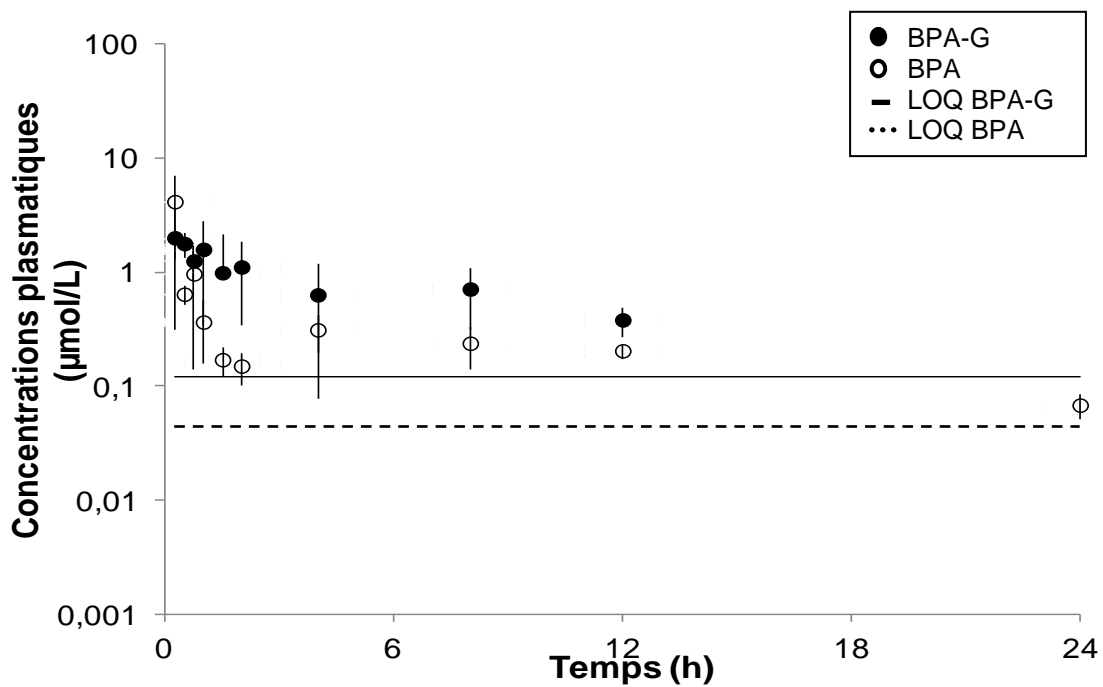
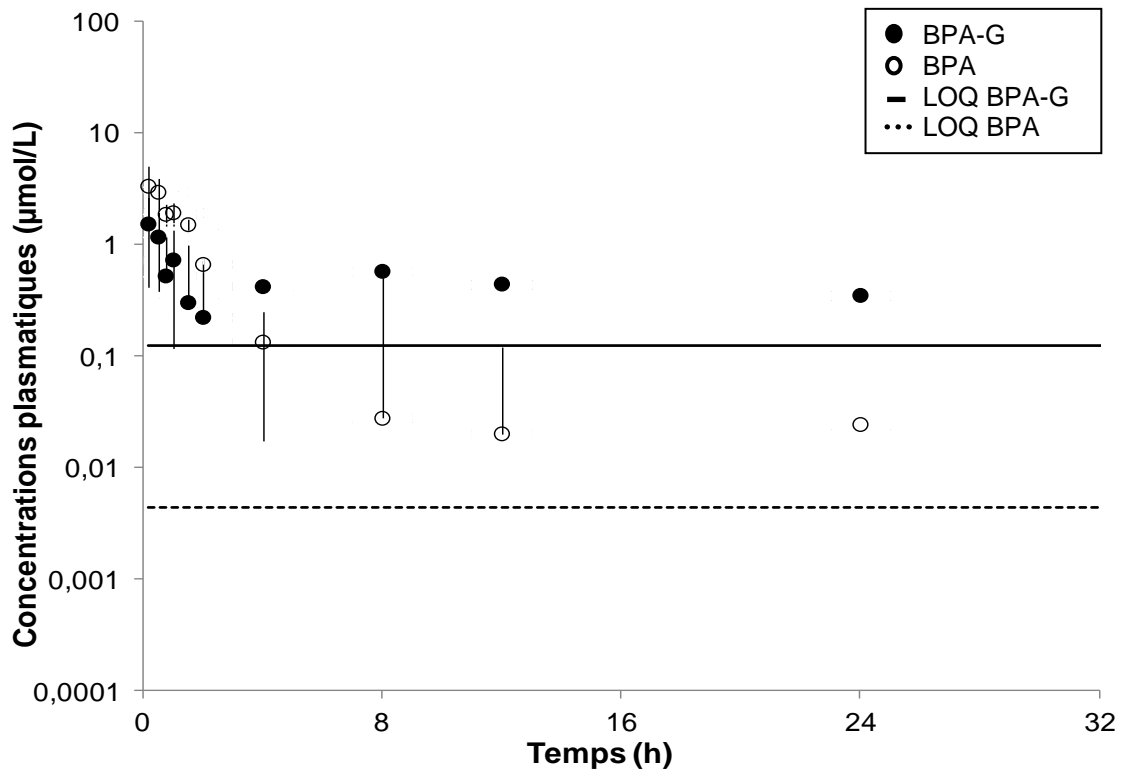


Figure 13 : Evolution des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G au cours du temps suite à l'administration IV de 5 mg/kg de BPA à cinq espèces animales (brebis, porc, chien, rat, souris).

Evolution par espèce des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SD) en BPA et BPA-G ($\mu\text{mol/L}$) au cours du temps suite à l'administration IV de BPA à la dose de 5 mg/kg. Les LOQ's du BPA et du BPA-G sont représentées sur le graphique par les droites.

Les profils des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G sont assez similaires d'une espèce à l'autre. Ils présentent une décroissance pluri-exponentielle traduisant que le BPA subit simultanément une diffusion vers les compartiments périphériques et une élimination. Après que l'équilibre entre le compartiment central et les compartiments périphériques soit instauré, seule la phase d'élimination apparaît sur la figure.

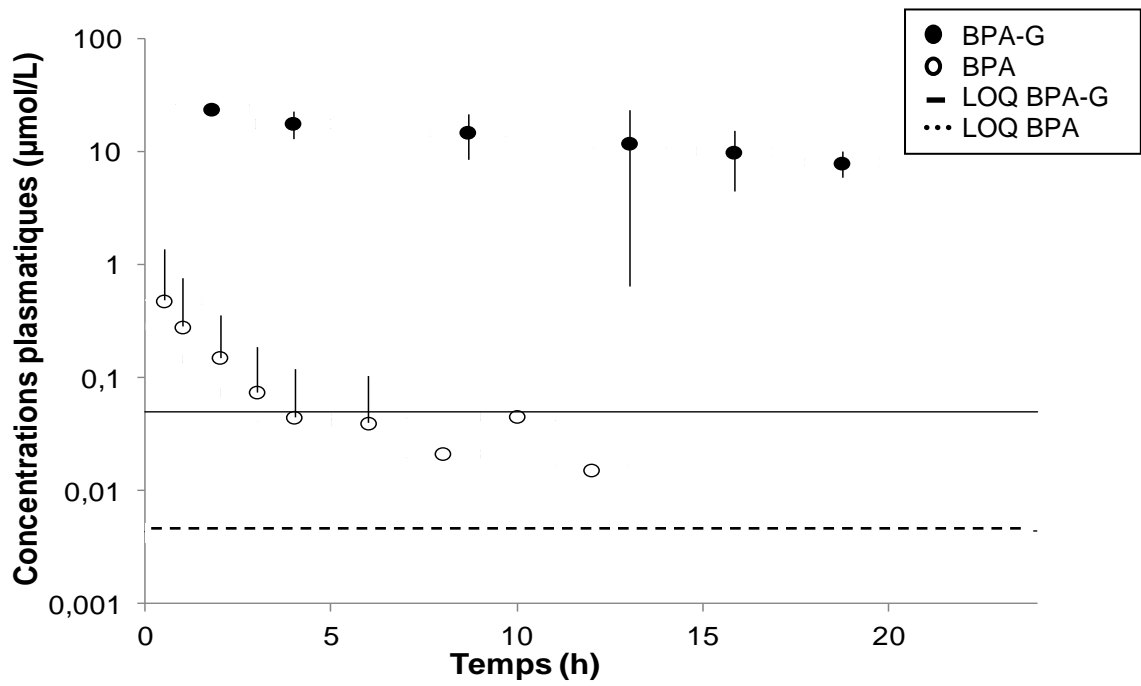
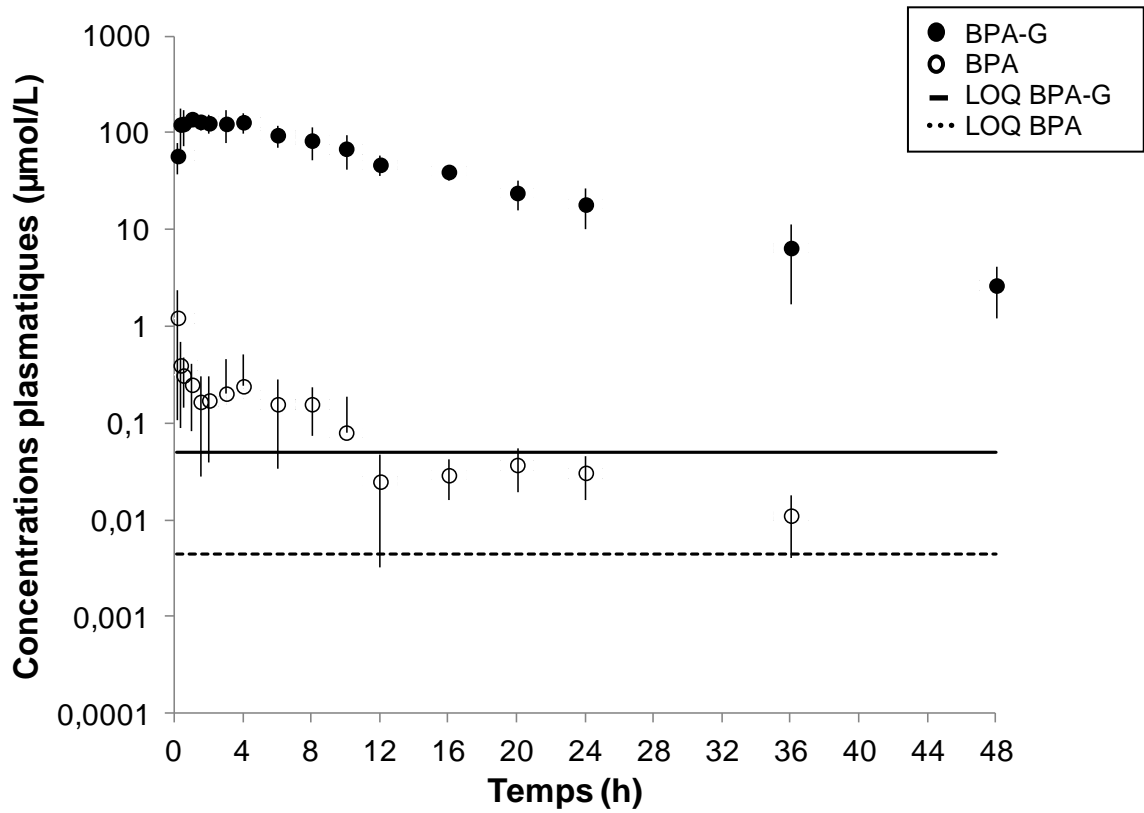
Les concentrations plasmatiques de BPA diminuent rapidement pour atteindre la LOQ à partir de 8 heures post administration chez le chien, 12 heures post administration chez la brebis et le porc et 24 heures post administration chez les rongeurs. Cette décroissance traduit une élimination rapide du BPA.

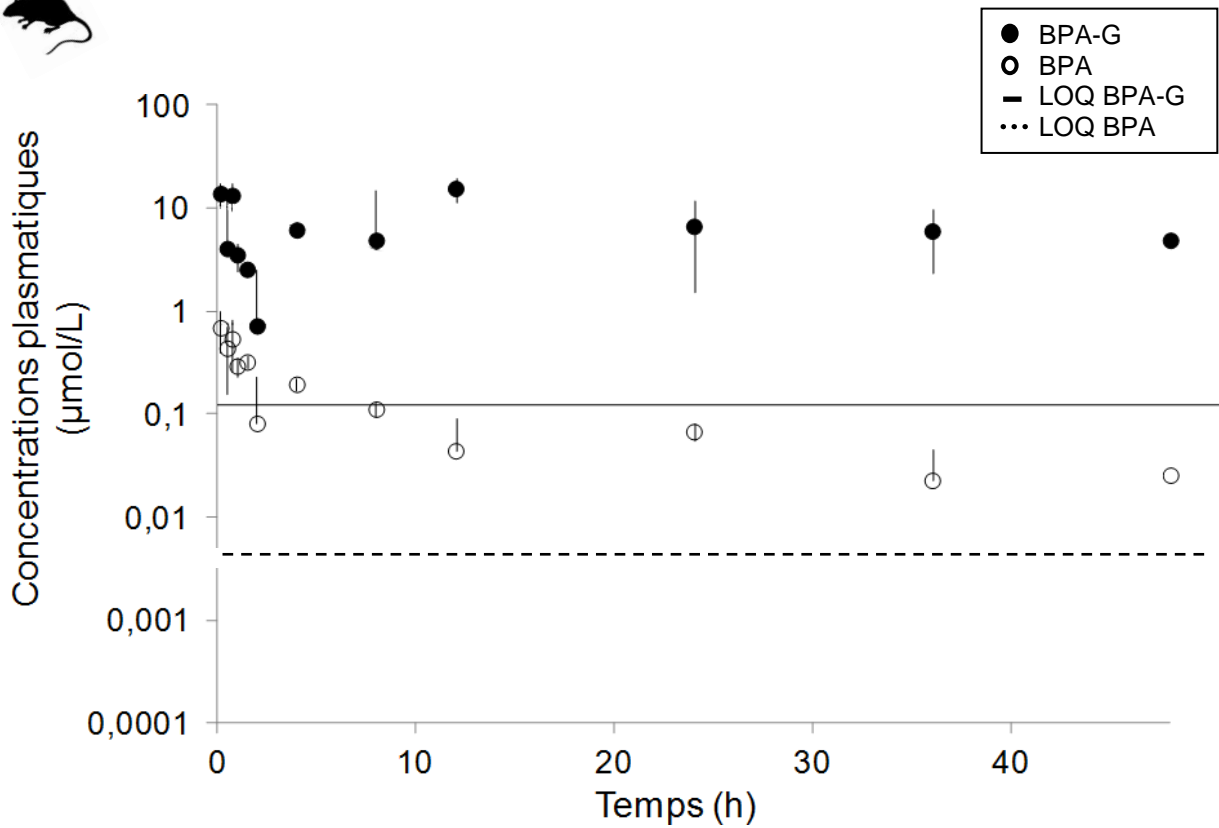
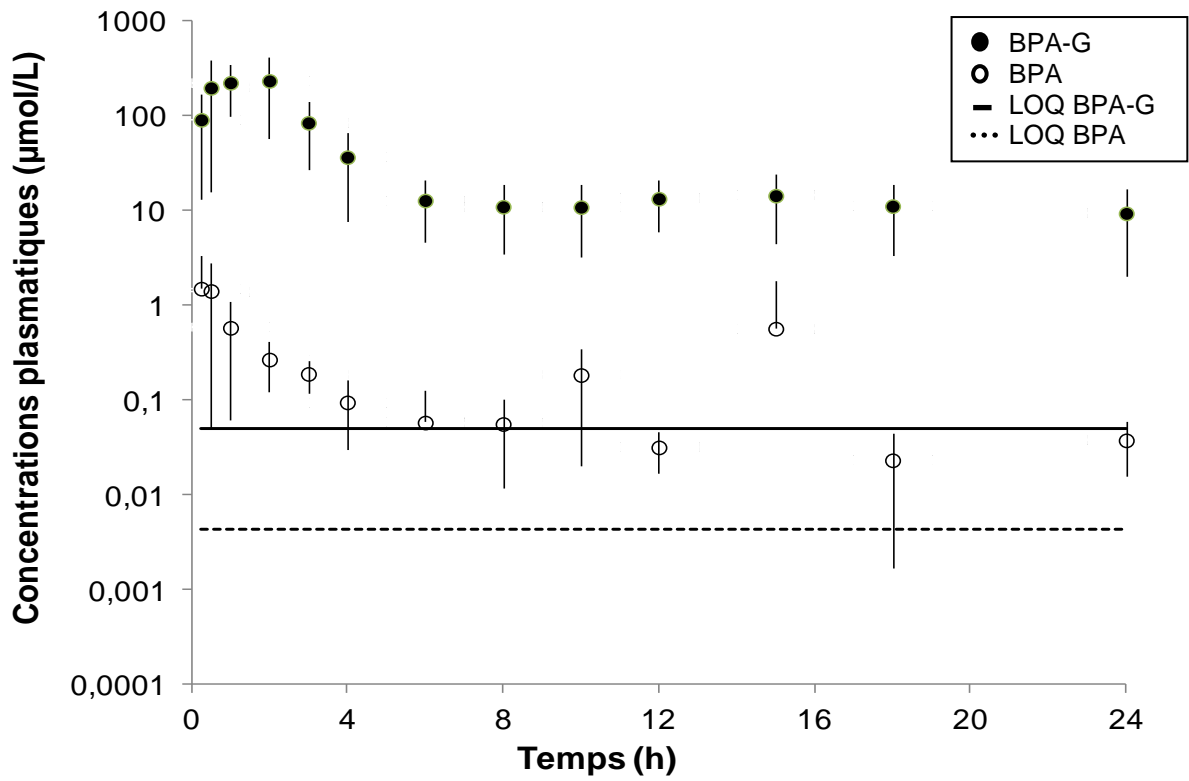
Les concentrations de BPA ne sont supérieures aux concentrations de BPA-G que durant les 15 premières minutes post administration chez la brebis, le porc et le chien alors que chez les rongeurs les concentrations de BPA-G ne deviennent supérieures aux concentrations de BPA qu'à partir de 4 heures post administration. Ces données suggèrent que le BPA-G est rapidement formé à partir du BPA.

La décroissance des concentrations plasmatiques de BPA est plus marquée que celle des concentrations plasmatiques de BPA-G. En effet, le BPA-G est quantifiable plus longtemps que le BPA chez toutes les espèces sauf chez la souris où les concentrations plasmatiques de BPA-G atteignent la LOQ entre 12 et 18 heures post administration. Chez les autres espèces, la LOQ du BPA-G n'est atteinte qu'après 24 heures post administration. Le BPA-G est donc éliminé plus lentement de l'organisme que le BPA.

4.1.2 Administration orale de 100 mg/kg de BPA

L'évolution des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G au cours du temps est représentée par espèce sur la figure 14.





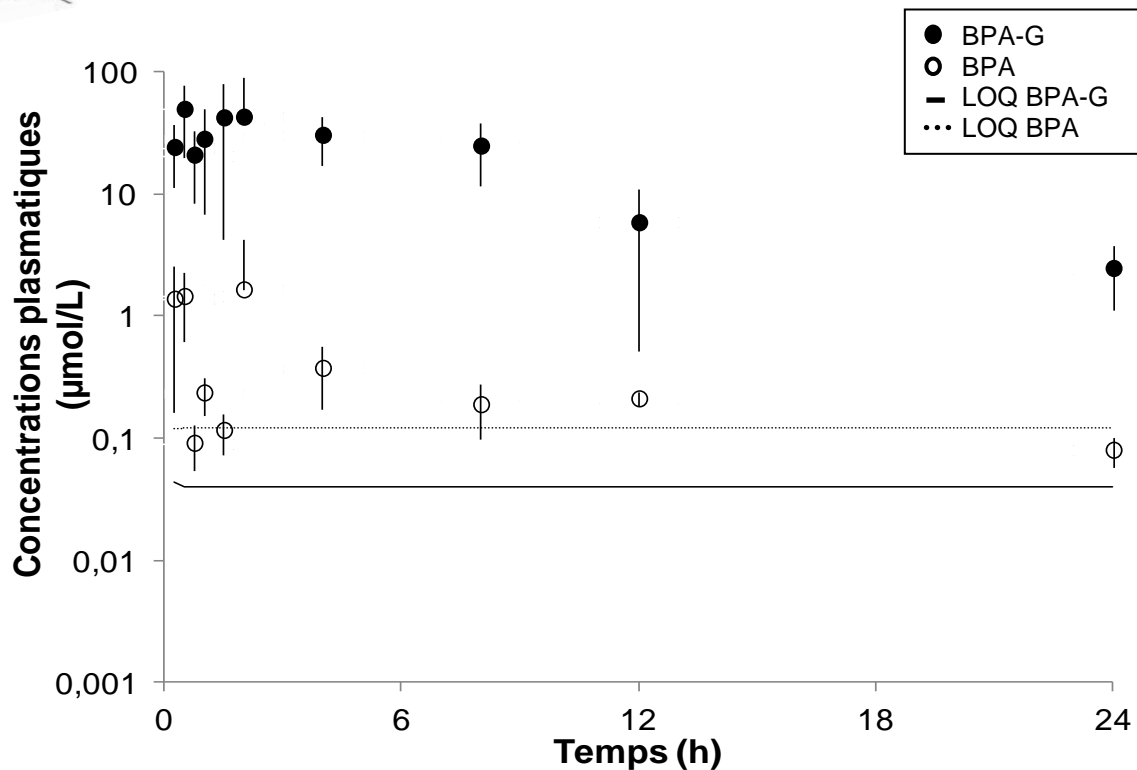


Figure 14 : Evolution des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G au cours du temps suite à l'administration orale de 100mg/kg de BPA à cinq espèces animales (brebis, porc, chien, rat, souris).

Evolution par espèce des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SD) en BPA et BPA-G ($\mu\text{mol/L}$) au cours du temps suite à une administration orale de BPA à la dose de 100mg/kg. Les LOQ's du BPA et du BPA-G sont représentées sur le graphique.

Concernant les profils temporels des concentrations de BPA et BPA-G, les rongeurs diffèrent des autres animaux par la présence d'un rebond entre 4 et 6 heures post administration.

Chez le porc, la brebis et le chien, les concentrations plasmatiques de BPA augmentent dans un premier temps pour atteindre une valeur maximale en moins de 15 minutes chez la brebis, en 1 heure chez le porc et le chien. Ces données graphiques suggèrent une absorption rapide du BPA au niveau du tractus gastro-intestinal.

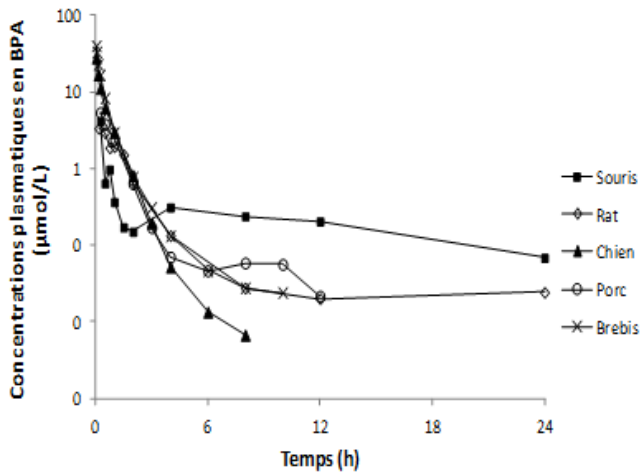
Les concentrations plasmatiques de BPA-G diminuent de façon parallèle à celles de BPA. Ce phénomène s'appelle « flip-flop » et suggère que l'élimination du BPA-G est limitée par sa production à partir du BPA et que l'élimination du BPA est limitée par son absorption.

Les LOQ ne sont pas atteintes durant la cinétique que ce soit pour le BPA ou le BPA-G sauf chez le porc où les concentrations de BPA atteignent la LOQ entre 12 et 15 heures post administration.

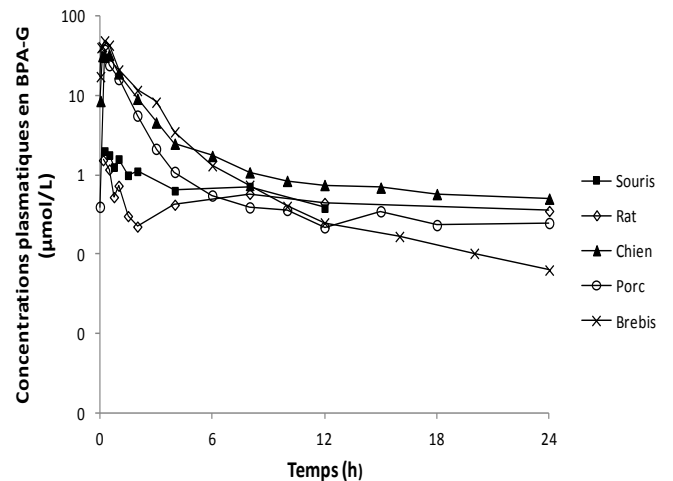
4.2 Comparaison interspécifique des concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G

La figure 15 présente par molécule (BPA ou BPA-G) et pour les deux voies d'administration (orale (100mg/kg), IV (5mg/kg)) l'évolution des concentrations plasmatiques au cours du temps.

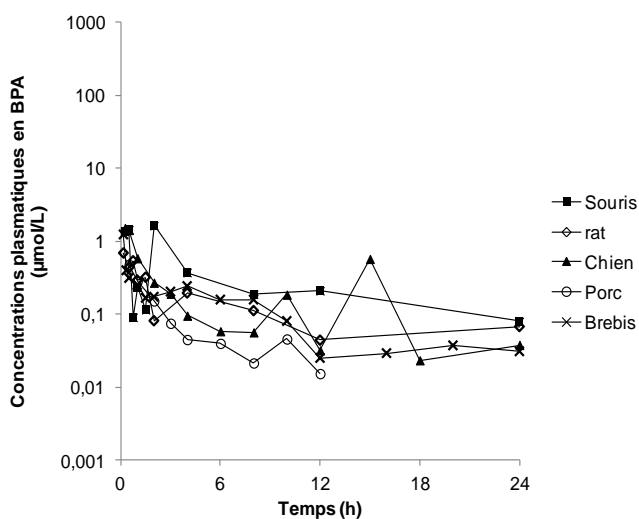
Administration IV (5mg/kg) BPA



BPA-G



Administration orale (100mg/kg) BPA



BPA-G

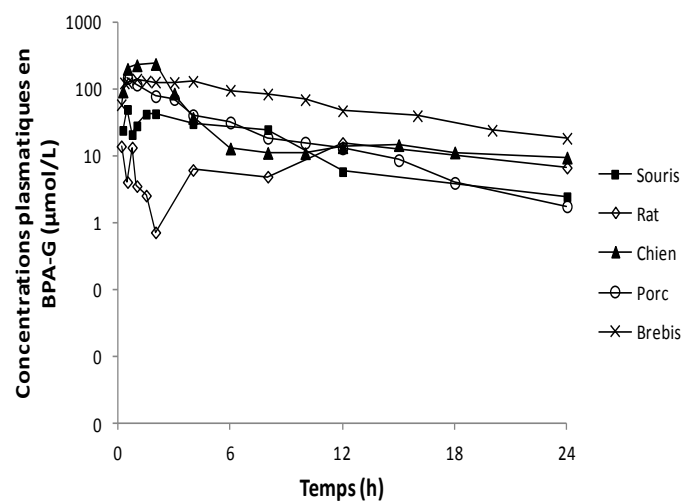


Figure 15 : Comparaison interspécifique de l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes en BPA et BPA-G suite à l'administration orale (100mg/kg) et IV (5mg/kg) de BPA.

Suite à l'administration IV de BPA à la dose de 5 mg/kg, les concentrations plasmatiques de BPA chez la souris sont inférieures à celles observées chez le porc, le mouton, le chien et le rat pendant les 4 premières heures. A partir de 4 heures, les concentrations plasmatiques de BPA les plus élevées sont celles de la souris et les plus faibles sont celles du chien. Les concentrations plasmatiques de BPA-G chez le rat et la souris sont inférieures à celles observées chez la brebis, le porc et le chien durant les 5 premières heures. A partir de 6 heures, les concentrations plasmatiques de BPA-G sont similaires chez toutes les espèces.

Suite à l'administration orale de BPA à la dose de 100mg/kg, les concentrations plasmatiques de BPA sont très faibles comparées à celles obtenues suite à l'administration IV d'une dose 20 fois inférieure. Les concentrations plasmatiques de BPA sont du même ordre de grandeur chez toutes les espèces tout au long de la cinétique. Les concentrations plasmatiques de BPA-G chez le rat sont inférieures à celles observées chez les autres espèces durant les 12 premières heures. A partir de 12 heures, cet écart se réduit et le niveau des concentrations plasmatiques de BPA-G est similaire chez toutes les espèces.

4.3 Analyse non compartimentale des données plasmatiques : paramètres pharmacocinétiques

Les paramètres estimés par l'analyse non-compartimentale sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Paramètres pharmacocinétiques du BPA (analyse non compartimentale)

Paramètres (unités)	Brebis <i>Moyenne ± SD</i>	Porc <i>Moyenne ± SD</i>	Chien <i>Moyenne ± SD</i>	Rat <i>Moyenne ± SD</i>	Souris <i>Moyenne ± SD</i>
$AUC_{BPA, IV} (\mu mol.h/L)$	15.6 ± 4.8	7.1 ± 2.2	12.6 ± 1.1	5.6 ± 0.4	5.8 ± 0.5
$AUC_{BPA-G, IV} (\mu mol.h/L)$	79.2 ± 16.1	45.0 ± 9.3	69.5 ± 14.8	10.8 ± 1.25	9.2 ± 1.4
$\frac{AUC_{BPA-G, IV}}{AUC_{BPA, IV}}$	5.0	6.3	5.5	1.9	1.6
$AUC_{BPA, PO} (\mu mol.h/L)$	2.6 ± 1.3	0.8 ± 1.4	2.8 ± 1.5	3.4 ± 0.5	7.0 ± 2.0
$AUC_{BPA-G, PO} (\mu mol.h/L)$	1765.1 ± 388.2	576.5 ± 119.4	1050.4 ± 156.3	145.8 ± 24.4	402.4 ± 65.5

$\frac{AUC_{BPA-G,PO}}{AUC_{BPA,PO}}$	678.9	720.6	375.1	42.9	57.5
$Cl_{BPA} (ml / (kg.min))$	25 ± 6.5	56.4 ± 19.5	29.2 ± 2.7	64.2	54
$T_{1/2, BPA} (h)$	1.3 ± 0.6	1.9 ± 3.2	0.9 ± 0.7	3.0	9.1
$Cl/F_{BPA-G} (ml / (kg.min))$	8.4 ± 1.5	14.4 ± 2.7	8.8 ± 1.6	1.7	18
$T_{1/2, BPA-G} (h)$	5.0 ± 2.3	5.2 ± 5.9	9.7 ± 7.8	24.5	6.8

Paramètres pharmacocinétiques du BPA obtenus par analyse non-compartmentale à partir des données plasmatiques en BPA et BPA-G après une administration orale de BPA à la dose de 100mg/kg ou une administration IV à la dose de 5mg/kg.

AUC : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques, Cl_{BPA} : clairance plasmatique du BPA, Cl/F : clairance apparente du BPA-G, $t_{1/2}$: temps de demi-vie plasmatique terminal.

Suite à une administration IV, les aires sous la courbe en BPA-G sont 5 à 6 fois supérieures à celles en BPA chez la brebis, le porc et le chien alors qu'elles sont similaires chez les rongeurs (rapport des AUC's compris entre 1.9 et 1.6). La clairance plasmatique du BPA est variable d'une espèce à l'autre : elle est plus basse chez la brebis et le chien (entre 25 et 30 ml/(kg.min)) que chez les autres espèces (supérieure à 54 ml/(kg.min)). Le temps de demi-vie du BPA est de l'ordre d'une à deux heures chez la brebis, le porc et le chien alors qu'il est plus long chez le rat et la souris (entre 3 et 9h). Concernant le BPA-G, le rat présente une clairance apparente faible (1.7ml/(kg.min)) et un temps de demi-vie long (24.5h) comparativement aux autres espèces. Chez toutes les espèces (excepté la souris), le temps de demi-vie du BPA-G est 5 à 10 fois supérieur à celui du BPA.

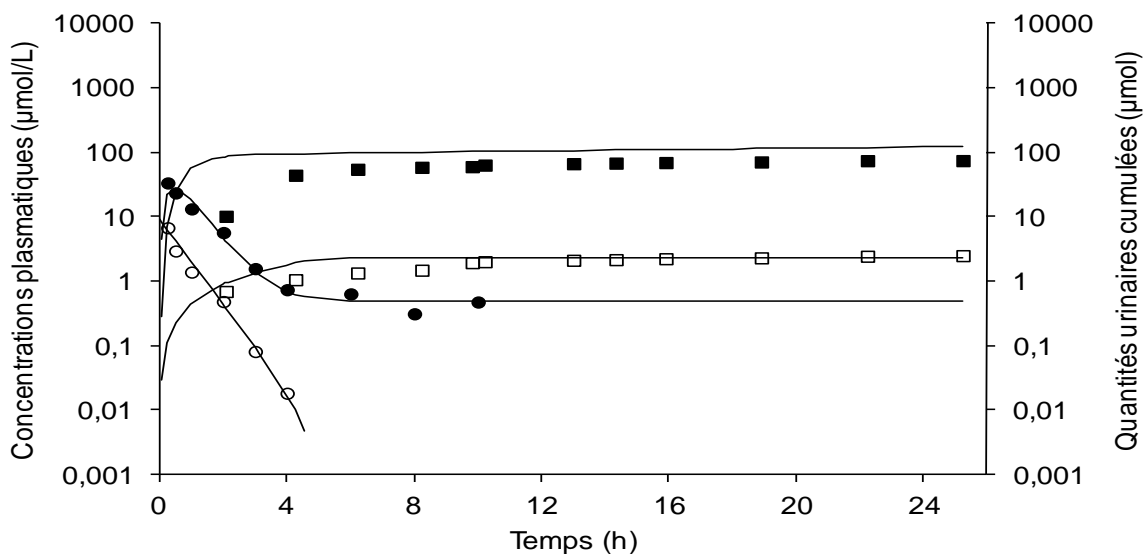
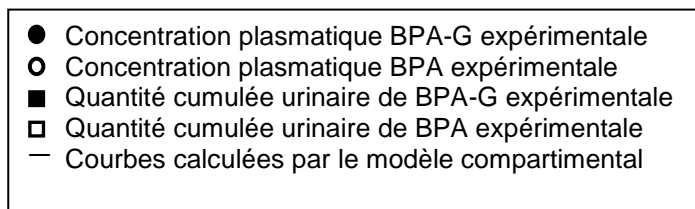
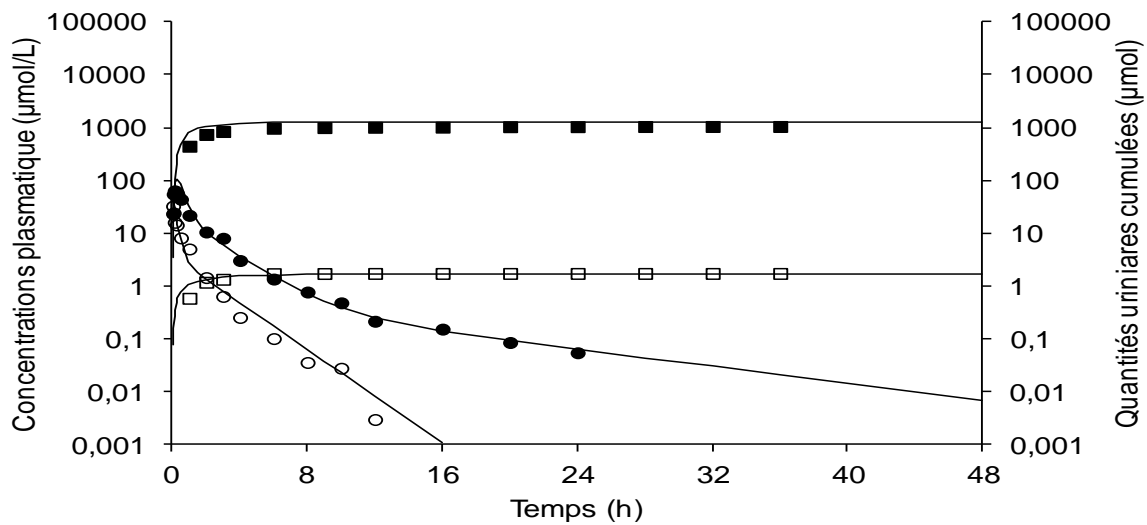
Suite à une administration orale, les aires sous la courbe en BPA sont inférieures à celles observées suite à l'administration IV et celles en BPA-G sont supérieures. Par conséquent, le rapport des AUC's (BPA-G sur BPA) est augmenté d'un facteur 100 chez la brebis, le porc et le chien et d'un facteur 10 chez les rongeurs.

4.4 Analyse compartimentale des données plasmatiques et urinaires chez les brebis, les porcs et les chiens

4.4.1 Ajustement des données plasmatiques et urinaires par le modèle

Afin d'ajuster les données expérimentales des trois espèces, nous avons choisi le modèle compartimental décrit dans le paragraphe 3.7.2. Nous voulions un modèle simple qui explique de manière satisfaisante les données obtenues (principe de

parcimonie). Les figures 16 et 17 représentent les concentrations plasmatiques, expérimentales et ajustées, en BPA et BPA-G en fonction du temps suite à l'administration IV de BPA à la dose de 5mg/kg et orale à la dose de 100mg/kg pour un animal représentatif par espèce. Il en est de même pour les quantités cumulées urinaires en BPA et BPA-G.



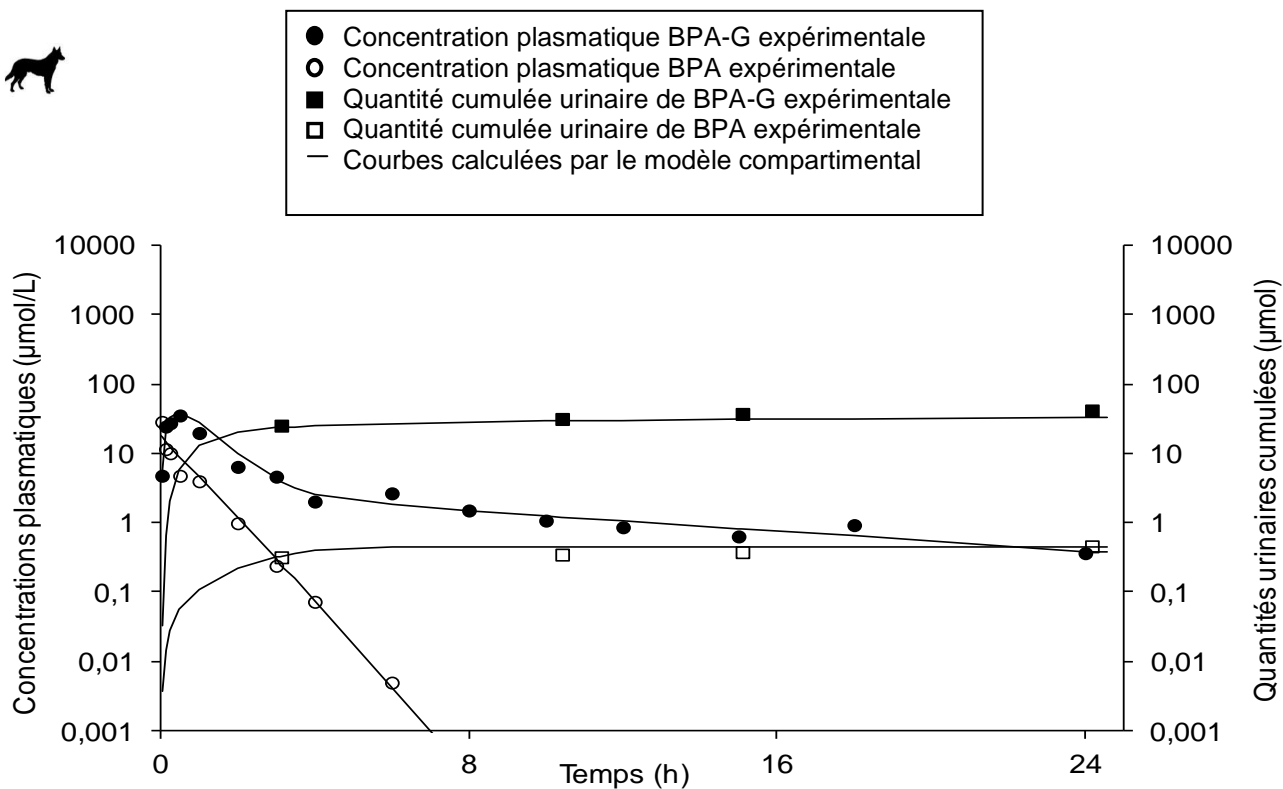
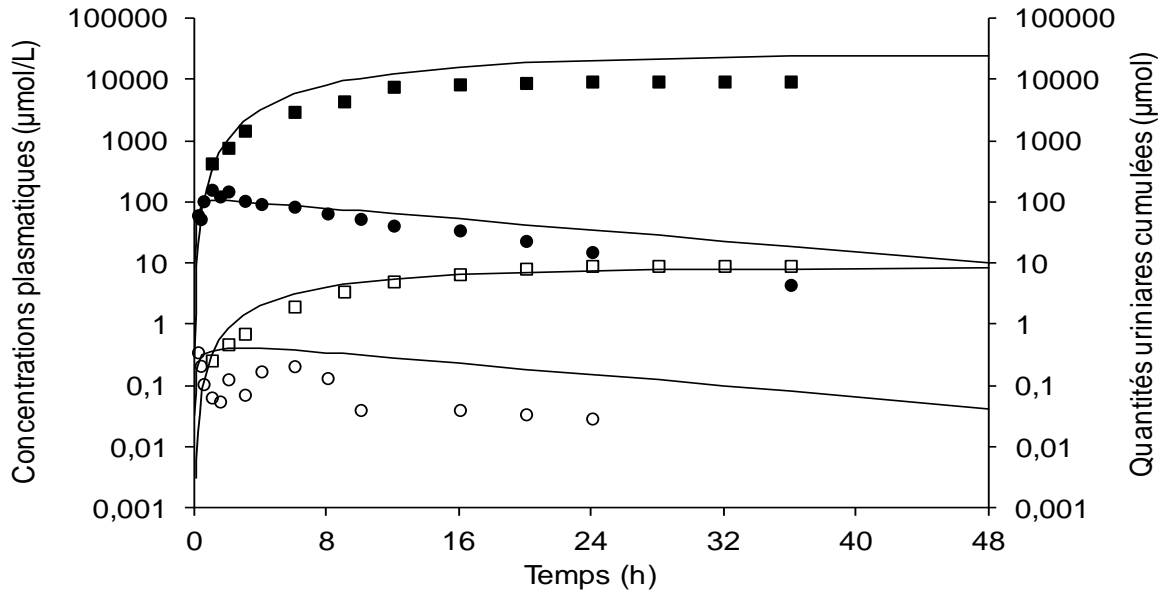
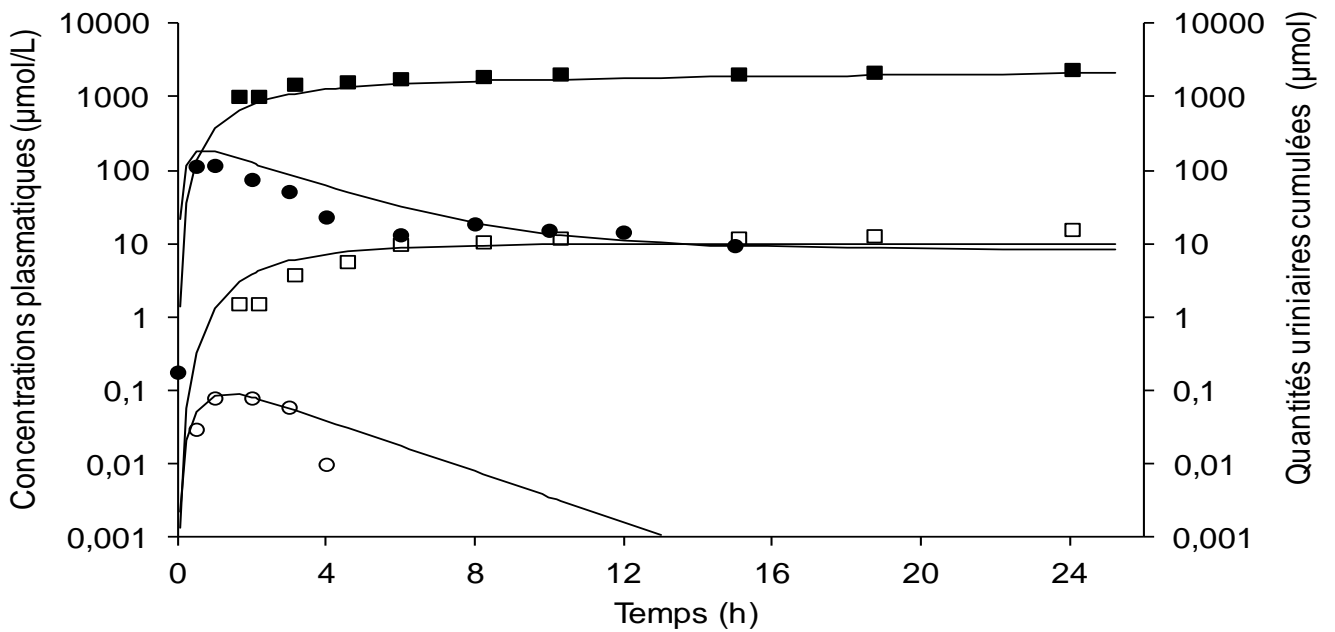


Figure 16 : Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques et des quantités cumulées urinaires de BPA et BPA-G après administration IV de BPA (5 mg/kg).

Evolution des concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G ($\mu\text{mol/L}$) et des quantités cumulées en BPA et BPA-G éliminées dans les urines (μmoles) expérimentales et ajustées avec le modèle compartimental en fonction du temps pour un animal représentatif de chaque espèce (brebis, porc, chien) après l'administration IV de BPA à la dose de 5 mg/kg.



- Concentration plasmatique BPA-G expérimentale
- Concentration plasmatique BPA expérimentale
- Quantité cumulée urinaire de BPA-G expérimentale
- Quantité cumulée urinaire de BPA expérimentale
- Courbes calculées par le modèle compartimental



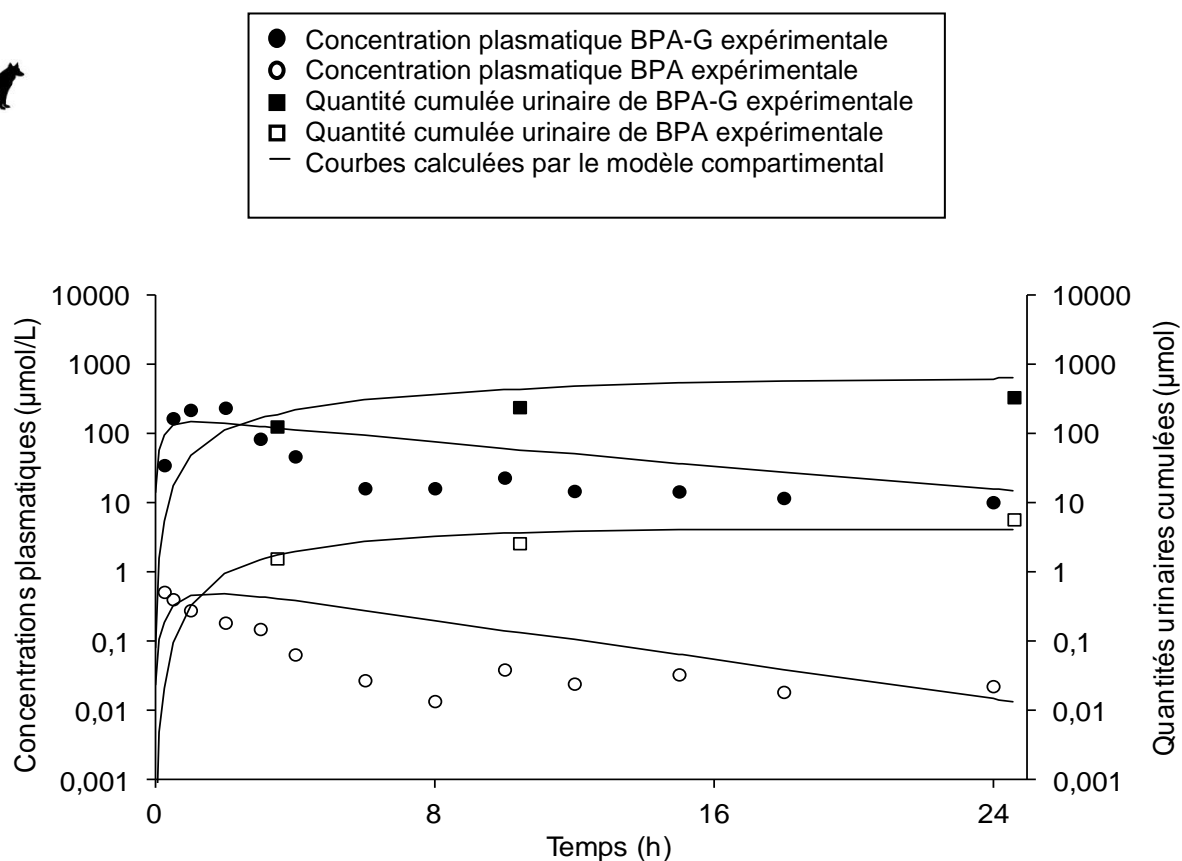


Figure 17 : Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques et des quantités cumulées urinaires de BPA et BPA-G après administration orale de BPA (100 mg/kg).

Evolution des concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G ($\mu\text{mol/L}$) et des quantités cumulées en BPA et BPA-G éliminées dans les urines (μmoles) expérimentales et ajustées avec le modèle compartimental en fonction du temps pour un animal représentatif de chaque espèce (brebis, porc, chien) après l'administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg.

D'après les figures 16 et 17, les données calculées par le modèle sont bien ajustées à celles observées quelle que soit la voie d'administration chez la brebis et le porc. L'ajustement est moins bon chez le chien après l'administration orale.

La représentation des quantités urinaires cumulées en BPA et BPA-G au cours du temps suggère une élimination rapide de ces deux molécules. Durant les 2, 3 premières heures, la quantité cumulée en BPA et BPA-G atteint plus de 80% de sa valeur maximale. Le BPA-G est la forme du BPA la plus représentée dans les urines comme en témoignent les facteurs 100 et 1000 qu'il y a entre les quantités cumulées en BPA-G et celles en BPA suite à une administration IV et orale respectivement.

4.4.2 Détermination des paramètres primaires du modèle

Les paramètres primaires du modèle ont été calculés à partir des équations présentées dans le paragraphe 3.7.2 (équations 3 à 16). Ils sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Paramètres primaires

Paramètres (unités)	Brebis Moyenne ± SD	Porc Moyenne ± SD	Chien Moyenne ± SD
V_1 (L)	26.2 ± 13.5	62.3 ± 20.6	9.7 ± 4.4
V_4 (L)	5.0 ± 3.4	0.7 ± 0.4	1.6 ± 1.7
K_{12} (h^{-1})	0.8 ± 0.6	0.01 ± 0.03	0.2 ± 0.2
K_{21} (h^{-1})	0.4 ± 0.4	0.004 ± 0.01	0.8 ± 0.7
V_m ($\mu\text{mole} \cdot h^{-1}$)	8.6 ± 14.5	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1
K_m (μM)	30.2 ± 32.4	0.00007 ± 0.00003	0.2 ± 0.2
K_{84} (h^{-1})	84.6 ± 51.7	5.2 ± 3.0	121.2 ± 78.2
K_{45} (h^{-1})	2.6 ± 2.3	10.5 ± 6.6	0.3 ± 0.1
K_{46} (h^{-1})	0.2 ± 0.4	0.0001 ± 0.0001	1.9 ± 0.8
K_{47} (h^{-1})	0.9 ± 0.9	10.0 ± 4.3	1.1 ± 0.6
K_{74} (h^{-1})	0.2 ± 0.2	0.02 ± 0.01	0.1 ± 0.0
K_{81} (h^{-1})	1.5 ± 1.2	0.04 ± 0.01	2.4 ± 1.7
K_{18} (h^{-1})	2.4 ± 1.2	1.2 ± 0.2	2.0 ± 0.9
K_{98} (h^{-1})	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2
K_{910} (h^{-1})	0.01 ± 0.03	NE	NE
K_{811} (h^{-1})	NE	NE	NE

Présentation des paramètres primaires calculés à partir des équations numérotées de 3 à 16.

V_1 et V_4 les volumes respectifs des compartiments 1 et 4, K_{ij} les constantes de transfert de premier ordre du compartiment i vers le compartiment j , V_{\max} le taux d'excrétion rénale de BPA maximum, K_m la constante de Michaelis Menten et NE non estimable.

4.5 Comparaison interspécifique des mécanismes d'absorption, de métabolisation et d'élimination du BPA et du BPA-G

A partir des paramètres primaires, les paramètres pharmacocinétiques secondaires ont été déterminés pour la brebis, le porc et le chien selon les équations numérotées

de 17 à 24. Pour le rat et la souris, le modèle n'ayant pas permis l'ajustement des données expérimentales, les paramètres pharmacocinétiques secondaires relatifs à l'administration du BPA par voie orale ont été calculés en utilisant les résultats de l'analyse non-compartimentale. Le pourcentage de la dose administrée retrouvé dans les urines sous forme de BPA-G a été évalué chez les rongeurs à partir de la quantité totale de BPA-G éliminée dans les urines.

4.5.1 Absorption, biodisponibilité systémique et effet de premier passage hépatique

Le tableau 19 présente par espèce l'absorption, la biodisponibilité systémique et l'effet de premier passage hépatique du BPA suite à une administration orale.

Tableau 19 : Absorption, biodisponibilité systémique et effet de premier passage hépatique du BPA

Paramètres (unités)	Brebis Moyenne \pm SD	Porc Moyenne \pm SD	Chien Moyenne \pm SD	Rat Moyenne	Souris Moyenne
F_{abs} (%)	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	67.1	100.0
F_h (%)	1.2 \pm 1.1	1.1 \pm 0.7	1.9 \pm 0.4	4.5	6.03
F (%)	1.2 \pm 1.1	1.1 \pm 0.7	1.9 \pm 0.4	3.03	6.03
E_h	0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01	0.98 \pm 0.004	0.95	0.94

Evaluation de l'absorption, de la biodisponibilité systémique et de l'effet de premier passage hépatique suite à une administration orale de BPA.

F_{abs} : fraction de la dose absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal après une administration orale, F_h : fraction de la dose qui échappe à l'effet de premier passage hépatique, F : biodisponibilité systémique du BPA, E_h : coefficient d'extraction hépatique.

Suite à une administration orale, le BPA est bien absorbé chez toutes les espèces par le tractus gastro-intestinal (F_{abs} comprise entre 67.1 et 100%). Il est ensuite intensément métabolisé en BPA-G par le foie comme en témoignent les coefficients d'extraction hépatique supérieurs à 0.94.

Chez la brebis, le porc, le chien et la souris l'absorption étant de 100%, la biodisponibilité systémique du BPA est égale à la fraction échappant à l'effet de premier passage hépatique. La biodisponibilité du BPA des rongeurs (3% pour le rat et 6% pour la souris) est légèrement supérieure à celle des autres espèces (entre 1.1

et 1.9%). Cette différence s'explique par une moins bonne absorption gastro-intestinale du BPA chez le rat (F_{abs} : 67%) et une augmentation de la fraction échappant à l'effet de premier passage hépatique chez la souris (F_h : 6%).

4.5.2 Métabolisation du BPA et élimination du BPA-G et du BPA

Le tableau 20 présente par espèce les voies de métabolisation du BPA et les modalités d'élimination du BPA-G.

Tableau 20 : Métabolisation du BPA et élimination du BPA et du BPA-G

Paramètres (unités)	Brebis Moyenne \pm SD	Porc Moyenne \pm SD	Chien Moyenne \pm SD	Rat Moyenne	Souris Moyenne
Métabolisation					
$F_{BPA-BPA-G}$ (%)	98.8 \pm 1.0	98.9 \pm 0.7	98.1 \pm 0.4	NE	NE
$F_{BPA-autres}$ (%)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	NE	NE
Elimination					
$F_{BPA-G\ urine}$ (%)	89.7 \pm 17.8	98.9 \pm 0.7	12.2 \pm 2.1	11.65	48.4
$F_{BPA-G\ autres}$ (%)	9.1 \pm 18.1	0.0 \pm 0.0	86.0 \pm 2.2	NE	NE

$F_{BPA-BPA-G}$: fraction de la dose métabolisée en BPA-G ; $F_{BPA-autre}$: fraction de la dose métabolisée en un autre métabolite que le BPA-G, $F_{BPA-G\ urine}$: fraction de la dose éliminée sous forme de BPA-G dans les urines, $F_{BPA-G\ autre}$: fraction de la dose éliminée sous forme de BPA-G par une autre voie que la voie urinaire, NE : non estimable.

Chez la brebis, le porc et le chien, le principal métabolite du BPA est le BPA-G ($F_{BPA-BPA-G}$ supérieure à 98.1%). L'existence d'autres voies métaboliques est possible. Elles sont cependant minoritaires sachant que la fraction de la dose métabolisée en un autre métabolite que le BPA-G est nulle après l'ajustement du modèle.

Les voies d'élimination du BPA-G présentent des différences interspécifiques. Il est majoritairement excrété par voie rénale chez la brebis et le porc : plus de 89% de la dose administrée sont retrouvés dans les urines. Ce n'est pas le cas des rongeurs et du chien qui présentent des $F_{BPA-G\ urines}$ inférieures à 50%. D'autres voies d'élimination du BPA-G ont été mises en évidence par notre modèle. Elles sont majoritaires chez le chien ($F_{BPA-G\ autre}$: 86%) et minoritaires chez la brebis ($F_{BPA-G\ autre}$: 9.1%).

Le BPA qui échappe à l'effet de premier passage hépatique est essentiellement éliminé par voie rénale selon une cinétique de Michaelis-Menten.

4.6 Relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids vif

La figure 18 présente la relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids vif.

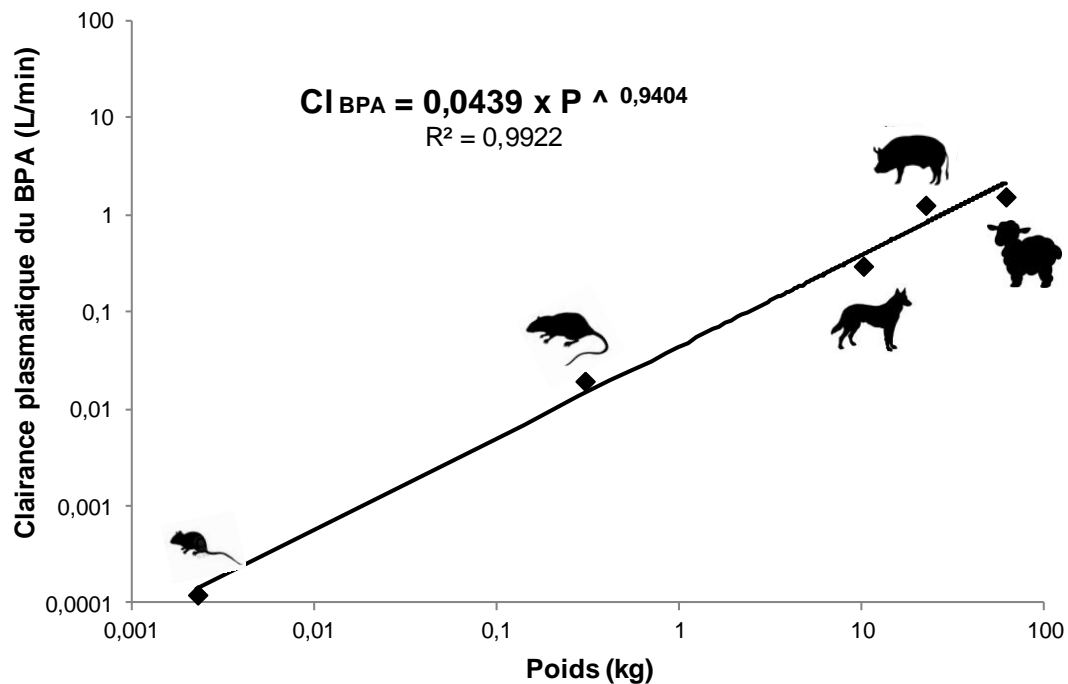


Figure 18 : Relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA (L/min) et le poids vif (kg).

Les points sur le graphique représentent la clairance plasmatique du BPA (calculée à l'aide de l'analyse non compartimentale) en fonction du poids vif de l'espèce considérée. La relation allométrique a subi une double transformation logarithmique qui a permis sa linéarisation (-). L'équation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids vif ainsi que le coefficient de détermination (R²) sont représentés sur le graphique.

Le coefficient et l'exposant allométriques ont été évalués à 0.0439 et 0.9414 respectivement. D'après le coefficient de détermination R², plus de 99% des variations de la clairance plasmatique entre les espèces sont expliqués par les variations du poids vif.

5. Discussion

Afin de documenter les ressemblances et les différences interspécifiques dans la disposition du BPA et du BPA-G, les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés chez cinq espèces animales différentes suite à une administration IV (5mg/kg) et orale (100mg/kg) de BPA. La relation allométrique entre les clairances nous permet d'estimer la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme.

Cette étude est innovante par deux aspects. Elle intègre de nouvelles espèces animales autres que les primates non humains et les rongeurs dans l'étude de la toxicocinétique du BPA. Elle compare cinq espèces animales alors que jusqu'à présent les études comportaient au maximum 3 espèces animales différentes. Elle utilise une méthode de dosage permettant la quantification simultanée du BPA et du BPA-G, ce dernier était jusque là dosé séparément après déconjugaison du BPA-G par une β -glucuronidase.

5.1 Comparaison interspécifique de l'exposition interne au BPA et BPA-G

5.1.1 Après une administration orale

Le BPA est très bien absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal chez toutes les espèces. Il est ensuite métabolisé intensément au niveau du foie en BPA-G comme en témoignent le rapport des AUC's et les coefficients d'extraction hépatique supérieurs à 0.9. La biodisponibilité du BPA par voie orale est donc faible (entre 1 et 6%) avec des concentrations plasmatiques en BPA non conjugué comparables chez toutes les espèces. Ce résultat est cohérent avec les études disponibles dans la littérature (DOERGE DR, 2010b) (KUREBAYASHI H, 2003). D'après notre étude, la biodisponibilité systémique du BPA chez les rongeurs (3% chez le rat) est légèrement supérieure à celle des autres espèces. Des auteurs l'ont estimée chez le rat à 0.028 % (DOERGE DR, 2010b) et 0.97 % (KUREBAYASHI H, 2003) suite à l'administration orale de 100 μ g/kg de BPA. Le genre et/ou la souche des animaux étudiés peuvent expliquer les différences entre ces valeurs. Dans toutes les recherches citées précédemment, les animaux sont soit des rats femelles soit des rats mâles autres que des mâles Wistar. Il est donc possible qu'il existe des différences dans le fonctionnement enzymatique hépatique selon le genre et/ou la

souche responsables de modifications dans le métabolisme hépatique du BPA et donc dans sa biodisponibilité.

Les concentrations plasmatiques de BPA-G diminuent de manière parallèle aux concentrations plasmatiques de BPA chez toutes les espèces. Cette observation suggère que l'élimination du BPA-G est limitée par sa formation à partir du BPA et que la métabolisation du BPA est limitée par son absorption. Ce phénomène appelé « flip-flop » est dû à la régulation du transit du BPA vers le duodénum par le pylore chez les monogastriques et l'orifice reticulo-omasal chez les ruminants (TOUTAIN PL, 2010). La détermination des paramètres pharmacocinétiques ($t_{1/2}$) à partir des données expérimentales obtenues suite à une administration orale de BPA n'est donc pas pertinente pour le BPA-G.

5.1.2 Après une administration IV

Suite à une administration IV, les temps de demi-vie du BPA et du BPA-G sont plus longs chez les rongeurs que chez les autres espèces : pour le BPA, 3 heures pour le rat et 9 heures pour la souris versus moins de 2 heures pour les autres espèces, 24.5 heures chez le rat versus moins de 10 heures chez les autres espèces pour le BPA-G. Upmeier et son équipe ont estimé la demi-vie du BPA chez le rat, suite à une administration IV de BPA à la dose de 10mg/kg, à 38.5heures (UPMEIER A, 2000). L'exposition prolongée au BPA et BPA-G peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. Le rat est un animal coprophage, c'est-à-dire qu'il ré-ingère ses fèces. Or il a été montré qu'une partie non négligeable de la dose administrée se retrouve dans les matières fécales sous forme de BPA (POTTENGER LH, 2000). Le rat serait donc surexposé au BPA par l'ingestion de ses fèces. Cette hypothèse a été réfutée par une étude complémentaire menée au laboratoire qui n'a montré aucune différence dans la disposition du BPA selon que les animaux portaient un harnais ou pas. Ce dernier avait pour but d'empêcher la coprophagie. Une autre hypothèse, plus probable est la présence d'un cycle entéro-hépatique propre aux rongeurs. Le rebond des concentrations plasmatiques entre 4 et 6 heures post administration orale est en faveur de cette hypothèse. Ce cycle entéro-hépatique, déjà mis en évidence par de nombreux auteurs, consiste en l'absorption du BPA suivie de sa métabolisation en BPA-G par le foie et l'intestin, puis son excrétion dans la bile à partir de laquelle il rejoint le tractus digestif où il est dé-conjugué pour pouvoir de

nouveau être réabsorbé. Ce phénomène pourrait expliquer la persistance des concentrations élevées de BPA et BPA-G chez les rongeurs.

5.2 Métabolisation du BPA

D'après notre modèle, le métabolite majoritaire du BPA est le BPA-G chez la brebis, le chien, et le porc. Notre modèle ne nous a pas permis de déterminer ce paramètre pour les rongeurs. Cependant, des données sont disponibles dans la littérature. Pottenger et son équipe ont administré selon trois voies différentes (orale, intrapéritonéale, sous-cutanée) 10mg/kg ou 100mg/kg de BPA marqué au carbone 14 à des rats. Le BPA-G est le principal métabolite suite à une administration orale et le BPA-sulfate n'est présent qu'après la voie intrapéritonéale. D'autres métabolites minoritaires ont été mis en évidence après les administrations intrapéritonéale et sous cutanée. Ils n'ont cependant pas été identifiés (POTTENGER LH, 2000). Ces données suggèrent que chez le rat le principal métabolite du BPA est le BPA-G et que d'autres métabolites minoritaires existent. Leur nature dépend de la voie d'administration.

5.3 Comparaison interspécifique de l'absorption, de la distribution et des voies d'élimination du BPA

5.3.1 Absorption, distribution et élimination du BPA

Le profil des concentrations plasmatiques de BPA est similaire chez toutes les espèces étudiées après une administration de 5mg/kg en IV. Il met en évidence la capacité du BPA à diffuser du secteur vasculaire vers les tissus périphériques. Cette observation graphique est en accord avec les volumes de distribution calculés par Doerge chez le rat (4.3L/Kg) et le singe (15L/kg) qui suggèrent une large distribution du BPA au sein des tissus périphériques (DOERGE DR, 2010b) (DOERGE DR, 2010a). Certains auteurs ont évalué le ratio des concentrations tissulaires de BPA sur les concentrations plasmatiques chez le rat. Ils ont calculé des valeurs allant de un pour le cerveau et les tissus adipeux jusqu'à 5.8 pour les poumons (YOO SD, 2000) (SHIN BS, 2004). Les concentrations plasmatiques sont donc représentatives des concentrations tissulaires.

Compte tenu des clairances élevées du BPA chez toutes les espèces étudiées, l'accumulation du BPA au sein des cellules sanguines ou des tissus périphériques

est peu probable. Cinq brebis pré pubères ont reçu deux fois par semaine, pendant 7 semaines, une administration intramusculaire de BPA à la dose de 3.5mg/kg. Les aires sous la courbe moyennes des concentrations sériques de BPA calculées après la première et la dernière administration étaient similaires (COLLET SH, 2011). La séquestration du BPA au sein des cellules sanguines n'a pas été mise en évidence chez le rat. Suite à l'administration orale de 100mg/kg, les concentrations plasmatiques de BPA libre sont comparables aux concentrations sanguines (POTTENGER LH, 2000).

Le BPA non métabolisé est éliminé majoritairement par voie urinaire chez la brebis, le chien, le porc et la souris alors qu'une autre voie d'élimination existe chez le rat : il s'agit de l'élimination fécale.

Le BPA est moins bien absorbé par le tractus digestif chez le rat que chez les autres espèces. Cette différence pourrait s'expliquer par des variations interspécifiques dans le seuil de saturation des mécanismes d'absorption qui serait plus bas chez le rat. Or chez les rongeurs, le temps nécessaire pour atteindre la concentration sanguine maximale en BPA est similaire après une administration orale de 10mg/kg et une de 100mg/kg (TOMINAGA T, 2006). L'élimination fécale du BPA n'est donc pas secondaire à une saturation des mécanismes d'absorption : elle est physiologique à la dose de 100mg/kg. Pottenger et son équipe ont mis en évidence qu'entre 52 et 83% de la dose administrée se retrouvaient dans les fèces majoritairement sous forme de BPA (POTTENGER LH, 2000). La fraction non absorbée que nous avons calculée est plus basse que ces valeurs. Cette différence est principalement due à la présence de BPA issu du cycle entéro-hépatique dans les mesures réalisées par Pottenger et son équipe alors que seul le BPA non absorbé lors de son transit dans le tube digestif a été pris en compte dans notre calcul. L'excrétion fécale du BPA est donc une voie d'élimination importante chez le rat alors qu'elle est négligeable chez les autres espèces.

L'élimination rénale du BPA n'est pas linéaire. Elle suit une cinétique de Michaelis-Menten : dès que la concentration plasmatique en BPA dépasse K_m , l'élimination qui était jusque là proportionnelle aux concentrations plasmatiques atteint sa capacité maximale (V_{max}). Le BPA n'est donc pas uniquement éliminé par un phénomène passif tel que la filtration glomérulaire. Le BPA est fortement lié aux protéines

plasmatiques. Dans la circulation sanguine, il se trouve donc majoritairement sous forme d'une molécule de haut poids moléculaire incapable de traverser la membrane basale (KUREBAYASHI H, 2003)(KUREBAYASHI H, 2002). De plus, l'équilibre de la forme libre de part et d'autre de la paroi glomérulaire est très vite atteint et entraîne l'arrêt rapide de la filtration glomérulaire. Des mécanismes saturables à l'origine de sa sécrétion et de sa réabsorption tubulaires pourraient être également impliqués dans son élimination rénale.

5.3.2 Elimination du BPA-G

Des différences interspécifiques dans l'élimination du BPA-G ont été mises en évidence dans notre étude.

Le BPA-G est essentiellement excrété par voie rénale chez la brebis et le porc alors qu'une autre voie d'élimination existe chez le rat, la souris et le chien. Elle est majoritaire chez ce dernier. Une étude sur les rongeurs a montré qu'entre 40% et 55% de la dose étaient retrouvés dans la bile sous forme de BPA-G durant les 6 premières heures post administration orale ou IV de la dose de 0.10mg/kg de BPA marqué au carbone 14 (KUREBAYASHI H, 2003). Il est donc très probable que cette autre voie d'élimination soit l'excrétion biliaire. Afin de confirmer cette hypothèse chez le chien, une étude complémentaire a été réalisée au laboratoire. Un chien a été équipé d'un système de dérivation de la bile après un cathétérisme du canal cholédoque. 39.5% de la dose administrée (5mg/kg, IV) ont été retrouvés dans la bile sous forme de BPA-G. Le poids moléculaire minimal pour lequel l'élimination biliaire est possible varie selon les espèces. Il est d'environ 350 daltons chez le rat et le chien alors qu'il est supérieur à 450 daltons chez les autres espèces (SHIN BS, 2010). Ceci explique que le BPA-G, d'un poids moléculaire de 404 daltons soit éliminé préférentiellement dans la bile chez le rat, la souris et le chien et par voie rénale chez les autres espèces.

D'après nos expériences, l'élimination rénale du BPA-G est très rapide (moins de 8 heures). Le BPA-G est sous forme ionisée dans les urines compte tenu de son faible pKa (environ 2.5). Comme il ne peut pas être ré-absorbé par le néphron, il est rapidement éliminé (TOUTAIN PL, 2010). La majorité de la dose administrée est retrouvée sous forme de BPA-G dans les urines chez la brebis et le porc. La

détermination du niveau d'exposition externe au BPA à partir des quantités retrouvées dans les urines est donc pertinente pour ces deux espèces.

Les principales différences interspécifiques mises en évidence par notre étude sont relatives à l'élimination du BPA et du BPA-G. Elles sont de nature quantitative et qualitative. Cependant, elles n'ont pas d'impact majeur sur les concentrations plasmatiques en BPA non conjugué qui sont le reflet de l'exposition interne au BPA et qui déterminent le niveau de risque.

5.4 Intérêts de l'étude pour l'extrapolation à l'homme

Le modèle utilisé présente plusieurs avantages :

- Il analyse simultanément les données expérimentales obtenues selon deux voies d'administration différentes : la voie IV et la voie orale
- Il détermine les paramètres pharmacocinétiques afin de décrire les données expérimentales et de les expliquer
- Il fonctionne pour différentes espèces animales
- Il peut être utilisé pour prédire les concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G pour différents niveaux d'exposition externe au BPA.

Il existe cependant quelques limites à ce modèle. Au moment de la rédaction du manuscrit, il n'a pas pu être ajusté aux données expérimentales obtenues chez les rongeurs car le déroulement temporel des concentrations plasmatiques de BPA et BPA-G est différent des autres espèces. Il se base sur le fait que tout le BPA est transformé en BPA-G au niveau du foie. Or certains auteurs ont montré qu'il existe d'autres organes capables de conjuguer le BPA tels que l'intestin.

5.4.1 Détermination de la Clairance plasmatique du BPA chez l'Homme

D'après la modélisation, le BPA est majoritairement métabolisé en BPA-G par le foie. Sa clairance plasmatique dépend donc essentiellement de sa clairance hépatique. Or nous avons montré que le BPA est une molécule à fort coefficient d'extraction hépatique. La clairance hépatique du BPA est donc liée au débit sanguin hépatique. Ce dernier (Q_h en L/min) peut être calculé à partir du poids (P en kg) grâce à la relation allométrique de Boxenbaum suivante : $Q_h = 0.0555 \cdot P^{0.894}$ (BOXENBAUM,

1980). La clairance plasmatique du BPA est donc fonction du poids vif de l'espèce considérée. Par conséquent, elle suit une loi allométrique (figure 19).

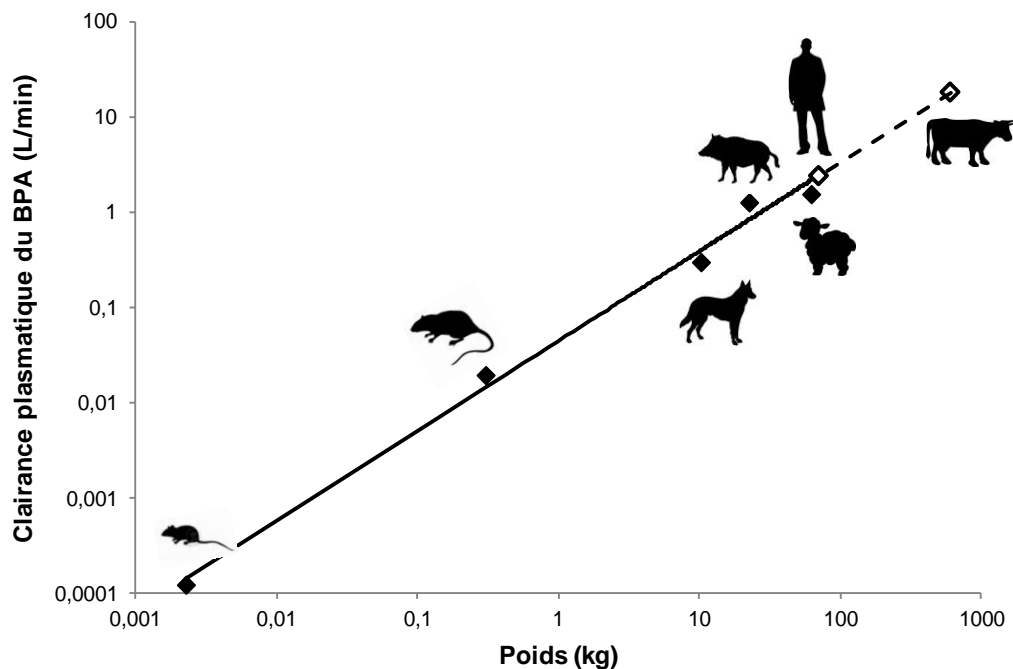


Figure 19 : Relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA (L/min) et le poids vif de l'espèce considérée (kg).

Les points ■ représentent la clairance plasmatique du BPA calculée à l'aide de l'analyse non compartimentale en fonction du poids vif de l'espèce considérée et les points □ la clairance plasmatique du BPA estimée chez l'Homme et la vache à l'aide de l'équation allométrique déterminée en 4.6. La relation allométrique a subi une double transformation logarithmique qui a permis sa linéarisation (-).

L'extrapolation de cette relation a permis d'estimer la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme à 2.4L/min soit 34 ml/kg/min chez un Homme de 70kg. Pour confirmer cette valeur, une étude similaire à celle présentée ici devra être réalisée sur un animal dont le poids vif est supérieur à celui de l'homme (exemples : cheval ou vache) afin de comparer la valeur de la clairance estimée par la relation allométrique à celle calculée à partir des données expérimentales.

L'évaluation de la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme par relation allométrique ne nécessite pas l'administration de la molécule. Il s'agit d'un avantage non négligeable étant donné que le BPA pourrait être responsable d'effets néfastes sur la santé humaine.

La valeur de la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme que nous avons estimée est comparable à celle calculée par d'autres auteurs (28ml/kg/min (CHO CY, 2002), (SHIN BS, 2004)). Kuester et son équipe ont incubé des hépatocytes humains cryoconservés (125 000 hépatocytes/0.5ml) avec du BPA marqué au carbone 14 pendant 10 minutes afin de déterminer les constantes K_m et V_{max} de la glucuronidation hépatique. A partir de ces données, ils ont estimé la clairance hépatique du BPA à 6ml/kg/min (KUESTER RK, 2007). Cette différence entre l'estimation de la clairance in vitro et in vivo pourrait être liée à des différences de fraction de BPA non liée aux protéines plasmatiques.

5.4.2 Quel risque pour la santé humaine ?

Nous avons montré que le BPA est une molécule à fort coefficient d'extraction hépatique chez toutes les espèces. Suite à une administration orale, moins de 10% de la dose administrée se retrouvent dans la circulation sanguine sous forme active. Les 90% restants représentent des formes conjugués du BPA dépourvues d'activités oestrogéniques (MATTHEWS JB, 2001). Etant donné l'absorption intense du BPA par le tractus digestif suite à une administration orale, le foie et l'intestin sont très fortement exposés au BPA. Il est donc possible que cette exposition soit responsable d'effets néfastes sur les différents systèmes physiologiques qu'ils soient directement en contact ou pas avec le BPA.

Notre étude n'a pas permis de comprendre l'incohérence bibliographique soulevée en introduction. En effet, en reprenant l'équation 2 avec la valeur que nous avons estimée pour la clairance plasmatique du BPA chez l'homme (environ 30ml/kg/min) et l'exposition orale la plus importante rapportée par l'EFSA (13µg/kg/j, (EFSA, 2006)), les concentrations plasmatiques de BPA calculées sont de l'ordre du pg/ml, soit une valeur bien inférieure à celles rapportées par les études de biosurveillance (de l'ordre du ng/ml, tableau 5). Nous proposons de reprendre et de discuter en fonction de nos résultats les hypothèses émises en introduction pour expliquer la différence entre les valeurs calculées et observées.

- (1) La clairance plasmatique du BPA chez l'Homme pourrait être inférieure à 30ml/kg/min. Les résultats que nous avons obtenus ne confortent pas cette hypothèse. En effet, nous avons montré que le BPA est une molécule à fort

coefficient d'extraction hépatique chez toutes les espèces et que sa clairance plasmatique est très proche du débit sanguin hépatique.

- (2) L'exposition externe au BPA est bien supérieure à la DJA. Nous avons mis en évidence que la totalité ou presque de la dose administrée est retrouvée dans les urines sous forme de BPA-G chez les animaux présentant les mêmes modalités d'élimination du BPA et BPA-G que l'Homme (la brebis et le porc). Les concentrations urinaires de BPA et BPA-G reflètent donc bien le niveau d'exposition externe au BPA, toutes sources confondues. Compte tenu des concentrations urinaires rapportées dans les études de biosurveillance, il est peu probable que l'Homme soit exposé à des doses supérieures à la DJA.
- (3) Il existe des erreurs lors de l'évaluation des concentrations plasmatiques observationnelles. La contamination des échantillons par le BPA présent dans l'environnement ainsi que la présence de molécules interférant avec le dosage du BPA telles que le resveratrol peuvent être à l'origine d'une surestimation des concentrations plasmatiques (VOLKEL W, 2005). A l'heure actuelle, il est possible d'envisager deux types de scénarios très différents en termes de risque pour la santé humaine.

Si les concentrations plasmatiques de BPA issues des études de biosurveillance sont avérées, la valeur de la DJA devrait être revue à la baisse. En effet, la plus faible concentration plasmatique de BPA générant une perturbation de la sécrétion de LH chez la brebis prépubère est de 40 ng/ml (COLLET SH, 2011). Le rapport entre cette valeur et les concentrations plasmatiques de BPA rapportées par les études de biosurveillance est d'environ 10, soit inférieur au facteur de sécurité de 100 correspondant au rapport entre la NOAEL et la DJA. Au contraire, si les concentrations plasmatiques du BPA sont surestimées comme le suggèrent nos résultats, il existe un facteur de sécurité de 1000 entre la valeur expérimentale (40ng/ml) et les concentrations plasmatiques de BPA calculées (de l'ordre du pg/ml) qui ne justifie pas la modification de la DJA.

Afin d'évaluer le vrai impact du BPA sur la santé humaine, il est important de continuer à réaliser des études de biosurveillance avec des méthodes de dosage pertinentes et de développer de nouvelles études toxicologiques décrivant la relation concentration-effet. La plupart des études toxicologiques n'ont pas évalué les

concentrations plasmatiques de BPA. Elles ont utilisé la relation dose-effet pour expliquer les réponses biologiques observées expérimentalement. Ce type de démarche ne permet pas l'extrapolation des données animales à l'Homme. La dose comprend une composante pharmacocinétique qui détermine le profil des concentrations plasmatiques et une composante pharmacodynamique qui étudie l'action de ces concentrations sur l'organisme. Comme nous l'avons vu, la composante pharmacocinétique peut être variable d'une espèce à l'autre. La relation concentration-effet permet donc de s'affranchir des différences interspécifiques de toxicocinétique. L'extrapolation des données animales à l'Homme n'est donc limitée que par les différences interspécifiques relatives à la pharmacodynamie.

6. Conclusion

Afin de documenter les ressemblances et les différences interspécifiques dans la disposition du BPA et du BPA-G, les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés chez cinq espèces animales différentes (brebis, porc, chien, rat, souris) suite à une administration IV (5mg/kg) et orale (100mg/kg) de BPA. Les principales différences interspécifiques mises en évidence par notre étude concernent les modalités d'élimination du BPA-G et du BPA. Elles n'ont cependant pas d'impact majeur sur les concentrations plasmatiques de BPA qui reflètent le niveau d'exposition interne.

Grâce à l'approche modélisatrice, nous avons montré que malgré une absorption intestinale quasi-totale, la biodisponibilité du BPA est faible. En effet, le BPA est une molécule à fort coefficient d'extraction hépatique chez toutes les espèces. Sa clairance plasmatique est donc équivalente au débit sanguin hépatique. Ce résultat nous a permis d'établir une relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel. Ainsi, nous avons pu estimer la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme à environ 30ml/kg/min. A partir de cette valeur et de l'exposition orale la plus importante rapportée par l'EFSA (13µg/Kg/j), nous avons calculé des concentrations plasmatiques de BPA de l'ordre du pg/ml, soit une valeur bien inférieure à celles observées dans les études de biosurveillance (de l'ordre du ng/ml). Cette incohérence pour être comprise nécessite de nouvelles études scientifiques.

Quelque soit le niveau d'exposition interne, l'exposition importante au BPA de l'intestin et du foie, véritable plaque tournante du métabolisme, pourrait être responsable d'effets néfastes sur les différents systèmes physiologiques qu'ils soient directement exposés ou pas au BPA.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussignée, *Nicole HAGEN*, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *Marion FARBOS* intitulée « *Toxicocinétique comparée du bisphénol A chez cinq espèces et extrapolation de l'animal à l'homme.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

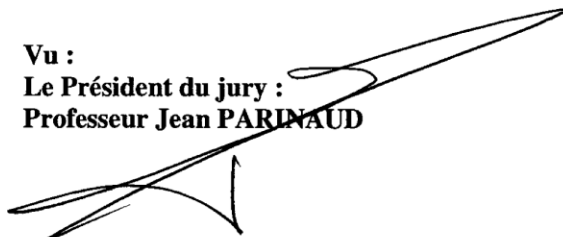


Fait à Toulouse, le 2 Mai 2012
Professeur Nicole HAGEN
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



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

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jean PARINAUD



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURCANDIER



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

7. Bibliographie

ANSES (2011). Effets sanitaires et usages du Bisphénol A [en ligne]. Disponible sur : <http://www.anses.fr/Documents/CHIM-Ra-BisphenolA.pdf> (consulté le 23/03/12).

BOXENBAUM H (1980). Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **8**, 165-176.

CABATON NJ, WADIA PR, RUBIN BS, ZALCO D, SCHAEBERLE CM, ASKENASE MH, GADBOIS JL, THARP AP, WHITT GS, SONNENSCHNIG C, SOTO AM (2011). Perinatal exposure to environmentally relevant levels of Bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environmental Health Perspectives*, **119**, 547-552.

CHO CY, SHIN BS, JUNG JH, KIM DH, LEE KC, HAN SY, KIM HS, LEE BM, YOO SD (2002). Pharmacokinetic scaling of bisphenol A by species-invariant time methods. *Xenobiotica*, **32**, 925-934.

CHUN TY, GORSKI J (2000). High concentrations of bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in an estrogen-responsive pituitary tumor cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **162**, 161-165.

COLLET SH, PICARD-HAGEN N, VIGUIE C, LACROIX MZ, TOUTAIN PL, GAYRARD V (2010). Estrogenicity of bisphenol A : a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicological Sciences*, **117**, 54-62.

COLLIER AC, MIYAGI SJ, YAMAUCHI Y, WARD MA. (2009). Assisted reproduction technologies impair placental steroid metabolism. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **116**, 21-28.

DEKANT W, VOLKEL W. (2008). Human exposure to bisphenol A by biomonitoring : methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **228**, 114-134.

DOERGE DR, TWADDLE NC, WOODLING KA, FISHER JW (2010a). Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **248**, 1-11.

DOERGE DR, TWADDLE NC, VANLANDINGHAM M, FISHER JW (2010b). Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **247**, 158-165.

EFSA (2006). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A). *The EFSA Journal*, **428**, 1-75.

GINSBERG G, RICE DC (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environmental Health Perspectives*, **117**, 1639-1643.

IKEZUKI Y, TSUTSUMI O, TAKAI Y, KAMEI Y, TAKETANI Y (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, **17**, 2839-2841.

INOUE K, KATO K, YOSHIMURA Y, MAKINO T, NAKAZAWA H (2000). Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **749**, 17-23.

INOUE H, TSURATA A, KUDO S, ISHII T, FUKUSHIMA Y, IWANO H, YOKOTA H, KATO S (2005). Bisphenol a glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metabolism and Disposition*, **33**, 55-59.

INSERM (2010). Synthèse expertise collective : Bisphénol A, effets sur la reproduction, [en ligne]. Disponible sur : <http://www.inserm.fr> (consulté le 23/03/12).

KADDARA N, BENDRID I, HARTHEB C, ROLLAND DE RAVEL M, BIENVENUE AL, CUILLERONA CY, MAPPUSA E, PUGEATA M, DECHAUDA H (2009). Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 1-4.

KUESTER RK, SIPES IG (2007). Prediction of metabolic clearance of bisphenol A (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane) using cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**, 1910-1915.

KUREBAYASHI H, HARADA R, STEWART RK, NUMATA H, OHNO Y (2002). Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences*, **68**, 32-42.

KUREBAYASHI H, BETSUI H, OHNO Y (2003). Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicological Sciences*, **73**, 17-25.

LACROIX MZ, PUEL S, COLLET SH, CORBEL T, PICARD-HAGEN N, TOUTAIN P, VIGUIE C, GAYRARD 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.

LEGIFRANCE - Le service public de la diffusion du droit. Disponible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/> (consulté le 23/03/12).

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. *Chemical Research in Toxicology*, **14**, 149-157.

MIELKEL H, GUNDERT-REMY U (2009). Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicology Letters*, **190**, 32-40.

MIELKE H, PARTOSCH F, GUNDERT-REMY U (2011). The contribution of dermal exposure to the internal exposure of bisphenol A in man. *Toxicology Letters*, **204**, 190-198.

MYERS JP, VOM SAAL FS, AKINGBEMI BT, ARIZONO K, BELCHER S, COLBORN T, CHAHOUD I, CRAIN DA, FARABOLLINI F, GUILLETTE LJ Jr, HASSOLD T, HO SM, HUNT PA, IGUCHI T, JOBLING S, KANNO J, LAUFER H, MARCUS M, MCLACHLAN JA, NADAL A, OEHLMANN J, OLEA N, PALANZA P, PARMIGIANI S, RUBIN BS, SCHOENFELDER G, SONNENSCHNIG C, SOTO AM, TALSNESS CE, TAYLOR JA, VANDENBERG LN, VANDENBERGH JG, VOGEL S, WATSON CS, WELSHONS WV, ZOELLER RT (2009). Why public health agencies cannot depend

on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, **117**, 309-315.

NEWBOLD RR, PADILLA-BLANKS E, JEFFERSON WN (2006, Juin). Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, **147**, 11-17.

OFFICE FEDERAL VETERINAIRE. Prélèvement de sang chez les rongeurs de laboratoire et les lapins à des fins expérimentales. *Information protection des animaux* 3.02 [en ligne], http://www.bvet.admin.ch/tsp/02262/02293/02302/index.html?lang=fr&download=NH zLpZeg7t,Inp6l0NTU042l2Z6ln1ae2lZn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCDdH14f2ym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A-- (consulté le 23/03/12).

PLASTICS EUROPE (2007) [en ligne]. Disponible sur : <http://www.bisphenol-a-europe.org/uploads/applications%20of%20BPA%20Sept%2008.pdf> (consulté le 23/03/12).

POTTENGER LH, DOMORADZKI JY, MARKHAM DA, HANSEN SC, CAGEN SZ, WAECHTER JM Jr (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*, **54**, 3-18.

RICHARD K, HUME R, KAPTEIN E, STANLEY EL, VISSER TJ, COUGHTRIE MW (2001). Sulfation of thyroid hormone and dopamine during human development : ontogeny of phenol sulfotransferases and arylsulfatase in liver, lung, and brain. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 2734-2742.

RICHTER CA, BIRNBAUM LS, FARABOLLINI F, NEWBOLD RR, RUBIN BS, TALSNESS CE, VANDENBERGH JG, WALSER-KUNTZ DR, VOM SAAL FS (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, **24**, 199-224.

SAJIKI J, TAKAHASHI K, YONEKUBO J (1999). Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **736**, 255-261.

SCHONFELDER G, WITTFOHT W, HOPP H, TALSNESS CE, PAUL M, CHAHOUD I (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, **110**, 703-707.

SHIN BS, KIM CH, JUN YS, KIM DH, LEE BM, YOON CH, PARK EH, LEE KC, HAN SY, PARK KL, KIM HS, YOO SD (2004). Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **37**, 1971-1985.

SHIN BS, HWANG SW, BULITTA JB, LEE JB, YANG SD, PARK JS, KWON MC, KIM DO J, YOON HS, YOO SD (2010). Assessment of Bisphenol A exposure in Korean pregnant women by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **73**, 1586-1598.

STAPLES CA, DORN PB, KLECKA GM, O'BLOCK ST, BRANSON D (2000). Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities. *Chemosphere*, **40**, 521-525.

TAKAHASHI O, OISHI S (2000). Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environmental Health Perspectives*, **108**, 931-935.

TOMINAGA T, NEGISHI T, HIROOKA H, MIYACHI A, INOUE A, HAYASAKA I, YOSHIKAWA Y (2006). Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology*, **226**, 208-217.

TOUTAIN PL, FERRAN A, BOUSQUET-MELOU A (2010). Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handbook of Experimental Pharmacology* **199**, 19-48.

TSUKIOKA T, TERASAWA J, SATO S, HATAYAMA Y, MAKINO T, NAKAZAWA H (2004). Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *Journal of Environmental Chemistry*, **14**, 57-63.

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, BRINE DR, VESELICA MM, FAIL PA, CHANG TY, SEELY JC, JOINER RL, BUTALA JH, DIMOND SS, CAGEN SZ, SHIOTSUKA RN, STROPP GD, WAECHTER JM (2002).

Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, **68**, 121-146.

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, VESELICA MM, SEELY JC, DIMIND SS, VAN MILLER JP, SHIOTSUKA RN, BEYER D, HENTGES SG, WAECHTER JM Jr (2008). Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicological Sciences*, **104**, 362-384.

UPMEIER A, DEGEN GH, DIEL P, MICHNA H, BOLT HM (2000). Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Archives of Toxicology*, **74**, 431-436.

VANDENBERG LN, HAUSER R, MARCUS M, OLEA N, WELSHONS WV (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, **24**, 139-177.

VOLKEL W, COLNOT T, CSANADY GA, FILSER JG, DEKANT W (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, **15**, 1281-1287.

VOLKEL W, BITTNER N, DEKANT W (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*, **33**, 1748-1757.

VOLKEL W, KIRANOGLU M, FROMME H (2008). Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicology Letters*, **179**, 155-162.

WILSON NK, CHUANG JC, MORGAN MK, LORDO RA, SHELDON LS (2007). An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environmental Research*, **103**, 9-20.

YE X, BISHOP AM, REIDY JA, NEEDHAM LL, CALAFAT AM (2007). Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, **17**, 567-572.

YOO SD, SHIN BS, KWACK SJ, LEE BM, PARK KL, HAN SY, KIM HS (2000). Pharmacokinetic disposition and tissue distribution of bisphenol A in rats after intravenous administration. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **61**, 131-139.

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

FARBOS Marion

Toxicocinétique comparée du Bisphénol A chez cinq espèces et extrapolation de l'animal à l'Homme.

Le Bisphénol A (BPA) est un xéno-œstrogène présent dans notre environnement et suspecté d'être néfaste pour la santé humaine. L'objectif de l'étude était d'évaluer les similarités et les différences interspécifiques dans la disposition du BPA et de son principal métabolite, le BPA-glucuronide chez 5 espèces de mammifères, de façon à documenter la toxicocinétique du BPA chez l'homme. Les études toxicocinétiques réalisées chez ces animaux ont montré que les profils des concentrations plasmatiques après une administration intraveineuse (5mg/kg) ou orale (100mg/kg) de BPA sont comparables. La relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel chez toutes les espèces considérées a permis d'estimer la clairance plasmatique du BPA chez l'homme à 30ml/kg/min. Cette valeur souligne l'incompatibilité entre les concentrations plasmatiques de BPA observées dans les études de biosurveillance et le taux d'exposition externe au BPA de 13 µg/kg rapporté par l'EFSA.

Mots-clés: perturbateur endocrinien, clairance, Bisphénol A, Bisphénol A-glucuronide, biodisponibilité, paramètres toxicocinétiques, relation allométrique interspécifique.

Interspecies comparison of Bisphenol A toxicokinetic in five species and extrapolation from animal to human.

Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen widely encountered in our environment and suspected to have potential adverse effects on human health. The goal of this study was to evaluate interspecies similarities and differences in disposition of BPA and its main metabolite, BPA-glucuronide, in five animal species of mammals in order to document the toxicokinetic of BPA in humans. Toxicokinetic studies showed that plasma BPA concentrations profiles were comparable in all investigated animal species both after an intravenous (5mg/kg) and after an oral administration (100mg/kg). The allometric scaling between BPA clearance and body weight observed in all species investigated allowed BPA human clearance of 30ml/kg/min to be predicted. This value reveals a major inconsistency between BPA concentrations reported in biomonitoring studies, and a BPA daily intake of 13 µg/kg reported by EFSA.

Key words: endocrine-disrupting compound, clearance, Bisphenol A, Bisphenol A-glucuronide, biodisponibility, toxicokinetic parameters, allometric interspecies scaling.