

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2023

THESE 2023 /TOU3 / N°2132

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Andréa RAYNAL

ETUDE DE LA LIAISON DES BISPHENOLS AUX PROTEINES PLASMATIQUES CHEZ LE
PORCELET

20/12/2023

Directeur de thèse : GAYRARD Véronique

JURY

Président : Pr GANDIA Peggy
1er assesseur : Pr GAYRARD Véronique
2ème assesseur : Dr LEROY Clément
3ème assesseur : Dr AZAM Camille

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques
de la Faculté de santé
au 08 mars 2023

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERAÈVE C.	Chimie Thérapeutique
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme ECHINARD-DOUIN V. (*)	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme RIGOLOT L.	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme MALLI Sophia	Pharmacie Galénique
M. TABTI Redouane	Chimie Thérapeutique

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury :

À Madame Peggy Gandia, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour y apporter votre expertise. Je vous en suis profondément reconnaissante.

À Madame Véronique Gayrard, je tiens à exprimer ma gratitude pour avoir accepté de superviser cette thèse. Merci particulièrement pour ton encadrement attentif et ta grande bienveillance. Sans ces éléments et ton soutien, la qualité de ce manuscrit ne serait pas la même.

À Camille Azam, je souhaite exprimer ma reconnaissance pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci également pour ton amitié, ta présence et ton soutien constants à travers tous les moments de notre vie.

À Clément Leroy, je tiens également à exprimer ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de mon jury. En plus d'apporter un peu de parité dans ce jury, on finit la boucle de nos heures de révisions à la BU ou à Saint Agne.

A ma famille :

À mes parents, merci pour tout votre amour, votre soutien et vos conseils dans chaque moment de ma vie. Cette thèse je vous la dédie. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis, mélange de valeurs, de bon petits plats et d'histoires rocambolesques. Vous êtes mes Tensing Norgay !

À ma sœur et mon frère, mes complices de toujours, merci pour tous ces joyeux moments et votre soutien. Comme dit le dicton, loin des yeux et près du cœur. A Adeline et Alexandre, merci de faire rayonner mon frère et ma sœur au quotidien.

À Anthony, merci pour ton amour et ta bienveillance, depuis toutes ces années. Merci également pour ton support et ta patience pour cette thèse. Ensemble, nous sommes capables de faire face à toutes les épreuves de la vie, et de gagner les vraies batailles.

Je t'aime.

À mes grands-parents, merci pour tous ces étés, toutes ces histoires et tout votre amour. Vous êtes des exemples de réussite et de courage. Papé et Grand-père, je sais que de là-haut vous allez également trinquer avec nous ce soir...

À toute ma famille, tantes, oncles, cousins et à ma belle-famille, merci pour toutes ces bons moments, et pour les futurs à venir.

A mes amis :

Aux Gringos, Anais K., Anais R., François, Isaline, qu'ils sont loin ces cours de maths et de section euro ! Je vous souhaite de nombreuses aventures, et de profiter de ces moments si précieux. *A titre personnel, je pense qu'on devrait ouvrir l'enveloppe des prédictions pour fêter ça !*

À mes copains pharmaciens, je garde un très bon souvenir de ces années passées avec vous, qui d'après les statistiques sont décrites comme les meilleures années de nos vies.

À mes fratées, Claire, Camille, Léa, Louise, Marie R, Mathilde, Morgane, merci pour ces supers années inoubliables, tous ces moments de bonheurs, et ce n'est pas fini ! Aux bébés fratées Sixtine et Jeanne, et à ceux à venir, vous avez des mamans exceptionnelles.

À Lucie, Amélie D, Virginie qui comme moi ont eu la brillante idée de rallonger les études par une école d'ingénieur : on a madequisé ce milestone ! Amélie, ton sourire et ton rire nous manque.

À mes copains des Mines, (*Ou plutôt aux Pirates des Mines*), je garde également un très bon souvenir de ces moments avec vous.

À mes copains de Toulouse, Amélie V., Clément, Jordan, Lisa, vous êtes la petite famille. Merci d'être là, merci pour tout.

À mes collègues :

À mes collègues d'Aignan, de Villepinte (*à lire avec l'accent*), de Normandie, de Toulouse... A toutes les personnes que j'ai rencontré sur ces différents sites/ entreprises, vous avez vous aussi contribué à ma réussite et à mon épanouissement professionnel.

Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à mon parcours. Chacune de vos contributions a été précieuse.

I never lose. I either win or learn.

Nelson Mandela

"LA FACULTÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS ÉMISES DANS LES THÈSES, CES
OPINIONS DOIVENT ÊTRE CONSIDÉRÉES COMME PROPRES À
LEUR AUTEUR."

1	Table des matières	
1	Introduction générale	13
2	Etude bibliographique :	14
2.1	Le bisphénol A : historique et évolution de la réglementation	14
2.2	Toxicocinétique des bisphénols	20
2.2.1	Voies d'exposition aux bisphénols	20
2.2.2	Devenir des bisphénols dans l'organisme	21
2.2.3	Liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques	24
2.3	Le bisphénol A et ses substituts : exposition humaine	26
3	Etude expérimentale : Evaluation de la liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques : influence des paramètres physicochimiques	28
3.1	Matériels et méthodes	28
3.1.1	Produits chimiques	28
3.1.2	Préparation des solutions de bisphénols	30
3.1.3	Dialyse à l'équilibre	32
3.1.4	Dosage des bisphénols	34
3.1.5	Analyse des données	35
3.2	Résultats-discussion	37
3.2.1	Temps d'incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre	37
3.2.2.	Evaluation d'une dépendance à la concentration de la fraction libre en bisphénols.	43
4	Conclusion	48

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1- Structure chimique du bisphénol A	14
Figure 2- Historique et évolution de la réglementation du bisphénol A (BPA) –	14
Figure 3- Application du règlement REACH au bisphénol A (BPA)-	18
Figure 4 Devenir du Bisphénol A (BPA) dans l'organisme après son ingestion	22
Figure 5: Résumé des principaux résultats du devenir du BPA et du BPS administrés par gavage oral aux porcelets (Gayrard et al. 2019)	23
Figure 6: Fractions libres du BPA (barres noires) et du BPS (barres blanches) chez différentes espèces (Gayrard et al. 2023)(12)	25
Figure 7: Quantités journalières moyennes (μg par personne et par jour) de BPA et de ses analogues auxquelles l'homme est exposé. Le nombre indiqué sur chaque histogramme correspond au nombre d'échantillons urinaires à partir desquels l'estimation a été réalisée (Wang et al. 2020)(31)	27
Figure 8: Quantités journalières moyennes (μg par personne et par jour) des analogues du BPA auxquelles l'homme est exposé en fonction du pays d'origine	28
Figure 9: Structure chimique et identification des bisphénols de l'étude	29
Figure 10- Remplissage d'une cellule de dialyse(35)	33
Figure 11 Représentation d'une série de dialyse avec 20 cellules de dialyse	34
Figure 12 Principe de la méthode de dialyse à l'équilibre. Les symboles ronds représentent les protéines du plasma séparé du tampon de dialyse par une membrane semi-perméable qui exclut le passage des substances de poids moléculaire supérieur à 5000 Da. Les triangles verts symbolisent les ligands (L). A l'équilibre la concentration en ligand libre [L] est identique de part et d'autre de la membrane.	36
Figure 13- Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol A des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	38
Figure 14- Ratio (%) entre les concentrations en 3-3 BPA des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	38

Figure 15- Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPZ des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	39
Figure 16 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol S (BPS) des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	39
Figure 17 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPAP des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	40
Figure 18 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPAF des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	40
Figure 19 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPB des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	41
Figure 20 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPBP des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	41
Figure 21 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol E (BPE) des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	42
Figure 22 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol F (BPF) des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	42
Figure 23 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPFL des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM	43
Figure 20- Fractions libres des Bisphénols à un temps d'incubation de 24h	45
Figure 21- Evolution du nombre d'études in vivo, in vitro et chez l'Homme portant sur les Bisphénols et leurs analogues au cours du temps (34)	49

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Quantité de papier thermique sur le marché de l'UE en 2014, 2019 et 2022 (projection); tonnes.....	20
Tableau 2: Caractéristiques physicochimiques des bisphénols de l'étude	30
Tableau 3 Préparation des solutions mères de bisphénol.	30
Tableau 4 Préparation des solutions de bisphénols dans le tampon de dialyse (volume de 30mL)	31
Tableau 5 Méthode de préparation des gammes de bisphénols dans le tampon de dialyse et le plasma (volume final de 5ml).....	32
Tableau 6 Limite de quantification (LOQ) du dosage des bisphénols (Gely et al. 2021).....	35
Tableau 7. . Concentrations de bisphénol libre (F) et lié (B, μ moles/L) et fraction libre de bisphénol (f_u , %) obtenus en fonction de la concentration nominale de bisphénol au temps d'incubation de 24h.....	44

Liste des abréviations

3-3BPA : 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl) propane

BP4-4: 4,4'- Dihydroxybiphényle

BPA : Bisphénol A

BPAF : Bisphénol AF

BPAG : Bisphénol A glucuronide

BPAG : BPA glucuronideBPAP : Bisphénol AP

BPB : Bisphénol B

BPBP : Bisphénol BP

BPC : Bis(4-hydroxyphényl)-2,2-dichloroéthylène

BPE : Bisphénol E

BPF : Bisphénol F

BPFL : Bisphénol FL

BPM : Bisphénol M

BPP : Bisphénol P

BPS : Bisphénol S

BPSG : Bisphénol S glucuronide

BPZ : Bisphénol Z

CLP : Classification, Labelling, Packaging

CoRAP : Plan d'action continu communautaire

DJA : Dose journalière admissible

ECHA : Agence européenne des produits chimiques

EFSA : Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments

Eh : coefficient d'extraction hépatique

FDA :(*Food and Drug Administration*) Autorité américaine de sécurité sanitaire des aliments

LOQ : Limit Of Quantification

REACH : Enregistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques

PE : Pré-Enregistrement (REACH)

SVHC : Substances of Very High Concern

TK : Toxicocinétique

UGT : UDP-glucuronyltransférase

1 Introduction générale

L'exposition humaine à des perturbateurs endocriniens est un sujet croissant de préoccupation en santé publique. Parmi ces substances, le bisphénol A (BPA) a été la substance dont l'évaluation du risque a fait l'objet du plus grand nombre de discussions, en raison de ses effets potentiellement délétères pour la santé et de sa large utilisation dans les produits de consommation. Suite aux mesures restrictives de son utilisation, le BPA a été progressivement remplacé par des analogues structuraux de la famille des bisphénols dans de nombreux produits de consommation (1). Ceux-ci ont été détectés dans les denrées alimentaires, les poussières domestiques, des échantillons d'urine ou de sang humains. Or des études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que de nombreux analogues du BPA ont des effets toxicologiques à des concentrations similaires ou inférieures à celles du BPA (2).

Un principe de base de pharmacologie et de toxicologie est que les effets systémiques d'une substance sont déterminés par le niveau de ses concentrations plasmatiques et plus précisément des concentrations de la forme libre (non liée aux protéines plasmatiques) qui est considérée comme la forme active. La connaissance de la fraction libre des bisphénols est nécessaire pour interpréter les données des études de biosurveillance humaine et extrapoler à l'homme des effets observés dans des études *in vitro* ou des études expérimentales réalisées sur des modèles animaux.

L'objectif de l'étude est d'évaluer la fraction libre de quinze bisphénols dans le plasma de porcelet, au titre d'espèce pertinente pour l'homme en recherche translationnelle. Le premier chapitre du manuscrit est une synthèse bibliographique qui présentera dans une première partie, l'historique de l'utilisation du bisphénol A et l'évolution de sa réglementation qui a conduit à sa substitution par d'autres bisphénols. La deuxième partie décrira les propriétés toxicocinétiques des bisphénols dont la liaison aux protéines plasmatiques. La troisième partie fera la synthèse des données de l'exposition humaine aux bisphénols.

Le deuxième chapitre du manuscrit sera consacré à l'étude expérimentale de la liaison du BPA et de 14 de ses analogues structuraux aux protéines du plasma de porcelet par dialyse à l'équilibre.

2 Etude bibliographique :

2.1 Le bisphénol A : historique et évolution de la réglementation

Le bisphénol A (BPA) est un composé organique contenant deux groupes phénoliques liés, comme le montre la figure 1. Il existe 40 autres noms pour cette substance, le plus commun est le 2,2-bis(4-hydroxyphényl) propane et son numéro CAS est 80-05-7.

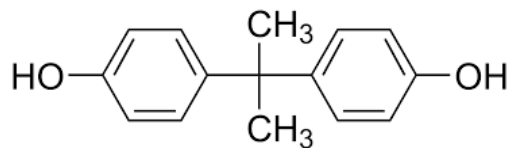


Figure 1- Structure chimique du bisphénol A

La figure 2 illustre l'historique et l'évolution de la réglementation du bisphénol A.



Figure 2- Historique et évolution de la réglementation du bisphénol A (BPA) –

Abréviations : DJA : Dose Journalière Admissible, EFSA : Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments, REACH : Enregistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques, SVHC : Substances of Very High Concern, PE : Pré-Enregistrement, DJA : Dose Journalière Admissible, EFSA : Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments, REACH : Enregistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques

La première synthèse chimique du bisphénol A est due à Alexandre Dianine, chimiste russe, en 1891. Dans les années 1930, ses propriétés estrogène-mimétiques ont été démontrées par Dodds et Lawson (3). Dès cette époque, on savait ainsi qu'il pouvait exercer des effets similaires à ceux des œstrogènes. Il ne fut jamais utilisé comme œstrogène de synthèse du fait de la découverte à la même époque d'un autre composé de synthèse, le diéthylstilbestrol (DES), dont les propriétés se révélèrent plus intéressantes. La connaissance de sa potentielle activité hormonale n'a pas empêché en 1960 son utilisation massive dans l'industrie du plastique.(4)

Une attention particulière s'est très vite portée au BPA en raison du niveau très élevée de sa production, c'est la molécule dont le tonnage de production annuelle est le plus élevé, avec plus de 7 millions de tonnes produites en 2019, et ses nombreuses utilisations majoritairement sous la forme de polycarbonates ou de résines époxy-phénoliques.

Le plastique de type polycarbonate est l'utilisation principale du bisphénol A (BPA), représentant près de 70 % de la production totale de BPA. Ces plastiques présentent des propriétés intéressantes comme la transparence, la durabilité et la résistance à la chaleur et aux chocs, propriétés qui sont essentielles pour de nombreuses applications, telles que des verres de lunettes ou du matériel médical, les bonbonnes des fontaines à eau. Les résines époxy phénoliques constituent près de 30 % de l'utilisation totale du BPA. Les résines époxy phénoliques sont utilisées pour leur protection contre la corrosion, de leur stabilité thermique et leur résistance mécanique. Elles sont principalement utilisées comme revêtement interne de boîtes de conserve et des canettes. Le BPA est aussi utilisé dans les papiers thermiques comme révélateur acide du leuco-colorant de l'encre contenue dans les papiers, en dentisterie, dans les composites dentaires qui sont à base de bis-GMA (BPA diglycidyl méthacrylate) ou encore comme additif ou stabilisateur des plastiques de types polychlorure de vinyle (PVC).

En 2007, Trente-huit des plus grands experts scientifiques mondiaux du bisphénol A ont mis en garde les décideurs politiques contre les effets néfastes potentiels sur la

santé de l'exposition au plastique largement répandu et ils ont publié une déclaration de consensus, issue d'un séminaire parrainé par l'Institut national des sciences de la santé environnementale, tenu à Chapel Hill. En 2006, la dose journalière admissible (DJA) de BPA a été établie à 50µg/kg de poids corporel et par jour par l'autorité européenne de sécurité des aliments (2006).

En 2011, la réglementation européenne a interdit le bisphénol A dans les biberons en plastique pour nourrissons. En France, une loi plus générale, adoptée le 24 décembre 2012, prévoit « la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement, contenant ou ustensile comportant du bisphénol A et destiné à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires ».

En 2015, les experts de l'EFSA ont proposé de réduire le niveau sans danger du BPA à 4 µg/kg de poids corporel/jour pour prendre en compte des incertitudes entourant les effets sanitaires potentiels du BPA sur la glande mammaire ainsi que sur les systèmes reproductif, métabolique, neurocomportemental et immunitaire. Cette DJA avait été fixée de manière provisoire dans l'attente des résultats d'une étude à long terme chez le rat, destinée à réduire ces incertitudes. En 2021, l'EFSA a réévalué les risques associés au BPA dans les aliments et a proposé de réduire considérablement la DJA par rapport à sa précédente évaluation de 2015. Le groupe d'experts de l'EFSA sur les matériaux en contact avec les aliments, les enzymes et les auxiliaires technologiques a ainsi établi la DJA à 0.2 ng par kilogramme de poids corporel par jour. L'abaissement de la DJA (divisée par 20000) résulte de l'évaluation de nouvelles études scientifiques publiées entre 2013 et 2018, particulièrement celles qui indiquaient des effets indésirables du BPA sur le système immunitaire. (5)

En Europe, le BPA comme l'ensemble des produits chimiques relève du règlement européen REACH, (Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals) entré en vigueur en 2007 et administré par l'agence européenne des produits chimiques (ECHA). Selon le règlement REACH, les importations de substances doivent être enregistrées par les importateurs. Les dossiers d'enregistrement doivent être soumis à l'ECHA qui évalue leur complétude et leur conformité. Selon le plan d'action continu communautaire (CoRAP), certaines substances suspectées de présenter un risque

pour la santé humaine ou l'environnement font l'objet d'une évaluation qui est effectuée par un État membre. L'évaluation de la substance peut aboutir à :

- Une proposition de classification et d'étiquetage harmonisés des substances cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, sensibilisant respiratoire ou toxique pour l'environnement selon le règlement sur la classification, l'étiquetage et l'emballage (CLP pour Classification, Labelling, Packaging). Ce règlement vise à informer les utilisateurs de la substance et de ses dangers sur la base d'un Système Général Harmonisé (SGH). Les substances sont inscrites dans l'annexe IV du règlement

- Une proposition d'identification de la substance en tant que substance très préoccupante (SVHC pour Substances of Very High Concern) si elle est cancérigène, mutagène ou toxique pour la reproduction, persistante, bioaccumulable ou perturbateur endocrinien. Une fois qu'une substance est identifiée comme SVHC, elle est incluse dans la liste candidate. Les substances de cette liste sont régulièrement priorisées par l'ECHA pour être incluses dans la liste d'autorisation (annexe XIV de REACH). La Commission européenne décide de l'inscription et la substance correspondante peut continuer à être utilisée mais est soumise à autorisation. Une proposition de restriction peut être faite par un État membre ou l'ECHA lorsqu'il y a des inquiétudes.

La figure 3 illustre l'application du règlement REACH au BPA.

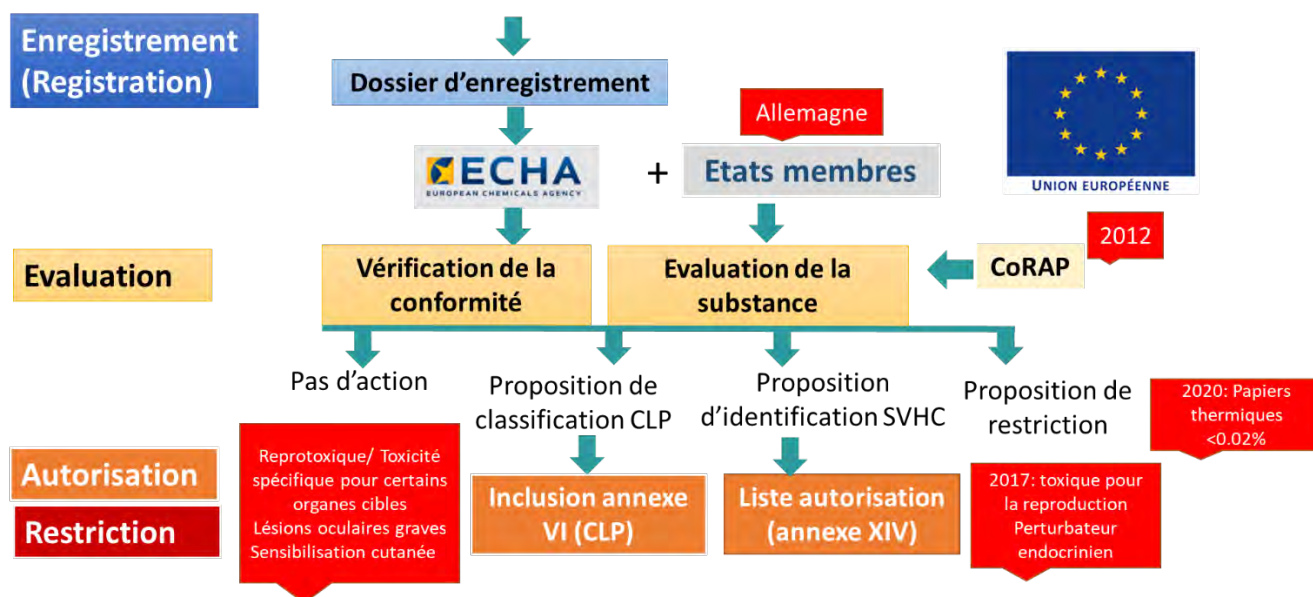


Figure 3- Application du règlement REACH au bisphénol A (BPA)-

Abréviations : CoRAP : Plan d'action continu communautaire, ECHA : Agence européenne des produits chimiques, CLP : Classification, Labelling, Packaging

Après l'entrée en vigueur de REACH, le premier CoRAP est apparu en février 2012. Il incluait le BPA, et l'Allemagne a été désignée pour effectuer l'évaluation de la substance.

Le BPA a été classé comme ayant des effets négatifs sur la santé des yeux, de la peau, des organes et du système reproducteur et est donc inclus dans l'annexe VI du règlement sur la classification, l'étiquetage et l'emballage. L'évaluation des substances menée par les autorités allemandes d'évaluation des risques s'est conclue en 2017 entre autres, par l'inclusion du BPA dans la liste candidate des SVHC sur la base de 3 paramètres :

- Janvier 2017, sur la base de sa classification comme toxique pour la reproduction catégorie 1B
- Juillet 2017, sur la base de propriétés présumées de perturbateurs endocriniens (PE) pour la santé humaine
- Janvier 2018, sur la base de propriétés présumées de perturbateurs endocriniens (PE) pour l'environnement

Le 5 septembre 2018, l'ECHA a publié son projet de proposition visant à inclure le BPA, dans la liste d'autorisation REACH. A l'initiative des autorités françaises, une restriction ciblée adoptée en 2014 restreint l'utilisation du BPA dans le papier thermique en fixant une limite de concentration à 0.02% g/g. La restriction a été publiée en 2016 et est pleinement applicable depuis le 2 janvier 2020.

La procédure d'autorisation du règlement REACH a pour objectif de veiller à ce que les substances extrêmement préoccupantes soient progressivement remplacées par d'autres substances ou technologies moins dangereuses lorsque des solutions de remplacement appropriées économiquement et techniquement viables existent.

En accord avec la réglementation le BPA a été largement remplacé par d'autres bisphénols majoritairement le bisphénol S (BPS) mais aussi d'autres bisphénols de structures analogues à celle du BPA tels que les bisphénols F (BPF), B (BPB), M (BPM), AP (BPAP) et AF (BPAF) (Anses 2013) (1).

Dans les papiers thermiques, le BPA a été largement remplacé par le BPS. Selon un rapport de l'ECHA (tableau 1, source ECHA 2020), en 2019, le bisphénol S (BPS) a pris le statut du bisphénol A (BPA) en tant que principal révélateur utilisé dans le papier thermique et son utilisation annuelle aurait été multipliée environ par cinq entre 2014 et 2022. En 2019, l'utilisation de papier thermique à base de BPS a augmenté de 80 % par rapport à l'année précédente, s'élevant à 187 kilotonnes, tandis que l'utilisation de papier thermique à base de BPA a diminué de 43 % passant à 136 kilotonnes. Le volume de papier thermique contenant d'autres révélateurs mis sur le marché de l'UE s'élevait à 154 kilotonnes en 2019, soit une augmentation de 33 % par rapport à 2014. En 2022, le volume de papier thermique à base de BPS mis sur le marché de l'UE est estimé à 307 kilotonnes (61 % du total) tandis que celui des autres révélateurs devrait s'élever à 199 kilotonnes (39 %).

Tableau 1 Quantité de papier thermique sur le marché de l'UE en 2014, 2019 et 2022 (projection); tonnes

Révéléateur	2014	2019	2022*	Croissance 2014-2022
Bisphénol A	247 198	136 125	0	-100 %
Bisphénol S	64 499	187 064	306 857	376 %
Autres	115 211	153 648	199 167	42 %
Total	426 908	476 837	506 023	19 %

L'utilisation des bisphénols fait l'objet d'un encadrement réglementaire croissant.

Des analogues structuraux du BPA ont également été identifiés par l'ECHA en tant que SVHC:

- Le bisphénol S pour ses propriétés reprotoxiques et de perturbateur endocrinien pour la santé humaine et pour l'environnement.
- Le 2,2',6,6'-tétrabromobisphénol A en raison de ses propriétés cancérigènes.

2.2 Toxicocinétique des bisphénols

2.2.1 Voies d'exposition aux bisphénols

L'exposition aux bisphénols est majoritairement d'origine alimentaire et résulte de contamination des aliments et des boissons par des monomères libérés suite à l'hydrolyse des polymères des emballages de type polycarbonate ou des résines époxy phénoliques qui peut être accrue lors du chauffage des matériaux en contact avec les aliments (Takao et al. 2002).

Des études réalisées en Chine et aux USA ont montré que BPA est le bisphénol le plus souvent détecté dans aliments, avec une fréquence de détection comprise entre 57 et 70% (Liao et Kannan 2013 ; 2014, Kasauliya et al. 2021, Gonzales et al. 2020, Morgan et Clifton 2021) suivi du BPS (21-32%) et du BPF (10-19%). D'autres bisphénols ont également été détectés avec une plus faible fréquence, comme c'est le cas pour le BPAF, le BPAP, le BPP, le BPZ et le BPB. En Espagne, seuls le BPA, le BPB

et le BPE ont été détectés dans les aliments, le BPA étant le bisphénol le plus fréquemment détecté (Gonzales et al. 2020).

L'apport quotidien en bisphénols via l'alimentation peut être estimé à partir des teneurs en bisphénols des aliments. Ainsi, Liao et Kannan (2013) ont estimé que les apports quotidiens via l'alimentation de BPA, BPAF, BPAP, BPB, BPF, BPP, BPS et de BPZ, étaient compris entre 0.35 ng par kg de poids corporel pour le BPB et 45 ng par kg pour le BPA. Ces valeurs sont supérieures à la nouvelle DJA établie à 0.2 ng par kilogramme de poids corporel par jour par l'EFSA.

La présence de bisphénol dans le papier thermique utilisé dans les reçus et divers types de tickets peut être une source importante d'exposition humaine. D'autres sources d'exposition possibles, mais peu étudiées, comprennent l'inhalation ou l'ingestion de poussières.

2.2.2 Devenir des bisphénols dans l'organisme

Les données toxicocinétiques (TK) du BPA obtenues chez l'homme indiquent que le BPA est très bien absorbé au niveau intestin et que la quasi-totalité du BPA absorbé est métabolisée majoritairement en BPA glucuronide (BPAG) par l'UDP-glucuronyltransférase, lors du 1^{er} passage hépatique (Volkel et al. 2002) (6). L'importance de la fraction éliminée par un effet de premier passage (E_H) explique la faible biodisponibilité du BPA estimée à 0.9% chez le singe (Doerge et al. 2010) (7). Le BPAG qui est un métabolite inactif est rapidement et en totalité éliminé dans les urines (Thayer et al. 2015, figure 4).

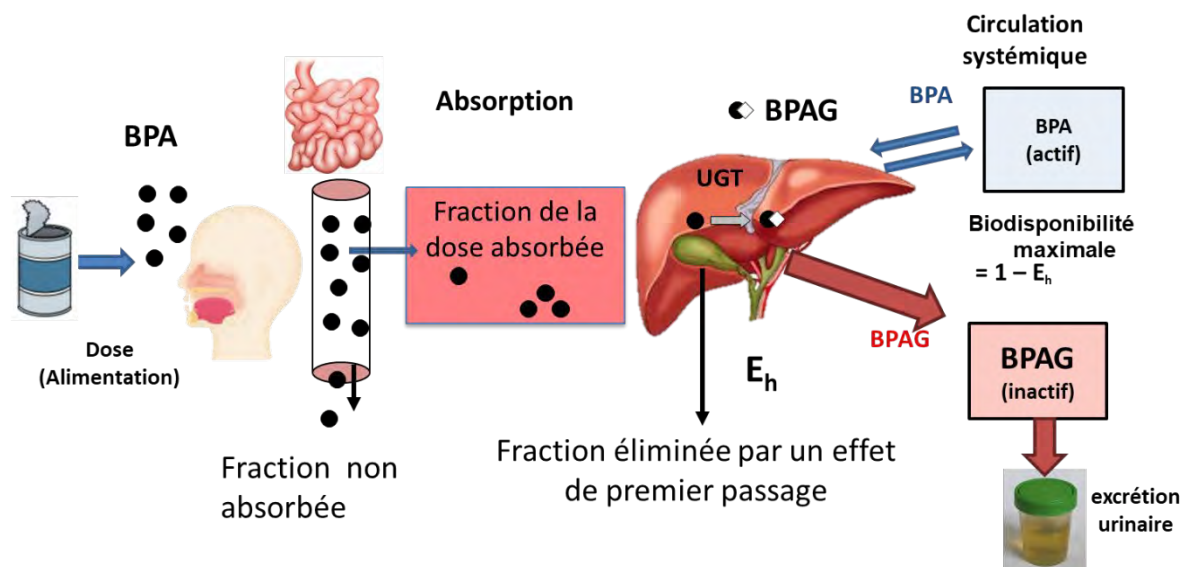


Figure 4 Devenir du Bisphénol A (BPA) dans l'organisme après son ingestion

Abréviations : BPAG : BPA glucuronide
 E_h : coefficient d'extraction hépatique
 UGT : UDP-glucuronyltransférase

La clairance du BPA chez l'homme a été estimée à 1.5 L/kg.h par allométrie (8) (9). Des données TK obtenues chez le porcelet ont permis de comparer le devenir du BPS à celui du BPA après une administration orale (figure 5, Gayraud et al. 2019) (10). La modélisation des données a montré que la quasi-totalité (99%) du BPS administrée par voie orale était absorbée alors que le taux d'absorption du BPA était de 77%. Selon le modèle, le BPS n'est pas métabolisé dans les entérocytes tandis que l'intestin contribuerait à la glucuronoconjugaison de 44 % de la fraction absorbée de BPA lors du premier passage intestinal. Alors que seulement 41 % de la fraction absorbée de BPS est glucuronoconjuguée dans le foie, la quasi-totalité (99 %) du BPA non métabolisé dans les entérocytes est glucuronoconjuguée lors du premier passage hépatique. L'absorption quasi-totale du BPS associée à l'absence de métabolisme dans les entérocytes et à un métabolisme hépatique pré-systémique modéré conduit à une biodisponibilité orale du BPS environ 100 fois supérieure à celle du BPA chez le porcelet (57.4 vs 0.50 %).

La clairance plasmatique du BPS estimée est environ 3.5 fois inférieure à celle du BPA (0.95 vs 3.41 L/kg.h soit 16 vs 57 ml/kg.min), ce qui indique que le BPS est éliminé

moins efficacement que le BPA et explique également l'effet limité de premier passage hépatique.

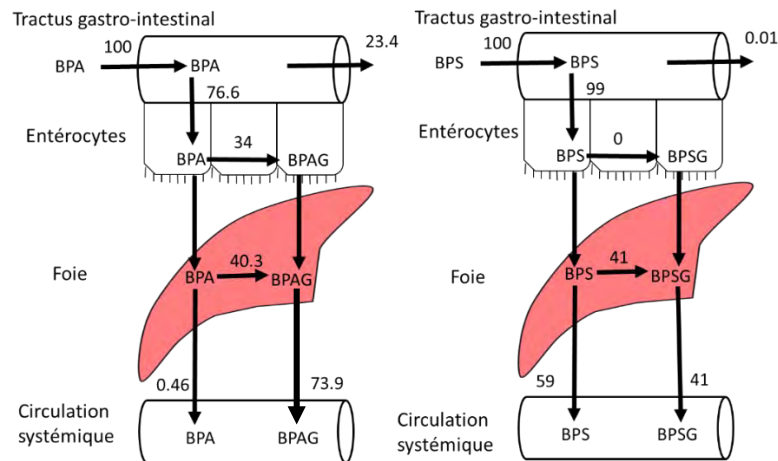


Figure 5: Résumé des principaux résultats du devenir du BPA et du BPS administrés par gavage oral aux porcelets (Gayrard et al. 2019)

BPA : Bisphénol A
 BPS : Bisphénol S
 BPAG : Bisphénol A glucuronide
 BPSG : Bisphénol S glucuronide

Des études *in vitro* ont montré que comme le BPA et le BPS, le BPAF et le BPF sont majoritairement métabolisés en leurs dérivés glucuro et sulfo conjugués (Cabaton et al. 2008, Gramec Skledar et Peterlin Mašič, 2016, Qu et al. 2021)(26-24-25) qui sont généralement éliminés dans les urines. Ainsi, des études toxicocinétiques réalisées chez différentes espèces dont les rongeurs, le porc, le singe et l'homme, ont montré que comme le BPA, le BPS, le BPF et le BPAF sont majoritairement éliminés dans les urines (Cabaton et al. 2006, Waidyanatha et al. 2019, Gayrard et al. 2019, Kmiri et al. 2020) (27-28-29-30).

Une étude récente réalisée avec le même modèle animal du porcelet a évalué les paramètres TK de 12 bisphénols, BPA, BPS, BPFL, BPZ, 3-3BPA, BP4-4, BPF, BPM, BPP, BPAF, BPAP et BPB (Gély et al. 2022)(11). Cette étude a montré que la clairance plasmatique des bisphénols était proche et variait de 40 à 60 mL/min/kg pour le 3-3BPA, le BPP, le BPFL, le BPA, le BPB, le BPF, le BPAP et le BPM. Les clairances plasmatiques des BP4-4, BPAF et BPZ étaient plus élevées et atteignaient environ 80

mL/min/kg. La clairance plasmatique moyenne du BPS (21 ml/min/kg) était environ 2 à 4 fois inférieure à celle de tous les autres bisphénols. Les bisphénols ont montré un large rang de variation de la biodisponibilité orale, avec des valeurs faibles inférieures à 5 % pour le 3-3BPA, le BPA, le BPAF, le BPB et le BPZ, des valeurs intermédiaires comprises entre 6 et 13 % pour le BP4-4, le BPAP, le BPF et le BPM et proches de 20 % pour BPP et BPFL. Le BPS a montré une biodisponibilité orale beaucoup plus élevée (59 %) par rapport à celle des autres bisphénols.

L'excrétion urinaire des 12 bisphénols a montré de larges variations, la fraction moyenne de la dose de bisphénol administrée par voie intraveineuse et collectée dans les urines a varié de 3.0 % (BPFL) à 76% (BPS). Cette fraction a été inférieure à 10% pour le BPM, le BPP et le BPFL. Cette faible fraction de la dose de bisphénol collectée dans les urines de 24h pourrait être expliquée par une sous-estimation de l'excrétion urinaire des bisphénols liée à une durée insuffisante de collecte des urines ou à la formation d'autres métabolites tels que les composés hydroxylés (Cabaton et al., 2008 ; Gramec Skledar et Peterlin Mašič, 2016) (26-24). Le poids moléculaire élevé de la forme conjuguée de certains bisphénols (de l'ordre ou supérieur à 500 g/mol pour BPM, le BPP et le BPFL) pourrait être à l'origine de leur excrétion biliaire, conduisant à une élimination fécale de ces bisphénols.

2.2.3 Liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques

La connaissance de la fraction libre (f_u) d'une substance dans le plasma est fondamentale pour prédire les concentrations plasmatiques de sa forme libre (active, C_f) à partir de la mesure des concentrations plasmatiques totales (C_{tot}) (Equation 1).

$$C_f = f_u \times C_{tot} \quad \text{Equation 1}$$

Il a été montré que le BPA se lie aux protéines plasmatiques chez l'homme (Csanady et al., 2002) (21), la brebis (Corbel et al., 2013) (20), le rat (Teeguarden et al., 2005) (23) et le macaque *Cynomologus* (Kurebayashi et al., 2002) (22). Chez toutes ces espèces, la fraction libre du BPA plasmatique représente environ 5-6 % du BPA.

La comparaison interspécifique de la liaison du BPA et du BPS aux protéines plasmatiques a montré que la fraction libre en BPA varie entre 4 et 7 % selon les espèces (Gayrard et al. 2023) (12). Les valeurs de la fraction libre du BPA obtenues chez le rat et la souris étaient très proches (6%), les valeurs les plus élevées ont été observées chez le singe parmi toutes les espèces adultes.

En revanche, la fraction libre de BPS a présenté de larges variations interspécifiques (de 3% à 20%). Les valeurs de la fraction libre du BPS plus élevées ont été observées chez les souris (20 %) avec des valeurs intermédiaires chez le rat et le singe (14 %).

La fraction libre de BPA a été la plus faible chez la femmes enceinte et la brebis adulte. Elle n'a pas différé au cours de la grossesse chez la femme (4 %) et a été plus élevée dans le plasma de cordon humain (7 %). Chez les brebis gravides, les fractions libres de BPA n'ont également pas différé des valeurs déterminées chez les brebis non gravides (4 %) et ont été inférieures aux valeurs estimées chez le fœtus ovin (9 %).

La fraction libre de BPS a été supérieure à celle du BPA chez toutes les espèces sauf les ovins, la plus grande différence étant observée chez les souris (6 % contre 20 %). Chez les ovins, la fraction libre de BPS a été proche voire inférieure à la fraction libre de BPA, étant d'environ 3 % chez les ovins adultes et 7 % chez les fœtus. La fraction libre de BPS est également restée inchangée tout au long de la grossesse chez la femme (9 % contre 10 %) et a été légèrement plus élevée dans le plasma de cordon (12 %).

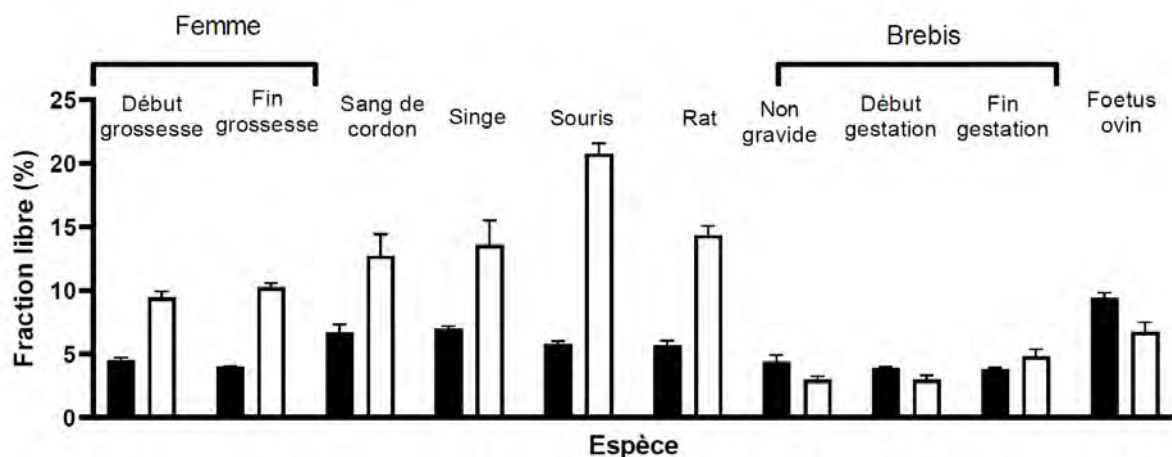


Figure 6: Fractions libres du BPA (barres noires) et du BPS (barres blanches) chez différentes espèces (Gayrard et al. 2023)(12)

La fraction libre de BPS s'est avérée de 2 à 3.5 fois supérieure à celle du BPA chez toutes les espèces sauf les ovins. Ce résultat a des implications pour l'évaluation de l'exposition puisque pour une même concentration plasmatique totale de BPA et de BPS, les concentrations de BPS libre prédites sont environ deux fois supérieures à celles de BPA, chez l'homme.

La liaison de 8 bisphénols émergents (BPA, BPS, BPF, BPE, BPB, BPAF, Bisphénol A BADGE et BPM) à l'albumine et l'alpha-1-glycoprotéine acide a été déterminée par chromatographie liquide biomimétique, en utilisant des colonnes dont les phases stationnaires contiennent des protéines plasmatiques. Cette étude a montré que le pourcentage de bisphénol lié à l'albumine estimé par des méthodes *in silico* est plus faible pour le BPS (87%) comparativement aux autres bisphénols : BPF (92%), BPE (94%), BPA (96%), BPB et BADGE (97%), BPAF et BPM (99%), Grumetto et al. 2019 (13).

2.3 Le bisphénol A et ses substituts : exposition humaine

Étant donné que les bisphénols sont rapidement métabolisés et excrétés dans l'urine, plusieurs études de biosurveillance ont évalué l'exposition humaine en mesurant les concentrations urinaires des bisphénols totaux (somme des formes non conjugués et conjugués). En effet, l'urine représente une matrice biologique pertinente pour la biosurveillance des substances non persistantes tels que les bisphénols car leurs concentrations dans l'urine sont supérieures aux concentrations plasmatiques et parce que les prélèvements d'urine sont non invasifs. De plus, pour les composés majoritairement éliminés dans les urines comme le BPA, les quantités collectées dans les urines de 24h constituent des marqueurs pertinents de l'exposition humaine à ces composés.

C'est la raison pour laquelle, les études de biosurveillance évaluent généralement l'exposition aux bisphénols à partir des données des concentrations urinaires. Une étude a ainsi estimé les quantités journalières moyennes de bisphénols auxquelles

l'homme est exposé, à partir des données concentrations urinaires obtenues dans 30 pays et publiées entre 2000 et 2019 (Wang et al. 2020) (31).

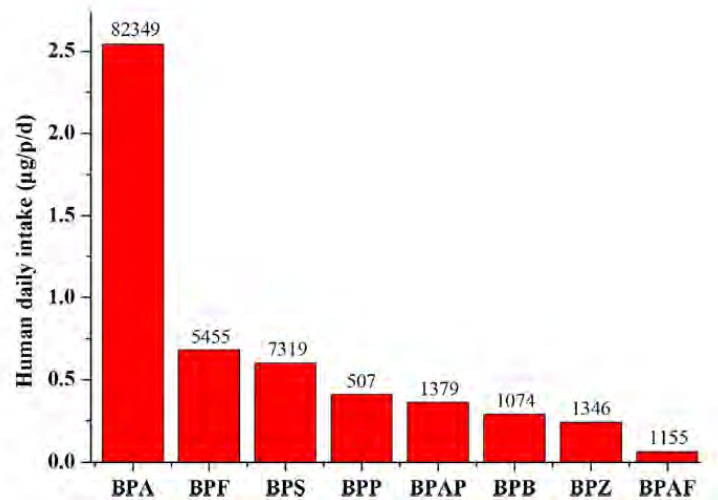


Figure 7: Quantités journalières moyennes (μg par personne et par jour) de BPA et de ses analogues auxquelles l'homme est exposé. Le nombre indiqué sur chaque histogramme correspond au nombre d'échantillons urinaires à partir desquels l'estimation a été réalisée (Wang et al. 2020)(31)

Les bisphénols dont les niveaux d'exposition sont les plus élevés sont dans l'ordre : BPA, BPF, BPS, BPP, BPAP, BPB, BPZ et BPAF, avec des apports quotidiens respectifs estimés respectivement à 2.53. 0.68. 0.60. 0.41. 0.36. 0.29. 0.24 et 0.06 μg par personne et par jour. La dose quotidienne de BPA est environ de 4 à 42 fois supérieure à celle des autres bisphénols.

La figure 8 illustre les apports quotidiens des analogues du BPA dans différents pays/régions. L'Arabie saoudite est le pays avec les apports quotidiens les plus élevés en BPS, BPF et BPAF, soit respectivement, 7.87, 3.46 et 1.76 $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{jour}$. La France et le Vietnam sont classés deuxième et troisième pour les apports quotidiens en BPS avec des valeurs correspondantes de 2.72 et 2.56 $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{jour}$. Les Pays-Bas et le Canada sont les deux pays qui sont classés deuxième et troisième pour les apports quotidiens en BPF avec les valeurs correspondantes de l'ordre de 1 $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{jour}$.

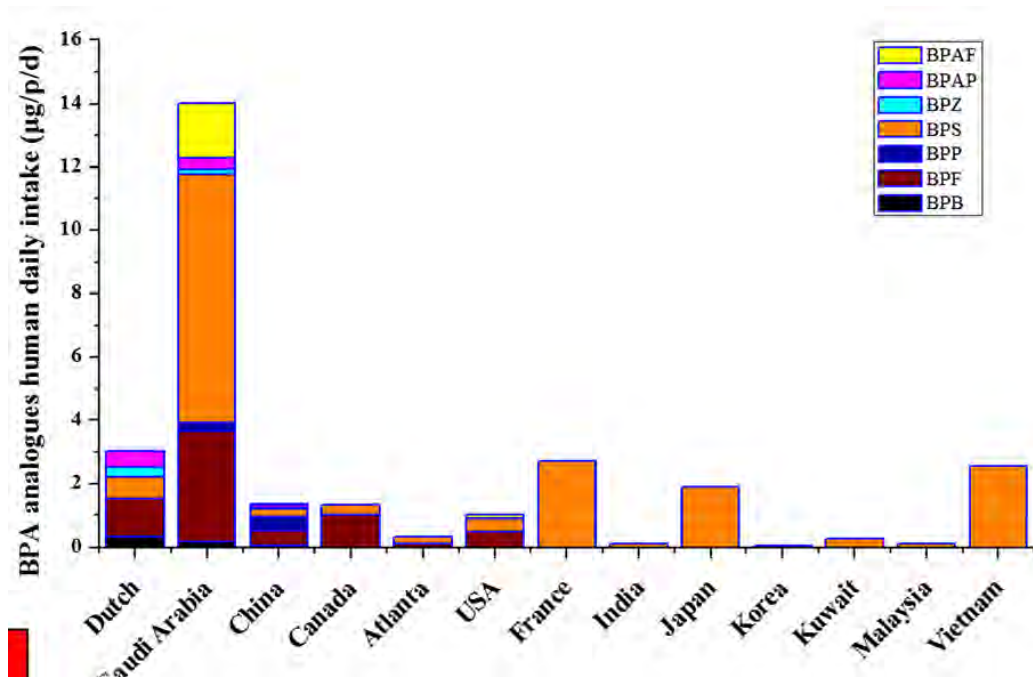


Figure 8: Quantités journalières moyennes (μg par personne et par jour) des analogues du BPA auxquelles l'homme est exposé en fonction du pays d'origine

Dans le cadre du programme national français de biosurveillance, l'étude Esteban a montré que le BPA, le BPS et le BPF étaient quantifiés dans la totalité des échantillons issus de la cohorte comprenant 500 enfants et 900 adultes, âgés de 6 à 74 ans inclus dans l'étude entre avril 2014 et mars 2016. Les moyennes géométriques en BPA étaient respectivement de 2.25 et 2.69 $\mu\text{g}/\text{g}$ de créatinine chez les enfants et les adultes ; de 0.44 et 0.53 $\mu\text{g}/\text{g}$ de créatinine pour le BPS et de 0.26 et 0.31 $\mu\text{g}/\text{g}$ de créatinine pour le BPF (4).

3 Etude expérimentale : Evaluation de la liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques : influence des paramètres physicochimiques

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Produits chimiques

Les bisphénols, Bisphénol S (BPS) (pureté $\geq 98\%$), Bisphénol A (BPA) (pureté $\geq 99\%$), Bisphénol E (BPE) (pureté $\geq 98\%$), 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl) propane

(3-3BPA) (pureté ≥ 97%), Bisphénol B (BPB) (pureté ≥ 98%), Bis(4-hydroxyphényl)-2,2-dichloroéthylène (BPC) (pureté ≥ 98%), Bisphénol BP (BPBP) (pureté ≥ 98%), Bisphénol F (BPF) (pureté ≥ 98%), Bisphénol FL (BPFL) (pureté ≥ 97%), Bisphénol Z (BPZ) (pureté ≥ 98%), 4,4'-Dihydroxybiphényle (BP4-4) (pureté ≥ 97%), Bisphénol AP (BPAP) (pureté ≥ 99%), Bisphénol AF (BPAF) (pureté ≥ 97%), Bisphénol P (BPP) (pureté ≥ 98%), Bisphénol M (BPM) (pureté ≥ 99 %) (Figure 1) et antipyrine (pureté ≥ 98 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA)..

La figure 9 illustre la structure chimique des bisphénols utilisés BPA, BPS, BPF, BP4-4, 3-3BPA, BPFL, BPZ, BPM, BPP, BPAF, BPAP, BPB, BPE, BPC et BPBP et le tableau 2 donne leurs caractéristiques physico chimiques.

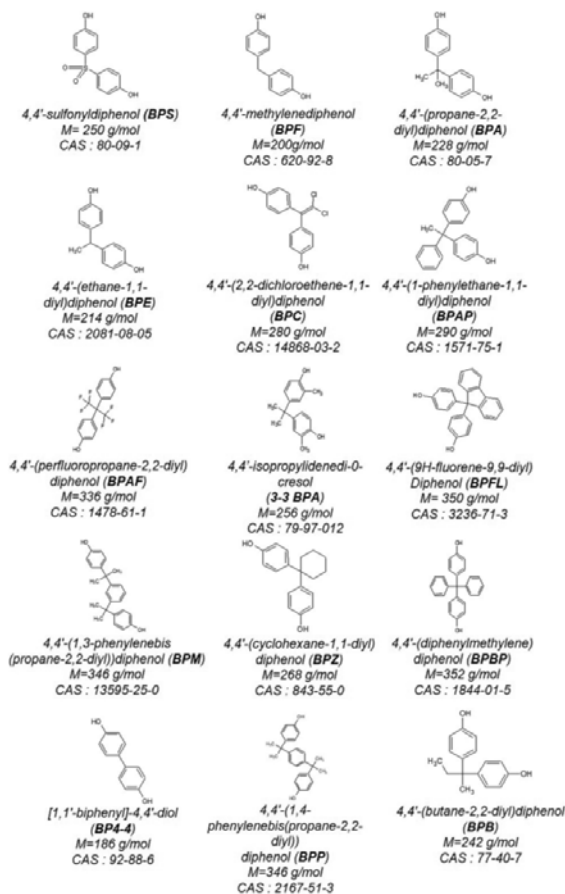


Figure 9: Structure chimique et identification des bisphénols de l'étude

Tableau 2: Caractéristiques physicochimiques des bisphénols de l'étude

	Molecular weight (Da) ^a	pKa ^a acidity constant	log P ^b partition coefficient
BPFL	350.13	9.14	5.59
BPS	250.03	8.44	2.15
BPBP	352.15	9.21	6.02
BPZ	268.15	9.45	5.00
BPC	280.01	9.23	3.95
BPM	346.19	9.47	7.04
BPP	346.19	9.49	7.04
BPAF	336.06	8.90	5.02
BPAP	290.13	9.36	5.00
BP4-4	186.07	9.45	2.52
BPE	214.10	9.59	3.18
BPF	200.08	9.66	2.91
3-3BPA	256.15	9.74	4.81
BPA	228.12	9.52	3.32
BPB	242.13	9.49	4.44

3.1.2 Préparation des solutions de bisphénols

Dans un premier temps, des solutions mères de chacun des bisphénols ont été préparées à la concentration de 5 mmole/L dans de l'acétonitrile conformément au protocole décrit dans le tableau 3.

Tableau 3 Préparation des solutions mères de bisphénol.

Bisphénols	Masse molaire (g)	Pureté	Pesée (mg)	Concentration (mg/mL)
BPA	228.29	98	23.30	1.16
BPS	208.27	0.98	21.25	1.06
BPF	200.23	0.98	20.43	1.02
BP4-4	186.21	0.97	19.20	0.96
3-3BPA	256.34	0.97	26.43	1.32
BPFL	350.41	0.97	36.12	1.80
BPZ	268.35	0.98	27.38	1.37
BPM	346.46	0.99	35.0	1.75
BPP	346.46	0.98	35.35	1.77
BPAF	336.23	0.97	34.66	1.73
BPAP	290.36	0.99	29.33	1.46
BPB	242.31	0.98	24.72	1.24
BPE	214	0.98	21.84	1.10
BPC	280	0.98	28.57	1.43
BPBP	352	0.98	35.92	1.80

À partir des solutions mères de chaque bisphénol, une solution de surcharge contenant les 15 bisphénols a été préparée à la concentration de 50µmol/L dans un mélange eau-acétonitrile (50/50, V/V).

Cette solution, conservée à 4°C a été utilisée pour surcharger en bisphénols le tampon de dialyse (tampon phosphate salé) aux concentrations de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µmoles/L utilisées pour l'étude de la liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques. Les solutions mères de chaque bisphénol ont également été utilisées pour préparer les gammes de bisphénols dans du tampon phosphate salé et du plasma porcin en vue du dosage des bisphénols dans les compartiments de dialyse.

Le tableau 4 indique la méthode de préparation extemporanée des solutions de bisphénols dans le tampon de dialyse à partir de la solution contenant les 15 bisphénols à la concentration de 50 µmol/L, en vue des expériences de dialyse à l'équilibre.

Tableau 4 Préparation des solutions de bisphénols dans le tampon de dialyse (volume de 30mL)

Concentration en bisphénols dans le tampon de dialyse (µmoles/L)	Volume de la solution de bisphénols à 50µmoles/L (µL)
0.25	150
0.5	300
1	600
2	1200
5	3000

Pour préparer les gammes de bisphénols, trois solutions de surcharge contenant tous les bisphénols aux concentrations de 0.5, 5 et 100 µmoles/L ont été préparées dans un mélange eau/acétonitrile (50/50, v/v) à partir des solutions mères des bisphénols à la concentration de 5mmoles/L.

Le tableau 5 indique la méthode de préparation des gammes de bisphénols dans le plasma porcin et le tampon de dialyse à partir des solutions de surcharge contenant tous les bisphénols aux concentrations de 0.5, 5 et 100 µmoles/L.

Tableau 5 Méthode de préparation des gammes de bisphénols dans le tampon de dialyse et le plasma (volume final de 5ml).

Concentration (μ moles/L)	Concentration des solutions (μ moles/L)	Volume (en μ L)
0.01	0.5	100
0.025	0,5	250
0.05	0,5	500
0.1	5	10
0.25	5	250
0.5	5	500
1	50	10
2.5	100	125
5	100	250
10	100	500

3.1.3 Dialyse à l'équilibre

La liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques a été évaluée par la technique de la dialyse à l'équilibre. Cette méthode repose sur l'utilisation de deux demi-cellules en Téflon (Diachema 16-10, Braun Scientetec, ZA, Courtaboeuf, Les Ulis, France). Ces demi-cellules sont séparées par une membrane en cellulose semi-perméable qui exclut le passage des substances de poids moléculaire supérieur à 5000 Da.

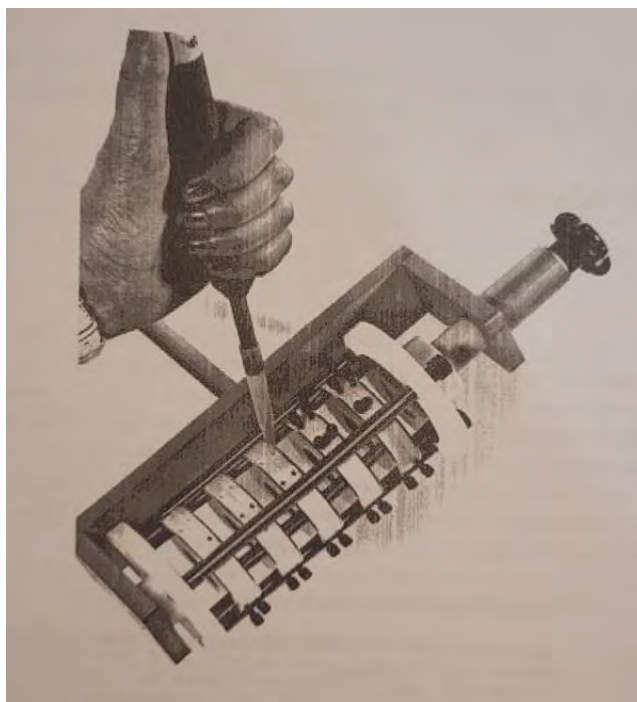


Figure 10- Remplissage d'une cellule de dialyse(35)

900 μ L de plasma et 900 μ L de solution du mélange de bisphénols dans le tampon sont introduits respectivement dans le compartiment plasma et le compartiment tampon de la cellule de dialyse. Les 20 cellules de dialyse sont ensuite soumises à une rotation constante de 20 rotations par minute à 37°C, afin de mimer le compartiment sanguin.

Les dialyses ont été réalisées en triplicate pour chacune des 5 concentrations de bisphénol testées : 0.5, 1, 3, 4 et 5 μ mole/L afin d'analyser la possible concentration-dépendance de la liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques. L'ensemble des mesures ont été répétées pour trois durées d'incubation (4, 8 et 24h) afin de déterminer le temps nécessaire à l'obtention de l'équilibre.

Pour chaque série de dialyse réalisée avec 20 cellules, le tampon de dialyse surchargé avec les 15 bisphénols aux 5 concentrations testées ont été dialysés contre du plasma porcin (3 répétitions par concentration) et contre du tampon. Les dialyses contre du tampon ont été réalisées afin de déterminer le temps nécessaire à l'équilibre.

Trois séries de dialyse ont été réalisées pendant des temps d'incubation respectifs de 4, 8 et 24h.

La figure 10 représente schématiquement une série de dialyse avec 20 cellules.

A la fin de la dialyse, les contenus des compartiments contenant le plasma et le tampon sont recueillis et conservés à -20°C en vue du dosage des bisphénols.

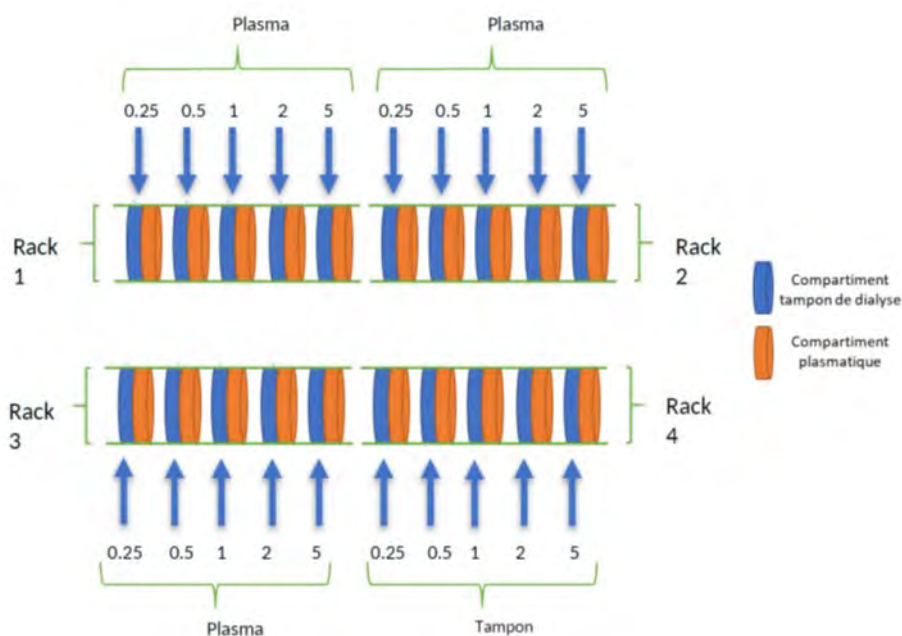


Figure 11 Représentation d'une série de dialyse avec 20 cellules de dialyse

3.1.4 Dosage des bisphénols

Les bisphénols ont été dosés par une méthode HPLC couplée à la spectrométrie de masse selon une méthode adaptée de celle précédemment décrite (Gely et al 2021) en utilisant une gamme de concentration allant de 0,01 à 10 $\mu\text{moles/L}$. Brièvement, 100 μL de méthanol sont ajoutés à 100 μL d'échantillon afin de précipiter les protéines. Après une agitation pendant 1 min à 140 rotations par minutes, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 20000g à 4°C. 200 μL de surnageant ont été sous azote à 50 °C et reconstitués avec 200 μL d'un mélange méthanol/eau: 50/50 (v/v). Les bisphénols ont été séparés sur une colonne Raptor Biphenyl (100 \times 2,1 mm ; 2,7 μm , Restek) à 0,3 mL/min et 40 °C en utilisant une élution en gradient eau/méthanol.

Seuls 13 des 15 bisphénols ont été quantifiés. Les concentrations en BP4-4 et BPC seront évaluées ultérieurement.

Le tableau 6 donne la limite de quantification (LOQ) du dosage des 15 bisphénols.

Tableau 6 Limite de quantification (LOQ) du dosage des bisphénols (Gely et al. 2021)

Bisphénols	LOQ (μM)
BPA	0.022
BPS	0.048
BPF	0.025
3-3BPA	0.195
BPFL	0.014
BPZ	0.019
BPM	0.014
BPP	0.144
BPAF	0.003
BPAP	0.003
BPB	0.021
BPE	0.023
BPBP	0.014

3.1.5 Analyse des données

Selon le principe de la dialyse, à l'équilibre, les concentrations de la forme libre des bisphénols (F pour Free) sont identiques de part et d'autre de la membrane (figure 11).

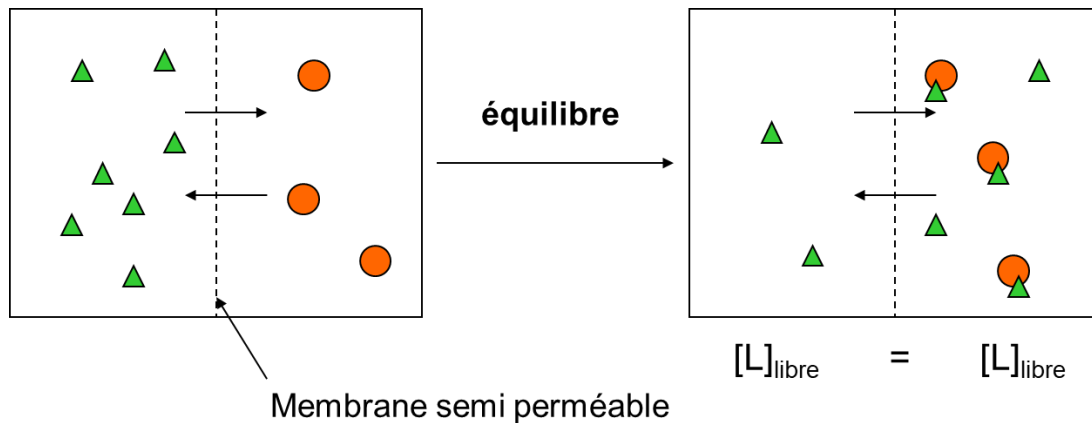


Figure 12 Principe de la méthode de dialyse à l'équilibre. Les symboles ronds représentent les protéines du plasma séparé du tampon de dialyse par une membrane semi-perméable qui exclut le passage des substances de poids moléculaire supérieur à 5000 Da. Les triangles verts symbolisent les ligands (L). A l'équilibre la concentration en ligand libre [L] est identique de part et d'autre de la membrane.

A l'équilibre, la concentration en bisphénols du tampon de dialyse correspond à la concentration de la forme libre des bisphénols appelée F (pour Free). La concentration en bisphénols du compartiment plasmatique (TOT) est la somme des concentrations des formes libres et des formes liées aux protéines plasmatiques (B pour Bound) des bisphénols. La différence entre les concentrations des compartiments plasmatiques et tampon donne les valeurs de la concentration de la forme liée aux protéines plasmatiques.

La fraction libre des bisphénol (f_u) est calculée à partir de l'équation 2

$$f_u = \frac{F}{TOT} \quad \text{Equation 2}$$

Les valeurs moyennes de F, B et f_u et l'écart-type ont été calculés à partir des 3 répétitions des mesures.

Lorsque le tampon de dialyse surchargé en bisphénols est dialysé contre du tampon, à l'équilibre, les concentrations en bisphénol sont équivalentes dans chacun des deux compartiments.

Le temps nécessaire à l'équilibre a été estimé à partir du ratio (exprimé en pourcentage) des concentrations en bisphénols entre les deux compartiments tampon, déterminé pour les différents temps d'incubation.

3.2 Résultats-discussion

3.2.1 Temps d'incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre

Les figures 13 à 23 montrent les valeurs du ratio (exprimé en pourcentage) entre les concentrations en bisphénols des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 μM de BPA, 3-3BPA, BPZ, BPS, BPAP, BPAF, BPB, BPBP, BPE, BPF et BPFL.

Le ratio des concentrations en bisphénols des deux compartiments tampon est moins variable et se rapproche de 100% pour le temps d'incubation de 24h pour les Bisphénols BPA, 3-3BPA, BPZ, BPS, BPAP, BPAF, BPB, BPBP, BPF et BPFL. Le Bisphénol E semble avoir un comportement différent : le ratio des concentrations en bisphénols des deux compartiments est proche de 100% au bout de 4h pour les fortes concentrations (2 et 5 μM) et tend vers les 24h pour les concentrations étudiées les plus faibles (0,25, 0,5 et 1 μM)

Ce résultat indique que le temps d'incubation nécessaire à l'équilibre est de 24h, soit une durée supérieure à celle qui a été précédemment utilisée pour évaluer la liaison du BPA et du BPS aux protéines plasmatiques, soit 1h (Gayrard et al. 2023) (12). Cette durée d'incubation avait été estimée comme nécessaire pour atteindre l'équilibre par Csanady et al. (2002) (21).

Pour cette raison, les fractions libres des différents analogues du BPA seront évaluées uniquement au temps d'incubation 24h.

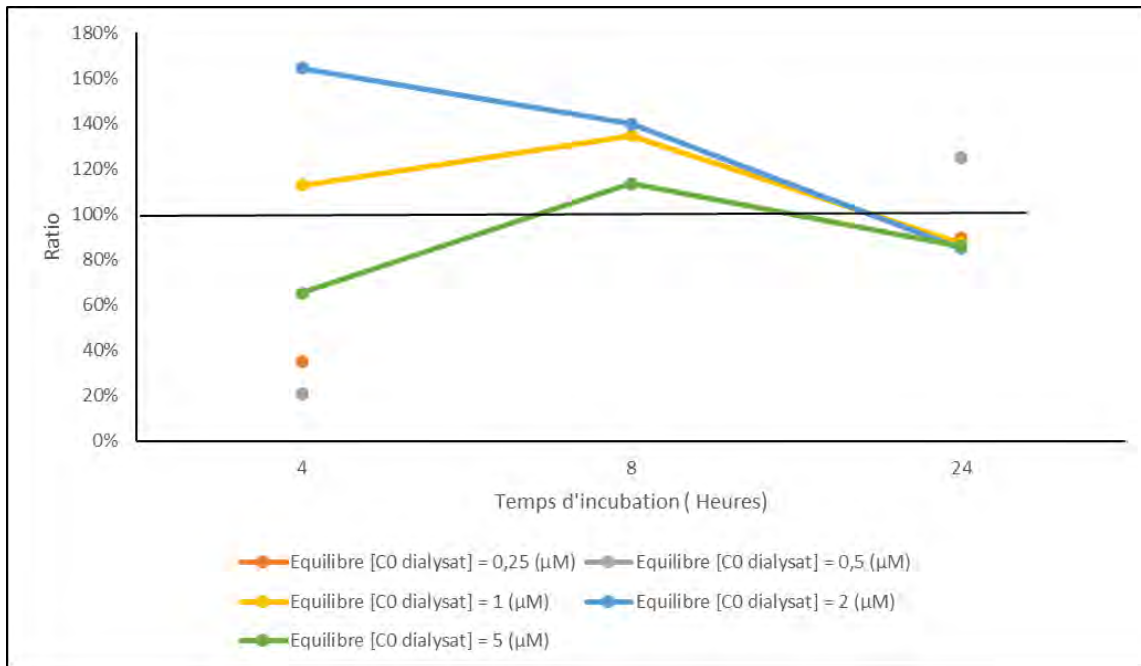


Figure 13- Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol A des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

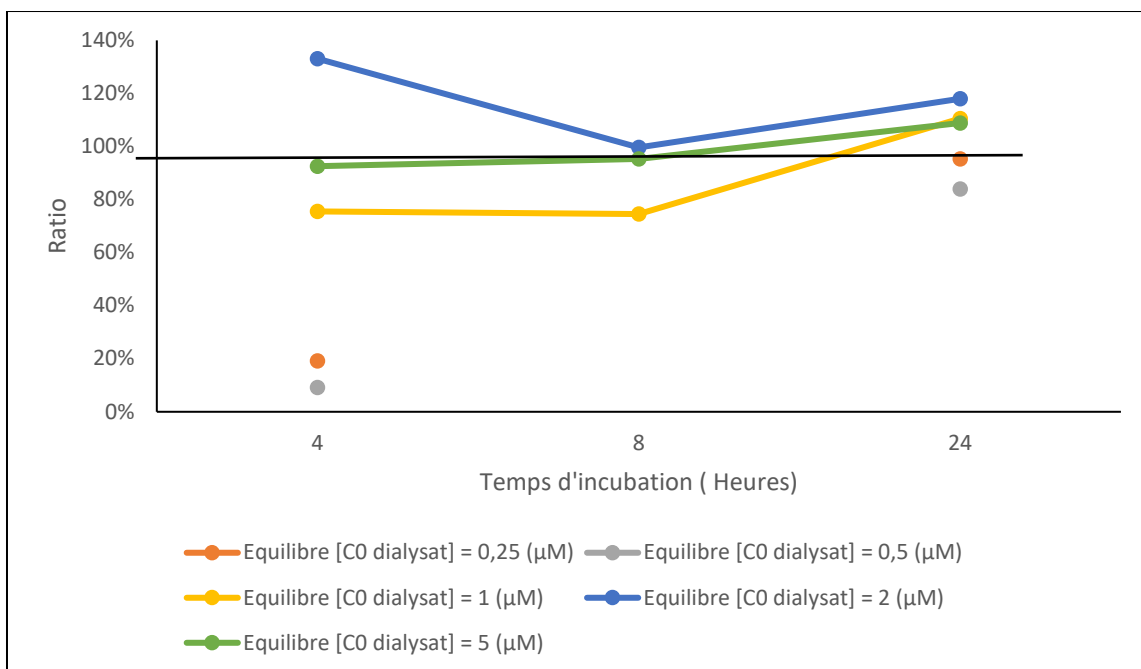


Figure 14- Ratio (%) entre les concentrations en 3-3 BPA des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

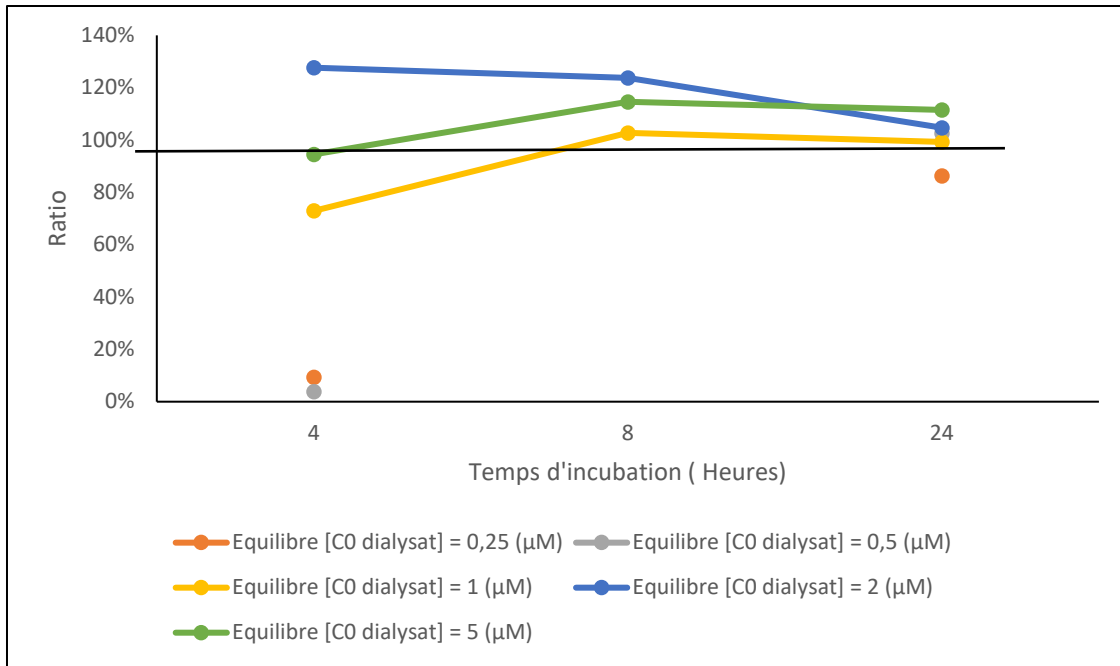


Figure 15- Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPZ des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

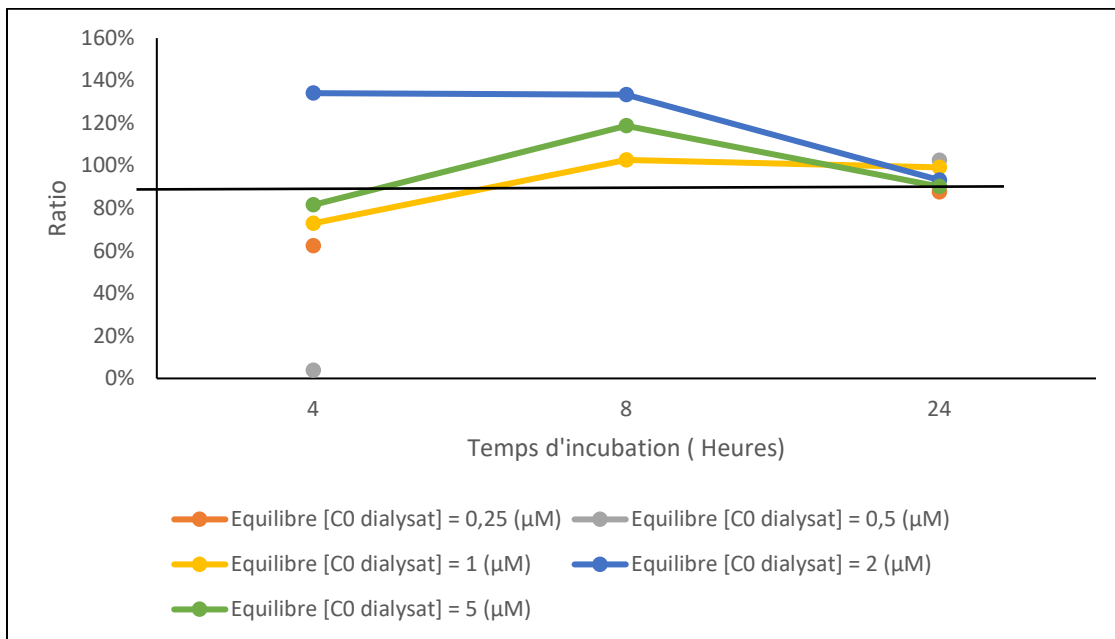


Figure 16 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol S (BPS) des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

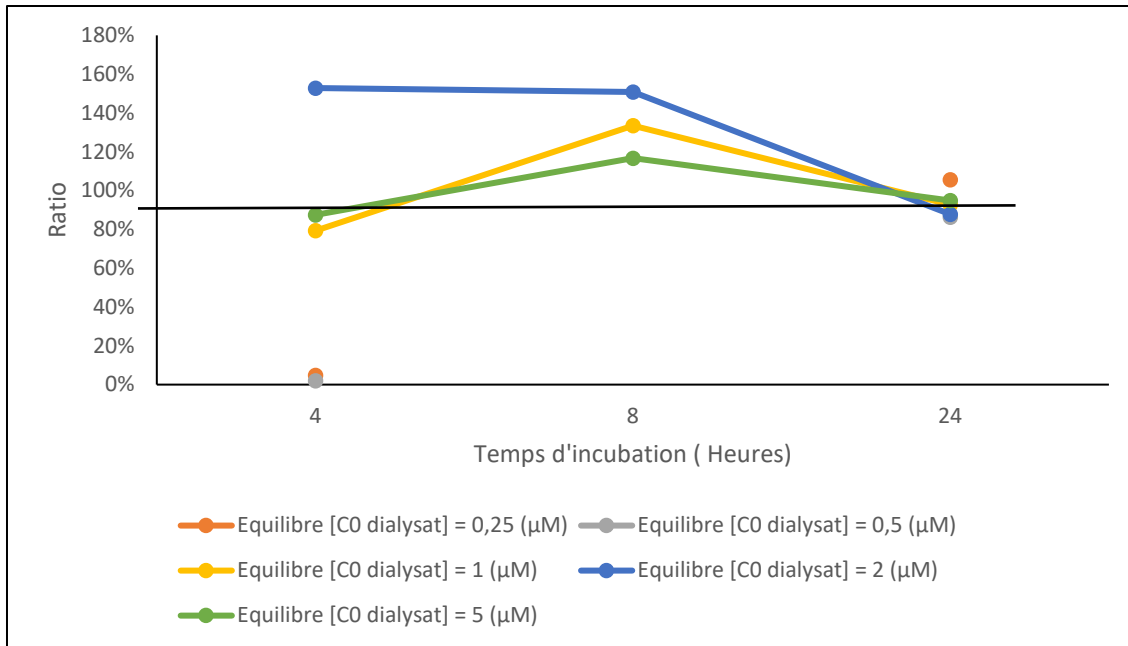


Figure 17 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPAP des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

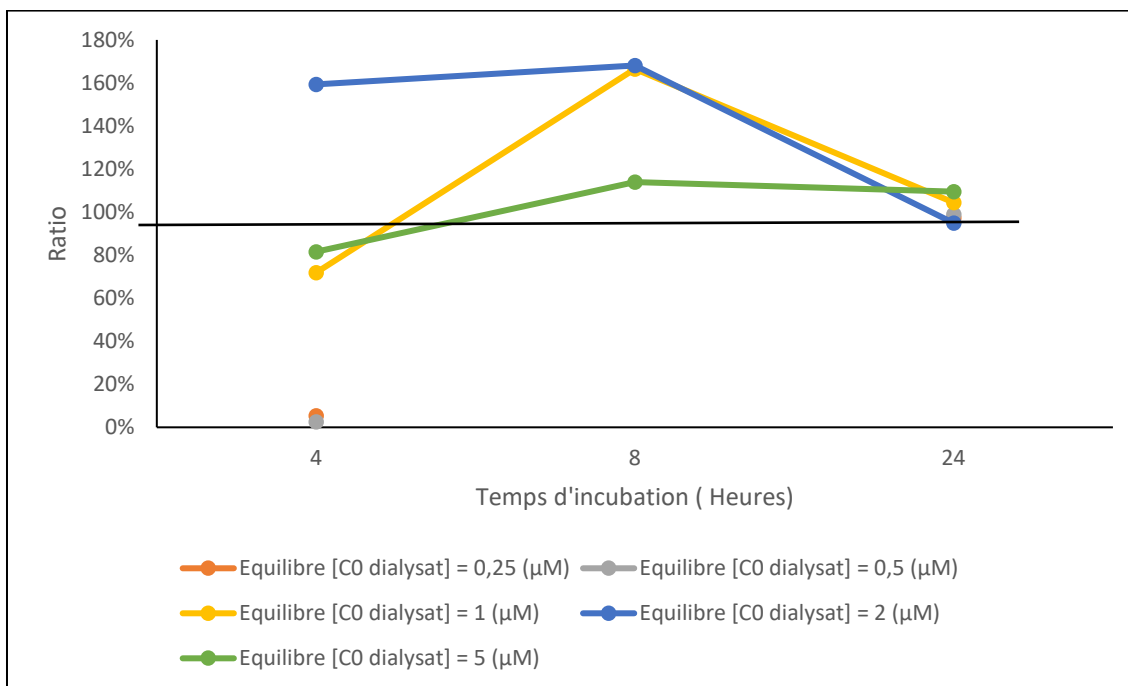


Figure 18 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPAF des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

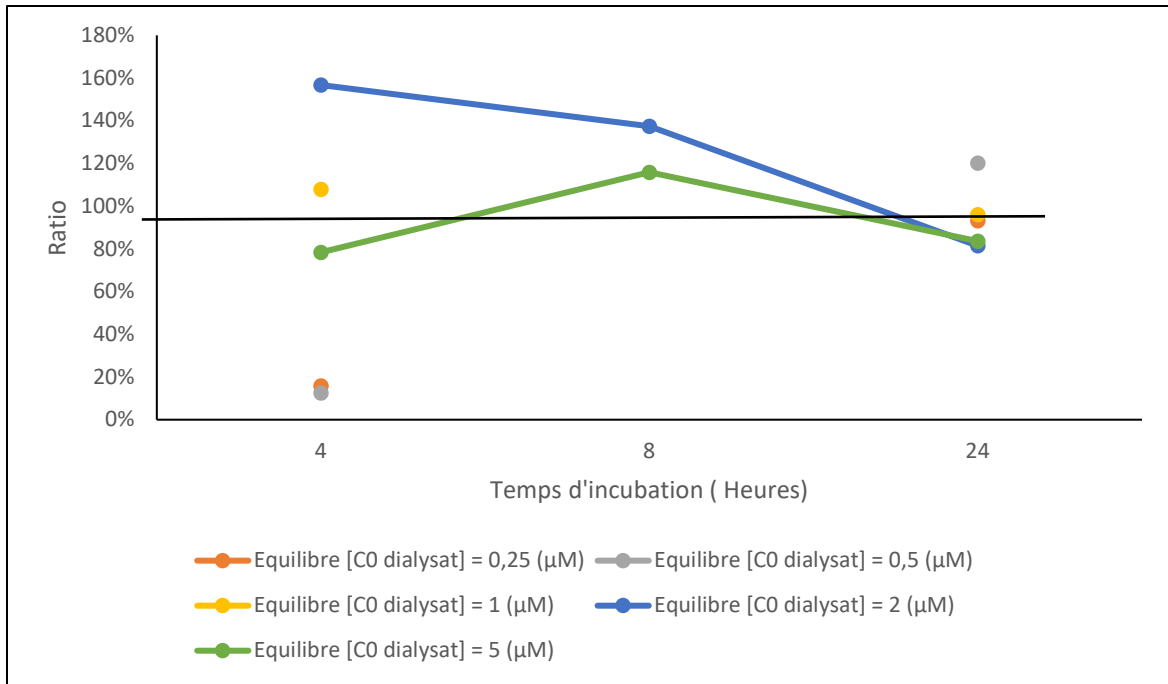


Figure 19 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPB des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

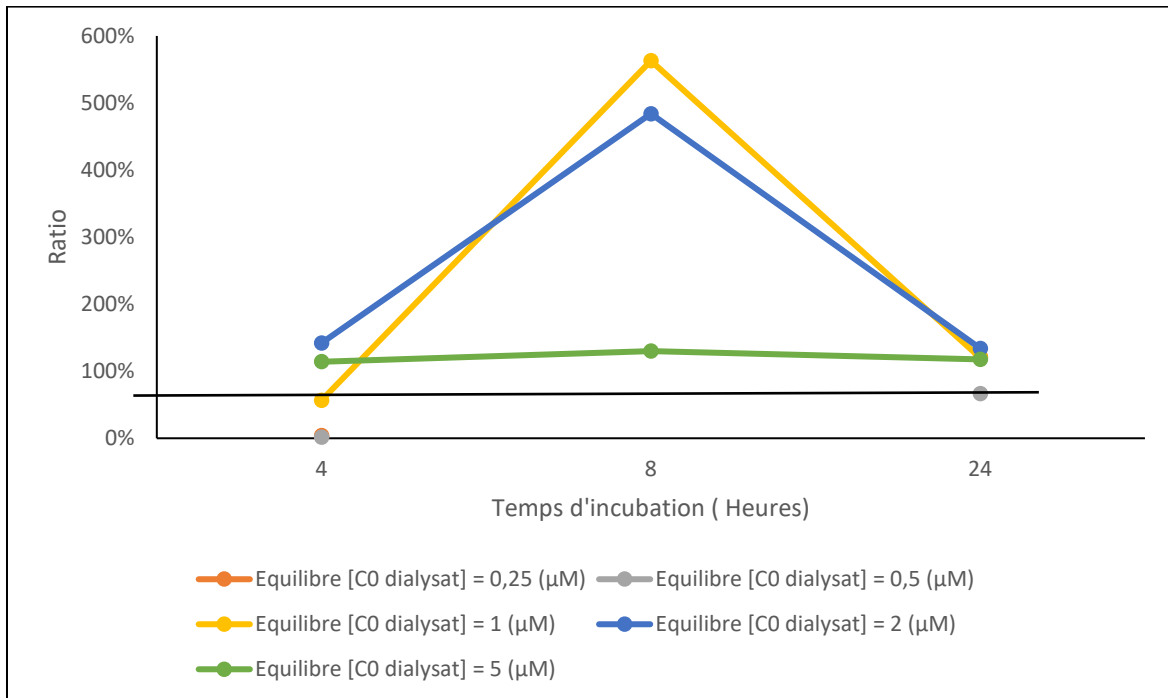


Figure 20 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPBP des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

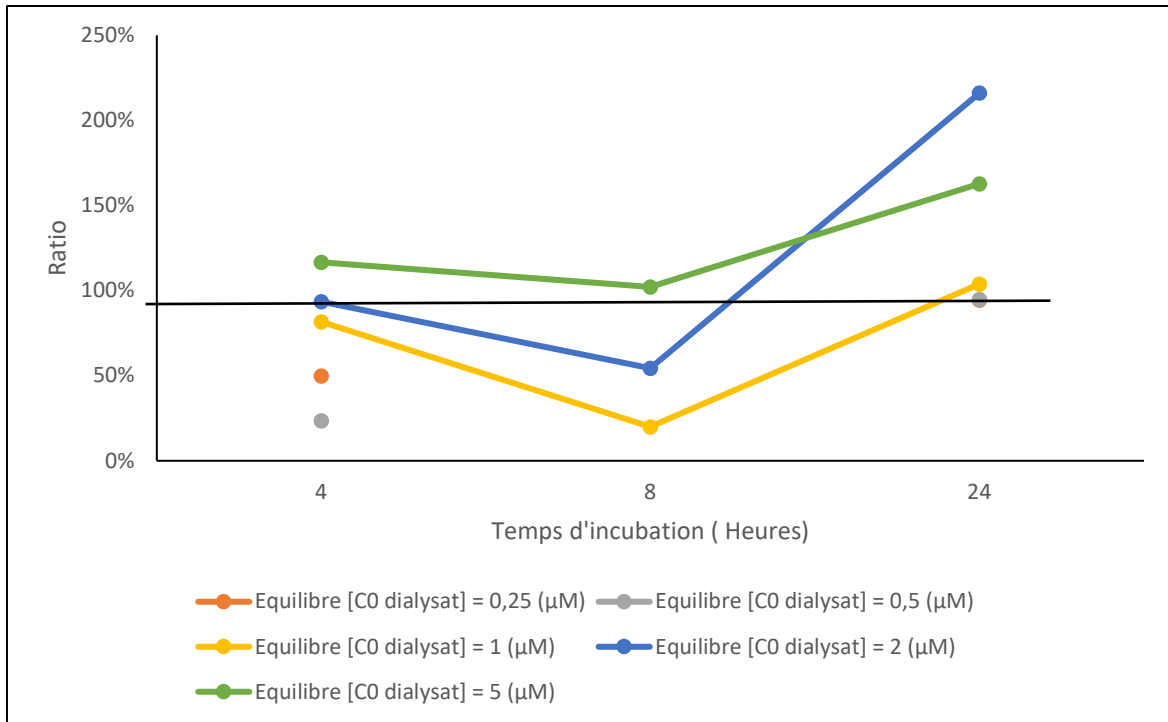


Figure 21 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol E (BPE) des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

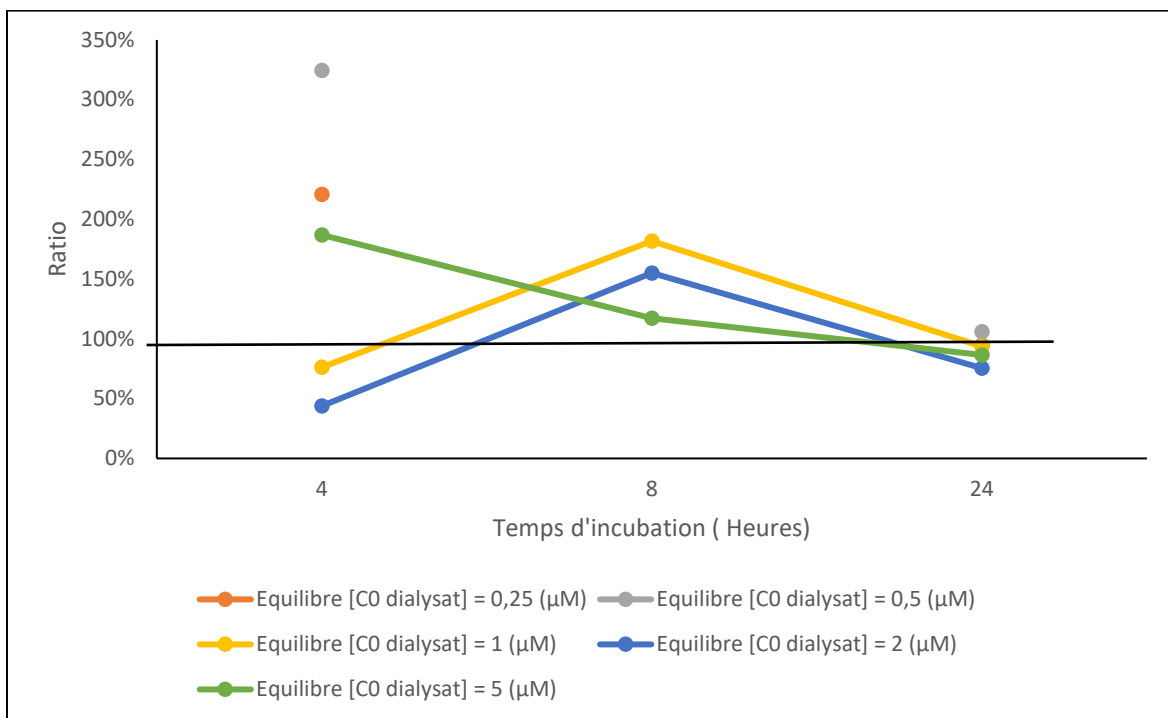


Figure 22 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol F (BPF) des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

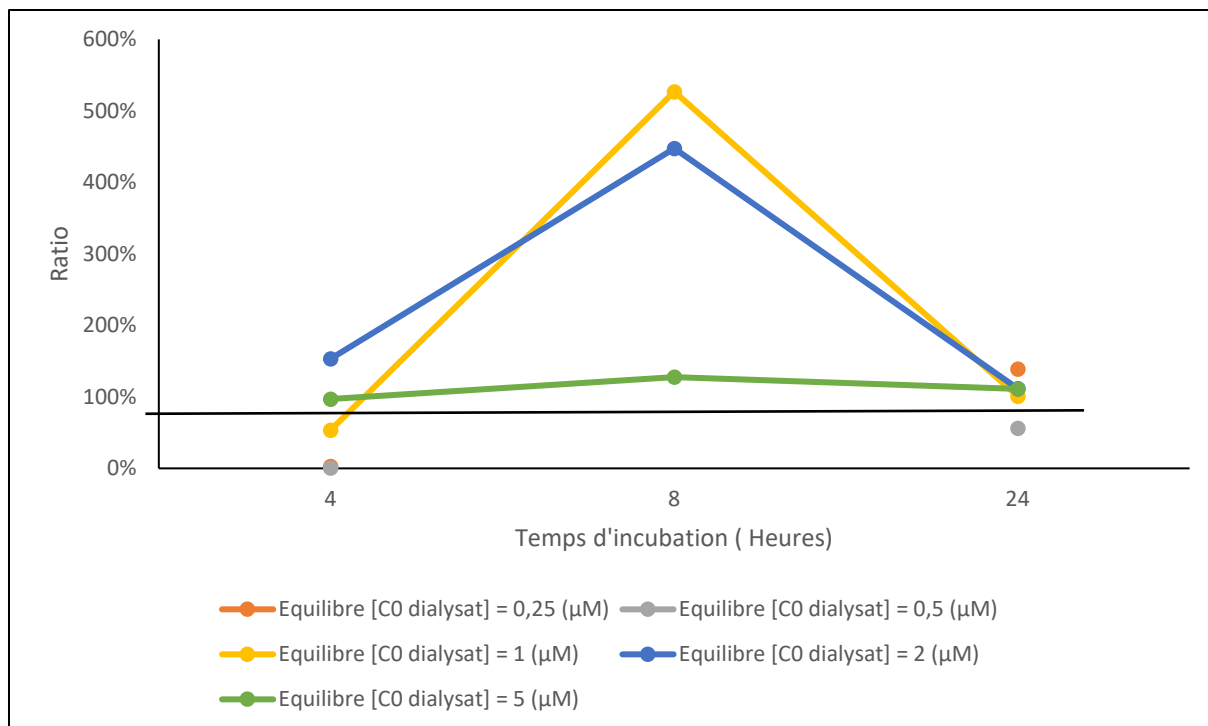


Figure 23 Ratio (%) entre les concentrations en bisphénol BPFL des deux compartiments tampon en fonction du temps d'incubation pour les concentrations nominales de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 µM

3.2.2. Evaluation d'une dépendance à la concentration de la fraction libre en bisphénols.

Le tableau 7 donne les valeurs moyennes (\pm écart-type) des concentrations de bisphénol libre (F) et lié aux protéines plasmatiques (B, µmoles/L) ainsi que la fraction libre moyenne de bisphénol. Les résultats obtenus pour les BPFL, BPAF, BPAP, BPM, BPP et BPBP ne sont pas présentés car les concentrations libres de ces analogues ont été inférieures à la LOQ de la méthode pour au moins l'un des réplicas testés.

Tableau 7. . Concentrations de bisphénol libre (F) et lié (B, $\mu\text{moles/L}$) et fraction libre de bisphénol (fu, %) obtenus en fonction de la concentration nominale de bisphénol au temps d'incubation de 24h

	0.25 $\mu\text{moles/L}$			0.5 $\mu\text{moles/L}$			1 $\mu\text{moles/L}$			2 $\mu\text{moles/L}$			5 $\mu\text{moles/L}$		
	F	B	Fu %	F	B	Fu %	F	B	Fu %	F	B	Fu %	F	B	Fu %
BPA	0.01 \pm 0	0.29 \pm 0.23	5.44 \pm 3.40	0.02 \pm 0	0.36 \pm 0.20	5.82 \pm 2.52	0.04 \pm 0	0.58 \pm 0.17	6.44 \pm 1.56	0.07 \pm 0.03	1.15 \pm 0.25	6.2	0.25 \pm 0.01	3.57 \pm 1.77	7.41 \pm 3.35
BPS	INFLOQ	INFLOQ	INFLOQ	0.02 \pm 0	0.80 \pm 0.36	5.24 \pm 3.62	0.04 \pm 0	1.06 \pm 0.19	3.03 \pm 0.84	0.07 \pm 0.03	1.15 \pm 0.25	2.52 \pm 1.18	0.25 \pm 0.01	3.57 \pm 1.77	5.64 \pm 1.17
BPF	0.05 \pm 0.01	0.53 \pm 0.40	4.13 \pm 4.04	0.02 \pm 0	0.45 \pm 0.29	6.60 \pm 3.92	0.05 \pm 0	0.74 \pm 0.20	7.35 \pm 2.73	0.11 \pm 0.06	1.37 \pm 0.13	7.60 \pm 3.41	0.38 \pm 0.03		12.51 \pm 2.80
3- 3BPA	INFLOQ	-	-	INFLOQ	-	-	INFLOQ	-	-	0.04	1.21 \pm 0,61	3.77 \pm 2.14	0.11 \pm 0.01	3.33 \pm 0.42	3.10 \pm 0.44
BPZ	INFLOQ	-	-	INFLOQ	-	-	0,01	3.48 \pm 0.28	1.39	0.02	1.36 \pm 0.57	1.47 \pm 0.5	0.04 \pm 0.01	3.48 \pm 0,28	1.17 \pm 0.19
BPB	INFLOQ	-	-	INFLOQ	-	-	0,02	1.34 \pm 0.51	1.41 \pm 0.46	0.03 \pm 0.01	2.22 \pm 0.47	1.45 \pm 0.77	0.11	5.76 \pm 0.15	1.92 \pm 0.22
BPE	0.01	0.10 \pm 0.04	11.65 \pm 5.87	0.02	0.46 \pm 0.17	5.24 \pm 2.34	0.05 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02	7.90 \pm 0.64	0.08 \pm 0.03	0.94 \pm 0.22	7.35 \pm 2.15	0.27 \pm 0.06	2.44 \pm 0.17	10.07 \pm 2.72

Parmi les bisphénols analysés, les fractions libres du 3-3BPA, du BPS et du BPB associées aux faibles concentrations (0.25 , 0.5 μ moles/L) n'ont pas pu être calculées, les concentrations libres étant inférieures à la limite de quantification (LOQ). La fraction libre du 3-3BPA a pu seulement être évaluée pour les concentrations de 2 et 5 μ moles/L.

La figure 20 illustre les valeurs moyennes (\pm écart-type) des fractions libres des bisphénols.

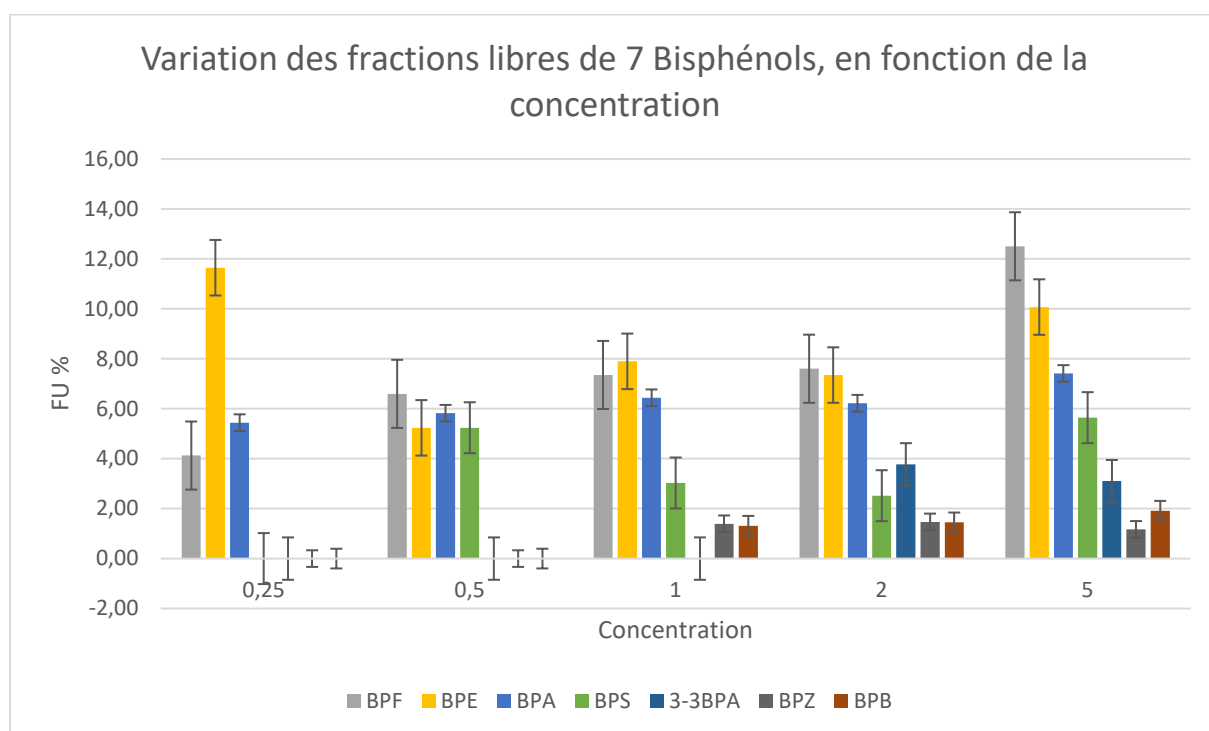


Figure 24- Fractions libres des Bisphénols à un temps d'incubation de 24h

Les valeurs des fractions libres des bisphénols fluctuent avec la concentration de bisphénol testée sans qu'il y ait une augmentation systématique et marquée de cette fraction avec la concentration en bisphénol total, à l'exception du BPF dont la fraction libre augmente avec la concentration. Ces faibles fluctuations peuvent être expliquées par la proximité des concentrations en bisphénol libre et les LOQ du dosage pour les faibles concentrations en bisphénol total (inférieures à 1 μ M). A partir de ces résultats, les bisphénols peuvent être classés en fonction de leur fraction libre.

Les bisphénols qui ont la fraction libre la plus élevée (entre 7 et 10%) sont les BPE et BPF suivis du BPA (5-7%), du BPS (3-6%), du 3,3'BPA (3-4%) et des BPB et BPZ (1-2%).

A partir des valeurs des LOQ des dosages, la fraction libre des BPFL, BPM, BPAF, BPAP et BPBP peut être estimée comme inférieure à 1%. La fraction libre estimée du BPP est inférieures à 3 % en raison de la valeur élevée de sa LOQ.

L'absence d'augmentation marquée de la fraction libre des bisphénols avec la concentration en bisphénol total indique que la liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques est non saturable et serait attribuée à l'albumine.

Les fractions libres de BPA comprises entre 5 et 6 % sont en adéquations avec les données précédemment obtenues chez d'autres espèces dont l'homme (5%, Csanady et al., 2002) (21), le rat (6%, Teeguarden et al., 2005) (23), le singe (5.5%, Kurebayashi et al., 2002)(22), la souris (5.9%, Gayrard et al. 2023) (12) et la brebis (6%, Corbel et al.,2013) (20). A la concentration en BPA de 5 μ moles/L, la fraction libre moyenne plus élevée (7,41%) a été associée à un écart type plus important.

La fraction libre de BPS estimée chez le porcelet (3-6%) est inférieure aux valeurs déterminées par dialyse à l'équilibre chez d'autres espèces comme l'homme, le singe et les rongeurs (de 10 à 20%), (Gayrard et al. 2023) (12) et proche de celle évaluée chez la brebis (3%), Gayrard et al. 2023) (12). Gayrard et al. (2023) (12) avaient mis en évidence de larges variations interspécifiques de la liaison du BPS aux protéines plasmatiques. Ces auteurs avaient également mis en évidence une relation inverse entre les fractions libres de BPA (BPS) et les concentrations d'albumine plasmatique chez les différentes espèces examinées, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle l'albumine est la principale protéine de liaison du BPA et du BPS dans le plasma et suggère que la variabilité interspécifique de la liaison du BPA (BPS) aux protéines plasmatiques résulterait de différences d'affinité de la liaison de ces substances à l'albumine.

Si l'on considère que les bisphénols se lient essentiellement à l'albumine, la fraction libre que nous avons évaluée, peut être comparée à la fraction non liée à l'albumine et l'alpha-1-glycoprotéine acide estimée par des méthodes *in silico* à 13% pour le BPS, 8% pour le BPF, 6% pour le BPE, 4% pour le BPA, 3% pour le BPB et 1% pour le BPAF

et le BPM (Grumetto et al. 2019) (13). A l'exception du BPS pour lequel ces estimations de la fraction libre (13%) sont très supérieures à celle que nous avons évalué chez le porcelet (3-6%), nos résultats confortent les estimations *in silico* de la fraction libre des bisphénols émergents.

4 Conclusion

A l'échelle mondiale, la population générale est exposée aux bisphénols et ses dérivés via son environnement (poussières sédimentées ou présentes dans le milieu aérien), la manipulation d'objets contenant des composés de bisphénols et dérivés et l'alimentation. Les voies d'exposition sont multiples (orales et cutanées). Suite à l'interdiction d'utilisation du Bisphénol A en 2015 selon la réglementation Française, l'exposition aux analogues de celui-ci a considérablement augmenté.

L'objectif de cette étude expérimentale était de comparer les fractions libres du BPA et de ses analogues sur un modèle de porcelet, à l'aide de la dialyse à l'équilibre et d'un dosage des bisphénols par HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats de cette expérimentation ont montré i) que l'équilibre était atteint au bout de 24 heures d'incubation dans le système, Et ii) que les analogues du bisphénol A, notamment le BPE et le BPF, présentent une fraction libre plus élevée que le Bisphénol A.

Toutefois, cette expérimentation présente des limites : huit des quinze bisphénols étudiés ont montré des concentrations libres inférieures à la limite de quantification pour au moins l'un des réplicas testés pour les concentrations 0,25, 0,5, 1, 2 μM (BPFL, BPAF, BPAP, BPM, BPP et BPBP). A la concentration de 5 μM , les fractions libres calculées pour le BPAF (0,78%) et le BPAP (0,39%) sont largement inférieures à celles des autres analogues étudiés. De plus, le faible nombre de répétitions des mesures ($n=3$) amène une incertitude importante sur les résultats de l'étude. L'intervalle de confiance étant trop important, la même expérimentation devrait être réalisée avec un plus grand nombre de répétitions d'une concentration élevée (5 $\mu\text{mol/L}$). Enfin, il est à noter que les concentrations qui peuvent être utilisées au vu de l'importance de la liaison aux protéines plasmatiques et des valeurs des LOQ du dosage sont également largement supérieures à celles auxquelles l'Homme est exposé : Selon le rapport de l'ANSES la population Française est exposée à des doses de l'ordre du nanomol/L, soit au moins 1000 fois inférieures aux concentrations testées dans ce modèle.

Cette étude montre cependant l'importance des travaux scientifiques pour éclairer la décision publique en matière de santé publique. En effet, en santé publique,

l'évaluation d'un risque est le produit du danger et d'une exposition. Le danger représente la capacité intrinsèque d'un agent à provoquer des effets néfastes sur la santé, et l'exposition est calculée en fonction de la fréquence et de la quantité en contact avec l'Homme. Afin de diminuer les risques, diverses stratégies peuvent être appliquées pour diminuer l'exposition, dont la substitution de substances. Les réglementations mises en place ont permis de diminuer les risques liés au Bisphénol A, en diminuant l'exposition de la population. Comme identifiée dans le rapport de 2013 (ANSES, substitution du Bisphénol A, 2013) (1), « l'ANSES soulignait que le Bisphénol A ne serait pas remplacé par une substance unique, mais par différents composés, en fonction de son utilisation ». Or les résultats de cette étude (et plus largement d'études menées dans la communauté scientifique) posent la question du risque associé à certains analogues du BPA.

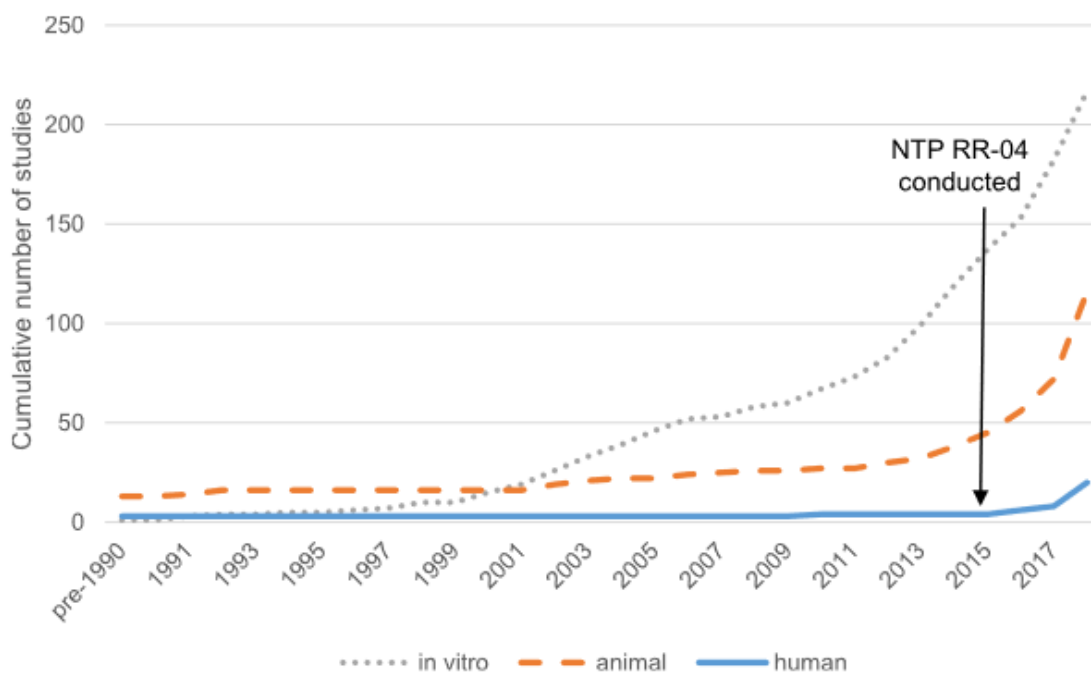


Figure 25- Evolution du nombre d'études in vivo, in vitro et chez l'Homme portant sur les Bisphénols et leurs analogues au cours du temps (34)

L'évolution importante du nombre d'études in vitro, in vivo et chez l'Homme portant sur les Bisphénols depuis 2015 (34) dénotent de l'inquiétude grandissante sur la famille de Bisphénols, mais également du besoin de données toxicologiques sur le danger des Bisphénols.

Par ailleurs, pour diminuer l'incertitude associée aux résultats scientifiques, limitant la mise en place d'une politique de santé publique, il est nécessaire de disposer d'un grand nombre d'expérimentations. C'est en particulier ce que le rapport de l'ANSES en 2013 sur les perturbateurs endocriniens recommande également d'améliorer l'acquisition de données sur l'exposition de la population aux Bisphénols. Cette acquisition de données est notamment réalisée grâce au programme de Biosurveillance Esteban. En 2019, le rapport Esteban conclu sur l'importance de suivre l'imprégnation de la population sur les Bisphénol A, S et F (32).

En conclusion, afin d'éviter de futures substitutions regrettables, la stratégie d'évaluation des risques doit être plus globale. La dangerosité des composés chimiques doit être évaluée sur l'ensemble d'une famille des composants chimiques, en étudiant les similarités structurelles par exemple. La quantification de l'exposition doit également être plus documentée, grâce à un meilleur recueil des informations avant commercialisation des molécules (un des objectifs de REACH), des études de biosurveillance de grande ampleur et la standardisation des méthodes de quantification, qui permettront une meilleure compréhension et analyse de l'exposition à ces produits.

Références Bibliographique

1. Anses, « Substances reprotoxiques et perturbateurs endocriniens Composés de la famille des bisphénols : bisphénols M, S, B, AP, AF, F et BADGE », Rapport d'expertise collective, mars 2013.
2. ECHA, "The use of bisphenol A and its alternatives in thermal paper in the EU during 2014 – 2022, juin 2020.
3. Dodds EC, Lawson W. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*. juin 1936;137(3476):996-996.
4. Mindeguia P. Développement d'un modèle toxicocinétique pour évaluer l'exposition foetale au bisphénol A et au bisphénol A-glucuronide Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017
5. Cwiek-Ludwicka K. Bisphenol A (BPA) in food contact materials - new scientific opinion from EFSA regarding public health risk. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 2015
6. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15: 1281–1287.
7. Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Woodling, K. A. & Fisher, J. W. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248, 1–11 (2010).
8. Thayer, K. A. et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ. Int.* 83, 107–115 (2015)
9. Collet, S. H. et al. Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284, 323–329 (2015)
10. Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Grandin, F.C., Collet, S.H., Mila, H., Viguié, C., Gély, C.A., Rabozzi, B., Bouchard, M., Léandri, R., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs. *Environ. Health Perspect.* 127, 77005
11. Gély, C.A., Lacroix, M.Z., Roques, B., Toutain, P.L., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., 2022 Comparison of toxicokinetic properties of eleven analogues of Bisphenol A in pig after intravenous and oral administrations. *Environment International* 171: 107722.
12. GAYRARD V, VIGUIE C, CABATON N, PERSON E, ZALCO D, GRANDIN F, BERREBI A, METSU D, TOUTAIN PL, PICARD-HAGEN N. 2023. Importance of relative binding of bisphenol A and bisphenol S to plasma proteins for predicting their in vivo potencies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 466: 116477
13. L. Grumetto, F. Barbato, et G. Russo, « Scrutinizing the interactions between bisphenol analogues and plasma proteins: Insights from biomimetic liquid chromatography, molecular

- docking simulations and in silico predictions », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 68, p. 148-154, mai 2019,
14. Gély, C.A., Huesca, A., Picard-Hagen N., Toutain P.L., Berrebi, A., Gauderat, G., Gayraud, V., Lacroix, M.Z., 2021. A new LC/MS method for specific determination of human systemic exposure to bisphenol A, F and S through their metabolites: Application to cord blood samples. *Environment International* 151: 106429.
 15. C. Liao et K. Kannan, « Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no 19, p. 4655-4662, mai 2013
 16. C. Liao et K. Kannan, « A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China », vol. 31, no 2, p. 319-329, 2014
 17. K. Karsauliya, M. Bhateria, A. Sonker, et S. P. Singh, « Determination of Bisphenol Analogues in Infant Formula Products from India and Evaluating the Health Risk in Infants Associated with Their Exposure », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 69, no 13, p. 3932-3941, avr. 2021
 18. N. González et al., « Concentrations of nine bisphenol analogues in food purchased from Catalonia (Spain): Comparison of canned and non-canned foodstuffs », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 136, p. 110992, févr. 2020
 19. M. K. Morgan et M. S. Clifton, « Exposure to Triclosan and Bisphenol Analogues B, F, P, S and Z in Repeated Duplicate-Diet Solid Food Samples of Adults », *Toxics*, vol. 9, no 3, p. 47, mars 2021
 20. Corbel T, Gayraud V, Viguié C, Puel S, Lacroix MZ, Toutain P-L, et al. 2013. Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol Reprod* 89:11
 21. Csanády GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. 2002. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 76:299–305;
 22. 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. *Toxicol Sci* 68:32–42; doi:10.1093/toxsci/68.1.32.
 23. Teeguarden JG, Waechter JM, Clewell HJ, Covington TR, Barton HA. 2005. Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci* 85:823–838
 24. D. Gramec Skledar et L. Peterlin Mašič, « Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 47, p. 182-199, oct. 2016, doi: 10.1016/j.etap.2016.09.014.W.

25. Qu et al., « Exploration of xenobiotic metabolism within cell lines used for Tox21 chemical screening », *Toxicology in Vitro*, vol. 73, p. 105109, juin 2021, doi: 10.1016/j.tiv.2021.105109.
26. Cabaton et al., « Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions », *Toxicology in Vitro*, vol. 22, no 7, p. 1697-1704, oct. 2008, doi: 10.1016/j.tiv.2008.07.004.
27. N. Cabaton, M.-C. Chagnon, J.-C. Lhuguenot, J.-P. Cravedi, et D. Zalko, « Disposition and Metabolic Profiling of Bisphenol F in Pregnant and Nonpregnant Rats », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no 26, p. 10307-10314, déc. 2006, doi: 10.1021/jf062250q.
28. S. Waidyanatha et al., « Toxicokinetics and bioavailability of bisphenol AF following oral administration in rodents: A dose, species, and sex comparison », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 373, p. 39-47, juin 2019, doi: 10.1016/j.taap.2019.04.015.
29. V. Gayrard et al., « Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs », *Environ Health Perspect*, vol. 127, no 7, p. 077005, juill. 2019, doi: 10.1289/EHP4599.
30. I. Khmiri et al., « Toxicokinetics of bisphenol-S and its glucuronide in plasma and urine following oral and dermal exposure in volunteers for the interpretation of biomonitoring data », *Environment International*, vol. 138, p. 105644, mai 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.105644.
31. H. Wang, Z. Liu, J. Zhang, R.-P. Huang, H. Yin, et Z. Dang, « Human exposure of bisphenol A and its analogues: understandings from human urinary excretion data and wastewater-based epidemiology », *Environ Sci Pollut Res*, vol. 27, no 3, p. 3247-3256, janv. 2020, doi: 10.1007/s11356-019-07111-9.
32. C. Fillol et al., « Exposure of the French population to bisphenols, phthalates, parabens, glycol ethers, brominated flame retardants, and perfluorinated compounds in 2014–2016: Results from the Esteban study », *Environment International*, vol. 147, p. 106340, févr. 2021, doi: 10.1016/j.envint.2020.106340.
33. Y. Takao, H. C. Lee, S. Kohra, et K. Arizono, « Release of Bisphenol A from Food Can Lining upon Heating. », *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*, vol. 48, no 4, p. 331-334, 2002
34. Pelch K, Wignall JA, Goldstone AE, Ross PK, Blain RB, Shapiro AJ, et al. A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology*. 1 août 2019;424:152235.
35. HARVARD APPARATUS, documentation technique DIANORM

ETUDE DE LA LIAISON DES BISPHENOLS AUX PROTEINES PLASMATIQUES CHEZ LE PORCELET

RESUME en français

L'exposition aux perturbateurs endocriniens, en particulier le bisphénol A (BPA), suscite des inquiétudes croissantes en santé publique. Bien que le BPA ait été remplacé dans de nombreux produits de consommation depuis 2015, ses analogues structuraux soulèvent des préoccupations similaires. Ce travail adopte une approche intégrative en combinant les résultats de l'expérimentation sur le porcelet, avec des données bibliographiques.

Les résultats posent des questions sur le risque associé aux analogues du BPA, soulignant la nécessité d'une approche plus globale et transverse de l'évaluation des risques avant toute action législative.

La croissance du nombre d'études sur les analogues du bisphénol A depuis 2015 semble également confirmer la nécessité d'une stratégie d'évaluation des risques plus globale, englobant la dangerosité des composés et une quantification documentée de l'exposition, notamment grâce à des études de biosurveillance approfondies et à la standardisation des méthodes de quantification.

Study of the binding of bisphenols to plasma proteins on piglets

Abstract in English

Exposure to endocrine disruptors, specifically Bisphenol A (BPA) raises public health concern. Although BPA have been widely replaced from consumer goods products since 2015, structural analogs are equally questioned and raising similar concerns. This study takes an integrated approach, combining results from experiments on piglets with bibliographic data.

Findings raise questions about the risks associated with BPA analogs, highlighting the need for a more comprehensive approach of risk study prior to legislative action.

The increasing number of studies on BPA analogs since 2015 is another cue calling for a global risk assessment, inclusive of composites dangers and a quantitative study of public exposure, particularly through extensive biomonitoring studies and harmonized methods for quantification across studies.

DISCIPLINE administrative : PHARMACIE

MOTS-CLES :

Binding, Bisphénol A, Bisphénol analogs, Pharmacokinetics, Pig model, Food can, Food packaging, Esteban, ANSES,

Perturbateurs endocriniens

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III Paul Sabatier
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, Chemin des Maraîchers
31062 TOULOUSE Cedex 9

Directeur de thèse : Véronique GAYRARD