



## 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 : 16077

**To cite this version :**

Gondin, Coralie. *Évaluation de l'absorption vésicale du bisphénol a et du bisphénol A-glucuronide chez la brebis*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 105 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# EVALUATION DE L'ABSORPTION VÉSICALE DU BISPHÉNOL A ET DU BISPHÉNOL A-GLUCURONIDE CHEZ LA BREBIS

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**GONDIN Coralie**

Née, le 28 mars 1990 à Chambéry (73)

---

**Directeur de thèse : Mme Nicole HAGEN**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Etienne CHATELUT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Nicole HAGEN**

**Mme Véronique GAYRARD**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



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

**Directrice** : Madame Isabelle CHMITELIN

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. AUTFAGE André, *Pathologie chirurgicale*  
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
MDELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*  
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*  
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. MILON Alain, *Microbiologie moléculaire*  
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. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*  
M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*  
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*  
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*  
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*  
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*  
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*  
M. SANS Pierre, *Productions animales*  
Mme TRUMEL Catherine, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des aliments*  
Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*  
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*  
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*  
M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*  
MSEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

#### **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

#### **MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

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

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

# Remerciements

Aux membres du jury de thèse,

**A Monsieur le Professeur Etienne CHATELUT**

De l'Université Paul Sabatier,  
Enseignant chercheur biologiste des centres de lutte contre le cancer  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.  
Hommage respectueux.

**A Madame le Professeur Nicole Hagen-Picard**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Qui m'a guidé tout au long de l'élaboration de ce travail.  
Pour sa disponibilité, sa patience et ses précieux conseils.  
Sincères remerciements.

**A Madame le Professeur Véronique Gayraud**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Qui a aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.  
Pour son aide dans ce projet.  
Sincère reconnaissance.



# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>I. Etude bibliographique .....</b>	<b>17</b>
I.1. Le Bisphénol A : utilisation et réglementation .....	17
<i>I.1.1. Structure et propriétés physicochimiques du Bisphénol A .....</i>	<i>17</i>
<i>I.1.2. Bisphénol A et domaines d'utilisations.....</i>	<i>19</i>
<i>I.1.3. Contexte réglementaire.....</i>	<i>22</i>
<i>I.1.4. Le Bisphénol A est-il un danger pour l'Homme ? .....</i>	<i>25</i>
<i>I.1.5. Mesures prises par les Etats .....</i>	<i>27</i>
I.2. Contamination et exposition humaine au Bisphénol A .....	29
<i>I.2.1. Sources et voies de contamination.....</i>	<i>29</i>
<i>I.2.2. Exposition externe humaine au BPA .....</i>	<i>32</i>
<i>I.2.3. Exposition actuelle de la population humaine au BPA : données de biosurveillance.....</i>	<i>34</i>
I.3. Devenir du Bisphénol A dans l'organisme .....	37
<i>I.3.1. Absorption, liaison aux protéines plasmatiques et distribution du Bisphénol A dans l'organisme .....</i>	<i>37</i>
<i>I.3.2. Métabolisme du Bisphénol A .....</i>	<i>39</i>
<i>I.3.3. Elimination du Bisphénol A .....</i>	<i>41</i>
I.4. Absorption vésicale des xénobiotiques.....	43
<i>I.4.1. Structure de la paroi vésicale .....</i>	<i>43</i>
<i>I.4.2. Absorption vésicale des xénobiotiques .....</i>	<i>45</i>
<i>I.4.3. Activité <math>\beta</math>-glucuronidase et cycle vésico-hépatorenal.....</i>	<i>47</i>

<b>II. Etude expérimentale .....</b>	<b>48</b>
II.1. Contexte de notre étude .....	48
II.1.1 <i>Choix du modèle ovin</i> .....	51
II.1.2 <i>Objectif de l'étude</i> .....	53
II.2. Matériels et méthodes .....	54
II.2.1. <i>Plan expérimental</i> .....	54
II.2.2. <i>Animaux</i> .....	56
II.2.3. <i>Préparation des solutions à administrer</i> .....	57
II.2.4. <i>Procédures expérimentaux</i> .....	59
II.2.5. <i>Modalités d'analyse des échantillons sanguins et urinaires</i> .....	61
II.2.6. <i>Analyse des données</i> .....	62
II.3. Résultats .....	63
II.3.1. <i>Etude 1 : absorption vésicale du BPA</i> .....	63
II.3.2. <i>Etude 2 : absorption vésicale du BPA-G en absence d'un inoculum bactérien</i> .....	71
II.3.3. <i>Etude 2 : absorption vésicale du BPA-G en présence d'un inoculum bactérien</i> .....	79
II.4. Discussion.....	86
II.4.1. <i>Evaluation de l'absorption vésicale du BPA</i> .....	86
II.4.2. <i>Sous quelle forme diffuse le BPA-G à travers la paroi vésicale ?</i> .....	88
II.4.3. <i>Comment expliquer la différence entre les quantités urinaires absorbées observées de BPA et de BPA-G et celles déterminées à partir des données plasmatiques ?</i> .....	88
II.4.4. <i>Evaluation de l'absorption vésicale du BPA-G en présence d'un inoculum bactérien</i> .....	91
II.4.5 <i>L'existence d'un cycle vésico-hépto-rénal peut-il modifier de manière importante l'exposition interne au BPA d'un individu ?</i> .....	91
<b>Conclusion.....</b>	<b>94</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>96</b>

# Liste des illustrations

## ❖ Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Réaction de condensation en catalyse acide du BPA (Source : Shimizu et al. 2008) .....	17
<b>Figure 2</b> : Domaines d'utilisation des polycarbonates (Source : Fédération de la plasturgie, 2001).....	20
<b>Figure 3</b> : Domaines d'application des résines époxydes (Source : Plastics Europe, 2007) ..	20
<b>Figure 4</b> : Evolution des réglementations adoptées par les différents Etats concernant l'utilisation du BPA au cours des dix dernières années (Sources : Anses 2013, Ineris 2010), (Sites : <a href="http://www.fda.gov">www.fda.gov</a> , <a href="http://www.legifrance.gouv.fr">www.legifrance.gouv.fr</a> ) .....	28
<b>Figure 5</b> : Schéma conceptuel d'exposition de la population française au BPA représentant les différents cas de figures d'exposition externe humaine au BPA (Source : Anses 2013) .....	31
<b>Figure 6</b> : Concentrations urinaires en BPA total rapportées dans la littérature pour des études publiées entre 2001 et 2012 (Source : Anses 2013) .....	35
<b>Figure 7</b> : Voies métaboliques majeures du BPA chez les Mammifères (Source Inserm 2010) .....	39
<b>Figure 8</b> : Structure de la paroi vésicale et de l'urothélium. (Source GuhaSarkar, Banerjee 2010).....	44
<b>Figure 9</b> : Modèles pharmacocinétiques vésico-plasmatique ouvert (A) et fermé (B) des composés organiques (Source : Dalton et al. 1994) .....	45
<b>Figure 10</b> : Echelle allométrique de la clairance plasmatique (CL, A), du volume de distribution à l'état d'équilibre ( $V_{dss}$ , B) et de la demi-vie ( $t_{1/2}$ , C) du BPA (Source Collet et al. 2015). ..	52
<b>Figure 11</b> : Plan expérimental des expériences réalisées .....	55
<b>Figures 12</b> : Evolution temporelle des concentrations de BPA (ng/ml) des brebis B3, B4 en 2014 et B5, B6 en 2015 après une administration intravésicale de BPA à la dose de 2 mg/kg. ....	66
<b>Figures 13</b> : Evolution temporelle des concentrations de BPA-G (ng/ml) des brebis B3 et B4 après une administration intravésicale pendant 6h d'urines de brebis ayant reçu du BPA à la dose de 100 mg/kg par voie orale.....	74
<b>Figure 14</b> : Evolution temporelle des concentrations de BPA-G (ng/ml) des brebis B3 et B4bis après une administration intravésicale pendant 4h d'urines de brebis ayant reçu du BPA à la dose de 100 mg/kg par voie orale.....	75
<b>Figure 15</b> : Evolution temporelle des concentrations de BPA-G (ng/ml) des brebis B3 et B4bis après une administration intravésicale d'urines surchargées en BPA-G (issues de brebis ayant	

reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg) contenant un inoculum bactérien pendant 4h à deux brebis B3 et B4 bis..... 81

**Figure 16** : Estimation approximative de l'impact d'un cycle vésico-hépatorenal fermé sur l'exposition interne humaine quotidienne au BPA, en prenant en compte les quantités de BPA et de BPA-G absorbées par voie vésicale évaluées sur le modèle brebis et le scénario pire cas de l'exposition humaine au BPA (EFSA, 2015) ..... 93

❖ *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1</b> : Principales caractéristiques physicochimiques du BPA et leurs conséquences physiologiques.....	18
<b>Tableau 2</b> : Estimation de l'exposition externe de la population humaine au BPA ( <i>Source : EFSA 2015</i> ).....	32
<b>Tableau 3</b> : Estimation des doses internes d'exposition au BPA ( <i>Source : Anses 2013</i> ).....	33
<b>Tableau 4</b> : Concentration de la solution mère de BPA (EtOH:NaCl 0.9%) préparée pour l'administration intravésicale lors de l'étude 1 (2015; brebis B5 et B6). ....	63
<b>Tableau 5</b> : Concentrations plasmatiques de BPA après une administration intravésicale de BPA à la dose de 2 mg/kg (solution Ethanol:NaCl:urine, volume 1:1:98 à la concentration de 2 mg/ml).....	64
<b>Tableau 6</b> : Bilan massique du BPA à partir des données urinaires et plasmatiques obtenues sur deux brebis B5 et B6 qui ont reçu une administration intravésicale de BPA à la dose de 2 mg/kg avec un temps de résidence vésical de 2h .....	68
<b>Tableau 7</b> : Analyse cytologique réalisée sur les urines des brebis B5 et B6 pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale de la solution de BPA à la dose de 2 mg/kg .....	69
<b>Tableau 8</b> : Analyse bactériologique réalisée sur les urines des brebis B5 et B6 pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale de la solution de BPA à la dose de 2 mg/kg.....	70
<b>Tableau 9</b> : Concentrations plasmatiques de BPA, BPA-G et BPA-S après une administration intravésicale d'urines surchargées en BPA-G, issues de brebis ayant reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg.....	72
<b>Tableau 10</b> : Bilan massique du BPA-G à partir des données urinaires et plasmatiques obtenues sur deux brebis B3 et B4bis qui ont reçu une administration intravésicale de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto avec un temps de résidence de 4h. ....	76
<b>Tableau 11</b> : Analyse cytologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto. ....	77
<b>Tableau 12</b> : Analyse bactériologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto. ....	78
<b>Tableau 13</b> : Concentration de la solution urinaire de BPA-G préparée pour l'administration intravésicale lors de l'étude 2 (2015 ; période 2), avant et après ajout de l'inoculum bactérien .....	79

**Tableau 14** : Concentrations plasmatiques de BPA, BPA-G et BPA-S après une administration intravésicale d'urines surchargées en BPA-G, issues de brebis ayant reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg contenant un inoculum bactérien pendant 4h, à deux brebis B3 et B4 bis ..... 80

**Tableau 15** : Bilan massique du BPA-G à partir des données urinaires et plasmatiques obtenues sur deux brebis B3 et B4bis qui ont reçu une administration intravésicale d'urines de brebis contenant du BPA-G à la dose de 1.375 g in toto et en présence d'un inoculum bactérien..... 82

**Tableau 16** : Analyse cytologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G, à la dose de 1,375 g in toto, en présence d'un inoculum bactérien..... 84

**Tableau 17** : Analyse bactériologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G, à la dose de 1,375 g in toto, en présence d'un inoculum bactérien..... 85

## Listes des acronymes et abréviations

Afssaps : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

Andem : Agence Nationale pour le Développement de l'Évaluation Médicale

Anses : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments, de l'Environnement et du Travail

AUC : Area Under Curve - Aire sous la courbe

BPA : Bisphénol A

BPA-G : Bisphénol A-Glucuronide

BPA-S : Bisphénol A-Sulfate

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

CEE : Communauté Economique Européenne

DJA : Dose Journalière Admissible

DO<sub>600</sub> : Densité Optique à 600 nm

EFSA : European Food Safety Authority - Agence européenne de sécurité des aliments

FDA : Food and Drug Administration - Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments

IM : Intra Musculaire

Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IV : Intra Veineuse

LB : LBagar

LMS : Limite de Migration Spécifique

LOQ : Limit of Quantification – Limite de quantification

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level - Dose sans effet toxique observable

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

p.c. : Poids corporel

REACH : enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques

SC : Sous Cutané

UFC : Unité Formant Colonie

UGT : Uridine 5'-diphosphate-GlucuronosylTransférase



## Introduction

Chaque jour, des produits créés par l'industrie chimique sont utilisés dans notre quotidien que ce soit dans notre assiette, notre trousse de toilette ou notre pharmacie. Ces développements industriels, avec une demande et une utilisation accrues de ces produits, ont permis d'améliorer notre mode de vie.

Parallèlement à ces développements industriels, depuis les années 80, on assiste à une augmentation de l'altération de la fertilité et de l'incidence de pathologies liées à des dysfonctionnements hormonaux dans la population humaine. En effet, ces dernières vingt années, en France, le taux d'incidence de tous les cancers (de la prostate, du sein, de la thyroïde, de l'utérus, des testicules...), a augmenté de 35 et 43 % respectivement chez les hommes et les femmes (Inserm 2008).

Dès lors, les scientifiques s'interrogent sur l'existence d'un lien entre l'exposition de la population aux composés chimiques, présents dans notre environnement, et l'évolution de la fréquence des troubles pathologiques observés. Certaines substances chimiques sont soupçonnées d'être des perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire des « agents exogènes qui interfèrent avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme », selon l'Agence américaine de Protection de l'Environnement. L'incertitude quant à l'innocuité de plusieurs substances sur la santé est à l'origine de l'inquiétude des consommateurs.

Dans ce cadre, le bisphénol A (BPA), composé chimique organique largement utilisé dans la plasturgie, est au centre des débats sociétaux et connaît une importante médiatisation ces dernières années notamment en raison de son implication dans la fabrication des biberons en polycarbonate et des emballages alimentaires et pour ses effets toxiques potentiels sur la reproduction.

En effet, un certains nombres d'études expérimentales, s'appuyant essentiellement sur des femelles rongeurs gravides, exposées à des doses inférieures à la dose journalière admissible, ont montré l'existence d'effets délétères du BPA sur leur descendance (Vom Saal, Hughes 2005).

Mais dernièrement, l'Agence européenne de sécurité des aliments (EFSA) a conclu « *qu'aux niveaux actuels d'exposition, le BPA ne présente pas de risque pour la santé des consommateurs de tous les groupes d'âge (y compris les enfants à naître, les nourrissons et les adolescents)* » Par conséquent, l'impossibilité de donner un avis univoque sur les effets de l'exposition humaine à ce perturbateur endocrinien rend difficile la prise de décision par les autorités réglementaires.

De plus, les études sur l'exposition de la population humaine au BPA montrent une différence entre les valeurs de l'exposition interne estimées à partir des données acquises dans les études de biosurveillance (Vandenberg et al. 2010) et celles prédites par les modèles toxicocinétiques actuels du BPA. Ainsi l'existence d'autres voies d'exposition, n'étant jusqu'à présent pas prises en compte dans le modèle toxicocinétique actuel du BPA, telle que l'absorption vésicale, pourrait être un facteur explicatif de l'écart entre les valeurs d'exposition interne observées et celles estimées.

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objet de notre travail afin de comprendre et de quantifier l'absorption vésicale du BPA et de ses métabolites. Les objectifs ont été alors, d'évaluer le passage du BPA à travers la paroi vésicale puis de tester l'hypothèse d'une hydrolyse vésicale du bisphénol A-glucuronide (BPA-G), métabolite inactif du BPA, en BPA chez la brebis saine ou lors d'une infection urinaire.

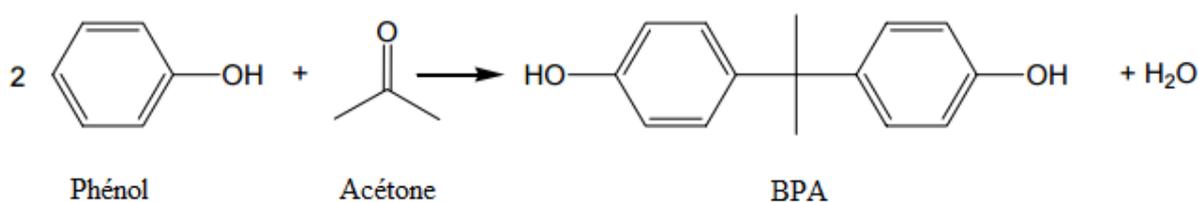
La première partie de notre travail fait état des connaissances actuelles concernant le BPA notamment ses domaines d'utilisation, la réglementation qui s'y rattache, l'exposition humaine au BPA et son devenir dans l'organisme. Les mécanismes d'absorption vésicale des xénobiotiques sont ensuite détaillés. Dans une seconde partie expérimentale, les matériels et méthodes et les résultats sont présentés puis discutés.

## I. Etude bibliographique

### I.1. Le Bisphénol A : utilisation et réglementation

#### I.1.1. Structure et propriétés physicochimiques du Bisphénol A

Le Bisphénol A (BPA) ou 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, composé chimique organique, a été synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe, A. Dianin. Il est issu d'une réaction de condensation catalysée par l'acide chlorhydrique ou par une résine de polystyrène faisant intervenir deux phénols et une cétone (Inserm 2010; Shimizu et al. 2008).



**Figure 1** : Réaction de condensation en catalyse acide du BPA (Source : Shimizu et al. 2008)

Les propriétés physicochimiques du BPA présentées dans le tableau 1 indiquent que le BPA est une molécule de petite taille, peu soluble dans l'eau, non ionisée dans l'intervalle des pH physiologiques et possédant un caractère relativement lipophile.

Dans l'environnement, le BPA n'est pas un produit chimique persistant du fait de son caractère non volatil, de son temps de demi-vie très court dans l'atmosphère (dû à une réaction spontanée avec des radicaux hydroxyles et à une photooxydation) et de sa biodégradation rapide en condition aérobie avec une demi-vie de 4,5 jours dans l'eau et le sol (Cousins et al. 2002; Staples et al. 1998). Cependant, étant donné la quantité importante de sources de rejet du BPA, telles que les eaux usées et les résidus de lavage des installations de production et de transformation des produits dans lesquels il est utilisé ou les rejets involontaires liés à la manutention et au transport, il est omniprésent dans l'environnement et est fréquemment détecté dans des milieux très variés tels que l'eau, les sédiments ou le sol (Oehlmann et al. 2009; Environnement Canada et Santé Canada 2008).

Propriétés	Données	Conséquences
N°CAS (Chemical Abstract Service)	80-05-7	
Formule chimique	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	Molécule de petite taille
Structure chimique		
Masse molaire	228,29 g.mol <sup>-1</sup>	
Densité	1,1 - 1,2 à 25°c	
Solubilité dans l'eau	120 – 300 mg/l à 25°c	
Coefficient de partage n-octanol/eau (log Kow)	3,32 - 3,4	Molécule lipophile (Log Kow >3)
Constante d'ionisation (pKa)	9,59 – 11,3	Molécule non ionisée au pH physiologique
Pression de vapeur (Pa)	5,3. 10 <sup>-6</sup> à 25°c	Molécule non volatile

**Tableau 1:** Principales caractéristiques physicochimiques du BPA et leurs conséquences physiologiques

### *1.1.2. Bisphénol A et domaines d'utilisations*

Dans les années 30, le BPA a fait l'objet d'études pour la recherche de molécules de synthèse à effets œstrogéniques à visée thérapeutique (Cook et al 1933). C'est en 1936 que, Dodds et Lawson, deux biochimistes anglais, ont mis en évidence l'activité œstrogénique du BPA après observation de modifications de l'épithélium vaginal chez des rattes ovariectomisées ayant reçu, au préalable, une administration de BPA (Dodds, Lawson 1936). Il est, en effet, capable de se fixer aux récepteurs nucléaires aux œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Néanmoins, ce xénoœstrogène n'a jamais été utilisé en tant que tel du fait de ses propriétés œstrogénomimétiques faibles par rapport à un autre œstrogène de synthèse, le diéthylstilbestrol, étudié au cours de la même décennie (Dodds et al. 1938).

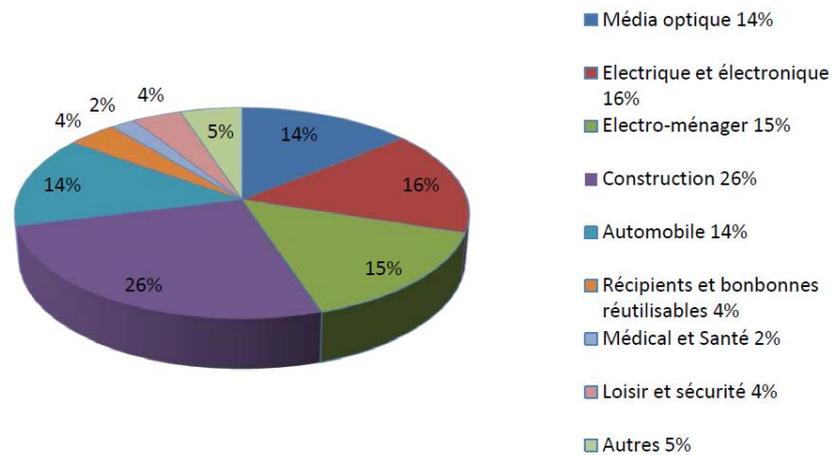
Dans les années 50, le BPA connaît sa première application industrielle. Redécouvert par le chimiste Hermann Schnell de la firme Bayer, il est utilisé pour la synthèse de polycarbonates par polycondensation interfaciale de BPA et de phosgène (Pielichowski, Njuguna 2005).

Désormais, avec une production mondiale annuelle estimée à 3,8 millions de tonnes et avec une utilisation de 1,15 millions de tonnes dans l'Union européenne, (d'après les données de 2005 et 2006, Inserm 2010, site [www.bisphenol-a-europe.org](http://www.bisphenol-a-europe.org)), le BPA occupe une place majeure au sein de l'industrie du plastique. Il constitue une source importante de bénéfices socio-économiques et est un levier pour l'innovation. Dans l'Union européenne, ce secteur économique génère plus de 550 000 emplois et près de 37 milliards de valeur ajoutée. Au niveau social, cela représente plus de 18 milliards d'euros en revenus et salaires (site [www.bisphenol-a-europe.org](http://www.bisphenol-a-europe.org)).

Le BPA rentre dans la composition de nombreux produits utilisés dans la vie de tous les jours, sous différentes formes (Figures 2 et 3), telles que les polycarbonates et les résines époxyphénoliques.

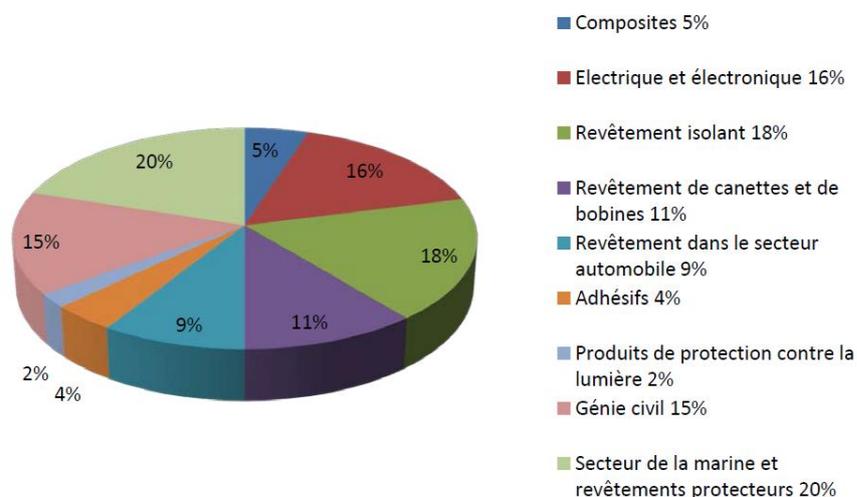
Les polycarbonates représentent 66% de l'utilisation totale du BPA. Grâce à ses propriétés polyvalentes telles que sa durabilité, sa transparence, sa légèreté, sa résistance à la chaleur, aux produits chimiques et au choc, le polycarbonate est un matériau de choix pour une large gamme de produits aussi divers que les CD, DVD, les appareils électriques et électroniques, les équipements automobiles (réflecteurs pour phares avant et arrière, protège-phares, pare-chocs, grilles de radiateur et d'aération, vitrage de sécurité, éclairage intérieur,

pare-brise de moto et casques protecteurs), les lunettes et lentilles optiques, les emballages alimentaires (bouteilles plastiques, biberons, bombonnes d'eau réutilisables, boîtes en plastique pour la conservation des aliments) et les instruments médicaux (hémodialyseurs, hémodiffuseurs, oxygénateur de sang, appareils respiratoires (site [www.bisphenol-a-europe.org](http://www.bisphenol-a-europe.org))).



**Figure 2** : Domaines d'utilisation des polycarbonates (Source : Fédération de la plasturgie, 2001)

Les résines époxydes représentent 30% de l'utilisation totale du BPA. Elles sont utilisées principalement en tant que revêtement pour des applications industrielles et de consommation, telles que la nourriture et les boissons en canettes et les revêtements de protection pour des utilisations électroniques et marines. Elles confèrent aux produits une protection contre la corrosion, une stabilité dimensionnelle élevée, une forte résistance mécanique, une résistance à la température et aux produits chimiques (Site [www.bisphenol-a-europe.org](http://www.bisphenol-a-europe.org)).



**Figure 3** : Domaines d'application des résines époxydes (Source : Plastics Europe, 2007)

Les autres utilisations du BPA représentent environ 4% de son utilisation totale. Elles concernent notamment la production d'autres polymères (polyester insaturés, poly-chlorure de vinyle, polysulfone, polyols/polyuréthanes) et résines vinylesters, phénoliques et phénoplastes. Le BPA trouve également une application dans la fabrication de papiers thermosensibles, tels que les tickets de caisse ou les reçus de carte bancaire, où il agit comme révélateur acide du leuco-colorant de l'encre contenue dans les papiers. Il permet la production de Tétrabromobisphénol-A retrouvé dans les retardateurs de flamme bromés et la fabrication de composites dentaires à partir du Bisphénol A glycidyl methacrylate (bis-GMA) ou du Bisphénol A diméthacrylate (bis-DMA) (EFSA 2015, site [www.bisphenol-a-europe.org](http://www.bisphenol-a-europe.org)).

Etant donné la diversité d'usages et la production mondiale excédant la tonne par an, le BPA est soumis à enregistrement, évaluation et autorisation en vigueur de la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals). Ce règlement européen (règlement n°1907/2006) a pour objectif de sécuriser la fabrication et l'utilisation de substances chimiques afin de protéger la santé humaine et l'environnement face à ses risques potentiels (site : [www.developpement-durable.gouv.fr](http://www.developpement-durable.gouv.fr)). C'est la raison pour laquelle, des seuils réglementaires concernant la production et l'utilisation du BPA ont été établis.

### *1.1.3. Contexte réglementaire*

Trois repères toxicologiques sont nécessaires à la compréhension de la réglementation du BPA.

La DJA (Dose Journalière Admissible) représente la quantité maximale de xénobiotique que peut ingérer un Homme ou un animal, par jour, au cours de sa vie, sans entraîner d'effet néfaste sur sa santé.

La NOAEL (dose sans effet toxique observable) représente la dose de xénobiotique, la plus élevée, pour laquelle aucun effet délétère n'est observé. Elle est issue de données expérimentales et permet l'estimation de la DJA par extrapolation de ces valeurs après application d'un facteur de sécurité qui varie généralement de 100 à 1000 prenant en compte les différences toxicologiques interspécifiques (données de l'animal de laboratoire à l'Homme) et interindividuelles.

La LMS (Limite de Migration Spécifique) représente la quantité maximale de migration de BPA à partir d'un matériau dans le milieu avec lequel il est en contact. Etant donné que les emballages alimentaires sont fabriqués à partir du BPA, ce dernier peut contaminer les aliments. La LMS permet alors de garantir que le contenant alimentaire ne présente aucun risque pour la santé. Pour le BPA, la LMS a été fixée à 0,6mg/kg dans les aliments selon la directive 2004/19/CE (Ineris 2010).

Les études expérimentales de Tyl et al., menées en 2002 et 2008 sur trois générations de rats (Tyl et al. 2002) et deux générations de souris (Tyl et al. 2008) dans le respect des lignes directrices élaborées par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) et les bonnes pratiques de laboratoire (BPL), ont permis de mettre en évidence des effets de toxicité systémique du BPA pour des doses supérieures à 5 mg/kg/j, représentant alors la NOAEL. En effet, pour des doses administrées supérieures à cette dernière, ils ont observé une diminution du poids corporel, une diminution du poids de certains organes des adultes (foie, rein, rate, glande surrénale, hypophyse, cerveau) et le développement de pathologies hépatiques (Tyl et al. 2002 ; 2008).

L'EFSA (European Food Safety Authority), agence réglementaire de l'Union européenne, a alors pris pour référence cette valeur pondérée d'un facteur de sécurité 100 et a établi la DJA du BPA à 50 µg/kg/j.

Cependant un certain nombre d'études scientifiques ont montré que l'administration de faibles doses de BPA peut causer des effets délétères sur la santé. En effet, l'exposition prénatale de femelles rongeurs à des doses de BPA inférieures à la NOAEL a été associée à des effets délétères survenus sur leur descendance : augmentation de la croissance et un avancement de l'âge de la puberté chez les femelles, marquée par une ouverture vaginale précoce (Honma et al. 2002; Howdeshell et al. 1999), altérations des voies génitales observées à l'âge adulte (Markey et al. 2005), altération de la différenciation sexuelle et modification du comportement socio-sexuel chez le mâle et la femelle (Rubin et al. 2006; Farabollini et al. 2002), réduction de la production quotidienne de spermatozoïdes chez le mâle (vom Saal et al. 1998), augmentation du poids de la prostate et diminution du poids de l'épididyme (Gupta 2000; Welshons et al. 1999), modification du développement et de l'organisation tissulaire de la glande mammaire avec une augmentation du nombre de structures épithéliales indifférenciées et une augmentation de la sensibilité à la transformation tumorale ((Markey et al. 2001; Muñoz-de-Toro et al. 2005; Murray et al. 2007; Vandenberg, Maffini, et al. 2007).

De plus, en décembre 2004, Vom Saal et Hughes ont référencé sur PubMed 115 études in vivo évaluant les effets du BPA administré à de faibles doses : 94 rapportent des effets avérés pour des doses inférieures à la NOAEL. Parmi celles-ci, 31 montrent des effets néfastes significatifs du BPA à des doses inférieures à la DJA (vom Saal, Hughes 2005).

A l'inverse d'autres études, financées par l'industrie chimique et respectant les BPL, n'ont pas mis en évidence d'effets délétères du BPA à faible dose (Ashby et al. 1999; Cagen et al. 1999).

Cette divergence est à l'origine de débats au sein de la communauté scientifique sur les éventuels effets délétères du BPA à faible dose sur la santé. D'une part, les agences de sécurité sanitaire estiment que les données toxicologiques acquises par les études expérimentales sur le modèle rongeur ne peuvent pas être extrapolées à l'Homme, du fait des différences toxicocinétiques du BPA entre les deux espèces et d'une sensibilité plus importante aux œstrogènes de certaines souches de rongeurs. En outre, certaines études ne sont pas réalisées selon les BPL et utilisent un seul niveau de dose, au lieu de rechercher la relation dose-réponse essentielle à l'évaluation du risque. D'autre part, les scientifiques du milieu académique ont émis des critiques sur la prise en compte des études de Tyl et al. en 2002 et 2008, dans les références scientifiques de l'EFSA. En effet, en mars 2009, une trentaine d'endocrinologues ont publié un article (Myers et al. 2009) dans lequel d'importants biais expérimentaux ont été soulevés, remettant alors en cause la pertinence des résultats expérimentaux présentés dans ces deux études.

Cependant, en 2010, à la suite d'un examen détaillé et exhaustif de la littérature scientifique récente et d'études sur la toxicité du BPA à faibles doses, l'EFSA n'a pas estimé nécessaire de réévaluer la DJA (Site : [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)).

Par conséquent, l'impossibilité de donner un avis univoque sur la dangerosité du BPA a nécessité un recours à des expertises scientifiques dans le but d'évaluer les risques du BPA sur la santé humaine.

#### *1.1.4. Le Bisphénol A est-il un danger pour l'Homme ?*

En France, à travers plusieurs saisines (2009-SA-0331 et 2010-SA-0197), la direction générale de la santé (DGS) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR) ont mandaté l'Anses, agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, afin d'effectuer une évaluation spécifique sur les risques sanitaires du BPA et de ses substituts potentiels (Bisphénol B, M, S, F, AF, AP, BADGE) en prenant en compte tous les types d'effets toxiques et non seulement ceux liés à la perturbation endocrinienne et/ou reprotoxiques.

Au sein du rapport de l'Anses paru en 2013, le groupe de travail chargé de cette expertise, a évalué les effets du BPA sur la fonction de reproduction, le cerveau et le comportement, le système cardiovasculaire, le métabolisme, la thyroïde, l'intestin, les seins et le système immunitaire.

A l'issue de cette analyse, chaque effet a été jugé en termes d'effets avérés, suspectés ou controversés chez l'animal et chez l'Homme. Il a été ainsi répertorié des effets avérés chez l'animal tels que :

- *L'augmentation de la survenue de kystes ovariens lors d'expositions pré et postnatales.*
- *Les modifications hyperplasiques de l'endomètre lors d'expositions pré et postnatales.*
- *L'avancement de l'âge de la puberté lors d'expositions pré et post-natales.*
- *L'altération de la production spermatique lors d'expositions à l'âge adulte.*
- *Les modifications histologiques sur la neurogénèse lors d'expositions pré ou périnatale.*
- *Les effets sur la lipogenèse suite à une exposition prénatale, périnatale ou à l'âge adulte.*
- *Les effets sur la glande mammaire : accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire à l'âge adulte et développement de lésions hyperplasiques intracanalaires en lien avec une exposition pré ou périnatale au BPA.*

Cependant aucun effet avéré n'a été retenu chez l'Homme, seulement des effets suspectés, c'est-à-dire montrés par une ou plusieurs études convergentes sans limite méthodologique majeure, à savoir :

- *Les effets sur la maturation ovocytaire chez la femme dans un contexte de procréation médicalement assistée.*
- *Les effets sur les pathologies cardiovasculaires (maladies coronariennes) et le diabète.*

### 1.1.5. Mesures prises par les Etats

Bien qu'aucun effet avéré n'ait été démontré, des situations à risques pour l'enfant à naître d'une femme ayant été exposée au BPA pendant sa grossesse ont été mises en évidence. Par conséquent, l'Anses a émis dans son rapport plusieurs recommandations dans le but de réduire l'exposition de la population au BPA notamment chez les femmes enceintes et les enfants de moins de trois ans.

De la même façon, en 2014, en raison des incertitudes relatives aux effets délétères à faible dose du BPA sur la glande mammaire et sur les systèmes reproductif, métabolique, neurocomportementale et immunitaire, l'EFSA a réévalué la DJA et a ainsi recommandé de diviser par 12 la valeur de cette dernière passant alors à une DJA de 4 µg/kg pc/j. « *Cette DJA est temporaire jusqu'à ce que les résultats des recherches en cours réalisées par l'US National Toxicology Program puissent être incorporés à l'évaluation* » (Site : [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)).

Cependant, dans un rapport publié en janvier 2015, l'EFSA a pris le contrepied de la France en blanchissant au moins provisoirement le BPA. Elle a estimé « *qu'aux niveaux actuels d'exposition, le BPA ne présente pas de risque pour la santé des consommateurs de tous les groupes d'âge (y compris les enfants à naître, les nourrissons et les adolescents)* » malgré des incertitudes qui subsistent quant aux effets toxiques du BPA ([www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)).

Dès lors, face aux publications scientifiques, aux expertises et aux contre-expertises, les autorités réglementaires ont décidé d'appliquer le principe de précaution et de prendre certaines mesures concernant l'utilisation du BPA (Figure 4).

Le BPA était une molécule classée toxique pour la reproduction de catégorie 3, c'est-à-dire jugée « *préoccupante pour la fertilité de l'espèce humaine* » en raison « *d'effets toxiques possibles* » selon la Directive 67/548/CEE (relative à la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances dangereuses) (Anses 2013). Cependant, depuis 2014, le comité d'évaluation des risques de l'Agence Européenne des Substances Chimiques s'est montré favorable à la proposition de l'Anses pour un classement plus strict du BPA en proposant une modification de la catégorie « *reprotoxique suspecté* » à « *toxique pour la reproduction* » (Site : [www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

L'évaluation des risques pour la santé publique exige non seulement l'identification de ses risques possibles pour la santé, mais aussi l'évaluation de l'exposition au BPA.

<b>2006</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'EFSA estime la DJA à 50 µg/kg pc/j.</li> <li>• Le BPA est soumis au règlement REACH (CE) n°1907/2006 adopté par le parlement européen.</li> </ul>
<b>2008</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La FDA (« agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux ») considère l'exposition au BPA sans danger et fixe la DJA à 50 µg/kg pc/j.</li> <li>• Le Canada, l'Australie interdisent la vente de biberons fabriqués à partir de BPA.</li> </ul>
<b>2009</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plusieurs Etats américains (Chicago, Minnesota, Connecticut et Suffolk County) interdisent la commercialisation de biberons contenant du BPA.</li> <li>• Règlement (CE) n°1229/2003 interdit l'utilisation du BPA dans les produits cosmétiques.</li> </ul>
<b>2010</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'AFSSA, agence française de sécurité sanitaire des aliments, déclare l'existence éventuelle d'effets du BPA sur le comportement de jeunes rats exposés in utero et estime que "la protection des consommateurs doit être renforcée, et le niveau d'exposition de la population réduit".</li> <li>• L'EFSA n'estime pas nécessaire de réévaluer la DJA.</li> </ul>
<b>2011</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le règlement UE n°10/2011 autorise le BPA dans les matériaux en contact avec les aliments avec une LMS de 0,6 mg/kg dans les aliments.</li> <li>• Le règlement UE n°321/2011 interdit l'utilisation de BPA dans la fabrication de biberons en polycarbonate pour nourrisson ainsi que leur importation et mise sur le marché.</li> </ul>
<b>2012</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La loi n° 2012-1442 interdit l'utilisation de BPA dans tous les conditionnements d'aliments destinés aux nourrissons et enfants de moins de trois ans à partir du 1er janvier 2013. Cette interdiction est étendue à tous les contenants alimentaires au 1er janvier 2015.</li> </ul>
<b>2013</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'Anses rend public un avis sur le BPA dans lequel elle met en évidence des risques potentiels pour la santé et émet des recommandations pour réduire l'exposition au BPA.</li> </ul>
<b>2014</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'EFSA recommande une DJA temporaire de 4 µg/kg pc/j.</li> </ul>
<b>2015</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'EFSA conclut que le BPA ne présente pas de risques pour les consommateurs de tous les groupes d'âge (y compris les enfants à naître, les nourrissons et les adolescents) aux niveaux actuels d'exposition.</li> <li>• Maintien de la DJA temporaire à 4 µg/kg pc/jour.</li> </ul>

**Figure 4** : Evolution des réglementations adoptées par les différents Etats concernant l'utilisation du BPA au cours des dix dernières années (*Sources : Anses 2013, Ineris 2010*), (*Sites : [www.fda.gov](http://www.fda.gov), [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr)*)

## I.2. Contamination et exposition humaine au Bisphénol A

### *I.2.1. Sources et voies de contamination*

Etant donné le caractère ubiquitaire du BPA, la population humaine est exposée au BPA via son environnement ou par la manipulation et l'usage de produits destinés au grand public contenant du BPA.

L'exposition au BPA se fait selon trois voies : l'ingestion, l'inhalation et le contact cutané.

L'Anses dans son rapport d'étude sur l'évaluation des risques du BPA pour la santé humaine de 2013 a représenté un schéma conceptuel d'exposition de la population française au BPA en prenant en compte les diverses utilisations et applications du BPA au quotidien et les différentes voies d'expositions (Figure 5).

L'agence a également conclu que la voie alimentaire contribue à plus de 80% de l'exposition globale de la population générale. En effet, le BPA étant largement utilisé en plasturgie, les denrées alimentaires se contaminent au contact de leurs emballages. Cette contamination s'effectue soit par migration dans l'aliment de monomères de BPA présents dans ces matériaux soit par libération de BPA après hydrolyse du polymère ayant subi une variation de pH ou de température, ce qui est le cas, par exemple, lors du chauffage du lait dans les biberons en polycarbonate (Geens et al. 2010, Inserm 2010).

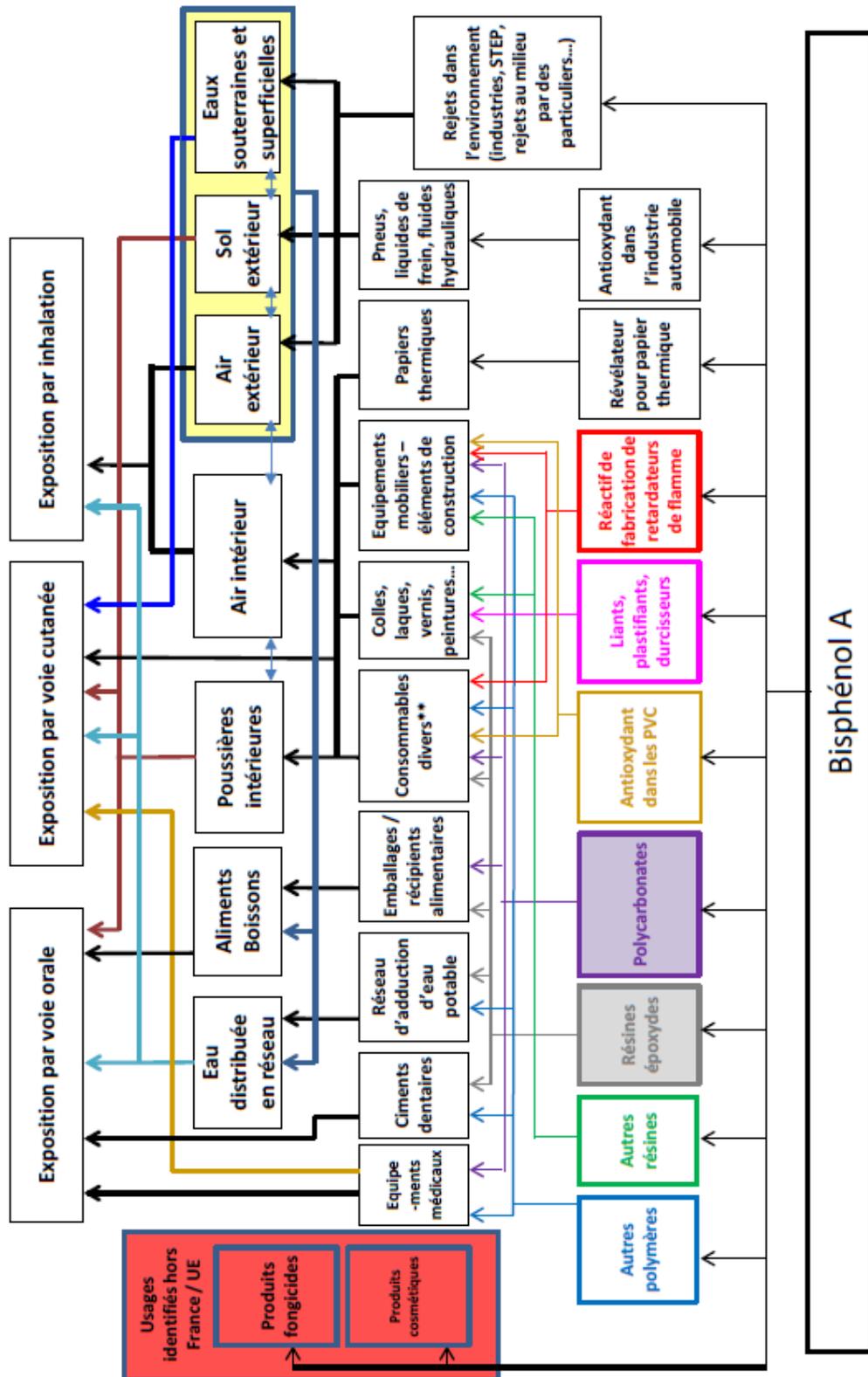
En 2006, l'Anses a réalisé une étude de l'alimentation totale visant à déterminer la présence du BPA dans les aliments les plus consommés au quotidien par la population et dans les aliments peu consommés mais susceptibles d'être fortement contaminés, en prenant en considération les habitudes de consommation, des lieux d'achats et du mode de conservation des aliments de la population française. Ainsi l'agence s'est intéressée à plus de 212 types d'aliments différents couvrant environ 90% de l'alimentation des adultes et enfants et a observé que certaines catégories d'aliments avaient tendance à contenir du BPA en quantité plus importante que d'autres. En effet, les poissons et les crustacés, la viande, les légumes et les plats composés (à base de légumes, de produits de la mer, de pâtes et de viande) présentent un niveau de contamination en BPA supérieur à 4µg/kg pouvant aller jusqu'à 30µg/kg pour les abats tandis que la majorité des catégories alimentaires ont un niveau de contamination inférieur à 4µg/kg.

De plus, Geens et al. en 2010 ont montré qu'un aliment conditionné en boîte de conserve métallique présente davantage de BPA que lorsque celui-ci est stocké dans un contenant en verre, brique ou plastique type polyéthylène téréphtalate.

L'eau destinée à la consommation humaine peut, elle aussi, être contaminée par le BPA du fait, d'une part d'une contamination directe de la ressource en eau et d'autre part par l'utilisation de matériaux (bonbonnes en polycarbonates, réseaux réhabilités par des résines époxydiques, cannettes avec revêtement époxyde) en contact avec l'eau. Cependant cette source d'exposition est négligeable et la teneur en BPA n'est pas réglementée dans les eaux destinées à être consommées (Anses 2013).

L'Homme peut également être exposé au BPA par inhalation de l'air ambiant, ingestion de poussières et par manipulation de produits d'usage. L'air ambiant est contaminé par les particules de BPA issues de certains revêtements de sol, de peintures et de matériels électriques et électroniques. Ainsi, il a été montré que les poussières domestiques pouvaient contenir plus de 1,5µg/g de BPA (Geens et al. 2009). Par ailleurs, la manipulation de tickets thermiques entraîne une pénétration cutanée de BPA. En effet, l'étude de Kaddar et al. en 2008 sur le transfert de BPA à travers la peau porcine, modèle de choix pour étudier la pénétration cutanée humaine, a montré que le BPA passe dans le derme avec un taux d'absorption percutanée allant de 3% à 11,4% après 2 à 10h d'exposition.

Cependant, ces deux voies de contamination, l'inhalation et le contact cutané, représentent des modalités d'exposition mineures pour l'Homme mais peuvent devenir importantes dans certaines situations lors, par exemple, de manipulations répétées de papiers thermiques par les agents de caisses.



\*\* : CD, DVD, ordinateurs, écrans, éléments électriques, appareils électroménagers, téléphones portables, équipements optiques, articles de sport...

**Figure 5** : Schéma conceptuel d'exposition de la population française au BPA représentant les différents cas de figures d'exposition externe humaine au BPA (Source : Anses 2013)

### 1.2.2. Exposition externe humaine au BPA

L'exposition externe correspond à la quantité totale de BPA à laquelle un individu peut être exposé quotidiennement en prenant en compte toutes les sources d'exposition externes à l'organisme.

En considérant l'ensemble des modalités d'exposition, la fréquence d'utilisation des produits contenant du BPA, les classes d'âge et les habitudes alimentaires des consommateurs, l'exposition externe d'un individu au BPA a pu être estimée par les agences telles que l'EFSA en 2014 et l'Anses en 2013 en prenant en compte les sources d'exposition intervenant essentiellement dans la contamination par voie orale (modalité d'exposition majoritaire) (Figure 6).

Groupe de population	Référence	Source d'exposition	Exposition externe au BPA ng/kg pc/j	
			Moyenne	Forte (95 <sup>ème</sup> percentile)
Enfants (plus de 3 ans)	Anses, 2013	Alimentation, boisson, eau destinée à la consommation humaine	56	141
Adultes			40	87
Femmes enceintes			60	130
Nourrissons (1-5j) allaités	EFSA, 2014	Alimentation, boisson	225	435
Bébés (0-6 mois) nourris au lait maternisé			30	80
Bébés (6j-3 mois) allaités			165	600
Bébés (4-6 mois) allaités			145	528
Bébés (6-12 mois)			375	857
Enfants (1-3 ans)			375	857
Enfants (3-10 ans)			290	813
Adolescents (10-18 ans)			159	381
Hommes (18-45 ans)			126	335
Femme (18-45 ans)			132	388
Autres adultes (45-65 ans)			126	341

**Tableau 2** : Estimation de l'exposition externe de la population humaine au BPA  
(Source : EFSA 2015)

\*La valeur du 95<sup>ème</sup> percentile est utilisée pour la caractérisation du risque sanitaire associé à cette exposition

Les estimations de doses externes, faites par les deux agences, restent largement inférieures à la DJA ( $4 \mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ ) mais révèlent que certaines sous population, telles que les nourrissons et les enfants sont sujets à une exposition plus importante.

A partir de la dose externe, la dose interne d'exposition, correspondant à la quantité de BPA absorbée par un individu exposé, peut être estimée prenant en compte les facteurs physiologiques et pharmacocinétiques propres à chaque voie d'exposition tels que l'absorption pour la voie orale, le taux de pénétration cutanée et le taux d'absorption par inhalation (Anses 2013). Ainsi, l'Anses a évalué la dose interne d'exposition pour les enfants de plus de 3 ans, les femmes et les adultes en tenant compte de toutes les modalités de contamination, voie orale, cutanée et inhalatrice (Figure 7).

Groupe de population	Dose interne en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$		
	Minimum	Maximum	95 <sup>ème</sup> percentile
Enfants (plus de 3 ans)	$2,5.10^{-4}$	$1,32.10^{-2}$	$5,1.10^{-3}$
Femmes enceintes	$2,2.10^{-4}$	$1,7.10^{-2}$	$4,2.10^{-3}$
Adultes	$2,6.10^{-4}$	$5,6.10^{-3}$	$2,5.10^{-3}$

**Tableau 3** : Estimation des doses internes d'exposition au BPA (Source : Anses 2013)

Ces doses internes confirment que les enfants âgés de plus de trois ans sont davantage exposés au BPA et suggèrent également que les femmes enceintes constituent un sous-groupe de la population présentant une exposition plus importante au BPA.

Cependant, l'évaluation de l'exposition globale de la population humaine à partir des données d'exposition externe nécessite l'identification des différentes sources d'exposition. Une autre alternative pour estimer l'exposition interne d'un individu au BPA repose sur les données de biosurveillance relatives au BPA afin de prendre en considération les sources d'exposition connues et celles inconnues (Calafat et al. 2006).

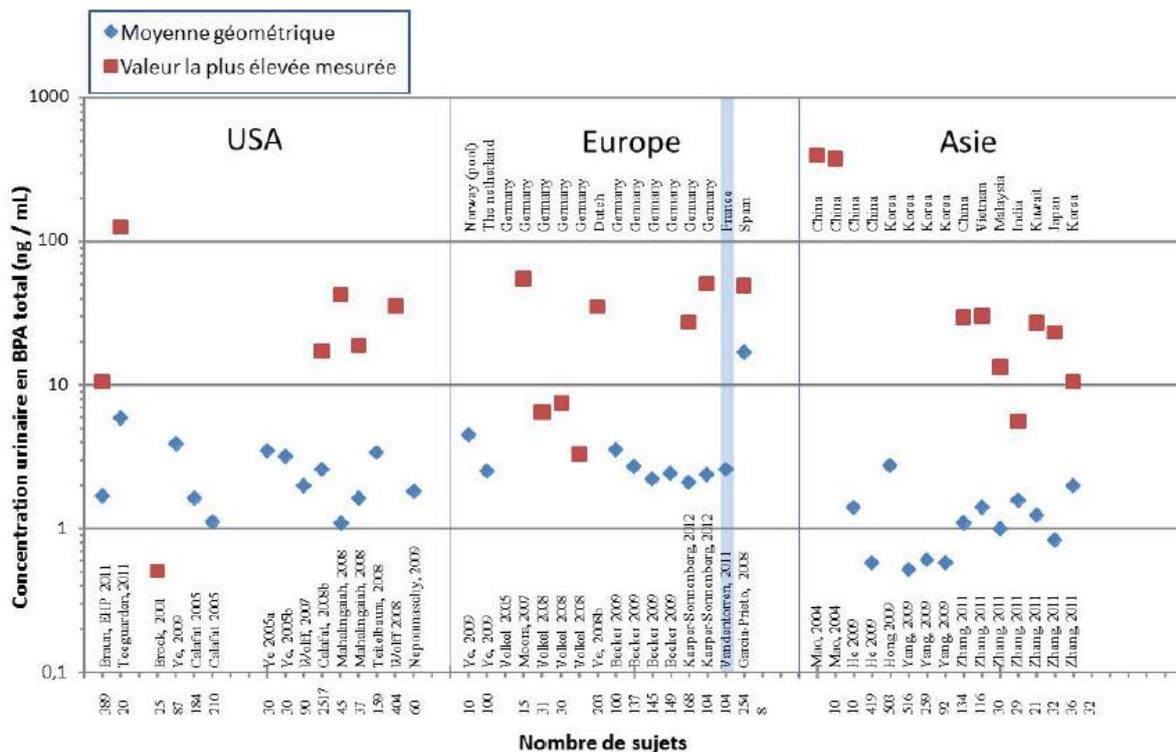
### *1.2.3. Exposition actuelle de la population humaine au BPA : données de biosurveillance*

Le BPA et ses métabolites ont été mis en évidence dans différents liquides biologiques : les urines, le sérum, le sang, le plasma, le liquide amniotique et le lait maternel (Vandenberg, et al. 2007).

Pour évaluer l'exposition interne humaine au BPA, les matrices les plus étudiées sont les urines et le sang (sérum ou plasma) (Dekant, Völkel 2008). En raison de l'élimination essentiellement urinaire du BPA et de sa demi-vie très courte chez l'Homme, la quantité de BPA total dans les urines constitue un marqueur pertinent de l'exposition interne humaine au BPA total (Völkel et al. 2002).

Une étude américaine réalisée au cours des années 2003, 2004, ayant pour but d'évaluer l'exposition de la population au BPA, a mis en évidence que sur 2517 personnes, âgées de six ans ou plus, 92,5% présentaient du BPA, sous forme active et conjuguée, dans leurs urines (Calafat et al. 2008).

L'Anses, lors de son expertise collective de 2013, a répertorié les concentrations urinaires moyennes en BPA total (BPA non conjugué + BPA conjugué) évaluées dans différentes études pour une population et une zone géographique données (Figure 7). Les résultats montrent que les valeurs moyennes sont toutes comprises entre 1 et 5 ng/ml mais peuvent être variables selon la population étudiée allant de plus de 100 ng/ml à des valeurs inférieures à la limite de détection des méthodes d'analyses (c'est-à-dire inférieures à 0,4 voire 0,1 ng/ml) (Becker et al. 2009; Calafat et al. 2005; He et al. 2009; Kasper-Sonnenberg et al. 2012; Mahalingaiah et al. 2008; Mao et al. 2004; Yang et al. 2009; Zhang et al. 2011).



**Figure 6** : Concentrations urinaires en BPA total rapportées dans la littérature pour des études publiées entre 2001 et 2012 (Source : Anses 2013).

Les citations multiples correspondent à des valeurs fournies pour différentes catégories au sein de la même étude : Calafat et al., 2005 (184 hommes, 210 femmes), Mahalingaiah et al., 2008 (45 femmes, 37 hommes), Völkel et al., 2008 (31 femmes, 30 enfants 5-6 ans, 21 adultes), Becker et al., 2009 (137 enfants 3-5 ans, 145 enfants 6-8 ans, 149 enfants 9-11 ans, 168 enfants 12-14 ans), Kasper-Sonnenberg et al., 2012 (104 mères, 104 enfants), Mao et al., 2004 (10 hommes, 10 femmes), He et al., 2009 (419 hommes, 503 femmes), Yang et al., 2009 (259 hommes, 92 femmes pré ménopause, 134 femmes post-ménopause), Zhang et al., 2011 (différents pays).

Le BPA est une molécule rapidement éliminé par l'organisme (demi-vie de 4 à 6h, Völkel et al. 2002; 2005) ce qui est à l'origine d'une importante variabilité dans les concentrations urinaires mesurées entre deux individus de la même espèce ou pour un même individu. En effet, l'étude de Teeguarden et al. menée en 2011 sur 20 personnes adultes recevant une alimentation contrôlée sur une période de 24h, constituant ainsi la principale source d'exposition au BPA, a montré que la quantité de BPA total éliminée dans les urines pendant un certain laps de temps, était variable d'un individu à l'autre avec un taux d'élimination allant de 15 à 60%. Ye et al., en 2011, ont également observé des variations de la teneur urinaire en BPA total chez un individu au sein d'une même journée mais également entre les différents jours de la période d'étude.

De plus, l'exposition interne au BPA des enfants serait plus importante que celle des adultes (Vandenberg et al. 2010).

En considérant que la totalité du BPA est éliminée par voie urinaire, la dose absorbée quotidienne peut être calculée en multipliant la concentration urinaire du BPA par le volume d'urine produite sur 24h ce qui permet alors de caractériser l'exposition interne d'un individu.

Ainsi, la dose interne journalière calculée est comprise entre 10 et 100 ng/kg/j ce qui est conforme aux estimations faites en agrégeant les doses d'exposition externe au BPA contenu dans l'air, les poussières domestiques et l'alimentation (Geens et al. 2011; Becker et al. 2009).

Les concentrations de BPA total mesurées dans le sang sont entre 3 à 250 (moyenne 42) fois plus faibles que celles mesurées dans les urines (Teeguarden et al. 2011).

Le BPA a également été détecté sous sa forme active dans plus de 60% des échantillons de lait maternel étudiés (Otaka et al. 2003; Sun et al. 2004; Ye et al. 2006, 2008) avec des concentrations moyennes allant de 0,61 à 1,3 ng/ml mais pouvant aller jusqu'à 6,3 ng/ml (Ye et al. 2006) mais aussi dans le colostrum des trois premiers jours avec des valeurs moyennes en BPA total de 3,4 ng/ml pouvant atteindre 7 ng/ml (Kuruto-Niwa et al. 2007).

Ainsi, l'exposition journalière d'un nourrisson allaité a été estimé à 171 ng/kg pour un lait contenant 1 ng/ml de BPA et à 1200 ng/kg pour un lait contenant 7 ng/ml (calculs effectués par l'Anses sur la base d'un nourrisson pesant 3,5 kg et consommant un volume de lait maternel de 600 ml) (Anses 2013). Ces valeurs montrent que les nourrissons constituent une population à risque avec une exposition supérieure à celle des adultes.

### I.3. Devenir du Bisphénol A dans l'organisme

Les paramètres toxicocinétiques d'une molécule permettent de caractériser son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination afin de déterminer son devenir au sein d'un organisme.

Dans cette partie, les paramètres toxicocinétiques de BPA sont décrits pour l'Homme, le rat qui est le modèle utilisé dans de nombreuses études toxicologiques et le mouton, modèle pour notre étude.

#### *I.3.1. Absorption, liaison aux protéines plasmatiques et distribution du Bisphénol A dans l'organisme*

L'exposition humaine au BPA se faisant majoritairement par voie alimentaire, l'évaluation de l'absorption digestive est essentielle pour comprendre le devenir du BPA dans l'organisme. Lors de deux études expérimentales sur l'évaluation du métabolisme et de la toxicocinétique du BPA chez l'Homme, Völkel et al. ont montré qu'après l'administration orale d'un isotope stable du BPA, le  $d_{16}$ -BPA, à la dose de 5 mg et 25  $\mu$ g, 118% ( $\pm$ 21%) et 84 à 97% de la dose initiale ont été respectivement retrouvés dans les urines des femmes et des hommes de 54 à 90 kg (Völkel et al. 2002; 2005). Ainsi la dose initiale de BPA a été absorbée quasiment en totalité au niveau du tractus digestif.

Chez le rat et le mouton, la fraction absorbée de BPA a été respectivement estimée à 97% et 100% après administration orale d'une dose de 100 mg/kg de BPA (Pottenger et al. 2000, Thèse Collet, 2012).

Après avoir été absorbé par le tube digestif, le BPA se retrouve dans le sang et est transporté par des protéines plasmatiques, principalement de façon non spécifique par l'albumine. En effet, plus de 90% du BPA est lié aux protéines plasmatiques et la forme libre, biologiquement active, se trouvant dans le plasma représente 5% du BPA circulant chez l'Homme. Cette liaison est capable de moduler l'accès du BPA à certains organes cibles (cerveau, utérus, ...) et récepteurs membranaires ou nucléaires (Csanády et al. 2002; Déchaud et al. 1999).

Etant donné le caractère relativement lipophile du BPA, cette molécule peut traverser les membranes plasmiques et être distribuée à de nombreux organes. D'après l'étude de Shin et al. en 2004, les plus fortes concentrations en BPA chez l'Homme ont été retrouvées respectivement dans l'intestin grêle, puis le foie, les reins, les poumons, le cerveau, l'estomac, le cœur, les testicules, le sang, les muscles et le tissu adipeux après une injection intraveineuse d'un bolus de 5 mg de BPA. Cette étude a également permis d'estimer le volume de distribution à l'équilibre du BPA chez l'Homme à 141,8 L en utilisant un modèle pharmacocinétique fondé sur les paramètres physiologiques du BPA. Ce volume de distribution est conforme à celui évalué par une approche allométrique ( $V_d = 125,3$  L) en se basant sur le volume de distribution du BPA chez la souris ( $V_d = 0,1$  L), le rat ( $V_d = 1,3$  L), le lapin ( $V_d = 7,1$  L) et le chien ( $V_d = 20,0$  L) après administration IV de 1 à 2 mg/kg de BPA (Cho et al. 2002).

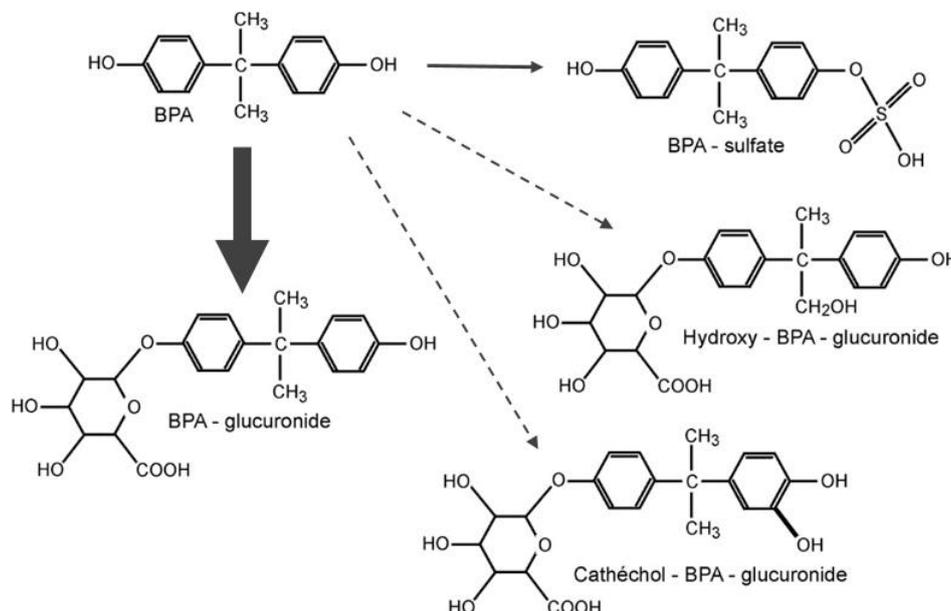
### 1.3.2. Métabolisme du Bisphénol A

Le BPA, arrivant au foie par la veine porte, subit une réaction de métabolisation de phase II sous l'action d'enzymes de biotransformation responsables de la conjugaison des xénobiotiques, aboutissant alors à la formation d'un composé conjugué hydrosoluble (Inoue et al. 2001).

En effet, la glucuroconjugaison, par l'ajout d'un acide glucuronique à la molécule de BPA catalysé par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) dans les microsomes hépatiques, conduit à la formation du BPA-Glucuronide (BPA-G) (Yokota et al. 1999). De plus, la glucuroconjugaison représente la principale voie de détoxification de l'organisme vis-à-vis du BPA chez les mammifères (Völkel et al. 2005).

La sulfoconjugaison, quant à elle, permet la synthèse du BPA-sulfate (BPA-S) sous l'action des sulfotransférases qui fixent un groupement sulfate sur le BPA (Pottenger et al. 2000).

L'étude de Zalko et al. en 2002 a révélé l'existence d'autres métabolites formés tels que des composés di-conjugués, méthoxylés, déshydratés, di-glucuronides et des dérivés catéchols après administration sous cutanée de 25 µg/kg de H<sup>3</sup>-BPA (substance radioactive) chez des souris gravides (Figure 7). Ces métabolites sont biologiquement inactifs et dépourvus d'activité œstrogénique car leurs structures tridimensionnelles ne leur permettent pas de se fixer aux récepteurs aux œstrogènes (Matthews et al. 2001).



**Figure 7 :** Voies métaboliques majeures du BPA chez les Mammifères (*Source Inserm 2010*). Chez l'Homme, les deux métabolites principaux sont le BPA-G et le BPA-S avec une prépondérance pour le BPA-G

Par conséquent, la métabolisation rapide et intense du BPA au niveau hépatique et/ou intestinal contribue à une faible biodisponibilité du BPA par voie orale. Elle a été estimée à moins de 1% chez le singe rhésus (Doerge et al. 2010b) et à 2,8% chez le rat adulte (Doerge et al. 2010a). Cette faible biodisponibilité est à l'origine de très faibles concentrations plasmatiques de la forme active du BPA mises en évidence après administration orale de BPA chez le rat adulte (Doerge et al. 2010a), la souris adulte (Taylor et al. 2010) et chez l'Homme adulte (Völkel et al. 2002) associées à des clairances plasmatiques de 62,6 ml/(kg.min) chez le rat adulte, de 25,9 ml/(kg.min) chez le mouton adulte et de 25,6 ml/(kg.min) chez l'Homme adulte, mesurées après administration IV de 5 mg/kg de BPA (Collet et al. 2015). La clairance plasmatique humaine est de même ordre de grandeur que le débit sanguin hépatique ce qui suggère que le foie est un organe très important dans le processus de détoxification du BPA par l'organisme (Collet et al. 2015).

Ainsi cet important effet de premier passage hépatique limite l'exposition interne à la forme active du BPA. Cependant, le débit sanguin du foie est variable d'un individu à l'autre mais également selon l'activité de l'individu. Cette variabilité entraîne une modification de l'effet de premier passage hépatique ce qui pourrait expliquer la différence interindividuelle d'exposition interne au BPA (Collet et al. 2015).

Par ailleurs, lorsque le BPA est absorbé par voie cutanée ou sublinguale, il rejoint directement le cœur et la circulation générale sans être soumis au métabolisme hépatique ce qui a pour conséquence d'augmenter l'exposition interne de l'individu (Gayraud et al. 2013; Mielke et al. 2011).

### *1.3.3. Elimination du Bisphénol A*

Le BPA, métabolisé par le foie et/ou l'intestin en conjugués hydrosolubles, est éliminé par voie urinaire ou fécale.

Chez l'Homme, le BPA est rapidement et majoritairement excrété dans les urines sous forme de BPA-G avec une demi-vie d'élimination de 4 à 6h et une élimination complète en 24h (Völkel et al. 2002; 2005). En effet, dans l'étude de Pottenger et al. (2000), il a été montré qu'après administration orale de 100 mg/kg de BPA à des rats mâles et femelles, 57% à 70% du BPA éliminé dans les urines est sous la forme BPA-G et que 1,7 à 3,6% représente du BPA-S. De même, 75% et 85% du BPA absorbé et éliminé dans les urines respectivement des femmes et des hommes est sous la forme glucuronidée (Völkel et al. 2005). De plus, des études réalisées sur différents modèles animaux ont indiqué que le BPA, sous forme active, représente une part minoritaire du BPA total, généralement inférieure à 3%. (Doerge et al. 2010a et b, Thèse Farbos, 2012).

Une étude récente réalisée par Liao et Kannan, en 2012, a présenté pour la première fois des résultats sur les différentes formes de BPA urinaire (non conjugué et conjugué) chez l'Homme dans laquelle les formes de BPA conjugué ont été analysées directement et non de manière indirecte, comme cela est généralement déterminé par différence du BPA non conjugué, avant et après déconjugaison enzymatique. Elle a ainsi montré que le BPA-G représenterait  $57\pm 34\%$  du total, suivi du BPA non conjugué ( $32\pm 31\%$ ), du BPA-S ( $7\pm 14\%$ ) et enfin des formes substituées par 1, 2 ou 3 atomes de chlore qui représenteraient une part de quelques pourcents du BPA total.

Chez les rongeurs un cycle entéro-hépatique du BPA a été mis en évidence. Dans leur étude en 2000, Pottenger et al. ont montré qu'après administration de 100 mg/kg de BPA par voie orale ou intrapéritonéale ou sous-cutanée à des rats, 52 à 83% de la dose initiale est retrouvée dans les fèces alors que seulement 21 à 34% du BPA initial est excrété dans les urines sous forme principalement de BPA-G. En effet, lors du premier passage hépatique, une partie du BPA-G est éliminé dans la bile et rejoint ainsi le tube digestif ce qui explique sa présence importante dans les fèces. En outre, certaines bactéries digestives, possédant une activité  $\beta$ -glucuronidase, déconjuguent le BPA-G en BPA permettant alors sa réabsorption à travers la barrière intestinale (Inoue et al. 2001).

De ce fait, l'existence d'un cycle entéro-hépatique chez les rongeurs est à l'origine d'un prolongement de la demi-vie d'élimination, à savoir 24 à 48h (Kurebayashi 2003) et donc d'une exposition interne à la forme active du BPA plus importante que chez l'Homme.

Cependant, d'après le modèle pharmacocinétique actuel du BPA, les concentrations plasmatiques prédites chez l'Homme sont très faibles, de l'ordre du pg/ml. Or certaines études de biosurveillance mettent en évidence des valeurs de concentrations plasmatiques plus élevées, de l'ordre du ng/ml (Vandenberg et al. 2010). Cet écart entre les valeurs prédites et celles observées pourrait être expliqué par l'intervention d'autres voies d'exposition (voie sublinguale, voie cutanée) ou de cycles modulant l'élimination (cycle entéro-hépatique, cycle vésico-hépatorenal) que ne prévoient pas le modèle pharmacocinétique actuel.

Dans le cadre de notre thèse, nous avons évalué la possibilité du cycle vésico-hépatorenal pour le BPA.

## I.4. Absorption vésicale des xénobiotiques

### *I.4.1. Structure de la paroi vésicale*

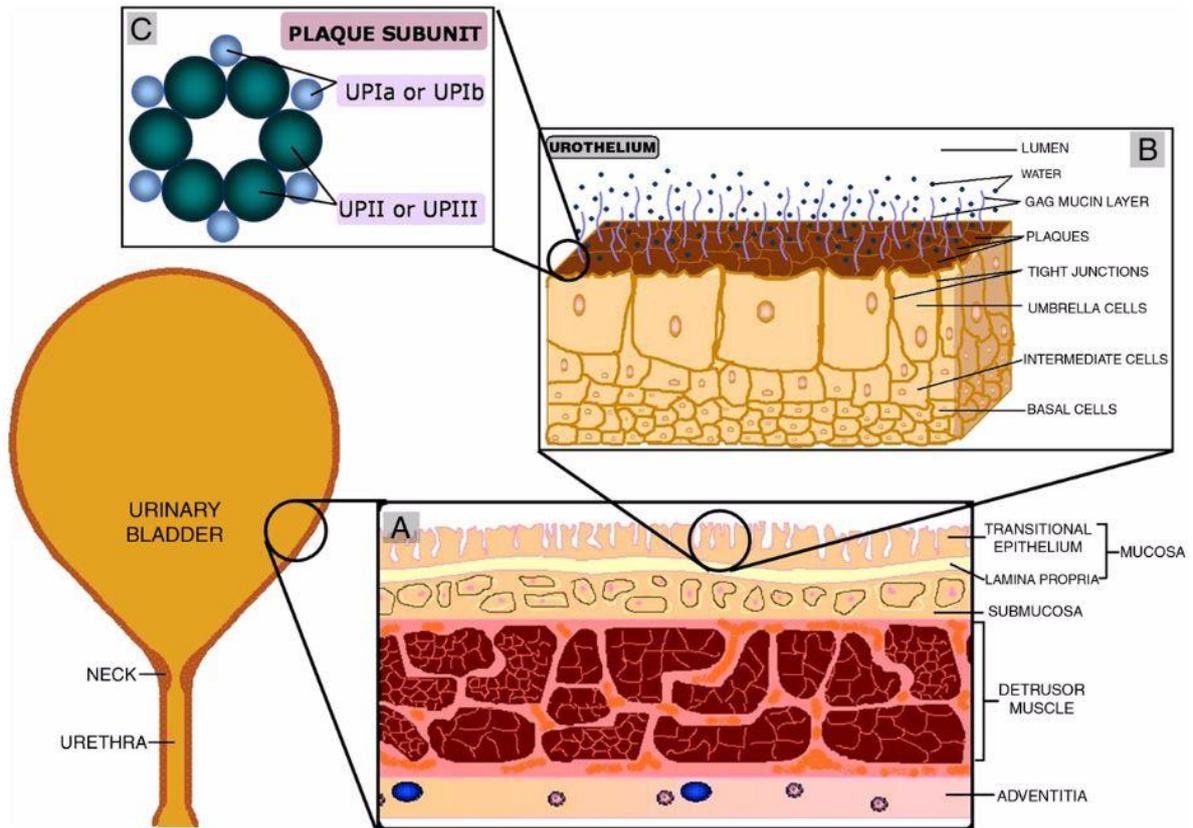
La vessie est un organe creux permettant le stockage à court terme de l'urine, produite par les reins et contenant des déchets. De ce fait, la paroi vésicale doit être imperméable afin que ces substances ne soient pas réabsorbées dans la circulation sanguine.

La paroi vésicale est constituée de plusieurs couches à savoir l'adventice, la plus externe, la musculuse ou détrusor, la sous-muqueuse et la muqueuse constituée de la lamina propria et d'un épithélium transitionnel appelé urothélium (Figure 8).

L'épithélium vésical autorise les changements de forme de la vessie tels que son extension pendant la phase de remplissage ou sa contraction pendant la miction. L'urothélium constitue une véritable barrière anatomique qui limite la réabsorption des substances toxiques de l'urine dans la circulation sanguine.

Il est constitué de trois couches de cellules en contact avec la lame basale : une couche de cellules basales de 5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, une zone intermédiaire avec un diamètre de 20  $\mu\text{m}$  et une couche superficielle ou luminale constituée de cellules en ombrelles caractérisées par la présence de jonctions serrées. Ces cellules de forme hexagonales peuvent s'étirer de 50 à 120  $\mu\text{m}$  en fonction du degré de remplissage vésical. En outre, la surface luminale de l'urothélium est tapissée d'une couche mucineuse constituée essentiellement de glycosaminoglycanes hydrophiles ce qui limite davantage le passage des xénobiotiques à travers la paroi vésicale (GuhaSarkar, Banerjee 2010) (Figure 8).

Cependant, cette barrière n'est pas complètement imperméable et certaines molécules sont capables de diffuser à travers l'urothélium, par passage transcellulaire ou paracellulaire, à travers les jonctions serrées.



**Figure 8** : Structure de la paroi vésicale et de l'urothélium. (Source GuhaSarkar, Banerjee 2010)

A : Les différentes couches de la paroi vésicale

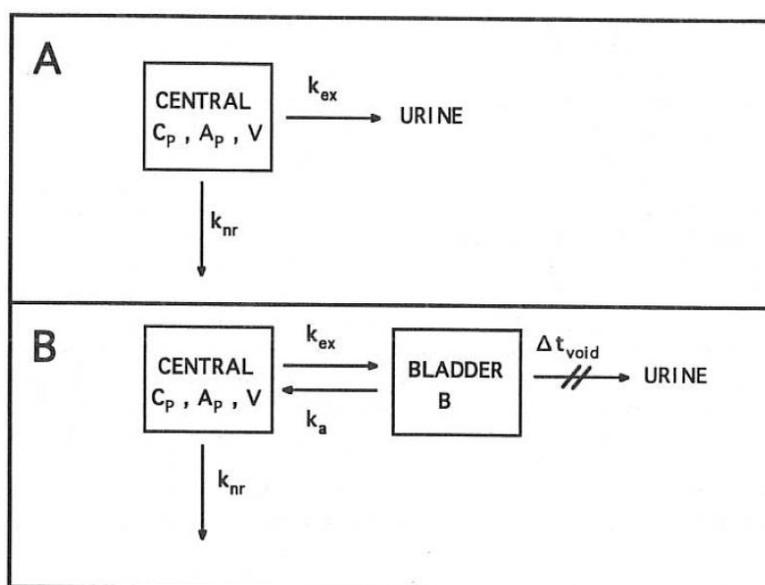
B : Composition cellulaire de l'urothélium montrant que les cellules en ombrelles sont caractérisées par des jonctions serrées couvertes par les plaques et la couche mucineuse. Chaque plaque est constituée de 100 sous-unités.

C : Composition d'une sous-unité : les uroplakines.

### 1.4.2. Absorption vésicale des xénobiotiques

De nombreux composés organiques et leurs métabolites sont principalement excrétés par les reins et concentrés dans l'urine avant d'être éliminés de l'organisme par vidange vésicale. Or les modèles pharmacocinétiques considèrent classiquement la vessie comme un organe de stockage, ne permettant pas une réabsorption systémique de ces molécules à travers la paroi vésicale (Dalton et al. 1994) (Figure 9A).

Cependant, certaines études pharmacocinétiques *in vivo* ou *in vitro* ont mis en évidence une absorption vésicale de différentes substances (Dalton et al. 1994) (Figure 9B).



**Figure 9** : Modèles pharmacocinétiques vésico-plasmatique ouvert (A) et fermé (B) des composés organiques (Source : Dalton et al. 1994).

A : Modèle pharmacocinétique classique. La vessie est seulement un organe de stockage des substances et de leurs métabolites excrétés par les reins.

B : Modèle pharmacocinétique incluant la vessie. La vessie est considérée comme un compartiment périphérique jouant un rôle dans l'absorption et la distribution des molécules.

En effet, une absorption vésicale a été observée pour le salicylate de sodium, acide faible majoritairement sous forme ionisée dans le rang de pH urinaire (compris physiologiquement entre 4,5 et 8 en fonction des conditions métaboliques et du régime alimentaire (GuhaSarkar, Banerjee 2010)) et éliminé principalement par voie urinaire (Au et al. 1991). Ainsi, 90 min après une administration intravésicale de 30 mg/kg de salicylate de sodium chez des rattes adultes possédant un urothélium intact, les concentrations plasmatiques de salicylate de sodium ont atteint  $10,8 \pm 5,6$  µg/ml, suggérant alors un passage de cette molécule à travers la paroi vésicale pour rejoindre la circulation systémique, avec une biodisponibilité moyenne estimée à 13%. De même, l'absorption vésicale de l'antipyrine a été mise en évidence chez des rattes femelles avec une biodisponibilité moyenne de 11,6% (Dalton et al. 1992). L'antipyrine est une base faible qui n'est pas ionisée au pH urinaire physiologique.

Les molécules capables de franchir l'urothélium sont de petite taille avec un poids moléculaire inférieur à 200 Da, pas ou faiblement ionisées dans le rang des pH urinaires physiologiques et présentent un coefficient de partage octanol/eau non compris dans les intervalles -0,4 à -0,2 et -7,5 à -8,0 (Shen et al. 2008). De plus, les substances lipophiles diffusent plus facilement à travers la paroi vésicale que les molécules hydrophiles (Shen et al. 2008; Hu et al. 2010). L'absorption vésicale dépend également du volume urinaire et de l'intégrité de l'urothélium (GuhaSarkar et al. 2010). Lors de maladies telles que les infections de l'appareil urinaire, les cystites, les cancers de la vessie ou lors d'intervention chirurgicale, l'intégrité de l'urothélium est atteinte (Dalton et al. 1994) ce qui favorise le passage à travers la paroi vésicale. Ce dysfonctionnement a été mis à profit dans un but thérapeutique pour traiter le cancer de la vessie par l'administration par voie intravésicale de mitomycine C, permettant ainsi de réduire ses effets délétères systémiques (Gao et al. 1998; GuhaSarkar et al. 2010).

### *1.4.3. Activité $\beta$ -glucuronidase et cycle vésico-hépatorenal*

Dans plusieurs tissus et cellules de l'organisme humain et notamment dans les urines, une activité  $\beta$ -glucuronidase a été mise en évidence (Goldbarg et al. 1959). La  $\beta$ -glucuronidase est une enzyme produite par les lysosomes urinaires et dont l'activité hydrolytique augmente lors de lésions ou de tumeurs de l'appareil urinaire et lors d'une nécrose tubulaire, d'un rejet d'une greffe rénale, d'hypertension vraie, d'administration de molécules néphrotoxiques, de glomérulonéphrites, de pyélonéphrite (Ho 1995). L'activité  $\beta$ -glucuronidase peut également avoir une origine bactérienne (Ho, Ho 1985). Il a été observé que des souches d'*Escherichia coli* communément impliquées dans les infections urinaires possèdent une activité  $\beta$ -glucuronidase. En effet, plus de 97% d'*Escherichia coli* isolées expriment le gène codant pour l'enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase (Vila et al. 1991; Maheux et al. 2008; Tapsall, McIver 1995). Par ailleurs, l'activité  $\beta$ -glucuronidase varie en fonction de son origine : l'enzyme lysosomiale est plus active à un pH de 5, alors que l'enzyme bactérienne est active à un pH de 6,5.

La  $\beta$ -glucuronidase permet l'hydrolyse des composés glucuronides et notamment des métabolites formés par glucuronoconjugaison au cours du processus de détoxification de l'organisme vis-à-vis de certaines molécules. Ainsi, l'activité  $\beta$ -glucuronidase présente dans les urines pourrait entraîner la déconjugaison des métabolites éliminés par voie urinaire et donc une réactivation de la molécule. Cette forme active pourrait alors traverser la paroi vésicale, être réabsorbée dans la circulation générale et ainsi entamer un cycle vésico-hépatorenal conduisant in fine à une exposition interne plus élevée. En effet, ce cycle de déconjugaison-reconjugaison a été mis en évidence, in vivo chez des rats, pour le diflunisal, et son métabolite, l'acyl glucuronide (Dickinson, King 1996).

## II. Etude expérimentale

### II.1. Contexte de notre étude

Chez l'Homme, les études toxicocinétiques publiées ont montré que le BPA absorbé par voie digestive est intensément métabolisé en BPA-G par effet de premier passage hépatique et que la totalité de la dose de BPA ingérée est retrouvée dans les urines essentiellement sous la forme de BPA-G au cours des quatre à six heures qui suivent son entrée dans l'organisme (Völkel et al. 2002; Völkel et al. 2008; Tsukioka et al. 2004). C'est la raison pour laquelle, la quantité urinaire de BPA total, BPA et ses métabolites, est considérée comme étant un marqueur pertinent de l'exposition interne au BPA, toutes sources d'exposition confondues.

Ainsi, les autorités réglementaires utilisent les données urinaires issues des études de biosurveillance humaine pour estimer l'exposition humaine quotidienne au BPA correspondant à la quantité de BPA absorbée quotidiennement, toutes sources confondues, selon l'équation 1 (Lakind, Naiman 2011). Les expositions moyennes et élevées ont ainsi été estimées à partir de la moyenne géométrique et du 95<sup>ème</sup> percentile des concentrations urinaires en BPA des différentes études européennes respectivement à 39 et 184 ng/(kg.j) chez l'adulte (Lakind, Naiman 2011).

$$\text{Equation 1 : Exposition quotidienne} = \frac{C_{BPA} \times V_{urine}}{P_c} \text{ en ng/(kg.j)}$$

Avec  $C_{BPA}$  : la concentration urinaire en BPA total (BPA et ses métabolites)

$V_{urine}$  : volume d'urine produit par jour (ml/j),

$P_c$  : poids corporel

Cependant, les effets délétères du BPA sont généralement liés aux concentrations plasmatiques et non à la dose. A partir de cette évaluation de l'exposition quotidienne et de la clairance plasmatique du BPA estimée chez l'Homme à 25 ml/(kg.min) (Teeguarden 2005; Collet et al. 2015), les concentrations plasmatiques en BPA prédites à l'aide de l'équation 2 sont très faibles, de l'ordre du pg/ml.

$$\text{Equation 2 : } C_{ss\ BPA} = \frac{Dose_{BPA} \times F}{Cl_{p\ BPA}}$$

Avec  $C_{ss\ BPA}$  : concentration plasmatique à l'équilibre de BPA

$Dose_{BPA}$  : dose de BPA à laquelle est exposé un individu quotidiennement, c'est-à-dire 184 ng/(kg.j) dans le scénario pire cas de l'exposition humaine au BPA

$Cl_{BPA}$  : clairance plasmatique du BPA chez l'Homme, c'est-à-dire 25ml/(kg.min) (Collet et al 2015 ; Teeguarden et al., 2005)

F : biodisponibilité du BPA absolue estimée à 3% par voie orale (Doerge et al. 2010a, Thèse Farbos, 2012)

Ainsi, l'estimation de l'exposition interne au BPA de la population humaine fondée sur ces modèles pharmacocinétiques donne des valeurs très inférieures aux valeurs moyennes, de l'ordre du ng/ml, rapportées dans certaines études de biosurveillance (Vandenberg et al. 2010).

Cette discordance entre les valeurs prédites et ces valeurs observées est à l'origine de controverses entre les scientifiques. En effet, l'agence réglementaire européenne s'appuie sur le modèle pharmacocinétique pour rejeter les valeurs élevées des concentrations plasmatiques de BPA en les attribuant à des contaminations des échantillons par le BPA présent dans l'environnement tandis que certains scientifiques interpellent les agences réglementaires pour leur demander d'ajuster le modèle pharmacocinétique aux concentrations plasmatiques élevées en BPA rapportées chez l'Homme.

Ainsi, afin de documenter la pharmacocinétique du BPA chez l'Homme et ses voies d'élimination, une approche comparative de la pharmacocinétique du BPA chez différentes espèces de mammifères a été développée (Collet et al. 2015). L'analyse des données a montré que chez toutes les espèces examinées, la fraction de la dose de BPA administrée par voie intraveineuse ou orale n'est pas retrouvée en totalité dans les urines, ce qui suggère l'existence d'autres voies d'élimination telle que l'élimination fécale.

De plus, une étude menée sur des chiens par Gayraud et al. en 2013, recevant du BPA par gavage, a montré une biodisponibilité du BPA de 70 à 90% par voie sublinguale. Cette voie d'exposition n'était jusqu'à présent pas prise en compte dans le modèle toxicocinétique du BPA et pourrait être à l'origine d'une sous-estimation de l'exposition interne au BPA administré par gavage.

Par ailleurs, le BPA est une molécule de faible poids moléculaire, non ionisée au pH urinaire physiologique, possédant un caractère relativement lipophile (Tableau 1) et essentiellement éliminé par voie urinaire ce qui suggère qu'il pourrait constituer une molécule candidate pour franchir la paroi vésicale.

De plus, le BPA se retrouve majoritairement sous forme BPA-G, composé hydrophile, dans les urines. Or une activité  $\beta$ -glucuronidase est présente dans les urines et pourrait être responsable d'une réactivation du BPA-G en BPA dans la vessie.

Ainsi, une éventuelle absorption du BPA par l'épithélium vésical pourrait être un facteur explicatif à prendre en compte pour relier les concentrations plasmatiques rapportées dans certaines études aux quantités de BPA-G éliminées par les urines. De ce fait, au même titre que le cycle entéro-hépatique, un cycle vésico-hépto-rénal, plus ou moins ouvert en fonction de la vitesse d'hydrolyse vésicale du BPA-G et de la fréquence des mictions, pourrait contribuer à une exposition plasmatique plus élevée que ne le prévoient les modèles pharmacocinétiques actuels qui considèrent une élimination urinaire irréversible du BPA-G (Dalton et al. 1994).

Si ces hypothèses étaient vérifiées, les situations expérimentales ayant évalué l'élimination urinaire du BPA par la collection fractionnée d'urine sur des périodes de temps relativement rapprochées, conduiraient à une sous-estimation de la dose de BPA absorbée et donc de l'exposition interne humaine à ce xénobiotique.

Dans ce contexte, notre étude a pour objectif de quantifier l'absorption vésicale du BPA et du BPA-G, afin d'évaluer si ce mécanisme est susceptible de modifier l'exposition interne au BPA.

### *II.1.1 Choix du modèle ovin*

Pour répondre à cette problématique, le modèle ovin a été choisi. En effet, des précédents travaux de recherches réalisés au laboratoire ont montré que le modèle ovin constitue un modèle pertinent pour étudier la toxicocinétique du BPA chez l'Homme (Collet et al. 2010). Les paramètres pharmacocinétiques (clairance plasmatique, volume de distribution à l'équilibre et demi-vie du BPA) chez le mouton et l'Homme sont très proches (Figure 9). De plus, chez les six espèces considérées (souris, rat, chien, cochon, mouton et cheval), la clairance plasmatique du BPA est proche du débit de filtration hépatique ce qui suggère un rôle important du foie dans la détoxification du BPA par l'organisme (Collet et al. 2015).

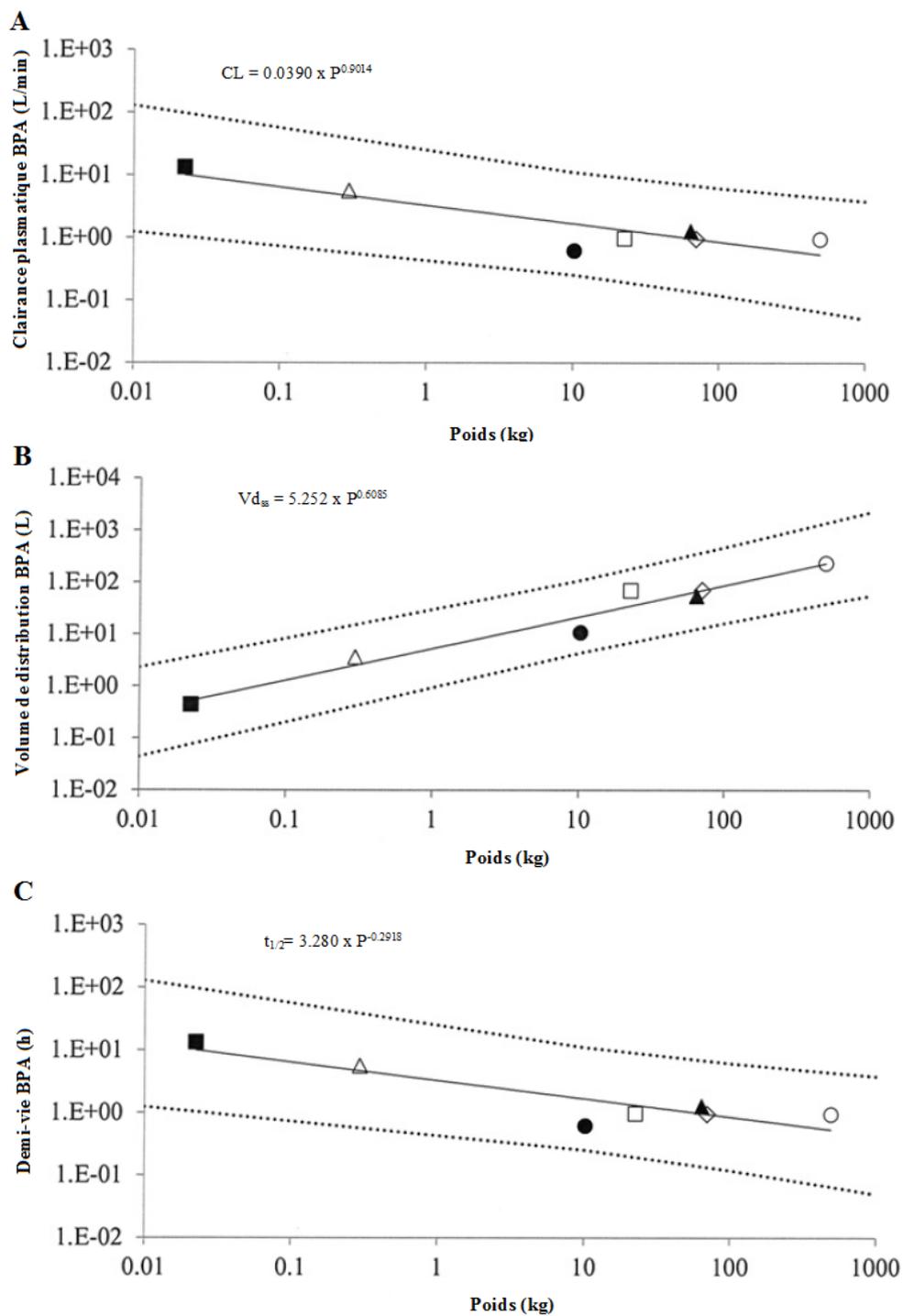


Figure 10 : Echelle allométrique de la clairance plasmatique (CL, A), du volume de distribution à l'état d'équilibre ( $Vd_{ss}$ , B) et de la demi-vie ( $t_{1/2}$ , C) du BPA (Source Collet et al. 2015).

Les données ont été acquises chez le cheval (cercle vide), le mouton (triangle rempli), le cochon (carré vide), le chien (cercle rempli), le rat (triangle vide), la souris (carré rempli). Les valeurs chez l'homme adulte de 70 kg (diamant) ont été obtenues par une approche allométrique. La ligne continue représente la régression linéaire et les lignes pointillées, l'intervalle de prédiction.

### *II.1.2 Objectif de l'étude*

Le premier objectif de ce travail vise à évaluer le passage du BPA à travers la paroi vésicale chez la brebis.

Le deuxième objectif est de tester l'hypothèse d'une hydrolyse vésicale du BPA-G en BPA chez la brebis saine ou lors d'infection urinaire.

Pour cela, nous avons évalué l'absorption vésicale ainsi que l'exposition interne de la brebis au BPA et au BPA-G après une administration intravésicale d'une dose de BPA de 2 mg/kg et après une administration intravésicale de BPA-G à la dose approximative de 10 à 20 mg/kg, en présence ou en absence d'un inoculum bactérien.

## II.2. Matériels et méthodes

Deux études ont été réalisées :

- Une première étude réalisée sur quatre brebis dans le but d'évaluer l'absorption vésicale du bisphénol A.
- Une deuxième étude a été menée sur trois brebis pour tester l'hypothèse d'une hydrolyse vésicale du BPA-G en BPA par les glucuronidases urinaires et l'impact d'une d'infection urinaire sur l'absorption vésicale du BPA-G.

### *II.2.1. Plan expérimental*

La première expérience a été réalisée sur quatre brebis en deux périodes, deux brebis, B3 et B4 en octobre 2014 et deux brebis B5 et B6 en juin 2015. Elles ont reçu par cathétérisme intravésical du BPA dissout dans une solution Ethanol :NaCl :urine, volume 1 :1 :98 à la concentration de 2 mg/ml.

La seconde expérience s'est déroulée sur trois brebis (B3, B4, B4bis) au cours de trois périodes, la première période en octobre 2014 et en juin 2015 sur deux périodes séparées de 7 jours.

Les brebis B3, B4 en octobre 2014 et les brebis B3, B4bis en juin 2015 période 1 ont reçu une administration vésicale d'urine de deux brebis ayant reçu au préalable une dose de 100 mg/kg de BPA par voie orale.

Les brebis B3, B4bis en juin 2015, période 2, ont reçu une administration vésicale d'urine surchargées en BPA-G (urines de deux brebis ayant reçu au préalable une dose de 100 mg/kg de BPA par voie orale) à laquelle a été ajoutée un inoculum bactérien.

Le plan expérimental des expériences réalisées est représenté ci-dessous.

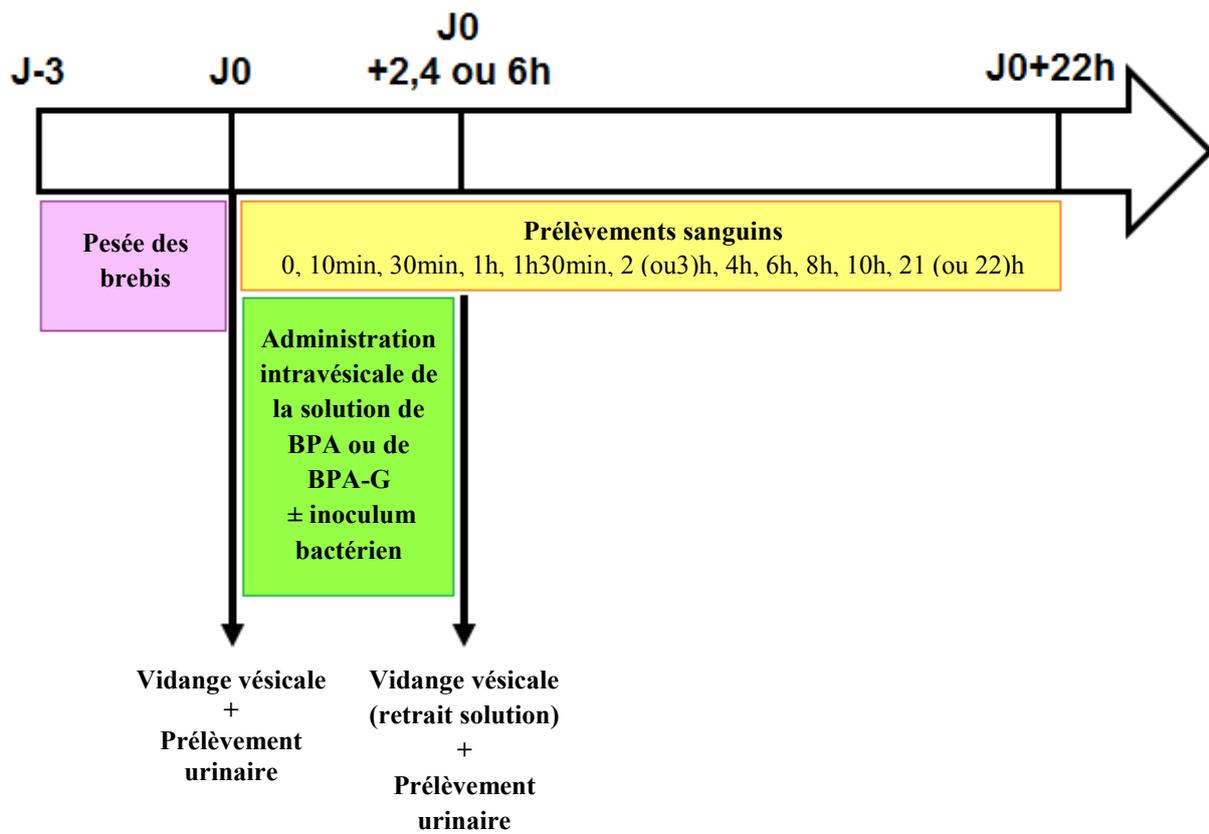


Figure 11 : Plan expérimental des expériences réalisées.

### II.2.2. Animaux

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les exigences de la législation française concernant les animaux de laboratoire sous le numéro d'agrément C31-55524 délivré par le Ministère de l'Agriculture.

La première étude a été réalisée sur quatre brebis adultes (B3, B4, B5 et B6) de race Lacaune pesant en moyenne  $78,5 \pm 10,6$  kg. La seconde, a été réalisée sur trois brebis adultes (B3, B4 et B4 bis) de race Lacaune de poids moyen  $78,6 \pm 3,7$  kg.

Avant les expériences et pendant les différentes phases des protocoles, les brebis ont été placées dans des boxes collectifs soumis aux variations naturelles de la durée du jour et nourries avec des granulés Brebilac® (400 g/jour/animal) distribués en deux repas quotidiens. La paille et le foin étaient distribués à volonté. Elles ont été abreuvées *ad libitum* excepté pendant le temps de résidence de la solution de BPA ou BPA-G dans la vessie où elles n'ont pas été abreuvées.

Les brebis ont été pesées dans les trois jours qui ont précédé les administrations intravésicales et tondues au niveau de la veine jugulaire.

Lors de la deuxième expérience, les brebis, donneuses d'urines chargées en BPA-G, ont été logées dans un box séparé de celui des autres brebis.

### *II.2.3. Préparation des solutions à administrer*

Tout le matériel utilisé pour la préparation des solutions était en verre ou en polypropylène.

- Solution de BPA

Le BPA utilisé est sous forme de poudre blanche (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France).

La solution de BPA a été préparée dans un flacon ambré à l'abri de la lumière, juste avant l'administration vésicale. Afin d'éviter toute source de contamination ultérieure, l'ensemble de la préparation des solutions de BPA a été réalisée dans une pièce identifiée pour la préparation des solutions d'administration et seul du matériel jetable a été utilisé.

Environ 400 ml d'urines de brebis contrôles ont été prélevées, centrifugées à 3000 g pendant 10 min puis le surnageant a été pipeté. Lors des expériences réalisées en juin 2015, le surnageant a été filtré sur 0,2 µm sous la hotte.

Une solution mère de BPA à la concentration de 200 mg/ml a été dissoute dans l'éthanol (2 g de bisphénol A dans 10 ml d'éthanol). Cette solution a été diluée deux fois dans du sérum physiologique (5 ml de la solution mère de BPA à la concentration de 200 mg/ml et 5 ml de sérum physiologique), soit une solution intermédiaire à la concentration de 100 mg/ml. Cette solution éthanolique a ensuite été diluée dans les urines de brebis contrôles (98 ml d'urine pour 2 ml de solution éthanolique, soit une concentration de 2 mg/ml).

Le volume de solution administré par voie vésicale a été de 100 à 150 ml soit environ 2 ml/kg.

- Urines surchargées en BPA-G

Pour obtenir des urines avec des concentrations élevées de BPA-G, deux brebis privées d'eau depuis la veille au soir, ont reçu par voie orale du BPA à la dose de 100 mg/kg par sondage naso-oesophagien.

Une solution de BPA à la concentration de 100 mg/ml a été préparée dans l'heure qui précède l'administration dans une solution éthanol : huile de maïs (1 :9, vol :vol).

La totalité des urines a été collectée deux heures après l'administration de BPA et a été pooling. Le volume a été enregistré et les urines ont été centrifugées à 3000 g pendant 10 min. Lors des expériences de juin 2015, les urines ont été filtrées sur 0,2 µm sous la hotte. Deux aliquots de 100 µL et 1 ml ont été conservés à -20°C pour le dosage de BPA et de BPA-G.

Les concentrations urinaires de BPA-G attendues sont de l'ordre de 10 mg/ml (Thèse Collet, 2012).

- Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum bactérien utilisé, pour la deuxième expérience, est une souche d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive qui a été isolée à partir d'urines de brebis.

A partir d'une culture de 24h en milieu Lbagar (LB), une suspension bactérienne de  $DO_{600}=0,05$  a été préparée dans 4 ml de bouillon LB. Ces bactéries ont été cultivées pendant 2-3 h jusqu'à obtenir une  $DO_{600}=0,5$  correspondant à environ  $10^8$  UFC/ml. La suspension bactérienne a été centrifugée à 3000g pendant 10 min et reprise dans 4 ml d'urine.

500 µL de cette suspension ont été mélangés à 500 ml d'urines permettant alors d'obtenir un inoculum bactérien à la concentration de  $10^5$  UFC/ml. Ce seuil de bactériurie de  $10^5$  UFC/ml a été choisi afin de ne pas entraîner de symptômes de cystite aiguë (Kaas 1960, Andem 1996, Afssaps 2008).

#### *II.2.4. Procédures expérimentales*

##### **❖ Etude 1 : évaluation de l'absorption vésicale du BPA chez la brebis**

- Administration intravésicale de BPA

La solution de BPA a été administrée dans la vessie à l'aide de la sonde de Foley (RÜSCH®), mise en place après nettoyage de la région périgénitale avec de la polyvidone iodée (Vétédine® savon) et essuyage. Puis, la vidange complète de la vessie a été réalisée par aspiration modérée de l'urine avec une seringue de 50 ml.

La solution urinaire de BPA a été administrée à l'aide d'une seringue de 50 ml puis le contenu résiduel dans la sonde de Foley a été poussé par injection d'air.

La solution a été laissée deux heures dans la vessie.

- Prélèvements sanguins

Les échantillons de sang (environ 4 ml) ont été prélevés par ponction de la veine jugulaire droite à l'aide d'une aiguille à usage unique (22G, 0,6 mm de diamètre et 25 mm de long, Terumo®) et de tubes vacutainers de 4 ml en polypropylène contenant de l'héparinate de lithium.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés avant l'administration de la solution de BPA puis au temps 10min, 30min, 1h, 1h30min, 2 (ou3)h, 4h, 6h, 8h, 10h, et 22h après l'administration de la solution de BPA.

Les tubes ont été immédiatement placés dans de la glace avant d'être centrifugés pendant 10 minutes à 3000g à 4°C dans un délai n'excédant pas 20 min après la collecte. Après centrifugation, le plasma a été réparti en deux fractions aliquotes de 0,1 et 1 ml, conservées à -20°C jusqu'au dosage du BPA, BPA-S et BPA-G.

- Prélèvements urinaires

La totalité des urines a été recueillie à l'aide d'une seringue de 50 ml (Terumo®), avant et 2h après l'administration vésicale de BPA. Le volume a été mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée puis enregistré.

Un échantillon de 50 ml a été conservé dans un tube polypropylène (Falcon) de 50 ml placé dans de la glace. Les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 3000g à 4°C. L'urine a été répartie en 2 fractions aliquotes de 0,1 et 1 ml, respectivement, conservées à -20°C jusqu'au dosage du BPA et de ses métabolites.

#### ❖ **Etude 2 : évaluation de l'absorption vésicale de BPA-G chez la brebis en présence ou non d'un inoculum bactérien**

- Administration intravésicale de BPA-G en présence ou non d'un inoculum bactérien

Pour chaque période expérimentale (octobre 2014 ; juin 2015 période 1 et juin 2015, période 2), les brebis ont reçu une administration intravésicale de la solution urinaire de BPA-G selon la même procédure que celle décrite pour l'administration de la solution de BPA lors de la première étude.

Les urines ont été laissées dans la vessie pendant 6h pour deux brebis en octobre 2014 et pendant 4h pour l'expérience de juin 2015.

- Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été réalisés avant l'administration de la solution de BPA-G en présence ou non d'un inoculum bactérien puis au temps 10min, 30min, 1h (ou 50 min et 1h20min), 1h30min, 3h, 4h, 6h, 8h, 10h, et 21h après l'administration de la solution de BPA.

Les échantillons sanguins ont été prélevés selon la même procédure que celle décrite pour la première étude.

- Prélèvements urinaires

Les urines ont été recueillies, traitées et conservées, avant et 4 ou 6h après l'administration de la solution de BPA-G selon la même procédure que celle décrite lors de la première étude.

#### *II.2.5. Modalités d'analyse des échantillons sanguins et urinaires*

- Dosage du BPA et des métabolites

Le BPA, le BPA-S et le BPA-G ont été dosés dans le plasma et dans les urines après extraction à l'acétonitrile par la méthode mise en place au laboratoire qui utilise la chromatographie liquide de haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-UV/SM) (Lacroix et al. 2011) .

La gamme d'étalonnage était de 1 à 500 ng/ml pour le BPA et de 5 à 10000 ng/ml pour la BPA-G dans le plasma et la gamme de concentrations était de 5 à 500 ng/ml pour le BPA et de 5 à 10000 ng/ml pour le BPA-G dans les urines.

- Analyse cytobactériologique urinaire

Pour les expériences réalisées en juin 2015, lors de la vidange vésicale avant et après l'administration de la solution de BPA ou de BPA-G en présence ou non d'un inoculum bactérien, un échantillon urinaire de 1,5 ml a été conservé dans un tube eppendorf puis envoyé directement au laboratoire central de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour un examen cytobactériologique afin de dénombrer les différents éléments cellulaires présents et d'évaluer la présence ou l'absence de bactéries.

### II.2.6. Analyse des données

La cinétique temporelle des concentrations plasmatiques en BPA et BPA-G a été analysée permettant alors l'évaluation de la concentration plasmatique en BPA ou BPA-G maximale, du temps d'occurrence de cette concentration maximale et de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques (AUC) en BPA ou BPA-G calculée à l'aide de la méthode des trapèzes.

La quantité de BPA ou de BPA-G absorbée à travers l'épithélium vésical a été estimée à partir de l'équation 2 :

$$\text{Equation 2 : } Xu = AUC_{\text{intravésicale}} \times Cl_p$$

Avec Xu, la quantité de BPA ou de BPA-G absorbée, AUC, l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA ou de BPA-G évaluées sur la période considérée et Cl la clairance plasmatique chez la brebis évaluée à 25 ml/(kg.min) pour le BPA et de 5,5 ml/(kg.min) pour le BPA-G (Collet et al. 2015; Gauderat et al. 2016).

La biodisponibilité du BPA ainsi que le pourcentage de la dose absorbée de BPA-G a alors estimé selon l'équation 3 :

$$\text{Equation 3 : } F = \frac{AUC_{\text{intravésicale}}}{AUC_{IV}} \times \frac{Dose_{IV}}{Dose_{\text{intravésicale}}}$$

Avec F, la biodisponibilité du BPA ou le pourcentage de la dose absorbée de BPA-G, AUC, l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA ou de BPA-G évaluées sur la période considérée et une dose de BPA ou de BPA-G administrée par voie IV ou par voie vésicale.

Par ailleurs, les quantités de BPA et de BPA-G dans les urines ont été évaluées avant et après l'administration vésicale.

## II.3. Résultats

### II.3.1. Etude 1 : absorption vésicale du BPA

La solution de BPA, administrée par voie vésicale et utilisée pour les expériences effectuées en octobre 2014 n'a pas été dosée.

La solution mère de BPA, avec une concentration théorique de 100 mg/ml, préparée pour l'administration intravésicale lors des expériences de juin 2015 a été dosée par HPLC-SM et la concentration mesurée a été du même ordre de grandeur que la concentration théorique. De plus, la solution ne contenait pas de BPA-G (Tableau 4).

<b>Echantillon</b>	<b>C. BPA (mg/ml)</b>	<b>C. BPA-G (ng/ml)</b>
PI-DoseBPA(EtOH :NaCl) 100mg/ml	104,33	infLOD
PI-DoseBPA(EtOH :NaCl) 100mg/ml #2	100,27	infLOD

**Tableau 4** : Concentration de la solution mère de BPA (EtOH : NaCl 0.9%) préparée pour l'administration intravésicale des brebis B5 et B6 en juin 2015.

L'ensemble des données plasmatiques sont décrites dans le tableau 5.

Les figures 11 illustrent l'évolution des concentrations plasmatiques de BPA pour les quatre brebis (B3, B4 en 2014 et B5, B6 en 2015) après une administration intravésicale d'une solution de BPA à la dose de 2 mg/kg.

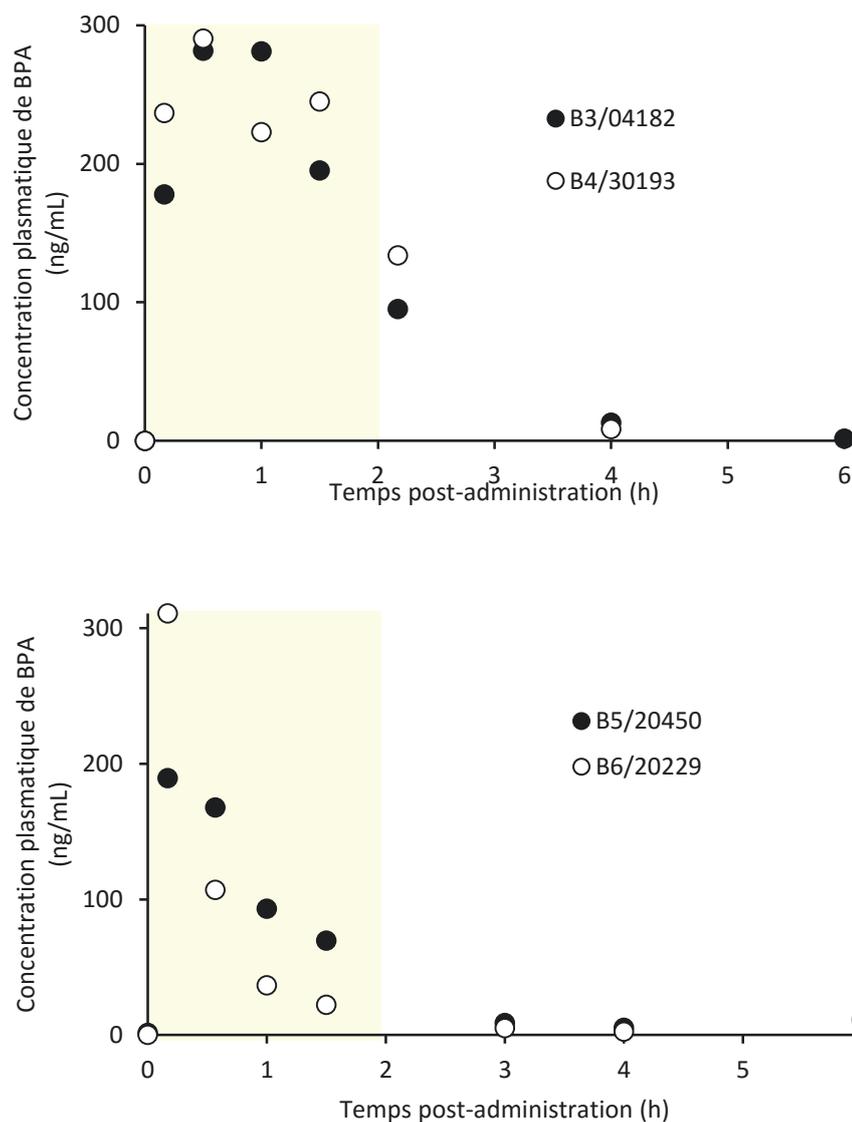
**Tableau 5** : Concentrations plasmatiques de BPA après une administration intravésicale de BPA à la dose de 2 mg/kg (solution Ethanol:NaCl:urine, vol 1:1:98 à la concentration de 2 mg/ml).

Temps post-administration (h)	B3/04182			B4/30193		
	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)
0	0.0	infLOD	infLOD	0.0	infLOD	infLOD
0.167	178	1029	infLOQ	237	730	infLOQ
0.50	282	2913	14.3	290	1933	7.0
1	281	3787	21.8	223	1874	13.3
1.5	195	3605	18.4	245	2605	20.0
2.17	95	2788	19.1	134	2304	25.7
4	13	750	9.1	8	377	7.4
6	1.4	300	infLOQ	0.0	162	infLOQ
8	0	117	infLOQ			
10.17	infLOD	67	infLOQ	infLOD	39	infLOQ
22	infLOQ	11	infLOD	infLOD	infLOQ	infLOD

Expérience de 2014 : brebis B3 et B4. Le temps de résidence de la solution de BPA a été de 2 h.

Temps post-administration (h)	B5/20450			B6/20229		
	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)
0	1.4	infLOD	infLOD	infLOD	infLOD	infLOD
0.167	189.3	1789	infLOQ	310.93	2313.03	5.3
0.57	167.7	2588	7.0	106.90	2016.27	5.6
1	93.1	1214	9.4	36.62	695.23	infLOQ
1.5	69.6	715	11.4	22.26	408.09	infLOQ
3	8.7	166	infLOQ	5.0	99	infLOD
4	5.2	139	infLOQ	2.4	42	infLOQ
6	11.0	81	infLOQ	1.6	18	infLOD
8	2.2	28	infLOD	infLOD	infLOQ	infLOD
10	1.1	18	infLOD	5	6.7	infLOD
22.4	infLOD	infLOD	5.2	infLOQ	infLOQ	infLOQ

Expérience de 2015 : brebis B5 et B6. Le temps de résidence de la solution de BPA a été de 2 h.



**Figures 12** : Evolution temporelle des concentrations de BPA (ng/ml) des brebis B3, B4 en 2014 et B5, B6 en 2015 après une administration intravésicale de BPA à la dose de 2 mg/kg. Le temps de résidence de la solution vésicale de BPA a été de 2h.

Chez les quatre brebis, les concentrations de BPA plasmatiques augmentent dans les minutes qui suivent l'administration intravésicale de BPA, atteignant très rapidement des concentrations maximales élevées de l'ordre de 200 à 300 ng/ml. Elles sont maintenues à ces niveaux pendant le temps de résidence de la solution vésicale de BPA (Figures 11).

Lors des expériences en 2015, les concentrations de BPA plasmatiques ont diminué assez rapidement chez les brebis B5 et B6, même pendant le temps de résidence de la solution urinaire de BPA (Figures 11).

Des concentrations élevées de BPA-G de l'ordre de 1000 à 3000 ng/ml ont été observées dans les heures qui ont suivi l'administration intravésicale de la solution. Ainsi, le BPA absorbé par voie vésicale, subit une métabolisation hépatique et est éliminé sous forme inactive ce qui suggère la réalisation d'un cycle vésico-hépto-rénal fermé. De plus, le BPA-G, détecté en plus grande quantité dans le plasma que le BPA-S, est le principal métabolite du BPA (Tableau 5).

Les concentrations plasmatiques de BPA et de ses métabolites diminuent rapidement après la vidange de la vessie. En effet, chez les quatre brebis, vingt heures après la vidange de la vessie, les concentrations plasmatiques de BPA, BPA-G et BPA-S sont inférieures à la LOD ou LOQ. Cette situation correspond à un cycle vésico-hépto-rénal ouvert avec une élimination du BPA par miction (Figures 11, Tableau 5).

Ainsi, ces résultats montrent une absorption systémique rapide et importante du BPA à partir de la vessie, avec une biodisponibilité relative, estimée à partir de la clairance plasmatique moyenne de 25 ml/(kg.min) de la brebis (Collet et al. 2015) de 42 et 46% pour les brebis B3 et B4 et de 21,2 et 15,7% pour les brebis B5 et B6.

Les échantillons urinaires n'ont pas été dosés pour les expériences de 2014, c'est-à-dire pour les brebis B3 et B4.

Le tableau 6 présente le bilan massique du BPA établi à partir des données urinaires et plasmatiques obtenues après une administration intravésicale de BPA à la dose de 2 mg/kg, pour les deux brebis B5 et B6 de l'expérience de 2015.

<b>Concentrations ou quantités urinaires 2h après l'administration intravésicale de la solution de BPA</b>									
<b>Brebis</b>	Poids (kg)	Dose BPA (mg in toto)	C. BPA urine (ng/ml)	C. BPA-G urine (ng/ml)	Volume urine vidangée (ml)	Quantité BPA urine (mg) (% dose)	Quantité BPA-G urine (mg) (% dose)	Dose de BPA absorbé (%)	Biodisponibilité estimée à partir des données plasmatiques (%)
<b>B5</b>	86	172	88713	211334	270	24,0 (13,9%)	57,1 (33,2%)	86,1	21,2
<b>B6</b>	88,6	177,2	5333	107703	195	1.04 (0,6%)	21.0 (11,9%)	99,4	15,7

**Tableau 6** : Bilan massique du BPA à partir des données urinaires et plasmatiques obtenues sur deux brebis B5 et B6 qui ont reçu une administration intravésicale de BPA à la dose de 2 mg/kg avec un temps de résidence vésical de 2h.

$$\text{Avec : } \text{Quantité}_{BPA \text{ urine}} = C_{BPA \text{ urine}} \times \text{Volume}_{urine}$$

$$\text{Quantité}_{BPA-G \text{ urine}} = C_{BPA-G \text{ urine}} \times \text{Volume}_{urine}$$

$$\text{Dose de BPA}_{absorbé} = \frac{\text{Dose}_{BPA} - \text{Quantité}_{BPA \text{ retrouvé dans urine}}}{\text{Dose}_{BPA}} \text{ en } \%$$

Les données urinaires montrent une différence importante entre les pourcentages de la dose de BPA absorbée par voie intravésicale (correspondant à la différence entre la quantité de BPA administrée par voie intravésicale et celle récupérée dans les urines après un temps de résidence de deux heures) et la quantité de BPA absorbée, estimée à partir des données plasmatiques. Ainsi 64,9 et 83,7% de la dose initiale de BPA n'a pas été retrouvée dans les urines à la fin de la période de 2h (Tableau 6).

Les quantités de BPA-G retrouvées dans les urines deux heures après l'administration vésicale de la solution de BPA à 2 mg/kg ont été de 33,2 et 11,9% de la dose respectivement pour B5 et B6. Ces quantités sont cohérentes avec la biodisponibilité estimée à partir des données plasmatiques à savoir 21,2 et 15,7% respectivement pour B5 et B6 ce qui suggère que le BPA-G retrouvé dans les urines provient de la métabolisation du BPA absorbé par voie vésicale (Tableau 6).

Une hématurie et une desquamation des cellules urothéliales ont été observées sur la brebis B5 deux heures après l'administration de la solution urinaire de BPA (Tableau 7). De plus, la présence d'entérobactéries  $\beta$ -glucuronidase positives a été mise en évidence lors de la mise en culture des urines de B5 et B6 sur gélose Mac Conkey à 37°C et sur gélose TBX à 42°C avant l'administration intravésicale de la solution de BPA à raison d'une concentration de 5,0 UFC/ml et  $1,08.10^4$  UFC/ml respectivement mais ces bactéries n'ont pas été retrouvées sur les urines collectées au moment de la vidange vésicale (Tableau 8). Cependant, la présence de ces bactéries  $\beta$ -glucuronidases positives n'a pas modifié de façon majeure l'absorption vésicale du BPA chez ces brebis.

	<b>B5/20450</b>		<b>B6/20229</b>	
	Avant administration	Après vidange vésicale	Avant administration	Après vidange vésicale
<b>Protéines</b>	0 à +	+++	0 à +	+++
<b>pH</b>	9	9	9	9
<b>Densité</b>	1,042	1,027	1,035	1,023
<b>Hémoglobine</b>	0	+	0	0
<b>Cellules épithéliales</b> (par champ microscopique)	1	2,1	0,3	0,9
<b>Globules rouges</b>	0	>10	0	3,1
<b>Globules blancs</b>	0	1,5	0	1
<b>Bactéries</b>	0	0	0	0
<b>Cyto-centrifugation</b>	Nombreux débris et squames, peu de cellules urothéliales	Nombreux débris et squames, population modérément abondante de cellules urothéliales	Nombreux débris et squames, quelques cellules urothéliales	Nombreux débris et squames, peu de neutrophiles
<b>Conclusion</b>	Protéinurie à confirmer	Hématurie, desquamation des cellules urothéliales Protéinurie à confirmer	Protéinurie à confirmer	Protéinurie à confirmer

**Tableau 7** : Analyse cytologique réalisée sur les urines des brebis B5 et B6 pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale de la solution de BPA à la dose de 2 mg/kg. Le temps de résidence de la solution a été de 2h.

	<b>B5/20450</b>		<b>B6/20229</b>	
	Avant administration	Après vidange vésicale	Avant administration	Après vidange vésicale
<b>Nombre de colonies</b> (culture sur gélose Mac Conkey à 37°C)	5	0	Non déterminé	0
<b>Concentration bactérie</b> (UFC/ml)	5,0	<1	1,08.10 <sup>4</sup>	<1
<b>Propriété β-glucuronidase</b> (culture sur gélose TBX à 42°C)	+		+	

**Tableau 8** : Analyse bactériologique réalisée sur les urines des brebis B5 et B6 pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale de la solution de BPA à la dose de 2 mg/kg. Le temps de résidence de la solution a été de 2h.

### *II.3.2. Etude 2 : absorption vésicale du BPA-G en absence d'un inoculum bactérien*

En octobre 2014, la quantité de BPA-G urinaire administrée n'a pas été mesurée, mais a été estimée à 700-1400 mg in toto (Thèse Collet, 2012) correspondant à une dose de 10 à 20 mg/kg.

La solution urinaire de BPA-G, utilisée pour les expériences en 2015, a été dosée par HPLC-SM après une dilution de 10000. La concentration est de 26,7 mg/ml, soit une dose de 2,41 g in toto pour un volume de 90 ml d'urine.

L'ensemble des données plasmatiques pour l'expérience de 2014 et celle de 2015 sont décrites dans le tableau 9.

Les figures 12 illustrent l'évolution des concentrations plasmatiques de BPA pour les quatre brebis (B3 et B4 en 2014 et B3 et B4bis en 2015) après une administration intravésicale d'urines surchargées en BPA-G issues de brebis ayant reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg.

**Tableau 9** : Concentrations plasmatiques de BPA, BPA-G et BPA-S après une administration intravésicale d'urines surchargées en BPA-G issues de brebis ayant reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg.

Temps post-administration (h)	B3/04182			B4/30193		
	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)
0	infLOD	0.0	infLOQ	infLOD	0.0	infLOD
0.167	infLOD	153	6.4	infLOD	24052	715.8
0.883	infLOQ	74	infLOQ	3.3	20263	1042.6
1.3	infLOQ	68	infLOQ	infLOD	16979	752.7
1.5	infLOQ	43	infLOQ	3.6	15026	540.7
3	infLOQ	35	infLOQ	infLOQ	14513	437.4
4	infLOQ	49	infLOQ	infLOQ	12661	405.6
6	infLOQ	31	infLOQ	2.0	14197	420.5
8	infLOD	9	infLOQ	infLOQ	4350	163.5
10	infLOD	0	infLOQ	infLOD	3321	182.8
21	infLOQ	infLOD	infLOQ	infLOD	131	8.4

Expérience de 2014 : brebis B3 et B4 : le temps de résidence a été de 6h.

La dose intravésicale n'a pas été déterminée.

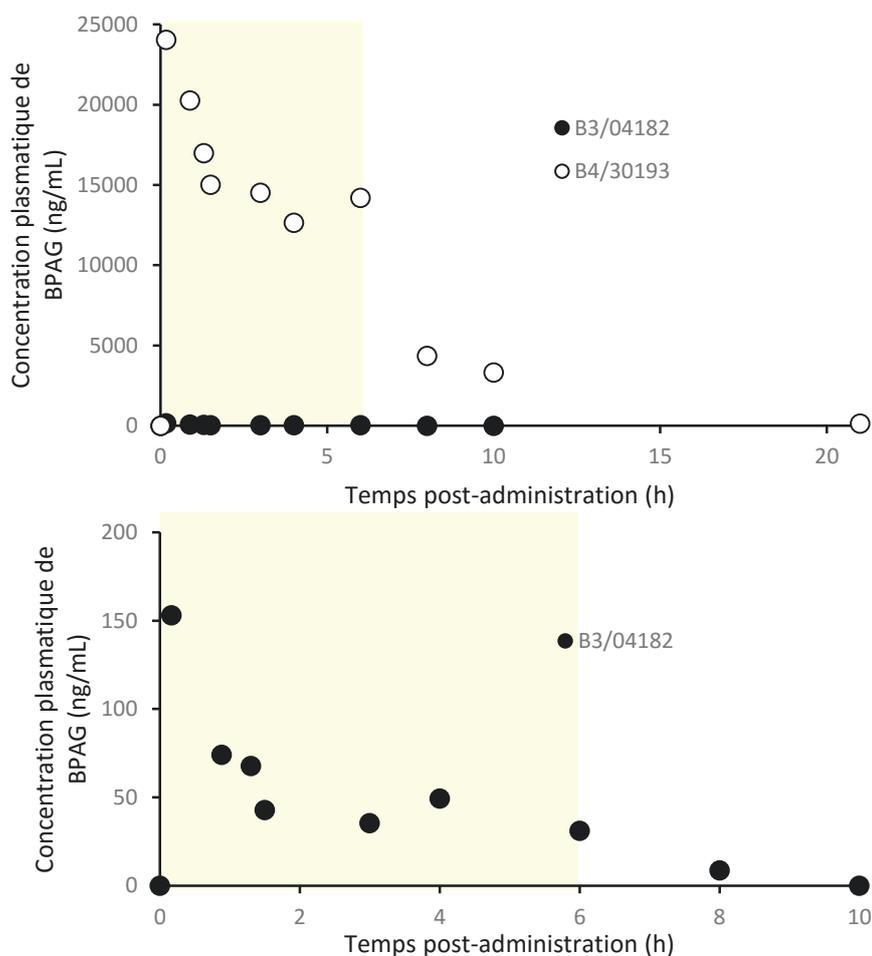
La quantité de BPA-G administrée a été estimée à 700-1400 mg in toto, soit 10 à 20 mg/kg.

Remarque : La brebis B4 a présenté des efforts de miction et une baisse d'appétit après l'expérience. Elle a reçu un traitement antibiotique (Amoxicilline longue action) pour prévenir une infection urinaire.

Temps post-administration (h)	B3/04182			B4bis/02627		
	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)
<b>0</b>	infLOQ	infLOD	infLOD	infLOD	infLOD	infLOD
<b>0.17</b>	1.9	938	21.2	2.1	232	11.1
<b>0.50</b>	1.0	811	36.4	1.7	400	18.3
<b>1.00</b>	1.6	425	15.8	InfLOQ	178	11.4
<b>1.50</b>	1.9	258	9.5	infLOD	87	5.4
<b>3.07</b>	1.1	58	20.5	2.0	64	infLOQ
<b>4.07</b>	infLOQ	107	6.0	2.0	48	infLOQ
<b>6.07</b>	infLOQ	57	9.7	infLOD	8	infLOD
<b>8.05</b>	8.0	59	13.4	infLOD	7.0	infLOD
<b>10.00</b>	infLOD	48	10.2	infLOD	infLOD	infLOQ
<b>21.00</b>	infLOD	74	27.4	infLOQ	infLOD	infLOQ

Expérience de 2015 : brebis B3 et B4bis : Le temps de résidence a été de 4 h.

La dose est de 2,41 g in toto, soit une dose de 31,4 et 28,8 mg/kg, respectivement pour les brebis B3 et B4bis



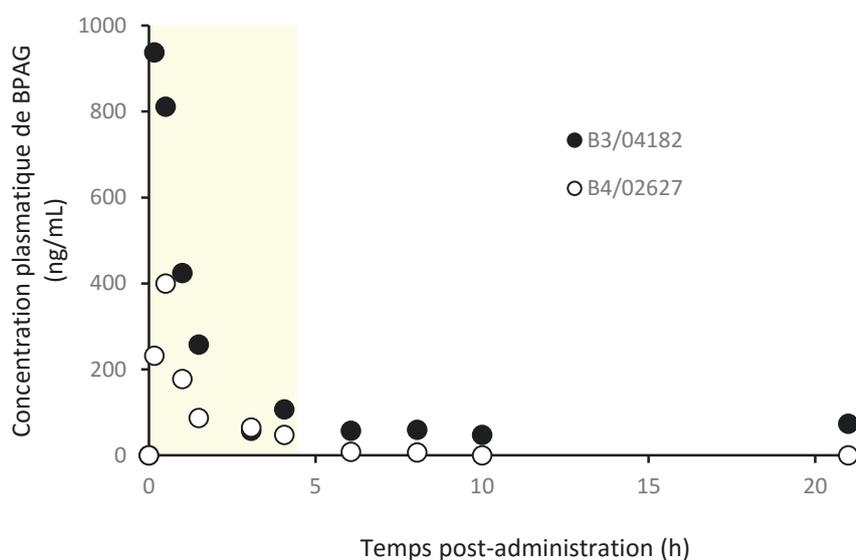
**Figures 13** : Evolution temporelle des concentrations de BPA-G (ng/ml) des brebis B3 et B4 après une administration intravésicale pendant 6h d'urines de brebis ayant reçu du BPA à la dose de 100 mg/kg par voie orale

La dose de BPA-G urinaire administrée n'a pas été mesurée, mais a été estimée à 700-1400 mg in toto, soit 10 à 20 mg/kg.

La 2<sup>ème</sup> figure 12 présente l'évolution temporelle des concentrations de BPA-G pour la brebis B3 (échelle différente).

Les résultats ont été très différents entre les deux brebis B3 et B4 (Figure 12). Les AUC<sub>0-21h</sub> de BPA-G ont été respectivement de 22 et de 7270  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  pour B3 et B4. De plus, la brebis B4 a présenté une absorption vésicale totale de la dose de BPA-G.

L'origine de cette divergence n'a pas pu être déterminée. Cependant, la brebis B4 a eu des urines légèrement plus sombres au retrait de la sonde urinaire, c'est-à-dire 6h après l'administration intravésicale des urines surchargées en BPA-G, ce qui pourrait suggérer des lésions vésicales modérées. De plus, elle est restée couchée et a présenté des efforts de miction après le retrait de la sonde urinaire. Notre hypothèse est que cette brebis aurait pu avoir une cystite entraînant une augmentation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase et une altération de l'intégrité de l'urothélium facilitant ainsi l'absorption du BPA-G à travers la paroi vésicale après son hydrolyse en BPA.



**Figure 14** : Evolution temporelle des concentrations de BPA-G (ng/ml) des brebis B3 et B4bis après une administration intravésicale pendant 4h d'urines de brebis ayant reçu du BPA à la dose de 100 mg/kg par voie orale.

La dose de BPA-G urinaire administrée a été de 2,41 g in toto, soit 31.4 et 28.8 mg/kg, respectivement pour les brebis B3 et B4bis.

Chez les deux brebis B3 et B4bis, les concentrations de BPA-G plasmatiques ont augmenté dans les minutes qui ont suivi l'administration vésicale d'urines surchargées en BPA-G. Puis elles ont diminué à des niveaux de 50 ng/ml pendant le temps de résidence de la solution de BPA-G dans la vessie, pour atteindre des valeurs de 10 à 50 ng/ml dans les heures qui ont suivi la vidange de la vessie. Les  $AUC_{0-21h}$  de BPA-G ont été respectivement de 106 et de 36  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  pour les brebis B3 et B4bis (Figure 13).

Par conséquent, en prenant en compte une clairance plasmatique moyenne de BPA-G de 5,5 ml/(kg.min) (Gauderat et al. 2016) et une dose approximative de BPA-G de 1 g (pour l'expérience de 2014) ou une dose mesurée de 2,41 g (pour l'expérience de 2015), la fraction de la dose absorbée estimée du BPA-G est de 0,89% pour la brebis B3 en 2014 et de 1,85 et 0,63% pour les brebis B3 et B4bis en 2015.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence une faible absorption du BPA-G par voie vésicale. De plus, chez les trois brebis (B3 en 2014 et B3, B4bis en 2015), du BPA et du BPA-S sont détectés dans le plasma mais leurs concentrations plasmatiques sont faibles, proches de la limite de quantification du dosage, par rapport aux concentrations plasmatiques de BPA-G dosées pendant l'étude (Tableau 9). Par ailleurs, les concentrations plasmatiques de BPA-S mesurées sont plus importantes que celles de BPA.

Les échantillons urinaires n'ont pas été dosés pour les expériences en 2014 c'est-à-dire pour les brebis B3 et B4.

Le tableau 10 présente le bilan massique du BPA-G établi à partir des données urinaires et plasmatiques après l'administration intravésicale de la solution de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto, pour les deux brebis B3 et B4bis des expériences de 2015.

Concentrations ou quantités urinaires BPA et BPA-G 4h après l'administration intravésicale de la solution de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto avec un temps de résidence de 4h									
Brebis	Poids (kg)	Dose BPA-G (mg in toto)	C. BPA urine (ng/ml)	C. BPA-G urine (ng/ml)	C. totale éq. BPA-G urine (mg/ml)	Volume urine (ml)	Quantité éq. BPA-G urine (mg)	Dose BPA-G absorbée (%)	Dose absorbée de BPA-G estimée à partir des données plasmatiques (%)
<b>B3</b>	76,8	2407	4464	4569592	4,578	289	1322,90	45	1,85
<b>B4bis</b>	83,8	2407	4893	3523161	3,532	341	1204,35	50	0,63

**Tableau 10** : Bilan massique du BPA-G à partir des données urinaires et plasmatiques obtenues sur deux brebis B3 et B4bis qui ont reçu une administration intravésicale de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto avec un temps de résidence de 4h.

Avec :

$$Concentration_{totale\ équivalente\ BPA-G\ urine} = C_{Bpa\ urine} \times \frac{Masse\ molaire_{BPA-G}}{Masse\ molaire\ BPA} + C_{BPA-G\ urine}$$

$$Quantité\ éq_{BPA-G\ urine} = C_{éq\ BPA-G\ urine} \times Volume_{urine}$$

$$Dose_{BPA-G\ absorbé} = \frac{Dose\ B_{BPA-G} - Quantité_{éq\ BPA-G\ retrouvé\ dans\ urine}}{Dose_{BPA-G}} \text{ en } \%$$

Les données urinaires montrent une différence importante entre les pourcentages de la dose d'équivalent BPA-G absorbé par voie intravésicale (correspondant à la différence entre la quantité de BPA-G administrée par voie intravésicale et celle d'équivalent BPA-G récupérée dans les urines après un temps de résidence de 4h) et la quantité de BPA-G absorbée, estimée à partir des données plasmatiques (Tableau 10). Ainsi 43,1 et 49,4% de la dose de BPA-G n'ont pas été retrouvés dans les urines à la fin de la période de 4h. Des écoulements d'urines ont parfois été observés autour de la sonde de Foley lorsque les brebis ont présenté des efforts de miction. Cependant, cette fuite urinaire ne peut pas expliquer une perte aussi importante du BPA-G.

Une hématurie a été observée sur la brebis B4bis, 4 heures après l'administration de la solution urinaire de BPA-G (Tableau 11). De plus, l'analyse bactériologique a mis en évidence la présence de bactéries dépourvues d'activité  $\beta$ -glucuronidase chez les deux brebis avant l'administration intravésicale de la solution de BPA-G mais qui sont retrouvées en quantité faible après la vidange vésicale (Tableau 12). Cependant, la présence de ces bactéries ne semble pas avoir modifiée l'absorption vésicale du BPA-G.

	<b>B3/04182</b>		<b>B4bis/02627</b>	
	Avant administration	Après vidange vésicale	Avant administration	Après vidange vésicale
<b>Protéines</b>	+	++	+	+
<b>pH</b>	9	9	9	9
<b>Densité</b>	1,042	1,048	1,042	1,042
<b>Hémoglobine</b>	0	0	0	++
<b>Cellules épithéliales</b> (par champ microscopique)	0,9	0	0,1	0,4
<b>Globules rouges</b>	0,3	0,4	0,1	>110
<b>Globules blancs</b>	0,3	0,7	0,1	4
<b>Bactéries</b>	0	0	0	0
<b>Cyto-centrifugation</b>	Quelques débris et squames, rares cellules urothéliales	Nombreux débris et squames, peu de neutrophile, quelques cellules urothéliales	Rares débris et squames	Population peu abondante de neutrophiles, quelques cellules urothéliales
<b>Conclusion</b>	Protéinurie à confirmer	Protéinurie à confirmer	Protéinurie à confirmer	Hématurie, protéinurie à confirmer

**Tableau 11** : Analyse cytologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto. Le temps de résidence de la solution a été de 4h.

	<b>B3/04182</b>		<b>B4bis/02627</b>	
	Avant administration	Après vidange vésicale	Avant administration	Après vidange vésicale
<b>Nombre de colonies</b> (culture sur gélose Mac Conkey à 37°C)	3	0	132	3
<b>Concentration bactérie</b> (UFC/ml)	3	<1	76,0	3
<b>Propriété <math>\beta</math>-glucuronidase</b> (culture sur gélose TBX à 42°C)	-		-	-

**Tableau 12** : Analyse bactériologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G à la dose de 2,41 g in toto.

Le temps de résidence de la solution a été de 4h

### II.3.3. Etude 2 : absorption vésicale du BPA-G en présence d'un inoculum bactérien

La solution urinaire de BPA-G utilisée pour l'expérience de 2015 a été dosée par HPLC-SM après une dilution d'un facteur de 10000. La concentration a été de 13.7 mg/ml, correspondant à une dose de 1.375 g in toto pour un volume de 100 ml d'urine (Tableau 13).

Echantillon	C. BPA (ng/ml)	C. BPA-G (ng/ml)	Volume urine (ml)	Dose de BPA-G (mg)
PII-DoseBPA-G 10mg/ml#1 avec inoculum	infLOQ	11565695	100	1375
PII-DoseBPA-G 10mg/ml#2 avec inoculum	infLOQ	15938445	100	
PII-DoseBPA-G 10mg/ml sans inoculum		13375506		

**Tableau 13** : Concentration de la solution urinaire de BPA-G préparée pour l'administration intravésicale (2015 ; période 2), avant et après ajout de l'inoculum bactérien.

L'inoculum bactérien préparé a été quantifié après culture sur gélose Mac Conkey à 37°C et sur gélose TBX à 42°C. La concentration de bactéries présentant une activité  $\beta$ -glucuronidase mesurée dans la solution urinaire a été de  $1.1 \times 10^4$  UFC/ml contre une concentration théorique souhaitée de  $10^5$  UFC/ml. Cet écart entre les dénombrements théoriques et observés n'a pas été élucidé mais l'hypothèse principale est une erreur de manipulation survenue lors de sa préparation.

L'ensemble des données plasmatiques sont décrites dans le tableau 14.

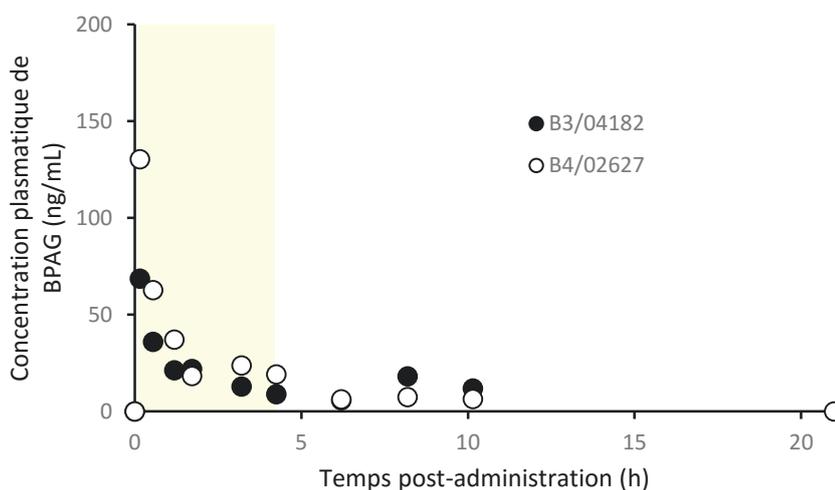
La figure 14 illustre l'évolution des concentrations plasmatiques de BPA après une administration intravésicale aux deux brebis (B3 et B4bis en 2015, période 2) d'urines surchargées en BPA-G, issues de brebis ayant reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg. Un inoculum bactérien a été ajouté à cette solution urinaire.

Temps post-administration (h)	B3/04182			B4bis/02627		
	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-G (ng/ml)	C <sub>p</sub> . BPA-S (ng/ml)
0	infLOD	infLOD	10.68	infLOD	infLOQ	infLOQ
0.15	1.13	68.61	14.11	infLOD	130.42	infLOQ
0.55	1.95	35.88	12.89	1.88	62.65	infLOQ
1.18	infLOD	21.29	9.98	infLOQ	37.04	infLOQ
1.72	infLOD	21.96	8.26	infLOD	18.29	infLOQ
3.2	infLOD	12.83	12.21	0.96	23.76	infLOQ
4.25	1.00	8.92	7.34	1.54	19.07	infLOQ
6.2	infLOD	5.73	9.94	infLOD	6.22	infLOQ
8.2	infLOD	18.19	8.94	infLOQ	7.33	infLOQ
10.2	infLOD	11.81	8.31	infLOQ	6.42	infLOQ
21	infLOD	17.58	11.45	infLOD	infLOQ	infLOQ

**Tableau 14** : Concentrations plasmatiques de BPA, BPA-G et BPA-S après une administration intravésicale d'urines surchargées en BPA-G (issues de brebis ayant reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg) et contenant un inoculum bactérien à deux brebis B3 et B4 bis.

La dose a été de 1.375 g in toto soit 18.2 et 17.5 mg/kg, respectivement pour les brebis B3 et B4bis.

Le temps de résidence vésicale a été de 4 h.



**Figure 15** : Evolution temporelle des concentrations de BPA-G (ng/ml) des brebis B3 et B4bis après une administration intravésicale d'urines surchargées en BPA-G (issues de brebis ayant reçu du BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg) contenant un inoculum bactérien pendant 4h à deux brebis B3 et B4 bis.

La dose a été de 1,375 g in toto, soit 18,2 et 17,5 mg/kg, respectivement pour les brebis B3 et B4bis.

Les profils de concentrations de BPA-G sont très similaires à ceux observées lors de la première période après administration d'urines surchargées en BPA-G sans ajout d'inoculum bactérien chez les mêmes brebis B3 et B4bis. Les concentrations de BPA-G plasmatiques ont augmenté dans les minutes qui ont suivi l'administration vésicale et ont diminué à des niveaux de 10 à 50 ng/ml pendant le temps de résidence de la solution de BPA-G dans la vessie, pour atteindre des valeurs de 10 à 20 ng/ml dans les heures qui ont suivi la vidange de la vessie (Figure 14). Les AUC<sub>0-21h</sub> de BPA-G ont été respectivement de 11,3 et de 12 µg.min/ml pour les brebis B3 et B4bis.

Ainsi, en prenant en compte une clairance plasmatique de BPA-G de 5,5 ml/(kg.min) (Gauderat et al. 2016) et une dose de BPA-G de 1,375 g in toto, la fraction de la dose absorbée de BPA-G a été estimée à 0,34 et 0,36% pour les brebis B3 et B4bis. La fraction de la dose absorbée de BPA-G est de même ordre de grandeur que celle observée sur ces brebis lors de la première période. Ainsi ces résultats ne montrent pas d'augmentation de l'absorption vésicale du BPA-G résultant de l'activité β-D-glucuronidase bactérienne.

Les concentrations plasmatiques du BPA mesurées sont proches de la LOQ de la méthode analytique et sont similaires à celles observées lors de la première période (Tableaux 9 et 14). Par ailleurs, des concentrations plasmatiques élevées de BPA-S sont détectées sur une seule brebis, en moyenne de l'ordre de 10 ng/ml.

Le tableau 15 présente le bilan massique du BPA-G établi à partir des données urinaires et plasmatiques après administration intravésicale de la solution de BPA-G à la dose de 1,375 g in toto, pour les deux brebis de l'expérience de 2015, période 2.

Concentrations ou quantités urinaires BPA et BPA-G 4h après l'administration intravésicale de la solution de BPA-G à la dose de 1,375 g in toto en présence d'un inoculum bactérien avec un temps de résidence de 4h									
Brebis	Poids (kg)	Dose BPA-G (mg in toto)	C. BPA urine (ng/ml)	C. BPA-G urine (ng/ml)	C. totale éq. BPA-G urine (mg/ml)	Volume urine (ml)	Quantité éq. BPA-G urine (mg)	Dose BPA-G absorbé (%)	Dose absorbée du BPA-G estimée à partir des données plasmatiques (%)
<b>B3</b>	75,4	1375	3718	2093728	2,100	252	529,28	61,5	0,34
<b>B4bis</b>	78,6	1375	2070	1662098	1,666	252	419,77	69,5	0,36

**Tableau 15** : Bilan massique du BPA-G à partir des données urinaires et plasmatiques obtenues sur deux brebis B3 et B4bis qui ont reçu une administration intravésicale d'urines de brebis contenant du BPA-G à la dose de 1.375 g in toto et en présence d'un inoculum bactérien. Le temps de résidence est de 4h.

Avec :

$$Concentration_{totale\ équivalente\ BPA-G\ urine} = C_{Bpa\ urine} \times \frac{Masse\ molaire_{BPA-G}}{Masse\ molaire\ BPA} + C_{BPA-G\ urine}$$

$$Quantité\ éq_{BPA-G\ urine} = C_{éq\ BPA-G\ urine} \times Volume_{urine}$$

$$Dose_{BPA-G\ absorbé} = \frac{Dose_{BPA-G} - Quantité_{éq\ BPA-G\ retrouvé\ dans\ urine}}{Dose_{BPA-G}} \text{ en } \%$$

Les données urinaires montrent une différence importante entre les pourcentages théoriques d'équivalent BPA-G absorbé par voie intravésicale (correspondant à la différence entre la quantité de BPA-G administrée par voie intravésicale et celle récupérée dans les urines après un temps de résidence de 4h) et la quantité de BPA-G absorbée, estimée à partir des données plasmatiques. Ainsi 61,2 et 69,1% de la dose de BPA-G n'a pas été retrouvés dans les urines à la fin de la période de 4h. Des écoulements d'urines ont parfois été observés autour de la sonde de Foley lorsque les brebis ont présenté des efforts de miction. Cependant, ils ne peuvent pas expliquer une perte aussi élevée du BPA-G.

L'analyse cytologique urinaire a mis en évidence une bactériurie chez la brebis B3 avant et après l'administration de la solution urinaire de BPA-G contenant un inoculum bactérien. Cependant ces bactéries sont des coques et ne correspondent pas aux *Escherichia coli* contenues dans l'inoculum bactérien (Tableau 16).

Les analyses bactériologiques sur les prélèvements urinaires, avant l'administration de la solution urinaire de BPA-G contenant un inoculum bactérien, montrent un dénombrement bactérien faible inférieur à 2 et de 18 UFC/ml respectivement pour les brebis B3 et B4bis (Tableau 17). Cependant, les entérobactéries retrouvées chez la brebis B4bis sont dépourvues d'activité  $\beta$ -glucuronidase positive et donc ne sont pas susceptibles d'hydrolyser le BPA-G en BPA dans la vessie (Tableau 17).

Après les 4h de temps de résidence de la solution urinaire de BPA-G, des bactéries  $\beta$ -glucuronidases positives similaires à celles de l'inoculum bactérien administré sont mises en évidence. Les dénombrements bactériens atteignent 40 et 440 UFC/ml mais restent très inférieurs à la concentration nominale de  $10^4$  UFC/ml de l'inoculum administré. De plus, les concentrations bactériennes mesurées le jour suivant, à partir du même échantillon, montrent une diminution importante du dénombrement bactérien, qui est inférieur à 10 UFC/ml chez les deux brebis (Tableau 17).

	<b>B3/04182</b>		<b>B4bis/02627</b>	
	Avant administration	Après vidange vésicale	Avant administration	Après vidange vésicale
<b>Protéines</b>	+ à ++	+ à ++	+	+
<b>pH</b>	9	9	8,5	9
<b>Densité</b>	1,045	1,045	1,038	1,038
<b>Hémoglobine</b>	0	0	0	++
<b>Cellules épithéliales</b> (par champ microscopique)	0,1	0	0,1	0,4
<b>Globules rouges</b>	0,1	1	0,1	0,3
<b>Globules blancs</b>	0,2	0	0,3	0
<b>Bactéries</b>	+++	+ à ++	0	0
<b>Cyto-centrifugation</b>	Quelques squames et coques	Nombreux débris et squames, neutrophiles	Quelques débris et squames	Nombreux débris et squames, Nombreuses cellules urothéliales abimées
<b>Conclusion</b>	Bactériurie, Protéinurie à confirmer	Bactériurie, Protéinurie à confirmer	Protéinurie à confirmer	Hématurie, protéinurie à confirmer

**Tableau 16** : Analyse cytologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G, à la dose de 1,375 g in toto, à laquelle a été ajoutée un inoculum bactérien.  
Le temps de résidence de la solution a été de 4h.

	<b>B3/04182</b>		<b>B4bis/02627</b>	
	Avant administration	Après vidange vésicale	Avant administration	Après vidange vésicale
<b>Nombre de colonies J0</b> (culture sur gélose Mac Conkey à 37°C)	0	4	9	44
<b>Concentration bactérie à J0</b> (UFC/ml)	<2	40	18,0	440
<b>Concentration bactérie à J+1</b> (UFC/ml)		<10	60,0	<10
<b>Propriété β-glucuronidase</b> (culture sur gélose TBX à 42°C)		+	-	+

**Tableau 17:** Analyse bactériologique réalisée sur les urines des brebis B3 et B4bis pour l'expérience de 2015, avant et après l'administration intravésicale d'une solution de BPA-G, à la dose de 1,375 g in toto, contenant un inoculum bactérien.

Le temps de résidence de la solution a été de 4h.

## II.4. Discussion

Les objectifs de notre étude étaient d'évaluer l'absorption vésicale du BPA puis de tester l'hypothèse d'une hydrolyse vésicale du BPA-G en BPA chez la brebis saine ou lors d'une infection urinaire

### *II.4.1. Evaluation de l'absorption vésicale du BPA*

Les résultats de cette étude ont montré une absorption importante du BPA par diffusion à travers la paroi vésicale, avec une biodisponibilité moyenne de  $31,2 \pm 15\%$ . L'absorption vésicale du BPA est caractérisée par une augmentation rapide des concentrations plasmatiques de BPA et de ses métabolites suite à l'administration intravésicale de la solution de BPA puis par une diminution de ces concentrations plasmatiques s'accroissant après la vidange de la solution vésicale de BPA. Cette cinétique de croissance rapide pour atteindre des valeurs de concentrations plasmatiques maximales de BPA puis de décroissance après la vidange vésicale est similaire à ce qui avait été observé pour l'absorption vésicale d'autres xénobiotiques tels que le salicylate de sodium, acide faible sous forme ionisée dans le rang des pH urinaires et l'antipyrine, base faible sous forme non ionisée, se comportant comme le BPA dans les urines (Dalton et al. 1992; Au et al. 1991).

Par ailleurs, nous avons observé une variabilité interindividuelle de biodisponibilité du BPA et notamment entre les brebis des expériences réalisées en octobre 2014 et en juin 2015. Cependant, les protocoles expérimentaux ont été similaires pour les deux expériences excepté la préparation de la solution urinaire de BPA qui a été filtrée juste avant son administration vésicale en 2015. En outre, la dose de la solution de BPA n'a pas été vérifiée pour la première période. Cette variabilité interindividuelle d'absorption vésicale a été précédemment décrite pour le salicylate de sodium, l'antipyrine et la mitomycine C avec un coefficient de variation de l'absorption vésicale de l'antipyrine, observé chez des ratte, de 55% (Dalton et al. 1992; Au et al. 1991; Hu et al. 2010). Ces études ont mis en évidence différents facteurs, tels que l'intégrité de l'urothélium, la fréquence des mictions et l'extension de la vessie qui pourraient modifier l'absorption vésicale des xénobiotiques (Au et al. 1991; Dalton et al. 1992; Wientjes et al. 1991).

Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les variations interindividuelles de biodisponibilité du BPA.

Tout d'abord, l'urothélium joue un rôle important dans la perméabilité de la vessie. Ainsi une perturbation de l'intégrité de l'urothélium pourrait conduire à une augmentation de l'absorption vésicale des xénobiotiques. Une étude menée par Au et al. 1991 a montré que l'absorption vésicale de l'inuline était 100 fois supérieure à travers un urothélium altéré qu'à travers un urothélium sain.

De plus, le degré d'ionisation des xénobiotiques dans l'urine peut être un facteur limitant leur passage à travers la paroi vésicale. Ainsi, le pH des urines des quatre brebis a été mesuré, (pH=9) avant l'administration vésicale de la solution de BPA et n'a pas présenté de variation après la vidange de la vessie. Le pKa du BPA étant de 9,59 à 11,30 (Tableau 1), le BPA est principalement sous forme non ionisée dans les urines des quatre brebis. De ce fait, dans notre étude, le degré d'ionisation du BPA ne peut pas expliquer la variabilité interindividuelle d'absorption vésicale du BPA observée.

Plus le volume urinaire est important et plus l'urothélium s'étire, devient fin, ce qui augmente la surface d'absorption des xénobiotiques. En effet, une étude menée par Wientjes et al. en 1991, a montré une corrélation entre l'absorption vésicale de la mitomycine C et l'extension vésicale chez les chiens. Toutefois la production et le stockage d'urine dans la vessie, au cours du temps, diminue la concentration urinaire de xénobiotique ce qui pourrait moduler sa biodisponibilité par voie vésicale (Moch et al. 2014). Dans notre étude, les volumes urinaires de B3 et B4 ( $486,5 \pm 118$  L) ont été deux fois plus importants que ceux de B5 et B6 ( $232,5 \pm 53$  L). Cette différence de volume, et donc de distension vésicale pourrait donc expliquer en partie l'absorption vésicale du BPA plus importante des brebis B3 et B4 comparativement à B5 et B6.

Lors de notre étude, aucun rinçage avec du soluté physiologique n'a été réalisé après la vidange de la solution vésicale de BPA afin de ne pas induire d'altération de l'urothélium par effet mécanique et ainsi de provoquer une augmentation erronée de l'absorption vésicale du BPA. Cependant, la quantité de BPA dans le contenu vésical résiduel, non quantifié, peut être variable d'une brebis à l'autre et peut être donc à l'origine de la différence interindividuelle de biodisponibilité observée durant notre étude.

De plus, la fréquence des mictions après la vidange de la vessie doit être également un facteur à prendre en compte pour expliquer la différence de biodisponibilité du BPA. Plus la brebis urine rapidement et de nombreuses fois et plus la quantité résiduelle de BPA est éliminée rapidement et donc ne peut plus être disponible pour l'absorption.

Par conséquent, il aurait été nécessaire de poursuivre les prélèvements urinaires après la vidange vésicale pour évaluer les quantités résiduelles de BPA et de ses métabolites dans le but d'expliquer la différence de biodisponibilité observée chez les quatre brebis.

#### *II.4.2. Sous quelle forme diffuse le BPA-G à travers la paroi vésicale ?*

Les résultats ont mis en évidence une faible absorption vésicale du BPA-G avec une fraction de la dose absorbée moyenne de  $1,12 \pm 0,64\%$  que ce soit en présence ou en absence d'un inoculum bactérien. Le BPA n'a été que très faiblement détecté dans le plasma au cours de l'expérience.

Une précédente étude menée par Corbel et al. en 2014, a montré que le BPA-G, composé hydrophile, était capable de passer sous forme inchangée à travers le placenta humain avec un taux de transfert de  $3,81 \pm 1,41\%$  et de  $7,77 \pm 2,39\%$  respectivement pendant la perfusion, de la mère au fœtus et du fœtus à la mère, d'une solution de BPA-G à la concentration de 2000 ng/ml pendant 90 min.

Par conséquent, ces observations suggèrent que le BPA-G traverse faiblement (1% en moyenne) la paroi vésicale sous forme inchangée.

Cependant, la détection de BPA-S et d'une très faible quantité de BPA dans le plasma des brebis après administration d'une solution urinaire de BPA-G suggère également qu'une fraction de la dose de BPA-G a été absorbée sous forme de BPA puis conjuguée rapidement en métabolites glucuronidés et sulfatés ou que la solution urinaire de BPA-G administrée présentait des niveaux résiduels de BPA et de BPS, qui ont pu être absorbés à travers la paroi vésicale. Cependant, si le BPA-G avait été absorbé après son hydrolyse vésicale, sous forme de BPA, les rapports de concentrations plasmatiques de BPA-G/BPA attendues auraient été autour de 10 pendant le temps de résidence de la molécule, comme dans la première partie de l'étude sur l'absorption vésicale de BPA.

Ainsi, l'ensemble de nos données sont en faveur d'un faible passage du BPA-G sous forme inchangée, même si elles ne permettent pas d'exclure l'hypothèse d'une hydrolyse vésicale du BPA-G en BPA précédant son absorption. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer et de confirmer sous quelle forme le BPA-G traverse la paroi vésicale.

#### *II.4.3. Comment expliquer la différence entre les quantités urinaires absorbées observées de BPA et de BPA-G et celles déterminées à partir des données plasmatiques ?*

Dans notre étude, une différence importante a été observée entre les pourcentages de la dose de BPA ou de BPA-G absorbée par voie intravésicale et les quantités réellement absorbées, estimées à partir des données plasmatiques de BPA et de BPA-G. Des résultats similaires ont été observés dans des études menées sur l'absorption vésicale d'autres xénobiotiques. Ainsi, chez le rat,  $64,6 \pm 17,7\%$  de la dose initiale d'antipyrine administrée préalablement dans la vessie est collectée après un temps de résidence de la solution vésicale d'antipyrine de 90 min (Dalton et al. 1992). La perte de l'ordre de 35% de la dose initiale est expliquée par une vidange vésicale incomplète conduisant à la présence d'un contenu résiduel d'antipyrine dans la vessie mais également par une fuite urinaire d'un volume faible de la solution de l'ordre de 25  $\mu$ L dans les organes génitaux.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette fraction de dose non disponible pour l'absorption vésicale.

Au cours de nos études, des fuites d'urines autour de la sonde de Foley ont été remarquées ce qui est à l'origine d'une perte non quantifiée de la dose initiale de BPA ou de BPA-G. De plus, lors de la vidange de la vessie, un contenu résiduel n'a pas pu être prélevé ce qui entraîne une sur-estimation de la fraction de la dose de BPA ou de BPA-G absorbée. Cependant ces deux hypothèses ne permettent pas d'expliquer une perte aussi élevée de la dose non absorbée de BPA ou de BPA-G.

L'urothélium constitue une véritable barrière physicochimique à l'absorption vésicale des xénobiotiques du fait de la présence des cellules en ombrelles liées par des jonctions serrées mais également de la couche mucineuse composée de glycosaminoglycanes hydrophiles qui tapissent sa surface luminale (GuhaSarkar, Banerjee 2010). Certaines études ont montré une augmentation du temps de résidence des xénobiotiques dans la vessie du fait de leur interaction avec des molécules de la couche de mucine (Ueda et al. 1992; Singh et al. 1996; Bogataj et al. 1999; Burjak et al. 2001). La bioadhésion des xénobiotiques à la paroi vésicale est à l'origine de leur relargage prolongé et tardif dans la vessie pouvant perdurer plusieurs jours après leur administration initiale (Le Visage et al. 2004).

Ainsi le BPA ou le BPA-G pourraient être retenus à la couche de mucine ce qui expliquerait que toute la dose de BPA ou de BPA-G n'a pas été retrouvée dans les urines après un temps de résidence de 2, 4 ou 6h. De plus, cette bioadhésion permettrait un relargage et une absorption vésicale tardifs des deux xénoestrogènes. Dès lors, la biodisponibilité et la fraction de la dose absorbée calculées du BPA et du BPA-G dans nos études pourraient être sous-estimées. Un prélèvement des urines des brebis sur un temps prolongé ainsi qu'une caractérisation des mécanismes d'absorption vésicale, diffusion passive ou implications de transporteurs membranaires, du BPA et du BPA-G permettraient de déterminer plus précisément leur pourcentage de la dose absorbée par voie vésicale.

#### *II.4.4. Evaluation de l'absorption vésicale du BPA-G en présence d'un inoculum bactérien*

Dans notre étude, l'introduction vésicale d'un inoculum bactérien n'a pas modifié l'absorption vésicale du BPA-G. Notre hypothèse pour expliquer ce résultat est que la concentration de bactéries *Escherichia coli* à activité  $\beta$ -glucuronidase constituant l'inoculum bactérien n'était pas suffisante pour entraîner la déconjugaison du BPA-G. En effet, les dénombrements bactériens ont été très inférieurs à la concentration nominale de bactéries inoculées de  $10^4$  UFC/ml. De plus, au sein d'un même échantillon d'urines, une diminution importante de la concentration bactérienne a été constatée après un jour de conservation des urines à une température de 4°C. Les bactéries *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidases positives ont pu présenter une instabilité dans les urines des brebis ou lors de leur conservation à 4°C. Cependant, les facteurs bactéricides n'ont pas été mis en évidence.

De plus, la détermination du caractère  $\beta$ -glucuronidase positif chez les bactéries contenues dans l'inoculum bactérien a été réalisée à partir d'un test qualitatif avec la mise en évidence d'une coloration bleutée caractéristique des colonies bactériennes  $\beta$ -glucuronidases positives lors de leur mise en culture sur gélose TBX à 42°C. Cependant, aucun dosage quantitatif de l'activité  $\beta$ -glucuronidase des bactéries n'a été réalisé. De ce fait, il est possible que l'activité  $\beta$ -glucuronidase des bactéries inoculées dans la vessie était insuffisante, ce qui pourrait expliquer une hydrolyse vésicale du BPA-G limitée.

Par ailleurs, une étude menée par Graef et al. en 1977, sur l'hydrolyse des composés stéroïdiens glucuronidés par l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase extraite de foie de bovin, d'*Helix pomatia* et d'*Escherichia coli*, rapporte la présence d'inhibiteurs de l'enzyme dans les urines. Ainsi, dans notre étude, la présence éventuelle d'inhibiteurs aurait pu diminuer l'activité de l'enzyme et donc modifier l'absorption vésicale du BPA-G sous forme non glucuronidée.

De plus, le temps d'incubation *in vivo* des bactéries dans les urines de brebis est peut être insuffisant pour induire une hydrolyse complète. Cependant, le pic d'activité enzymatique d'une quantité de 50  $\mu$ L de  $\beta$ -glucuronidase extraite d'*Escherichia coli* mise en présence de l'estriol glucuronide dans 2 ml d'urine de femmes enceintes, est atteinte après un temps d'incubation de 2h et l'activité enzymatique reste importante avec un taux de 90% d'hydrolyse pendant 24h (Graef et al. 1977). Ainsi, d'après ces observations, le temps de résidence de l'inoculum bactérien de 4h dans notre étude devrait permettre d'atteindre un taux d'hydrolyse des composés glucuronides de 100% par l'enzyme.

Par conséquent, pour poursuivre cette étude, il est nécessaire de déterminer les conditions expérimentales notamment la concentration de bactéries  $\beta$ -glucuronidases positives nécessaires, la quantification de l'activité  $\beta$ -glucuronidase de ces bactéries et le temps d'incubation optimales pour mettre à l'épreuve l'hypothèse d'une hydrolyse vésicale du BPA-G en BPA lors d'une infection bactérienne.

#### *II.4.5 L'existence d'un cycle vésico-hépto-rénal peut-il modifier de manière importante l'exposition interne au BPA d'un individu ?*

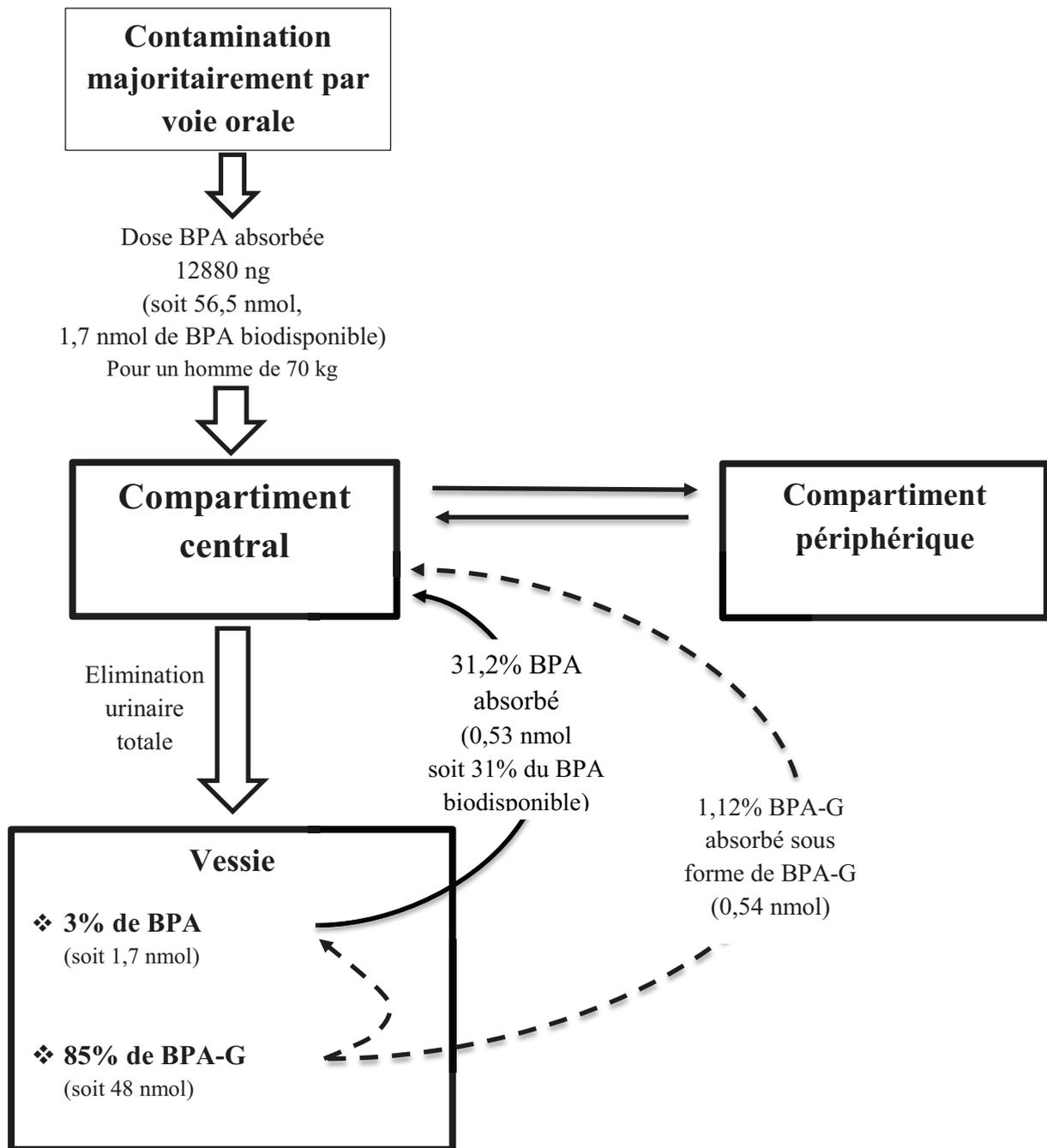
Chez l'Homme, l'exposition quotidienne au 95<sup>ème</sup> percentile a été estimée à 184 ng/(kg.j), c'est-à-dire pour le scénario pire cas de l'exposition humaine au BPA évalué à partir des différentes études européennes (Lakind, Naiman 2011).

L'étude de Völkel et al, en 2002, a montré que la totalité de la dose de BPA administré par voie orale est retrouvée dans les urines. De plus, chez l'Homme et dans le modèle ovin, le BPA absorbé est éliminé sous forme glucuronidée à 85% et sous forme non conjuguée à 3% (Völkel et al. 2005, Doerge et al. 2010a et b, Thèse Farbos, 2012).

Ainsi, l'ensemble de ces données et des résultats expérimentaux acquis dans notre étude utilisant un modèle ovin et extrapolés à l'Homme, permettent d'estimer l'impact d'un cycle vésico-hépto-rénal fermé du BPA sur l'exposition interne quotidienne humaine.

L'absorption vésicale du BPA et de ses métabolites estimée lors d'un cycle vésico-hépto-rénal fermé est à l'origine d'une très faible augmentation de l'ordre de 2% de l'exposition interne quotidienne d'un individu au BPA total. Cependant, l'absorption vésicale du BPA entraîne une surexposition de 31% du BPA non glucuroconjugué. En outre, en se basant sur les proportions des différentes formes de BPA éliminées dans les urines dans l'étude de Liao et Kannan en 2012 (32% sous forme de BPA), l'absorption vésicale du BPA entraînerait une augmentation plus importante, de l'ordre de 10%, de l'exposition interne quotidienne de l'Homme au BPA total et serait à l'origine d'une surexposition plus conséquente au BPA non conjugué.

Par ailleurs, dans notre étude, sur une brebis, qui a présenté une cystite, une absorption vésicale très importante de la dose de BPA-G a été mise en évidence. Par conséquent, cela signifie que certains facteurs de risques, non encore identifiés à l'heure actuelle, pourraient être à l'origine d'une surexposition humaine au BPA.



**Figure 16** : Estimation approximative de l'impact d'un cycle vésico-hépatorenal fermé sur l'exposition interne humaine quotidienne au BPA, en prenant en compte les quantités de BPA et de BPA-G absorbées par voie vésicale évaluées sur le modèle brebis et le scénario pire cas de l'exposition humaine au BPA (EFSA, 2015).

## Conclusion

Les modèles pharmacocinétiques actuels évaluant l'exposition interne aux xénobiotiques considèrent généralement la vessie comme étant un compartiment final n'autorisant pas la réabsorption des molécules dans la circulation générale. En effet, le BPA, majoritairement métabolisé par le foie en BPA-glucuronide, est excrété par les reins dans la vessie où il est stocké puis éliminé lors de la vidange vésicale.

Cependant, dans notre étude réalisée sur le modèle ovin, nous avons mis en évidence une absorption vésicale importante du BPA (Figure 15). Ainsi, après administration intravésicale d'une solution de BPA à la dose de 2 mg/kg chez quatre brebis, le BPA, sous forme non ionisée dans les urines, a franchi la barrière vésicale avec une biodisponibilité moyenne de 31,2%.

Par conséquent, la réabsorption vésicale de certains xénobiotiques, qui n'est actuellement pas prise en compte dans le modèle pharmacocinétique, est à l'origine d'une sous-estimation de l'exposition interne humaine à ces molécules.

Cependant, le BPA dans la vessie est essentiellement sous forme conjuguée, majoritairement glucurono et sulfoconjuguée. Notre étude a montré une faible réabsorption du BPA-G avec une fraction de dose absorbée moyenne de 1,12%. De plus, nos données suggèrent que, dans les conditions physiologiques, le BPA-G passe la barrière vésicale sous forme inchangée ce qui n'entraînerait pas de surexposition de l'individu à la forme active du BPA.

Par ailleurs, l'introduction d'un inoculum bactérien présentant une activité  $\beta$ -glucuronidase dans la vessie n'a pas permis d'augmenter l'absorption vésicale du BPA-G notamment sous la forme de BPA, probablement en raison d'une croissance bactérienne insuffisante pendant le temps de résidence de la molécule..

Or, dans notre étude l'hypothèse d'une l'hydrolyse vésicale du BPA-G en BPA ne peut pas être exclue et des expériences supplémentaires ainsi que l'évaluation in vitro de la capacité de cet inoculum à hydrolyser le BPA-G sont nécessaires pour mettre à l'épreuve l'hypothèse selon laquelle le BPA-G peut être réabsorbé par voie vésicale sous forme de BPA.

Pour poursuivre cette étude ; il est ainsi nécessaire de préciser les mécanismes de diffusion à travers la paroi vésicale du BPA et de son principal métabolite, ainsi que les situations à l'origine de surexposition au BPA, afin de déterminer si ce cycle vésico-hépatorenal peut moduler de manière importante l'exposition interne 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 **GONDIN Coralie** intitulée « **Evaluation de l'absorption vésicale du bisphénol A et du bisphénol A-glucuronide chez la brebis.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 1 juin 2016  
Professeure Nicole HAGEN  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHATELUT

Pour la Directrice et par délégation,  
le Directeur Scientifique  
**François SCHELCHER**



Vu : 03/6/2016  
Le Président du jury :  
Professeur Etienne CHATELUT



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU

**Régine ANDBE-OBRECHT**



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.

## Bibliographie

**ANDEM.** Cystites et pyélonéphrites aiguës simples de la femme de 15 à 65 ans ; Recommandations et Références Médicales. Concours médicale ; supplément au n°40. 1996.

**AFFSAPS.** Recommandations de bonne pratique. Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires chez l'adulte. Juin 2008

**ANSES.** Evaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine : Avis de l'Anses, rapport d'expertise collective. *Tome 1, Edition scientifique.* Mars 2013.

[www.anses.fr/fr/content/bisphénol](http://www.anses.fr/fr/content/bisphénol), consulté le 4 avril 2016

**ASHBY J., TINWELL H. et HASEMAN, J.** Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP.* Vol. 30, n° 2 Pt 1, pp. 156-166. Octobre 1999.

**AU J. L., DALTON J. T. et WIENTJES M. G.** Evidence of significant absorption of sodium salicylate from urinary bladder of rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* Vol. 258, n° 1, pp. 357-364. Juillet 1991.

**BECKER K., GÖEN T., SEIWERT M., CONRAD A., PICK-FUSS H., MÜLLER J., WITTASSEK M., SCHULZ C. et KOLOSSA-GEHRING M.** GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* Vol. 212, n° 6, pp. 685-692. Novembre 2009

[www.bisphenol-a-europe.org](http://www.bisphenol-a-europe.org), consulté le 16 septembre 2015.

**BOGATAJ M., MRHAR A. et KOROSSEC L.** Influence of physicochemical and biological parameters on drug release from microspheres adhered on vesical and intestinal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics.* Vol. 177, n° 2, pp. 211-220. Janvier 1999.

**BURJAK M., BOGATAJ M., VELNAR M., GRABNAR I. et MRHAR A.** The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. *International Journal of Pharmaceutics.* Vol. 224, n° 1-2, pp. 123-130. Août 2001.

**CAGEN S. Z., WAECHTER J. M., DIMOND S. S., BRESLIN W. J., BUTALA J. H., JEKAT F. W., JOINER R. L., SHIOTSUKA R. N., VEENSTRA G. E. et HARRIS L. R.** Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology.* Vol. 50, n° 1, pp. 36-44. Juillet 1999

**CALAFAT A.M., KUKLENYIK Z., REIDY J.A., CAUDILL S.P., EKON J. et NEEDHAM L.L.** Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives.* Vol. 113, n° 4, pp. 391-395. Avril 2005.

- CALAFAT A.M., YE X., SILVA M.J., KUKLENYIK Z. et NEEDHAM L.L.** Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring. *International Journal of Andrology*. Vol. 29, n° 1, pp. 166-171; discussion 181-185. Février 2006.
- CALAFAT A.M., YE X., WON L-Y., REIDY J.A. et NEEDHAM L.L.** Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 116, n° 1, pp. 39-44. Janvier 2008.
- CHO C.Y., SHIN B.S., JUNG J.H., KIM D.H., LEE K.C., HAN S-Y., KIM H.S., LEE B.M. et YOO S.D.** Pharmacokinetic scaling of bisphenol A by species-invariant time methods. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*. Vol. 32, n° 10, pp. 925-934. Octobre 2002.
- COLLET S.H.** Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A. *Thèse de doctorat de l'université de Toulouse*. 2012
- COLLET S.H., PICARD-HAGEN N., LACROIX M.Z., PUEL S., VIGUIÉ C., BOUSQUET-MELOU A., TOUTAIN P-L. et GAYRARD V.** Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 284, n° 3, pp. 323-329. Mai 2015.
- COOK J.W., DODDS E.C. et HEWETT C.L.** A synthetic oestrus-exciting compound. *Nature*. 1933. Vol. 131. 1933.
- CORBEL T., GAYRARD V., PUEL S., LACROIX M.Z., BERREBI A., GIL S., VIGUIÉ C., TOUTAIN P.-L. et PICARD-HAGEN N.** Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reproductive Toxicology*. Vol. 47, pp. 51-58. Août 2014.
- CSANÁDY G.A., OBERSTE-FRIELINGHAUS H.R., SEMDER B., BAUR C., SCHNEIDER K.T. et FILSER J.G.** Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Archives of Toxicology*. Vol. 76, n° 5-6, pp. 299-305. Juin 2002.
- DALTON J.T., HARRINGTON M.D. et AU J.L.** Evidence of significant absorption of antipyrine from urinary bladder of rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 260, n° 2, pp. 608-613. Février 1992.
- DALTON J.T., WEINTJES M.G. et AU J.L.** Effects of bladder resorption on pharmacokinetic data analysis. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. Vol. 22, n° 3, pp. 183-205. Juin 1994.
- DÉCHAUD H., RAVARD C., CLAUSTRAT F., DE LA PERRIÈRE A.B. et PUGEAT M.** Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids*. Vol. 64, n° 5, pp. 328-334. Mai 1999
- DEKANT W. et VÖLKEL W.** Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 228, n° 1, pp. 114-134. Avril 2008.

www.developpement-durable.gouv.fr, consulté le 8 octobre 2015.

**DICKINSON R.G. et KING A.R.** Vesico-hepato-renal cycling of acidic drugs via their reactive acyl glucuronide metabolites ? Studies with diflunisal in rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. Vol. 23, n° 8, pp. 665–668. 1996.

**DODDS, E.C., GOLDBERG, LAWSON W. et ROBINSON, R.** Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature*. Vol. 141. 1938.

**DODDS E.C. et LAWSON W.** Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*. Vol. 137, pp. 996. Juin 1936.

**DOERGE D.R., TWADDLE N.C., VANLANDINGHAM M. et FISHER J.W. (a).** Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 247, n° 2, pp. 158-165. Septembre 2010

**DOERGE D.R., TWADDLE N.C., WOODLING K.A. et FISHER J.W. (b).** Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1 octobre 2010. Vol. 248, n° 1, pp. 1-11. Octobre 2010

**ENVIRONNEMENT CANADA ET SANTE CANADA.** Évaluation préalable finale pour le Défi concernant le Phénol, 4,4' -(1-méthyléthylidène)bis (Bisphénol-A) Numéro de registre du Chemical Abstracts Service 80-05-7. 2008

**EFSA.** Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *The EFSA journal*. 2015

www.efsa.europa.eu, consulté le 28 mars 2016.

**FARABOLLINI F., PORRINI S., DELLA SETA D., BIANCHI F. et DESSÌ-FULGHERI F.** Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 110 Suppl 3, pp. 409-414. Juin 2002.

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

www.fda.gov, consulté le 29 septembre 2015

**GAO X., AU J.L., BADALAMENT R.A. et WIENTJES M.G.** Bladder tissue uptake of mitomycin C during intravesical therapy is linear with drug concentration in urine. *Clinical cancer research*. Vol. 4, n° 1, pp. 139–143. 1998.

**GAUDERAT G., PICARD-HAGEN N., TOUTAIN P-L., CORBEL T., VIGUIÉ C., PUEL S., LACROIX M.Z., MINDEGUIA P., BOUSQUET-MELOU A. et GAYRARD V.** Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environment International*. Vol. 86, pp. 52-59. Janvier 2016.

- GAYRARD V., LACROIX M.Z., COLLET S.H, VIGUIÉ C., BOUSQUET-MELOU A., TOUTAIN PL. et PICARD-HAGEN N.** High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environmental Health Perspectives*. Juin 2013.
- GEENS T., APELBAUM T.Z., GOEYENS L., NEELS H. et COVACI A.** Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. Vol. 27, n° 11, pp. 1627-1637. Novembre 2010.
- GEENS T., GOEYENS L. et COVACI A.** Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Vol. 214, n° 5, pp. 339-347. Septembre 2011.
- GEENS T., ROOSENS L., NEELS H. et COVACI A.** Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*. Vol. 76, n° 6, pp. 755-760. Août 2009.
- GOLDBARG J.A., PINEDA E.P., BANKS B.M. et RUTENBURG A.M.** A method for the colorimetric determination of  $\beta$ -glucuronidase in urine, serum, tissue; Assay of enzymatic activity in health and disease. *Gastroenterology*. Vol. 36, n° 2, pp. 193-201. Février 1959.
- GRAEF V., FURUYA E. et NISHIKAZE O.** Hydrolysis of steroid glucuronides with beta-glucuronidase preparations from bovine liver, *Helix pomatia*, and *E. coli*. *Clinical Chemistry*. Vol. 23, n° 3, pp. 532-535. Mars 1977.
- GUHASARKAR S. et BANERJEE, R.** Intravesical drug delivery: challenges, current status, opportunities and novel strategies. *Journal of Controlled Release*. Vol. 148, n° 2, pp. 147-159. Décembre 2010.
- GUPTA, C.** Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*. Vol. 224, n° 2, pp. 61-68. Juin 2000.
- HE Y., MIAO M., HERRINTON L.J., WU C., YUAN W., ZHOU Z. et LI D-K.** Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environmental Research*. Vol. 109, n° 5, pp. 629-633. Juillet 2009.
- HO K.J.** Absolute concentration of urinary endogenous  $\beta$ -glucuronidase determined by an ELISA method as a sensitive but non-specific indicator for active renal parenchymal damage. *British journal of urology*. Vol. 75, n° 1, pp. 78-84. 1995.
- HO Y. C. et HO K.J.** Differential quantitation of urinary beta-glucuronidase of human and bacterial origins. *The Journal of Urology*. Vol. 134, n° 6, pp. 1227-1230. Décembre 1985.
- HU L., WIENTJES M.G., LI J. et AU J.L.S.** Bladder Tissue Pharmacokinetics of Intravesical Mitomycin C and Suramin in Dogs. *The AAPS Journal*. Vol. 12, n° 4, pp. 586-591. Décembre 2010.

- INERIS.** Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Bisphénol A, INERIS –DRC-10-102861-01251B, 77 p. 2010.
- INOUE H., YOKOTA H., MAKINO T., YUASA A. et KATO S.** Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug metabolism and disposition*. Vol. 29, n° 8, pp. 1084–1087. 2001.
- Inserm.** Cancers et environnement, expertise collective. Octobre 2008.
- Inserm.** Effets sur la reproduction du Bisphénol A, rapport préliminaire. Juin 2010.
- KADDAR N., HARTHÉ C., DÉCHAUD H., MAPPUS E., et PUGEAT M.** Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. Vol. 71, n° 8, pp. 471-473. Mars 2008.
- KASPER-SONNENBERG M., WITTSIEPE J., KOCH H.M., FROMME H., et WILHELM M.** Determination of bisphenol a in urine from mother-child pairs-results from the duisburg birth cohort study, Germany. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. Vol. 75, n° 8-10, pp. 429-437. 2012.
- KASS E.H.** Bacteriuria and pyelonephritis of pregnancy. *A.M.A. Archives of Internal Medicine*. Vol. 105, n° 2, pp. 194-198. Février 1960.
- KUREBAYASHI, H.** Disposition of a low dose of <sup>14</sup>C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicological Sciences*. Vol. 73, n° 1, pp. 17-25. Mai 2003.
- KURUTO-NIWA R., TATEOKA Y., USUKI Y., et NOZAWA R.** Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*. Vol. 66, n° 6, pp. 1160-1164. Janvier 2007.
- LACROIX M.Z., PUEL S., COLLET S. H., CORBEL T., PICARD-HAGEN N., TOUTAIN PL., VIGUIÉ C. et GAYRARD V.** Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta*. Vol. 85, n° 4, pp. 2053-2059. Septembre 2011.
- LAKIND, Judy S. et NAIMAN, Daniel Q.** Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure : 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. Vol. 21, n° 3, pp. 272-279. Juin 2011.
- www.legifrance.gouv.fr, consulté le 30 septembre 2015.
- LE VISAGE C., RIOUX-LECLERCQ N., HALLER M., BRETON P., MALAVAUD B. et LEONG K.** Efficacy of paclitaxel released from bio-adhesive polymer microspheres on model superficial bladder cancer. *The Journal of Urology*. Vol. 171, n° 3, pp. 1324-1329. Mars 2004.

- LIAO C. et KANNAN K.** Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*. Vol. 46, n° 9, pp. 5003-5009. Mai 2012.
- MAHALINGAIAH S., MEEKER J.D., PEARSON K.R., CALAFAT A.M., YE X., PETROZZA J. et HAUSER R.** Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 116, n° 2, pp. 173-178. Février 2008.
- MAHEUX A.F., HUPPÉ V., BOISSINOT M., PICARD F.J., BISSONNETTE L., BERNIER J.L.T. et BERGERON M.G.** Analytical limits of four  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 75, n° 3, pp. 506-514. Décembre 2008.
- MAO L., SUN C., ZHANG H., LI Y., et WU D.** Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 522, n° 2, pp. 241-246. Septembre 2004.
- MARKEY C.M., WADIA P.R., RUBIN B.S., SONNENSCHNEIN C. et SOTO A.M.** Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biology of Reproduction*. Vol. 72, n° 6, pp. 1344-1351. Juin 2005.
- MARKEY C. M., LUQUE E. H., MUNOZ DE TORO M., SONNENSCHNEIN C. et SOTO A. M.** In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biology of Reproduction*. Vol. 65, n° 4, pp. 1215-1223. Octobre 2001.
- MATTHEWS J.B., TWOMEY K., et ZACHAREWSKI T.R.** 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*. Vol. 14, n° 2, pp. 149-157. Février 2001
- MIELKE H., PARTOSCH F. et GUNDERT-REMY U.** The contribution of dermal exposure to the internal exposure of bisphenol A in man. *Toxicology Letters*. Vol. 204, n° 2-3, pp. 190-198. Juillet 2011.
- MOCH C., SALMON D., RODRÍGUEZ ARMESTO L., COLOMBEL M., PIVOT C. et PIROT F.** Bladder tissue permeability and transport modelling of intravesical alum, lidocaine hydrochloride, methylprednisolone hemisuccinate and mitomycin C. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 464, n° 1-2, pp. 91-103. Avril 2014.
- MUÑOZ-DE-TORO M., MARKEY C.M., WADIA P.R., LUQUE E.H., RUBIN B.S., SONNENSCHNEIN C. et SOTO A.M.** Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*. Vol. 146, n° 9, pp. 4138-4147. Septembre 2005.

- MURRAY T.J., MAFFINI M.V., UCCI A.A., SONNENSCHNEIN C. et SOTO A.M.** Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*. Vol. 23, n° 3, pp. 383-390. Mai 2007.
- MYERS J.P., VOM SAAL F.S., AKINGBEMI B.T., et al.** Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 117, n° 3, pp. 309-315. Mars 2009.
- OEHLMANN J., SCHULTE-OEHLMANN U., KLOAS W., JAGNYTSCH O., LUTZ I., KUSK K. O., WOLLENBERGER L., SANTOS E. M., PAULL G. C., VAN LOOK K. J. W. et TYLER C. R.** A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol. 364, n° 1526, pp. 2047-2062. Juillet 2009.
- OTAKA H., YASUHARA A., et MORITA M.** Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. Vol. 19, n° 12, pp. 1663-1666. Décembre 2003.
- PIELICHOWSKI K. et NJUGUNA J.** *Thermal degradation of polymeric materials*. iSmithers Rapra Publishing. ISBN 978-1-85957-498-0. 2005.
- POTTENGER L.H., DOMORADZKI J.Y., MARKHAM D.A., HANSEN S.C., CAGEN S.Z. et WAECHTER JM.** The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*. Vol. 54, n° 1, pp. 3-18. 2000.
- RUBIN B.S., LENKOWSKI JR., SCHAEBERLE C.M., VANDENBERG L.N., RONSHEIM P.M. et SOTO A.M.** Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*. Vol. 147, n° 8, pp. 3681-3691. Août 2006.
- SHEN Z., SHEN T., WIENTJES M.G., O'DONNELL M.A. et AU J.L.-S.** Intravesical treatments of bladder cancer: review. *Pharmaceutical Research*. Vol. 25, n° 7, pp. 1500-1510. Juillet 2008.
- SHIMIZU K., KONTANI S., YAMADA S., TAKAHASHI G., NIHISYAMA T. et SATSUM A.** Synthesis of bisphenol-A from phenol and acetone using organic-inorganic modified heteropoly acid catalyst. In : *18th Saudi Arabia-Japan Joint Symposium, Dhahran, Saudi Arabia*. 2008.
- SINGH S.S., SMITH K.M. et BROWN D.M.** Drug retention following intravesical delivery of fluorouracil therapeutic adhesive in C3H mouse bladder. *Anti-Cancer Drugs*. Vol. 7, n° 5, pp. 507-513. Juillet 1996.
- SUN Y., IRIE M., KISHIKAWA N., WADA M., KURODA N., et NAKASHIMA K.** Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomedical chromatography: BMC*. Vol. 18, n° 8, pp. 501-507. Octobre 2004.

- TAPSALL J. W. et MCIVER C. J.** Beta-D-Glucuronidase activity among prototrophic and auxotrophic variants of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae commonly implicated in urinary tract infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol. 22, n° 3, pp. 261-266. Juillet 1995.
- TAYLOR J.A., VOM SAAL F.S., WELSHONS W.V., DRURY B., ROTTINGHAUS G., HUNT P.A., TOUTAIN P-L, LAFFONT C.M. et VANDEVOORT C.A.** Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in Rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 119, n° 4, pp. 422-430. Septembre 2010.
- TEEGUARDEN J. G., CALAFAT A. M., YE X., DOERGE D. R., CHURCHWELL M. I., GUNAWAN R. et GRAHAM M. K.** Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol A during high-dietary exposure. *Toxicological Sciences*. Vol. 123, n° 1, pp. 48-57. Septembre 2011.
- TEEGUARDEN J. G.** Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A : a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicological Sciences*. Vol. 85, n° 2, pp. 823-838. Février 2005.
- TSUKIOKA T., TERASAWA J-I., SATO S., HATAYAMA Y., MAKINO T., et NAKAZAWA H.** Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *Journal of Environmental Chemistry*. Vol. 14, n° 1, pp. 57-63. 2004.
- TYL R. W., MYERS C. B., MARR M. C., SLOAN C. S., CASTILLO N. P., VESELICA M. M., SEELY J. C., DIMOND S. S., VAN MILLER J. P., SHIOTSUKA R. N., BEYER D., HENTGES S. G. et WAECHTER J. M.** Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicological Sciences*. Vol. 104, n° 2, pp. 362-384. 2008.
- TYL R. W., MYERS C. B., MARR M. C., THOMAS B. F., KEIMOWITZ A. R., BRINE D. R., VESELICA M. M., FAIL P. A., CHANG T. Y., SEELY J. C. et al.** Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*. Vol. 68, n° 1, pp. 121-146. 2002.
- UEDA K., SAKAGAMI H., OHTAGURO K. et MASUI Y.** Studies on the retention of the mucous-membrane-adhesive anticancer agent hydroxypropylcellulose doxorubicin. *European Urology*. Vol. 21, n° 3, pp. 250-252. 1992.
- VANDENBERG L.N., CHAHOUD I., HEINDEL J.J., PADMANABHAN V., PAUMGARTTEN F.J. R. et SCHOENFELDER G.** Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 118, n° 8, pp. 1055-1070. Août 2010.
- VANDENBERG L.N., HAUSER R., MARCUS M., OLEA N. et WELSHONS W.V.** Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. Vol. 24, n° 2, pp. 139-177. Août 2007.

- VANDENBERG L.N., MAFFINI M.V., WADIA P.R., SONNENSCHNEIN C., RUBIN B.S. et SOTO A.M.** Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology*. Vol. 148, n° 1, pp. 116-127. Janvier 2007.
- VILA J., GENE A., RULLAN J. et DE ANTA MT J.** Rapid detection of urinary tract infection caused by *Escherichia coli* or *Proteaeae* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 10, n° 11, pp. 922–926. 1991.
- VÖLKEL W., BITTNER N. et DEKANT W.** Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol. 33, n° 11, pp. 1748-1757. Août 2005.
- VÖLKEL W., COLNOT T., CSANÁDY G.A., FILSER J.G. et DEKANT W.** Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*. Vol. 15, n° 10, pp. 1281-1287. Octobre 2002.
- VÖLKEL W., KIRANOGLU M. et FROMME H.** Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicology Letters*. Vol. 179, n° 3, pp. 155-162. Juillet 2008.
- VOM SAAL F.S. et HUGHES C.** An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 113, n° 8, pp. 926-933. Août 2005.
- VOM SAAL F. S., COOKE P. S., BUCHANAN D. L., PALANZA P., THAYER K. A., NAGEL S. C., PARMIGIANI S. et WELSHONS W. V.** A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and Industrial Health*. Vol. 14, n° 1-2, pp. 239-260. Avril 1998.
- WELSHONS W. V., NAGEL S. C., THAYER K. A., JUDY B. M. et VOM SAAL F. S.** Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicology and Industrial Health*. Vol. 15, n° 1-2, pp. 12-25. Mars 1999.
- WIEN TJES M.G., DALTON J.T., BADALAMENT R.A., DRAGO J.R. et AU J.L.** Bladder wall penetration of intravesical mitomycin C in dogs. *Cancer Research*. Vol. 51, n° 16, pp. 4347-4354. Août 1991.
- YANG Y.J., HONG Y-C., OH S-Y., PARK M-S, KIM, H., LEEM J-H. et HA E-H.** Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environmental Research*. Vol. 109, n° 6, pp. 797-801. Août 2009.
- YE X., BISHOP A.M., NEEDHAM L.L. et CALAFAT A.M.** Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 622, n° 1-2, pp. 150-156. Août 2008.

- YE X., KUKLENYIK Z., NEEDHAM L.L. et CALAFAT A.M.** Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Vol. 831, n° 1-2, pp. 110-115. Février 2006.
- YE X., WONG L-Y., BISHOP A.M. et CALAFAT A.M.** Variability of urinary concentrations of bisphenol A in spot samples, first morning voids, and 24-hour collections. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 119, n° 7, pp. 983-988. Juillet 2011.
- YOKOTA H., IWANO H., ENDO M., KOBAYASHI T., INOUE H., IKUSHIRO S. et YUASA A.** Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *The Biochemical Journal*. Vol. 340 ( Pt 2), pp. 405-409. Juin 1999.
- ZALKO D., SOTO A.M., DOLO L., DORIO C., RATHAHAO E., DEBRAUWER L., FAURE R. et CRAVEDI J-P.** Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-Dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 111, n° 3, pp. 309-319. Octobre 2002.
- ZHANG Z., ALOMIRAH H., CHO H-S., LI Y-F, LIAO C., MINH T.B., MOHD M.A., NAKATA H., REN N. et KANNAN K.** Urinary bisphenol A concentrations and their implications for human exposure in several Asian countries. *Environmental Science & Technology*. Vol. 45, n° 16, pp. 7044-7050. Août 2011.

Toulouse, 2016

**NOM :** GONDIN

**PRENOM :** Coralie

**TITRE :** EVALUATION DE L'ABSORPTION VESICALE DU BISPHEENOL A ET DU BISPHEENOL A-GLUCURONIDE CHEZ LA BREBIS

**RESUME :** Le Bisphénol A (BPA) est un composé largement utilisé en plasturgie et possédant des propriétés œstrogénomimétiques. Les données pharmacocinétiques actuelles relatives au bisphénol A montrent une incohérence entre l'exposition interne humaine prédite par les modèles pharmacocinétiques et celle observée dans les études de biosurveillance. Le bisphénol A est majoritairement éliminé par voie urinaire. L'objectif de cette étude est de tester l'hypothèse selon laquelle un cycle vésico-hépatorenal du bisphénol A ou du bisphénol A-glucuronide pourrait contribuer à augmenter l'exposition interne au bisphénol A. De plus, lors d'infection vésicale avec des bactéries présentant une activité  $\beta$ -glucuronidase, l'hydrolyse vésicale du BPA-glucuronide (BPA-G) en BPA, pourrait renforcer ce cycle vésico-hépatorenal et conduire à une surexposition au BPA. Sur le modèle ovin, le BPA est réabsorbé à travers la paroi vésicale avec une biodisponibilité moyenne de 31,2%. Le principal métabolite du bisphénol A, le bisphénol A-glucuronide est très faiblement réabsorbé par la vessie. La présence d'un inoculum bactérien dans la vessie, présentant une activité  $\beta$ -glucuronidase, ne permet pas d'augmenter cette absorption vésicale

**MOTS-CLES :** BISPHEENOL A, BPA-GLUCURONIDE, ABSORPTION VESICALE, CYCLE VESICO-HEPATO-RENAL, OVIN, ESCHERICHIA COLI

**ENGLISH TITLE :** EVALUATION OF BISPHEENOL A AND BISPHEENOL A-GLUCURONIDE VESICAL ABSORPTION IN OVINE MODEL

**ABSTRACT :** Bisphenol A is An estrogenic compound used in plastic industry. Current data related to BPA seems to show some inconsistency between human exposure as predicted by the model-dependent pharmacokinetics analysis or observed in biomonitoring studies. BPA is mostly eliminated through urine. The purpose of this study is to test the assumption that BPA or BPA-G vesico-hepato-renal cycle could contribute to raise human exposure to BPA. Moreover during bladder infection with  $\beta$ -glucuronidase bacteria, BPA-G bladder hydrolysis into BPA could fuel the vesico-hepato-renal cycle too that lead to overexposure. Ovine model showed a BPA reabsorption through bladder wall with a bioavailability of 31.2% on average. BPA-G is the major BPA metabolite and is weakly reabsorb by the bladder. However  $\beta$ -glucuronidase inoculum in the bladder does not rise its absorption.

**KEYWORDS :** BISPHEENOL A, BPA-GLUCURONIDE, VESICAL ABSORPTION, VESICO-HEPATO-RENAL CYCLE, OVINE, ESCHERICHIA COLI