

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme FLORE GRANDIN

le jeudi 11 octobre 2018

Titre :

Développement d'une approche intégrative pour évaluer l'exposition interne foetale au Bisphénol S

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME NICOLE HAGEN-PICARD

MME MARLENE LACROIX

Rapporteurs :

Mme MICHELE BOUCHARD, UNIVERSITE DE MONTREAL

M. SERGE RUDAZ, UNIVERSITE DE GENEVE

Membre(s) du jury :

M. PIERRE-LOUIS TOUTAIN, UNIVERSITY OF LONDON, Président

Mme MARLENE LACROIX, INRA TOULOUSE, Membre

Mme NICOLE HAGEN-PICARD, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

Mme VÉRONIQUE GAYRARD, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. PAUL FOWLER, UNIVERSITY OF ABERDEEN, Membre

Remerciements

À Madame Michèle Bouchard et Monsieur Serge Rudaz qui ont accepté de consacrer leur temps à la lecture et l'appréciation de ce manuscrit. À Madame Véronique Gayrard, Monsieur Paul Fowler et Monsieur Pierre-Louis Toutain qui ont accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examinateurs.

À Nicole Picard-Hagen et Marlène Lacroix pour m'avoir accompagné tout au long de cette thèse, pour m'avoir appris, Nicole à la bergerie ou au bloc de chirurgie et Marlène derrière le Xevo (qui ne vieillit pas mal du tout ^^). Merci également à toutes les deux de m'avoir permis de m'ouvrir à d'autres horizons en acceptant cette expédition du mois de septembre 2017 à l'EFSA. Enfin, pour m'avoir épaulée pour la rédaction des articles et de cette thèse.

Nicole, peut-être pourrez-vous être encore un peu mon encadrante à l'occasion d'une formation de bio à la plongée !

Marlène, je te remercie de m'avoir aidée matériellement dans ma découverte des Pyrénées et pour les sympathiques séances de footing en congrès ! Ah, je crois aussi que s'il te reste un pot de compote de poire dont tu ne sais pas quoi faire, je peux t'aider à le manger.

À Alain Bousquet-Mélou, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, je vous souhaite tous mes vœux de réussite avec la nouvelle unité Intheres !

À Bruno Le Bizec et Peggy Gandia pour avoir suivi l'avancement de ma thèse, merci pour vos conseils.

À Pierre-Louis Toutain pour avoir partagé ses connaissances en pharmacocinétique et ses conseils avisés sur notre projet de recherche.

À Véronique Gayrard, pour votre aide précieuse tout au long de ce projet et pour toujours savoir sur quel budget je peux prendre de l'argent pour passer une commande ! À Catherine Viguié et Hanna Mila, pour les coups de main en manips, les corrections d'abstract, d'articles et les nombreuses répétitions de présentations.

À l'équipe des statisticiens, Didier, Rémi et Marie, pour m'avoir fait aimer les stats et pour votre précieuse aide dans l'analyse des résultats de nos profils stéroïdiens, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

Remerciements

À Béa pour m'avoir tout apprit sur les saisines et Apafis ! À Noémie, Cédric et Jean-Pierre, les zootechniciens du laboratoire. J'ai passé de bons moments à la bergerie avec vous, merci pour votre aide indispensable pendant les phases animales.

À l'équipe gestion, Christiane, Marie-Françoise, Valérie, Kathya pour votre disponibilité et votre efficacité dans la gestion des commandes, etc. Et à Simone, pour les nombreux articles que je t'ai demandés et pour chaque jour faciliter notre vie à tous au laboratoire.

Aux thésards (anciens ou présent), Glenn et Davy pour vos conseils et votre aide au début de la thèse. À Diane, ma co-bureau pendant ces trois années de thèse, pour les quelques mots d'encouragement lors des coups de mou et les conversations sur l'avenir « post-thèse ». Petite dédicace à Vilma, la chienne la plus sage que j'ai rencontrée jusqu'ici !

À Malika, Manue et David pour les conversations aussi pertinentes que drôles lors des repas de midi dehors !

Aux étudiants qui ont participé de prêt ou de loin à certaines parties de ce projet de thèse : Léa, Kévin, Aymeric, Théo, Aude, Cécile, Julie, Claire, Clémence. Clémence, je te passe le flambeau et te souhaite une belle réussite pour ta thèse qui commence désormais. Avec Nicole, Marlène et ton énergie, je n'ai aucun doute, ça sera un succès !

À tous les membres du labo de physio pour l'ambiance agréable et bienveillante qui règne dans ce laboratoire et les nombreuses friandises à la cafèt' !

Aux membres de la commission animation, j'ai apprécié les mardis midi à Toxalim et j'ai beaucoup appris sur l'animation scientifique à vos côtés, continuez comme ça !

À mes parents, ma sœur Marylise, et mes frères Antoine et Louis, pour votre soutien inconditionnel dans chacun des choix que j'ai faits jusqu'ici.

Aux copains, Ameline, Amélie, Valérie & Luc, Nath', les dormiteuses, Nathan & Cardon, Gab, Guillaume et tout le M1B pharmaco/tox, simplement pour m'avoir permis de penser à autre chose en vous retrouvant !

Aux colocs pour les bons repas et les petits apéros improvisés pour décompresser en semaine.

À Vincent, tu es ce qu'il m'ait arrivé de plus beau. Merci pour ton soutient et ta patience. Partons maintenant voguer vers de nouveaux horizons !

Valorisation scientifique

Publications

Grandin F., Picard-Hagen N., Gayrard V., Puel S., Viguié C., Toutain P.-L., Debrauwer L., Lacroix M.Z. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of Bisphenol S and Bisphenol S glucuronide: applicability to toxicokinetic investigations. J Chromatogr A 1526:39–46; doi:10.1016/j.chroma.2017.10.020

Grandin F.C., Gayrard V., Lacroix M.Z., Picard-Hagen N., Mila H., Toutain P.-L. Comment on 'Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after a single oral administration.' Environment International 116, 29. doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.042

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Gayrard V., Gauderat G., Mila H., Gauderat G., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Bisphenol S instead of Bisphenol A: toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. Environment International 120, 584-592. doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019.

Communications orales

Grandin F.C., Picard-Hagen N., Gayrard V., Puel S., Viguié C., Toutain P.-L., Lacroix M.Z. Développement d'une méthode de dosage du Bisphenol S et de son principal métabolite, le Bisphenol S Glucuronide dans le plasma ovin : application en toxicocinétique. Séminaire de l'association francophone des sciences séparatives, 17 novembre 2016, Toulouse, France.

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Gayrard V., Viguié C., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Disposition du Bisphénol S et de son principal métabolite dans l'unité materno-fœto-placentaire. Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité (Ed.), 6ème Symposium Aliments-Cancers Santé 2017, 20 janvier 2017, Toulouse, France.

Grandin F.C., Picard-Hagen N., Gayrard V., Puel S., Viguie C., Toutain P.-L., Lacroix M.Z. Doit-on remplacer le Bisphénol A par le Bisphénol S ? Contribution de la SPE-UPLC-MS/MS pour évaluer les déterminants de l'exposition fœtale au BPS sur un modèle ovin. 12ème congrès francophone sur les sciences séparatives et les couplages de l'association francophone des sciences séparatives, 27-29 Mars 2017, Paris, France.

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Gayrard V., Viguié C., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Étude du transfert bidirectionnel du Bisphénol S sur un modèle de placenta humain perfusé. 6e Colloque du groupe de la francophonie placentaire : de l'implantation à la parturition : bases fondamentales et cliniques. 7-8 septembre 2017, Grenoble, France.

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Gayrard V., Mila H.,Viguié C., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Bisphenol S, used as Bisphenol A alternative, accumulates in the fœtal compartment throughout the gestation. 14th EAVPT congress 2018, 24-27 June 2018, Wroclaw, Poland.

Communications affichées

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Gayrard V., Viguié C., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Bisphenols S, used as Bisphenol A alternative, accumulates in the fetal compartment throughout the gestation. 2d scientific days of the GDR Reprosciences. 10-12 April 2017, Tours, France.

Lacroix M.Z., **Grandin F.C.**, Berrebi A., Viguié C., Gayrard V., Picard-Hagen N., Debrauwer L. Development and validation of a novel method for the analysis of bisphenol biomarkers in human by on-line SPE/LC/MS/MS. HPLC 2017, 18-22 juin 2017, Prague, République Tchèque.

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Gayrard V., Viguié C., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Bisphenol S, used as Bisphenol A alternative, accumulates in the fœtal compartment throughout the gestation. Induction training of EFSA's EU-FORA fellowship programme, 4-22 september 2017, Parma, Italy.

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Morvan M.-L., Antignac J.-P., Gayrard V., Viguié C., Mila H., Servien R., Toutain P.-L., Le Bizec B., Picard-Hagen N. Effet d'une exposition maternelle chronique au Bisphénol S sur la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire. Journées scientifiques du RFMF, 23-25 mai 2018, Liège, Belgique.

Grandin F.C., Lacroix M.Z., Gayrard V., Gauderat G., Viguié C., Mila H., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Bisphenol S, a Bisphenol A substitute, accumulates in the fetal compartment throughout the gestation. 3-7 June 2018, Les Diablerets, Suisse.

Gayrard V., Lacroix M.Z., **Grandin F.C.**, Mila H., Viguié C., Gély C., Rabozzi B., Bouchard M., Toutain P.-L., Picard-Hagen N. Bisphenol S oral toxicokinetics in piglets: Why Bisphenol S is not a safe alternative to bisphenol A. 3-7 June 2018, Les Diablerets, Suisse.

Table des matières

Valorisation scientifique 5
Abréviations 11
Liste des figures 13
Liste des tableaux 15
Introduction générale 16
Chapitre 1 : Étude bibliographique 23
Partie 1 : Le bisphénol S, un substitut majeur du Bisphénol A 23
I. Historique 23
II. Caractéristiques physico-chimiques, utilisation et règlementation du BPS 24
A. Structure et propriétés physico-chimiques du Bisphénol S 24
B. Utilisation du BPS 25
C. Règlementation du BPS 26
III. Effets toxicologiques du BPS 27
IV. Exposition humaine au BPS 29
A. L'exposition humaine externe 30
1. Les papiers 30
2. L'alimentation 33
3. L'environnement 35
4. Les produits d'hygiène corporelle et les vêtements 36
5. Conclusion 36
B. Exposition interne humaine 36
V. Données toxicocinétiques du BPS chez l'animal et chez l'Homme 43
A. Métabolisme *in vitro* 43
B. Données toxicocinétiques du BPS *in vivo* 44
C. La liaison du BPS aux protéines plasmatiques 45
Partie 2 : Mécanismes de l'exposition fœtale 49
I. Développement des capacités métaboliques chez le fœtus 50
A. Le métabolisme hépatique fœtal 50
B. Le métabolisme placentaire 51
II. Transfert placentaire des xénobiotiques 52
A. Placentation ovine *versus* placentation humaine 52
B. La diffusion passive et facilitée 53
C. Le transport actif 53
III. Échange sang-liquide amniotique 55

Table des matières

Partie 3 : La stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire. 59

I. Description générale de la stéroïdogenèse 59

A. Approvisionnement en cholestérol des cellules stéroïdogéniques 60

B. Les enzymes de la stéroïdogenèse 60

1. Les CYP450 60

2. Les hydroxystéroïdes déhydrogénases 61

3. Les sulfatases 61

C. Les voies de biosynthèse des stéroïdes 62

1. Du cholestérol à la prégnénolone 62

2. Voie de synthèse de la progestérone 63

3. Voie de synthèse des androgènes 63

4. Voie de synthèse des corticostéroïdes et des minéralocorticostéroïdes 64

5. Voie de synthèse des œstrogènes 64

II. Stéroïdogenèse et interrelations materno-fœto-placentaires 64

A. La voie de synthèse et de métabolisation de la testostérone dans l'unité fœto-placentaire 67

B. Évolution des stéroïdes sexuels dans le compartiment maternel au cours de la gestation 69

C. Évolution des stéroïdes sexuels dans le compartiment fœtal 71

1. Liquide allantoïdien et amniotique 71

2. Plasma fœtal 73

Objectifs et stratégies de la thèse 74

Chapitre 2 : Études expérimentales 79

Mise au point des outils analytiques nécessaires à l'étude de la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire 79

I. Contexte et objectifs 79

II. Annexe de l'article 1 : Production du BPSG en chromatographie flash 83

A. Materials and methods 84

1. Animal treatment and sample collection 84

2. BPSG purification from sheep urine by flash chromatography 84

3. Identification and quantification of BPSG and residual BPS in purified urine collected after oral administration of BPS to sheep. 84

B. Results 85

1. Optimization of flash chromatography 85

2. BPSG identification 85

3. BPSG quantification 86

III. Article 1 88
IV. Conclusion 96
Disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire ovine 101
I. Contexte et objectifs 101
II. Article 2 102
III. Études complémentaires à l'article 2 115
A. Évaluation de l'excrétion urinaire du BPSG chez les brebis 115
B. Détermination de la fraction libre du BPS chez la brebis et le fœtus ovin .. 116
1. Contexte et objectif 116
2. Méthode expérimentale 117
3. Résultats et conclusion 118
C. Étude préliminaire 1 : hydrolyse du BPSG dans le liquide amniotique *ex vivo* 118
1. Contexte et objectif 118
2. Méthode expérimentale 119
3. Résultats et conclusion 119
IV. Conclusions 120
Étude du transfert placentaire du BPS et du BPSG sur le modèle de perfusion de cotylédon humain isolé 125
I. Contexte et objectifs 125
II. Article 3 128
III. Conclusion 151
Étude de l'effet du BPS sur la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire ovine. 156
I. Contexte et objectifs 156
II. Expérience préliminaire : évaluation de la biodisponibilité du BPS administré par voie intramusculaire 157
A. Contexte et objectif 157
B. Matériels et méthodes 158
1. Animaux 158
2. Protocole expérimental 158
3. Conservation et analyse des échantillons 158
4. Analyse des données 159
C. Résultats et conclusion 159
III. Article 4 161
IV. Conclusion 215

Table des matières

Discussion générale et perspectives 220

Références bibliographiques 230

Annexe 1 : Comment on « Pharmacokinetic of bisphenol S in humans after a single oral administration » 246

Abréviations

ABC : ATP Binding Cassette

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

AUC : Area Under Curve

BCRP : Breast Cancer Resistant Protein

BPA : Bisphénol A

BPAG : BPA Glucuronide

BPS : Bisphénol S

BPSG : BPS Glucuronide

BPSS : BPS Sulfate

C_{max} : Concentration maximale

CYP : Cytochrome

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHEA-S : Sulfate de déhydroépiandrostérone

DHT : Dihydrotestostérone

DJA : Dose Journalière Admissible

DLLME : Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction

ECHA : European Chemicals Agency

EFSA : European Food Safety Agency

EMA : European Medicines Agency

F : biodisponibilité absolue

GC : Gaz Chromatography

GST : Glutathions S transférase

HSD : Hydroxystéroïde déhydrogénase

Abréviations

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineuse

JG : Jour de Gestation

LMS : Limite de Migration Spécifique

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

MRP : Multidrug Resistance Protein

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

P-gp : P-glycoprotéine

SDR5A2 : 5α-réductase de type 2

SULT : sulfotransférase

TK : Toxicocinétique

t_{max} : temps d'occurrence de la concentration maximale

UGT : UDP-Glucuronosyltransférase

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques du BPS et du BPA. 24
Figure 2 : Répartition de l'utilisation du BPS dans les différents secteurs industriels, sur la base de la répartition de l'utilisation du BPA, d'après [30]. 26
Figure 3 : Représentation schématique de l'exposition externe, de la dose interne et de l'exposition interne. 29
Figure 4 : Répartition des denrées alimentaires aux États-Unis (à gauche) et en Chine (à droite) en fonction de leur fréquence de détection du BPS [59.60]. 33
Figure 5 : Fréquence de détection du BPA, BPF, BPS et BPAF dans 42 urines de la population générale et concentrations moyennes urinaires en BPS entre 2000 et 2014, d'après [75]. ... 37
Figure 6 : Représentation schématique des déterminants de l'exposition fœtale aux xénobiotiques. 49
Figure 7 : Localisation des principales protéines de transport exprimées dans le placenta humain d'après [136]. 54
Figure 8 : Volume de liquide amniotique bu par le fœtus ovin chaque jour en fonction du volume de liquide amniotique présent dans le compartiment fœtal, d'après [140]. 56
Figure 9 : Structure cyclopentanophénanthrène caractéristique des hormones stéroïdes et transformation des stéroïdes Δ^5 en Δ^4. 59
Figure 10 : Schéma des voies de la stéroïdogenèse 62
Figure 11 : Schéma général de la stéroïdogenèse au sein de l'unité materno-fœto-placentaire. 65
Figure 12 : Représentation schématique du métabolisme de la DHEA-S par l'unité fœto-placentaire au milieu de la gestation [149] 66
Figure 13 : Voie classique de biosynthèse de la testostérone dans les testicules fœtaux, d'après [153]. 68
Figure 14 : Synthèse de la testostérone dans la surrénale fœtale d'après [155]. 69
Figure 15 : Évolution temporelle des concentrations d'estrone et d'estrone sulfate, d'œstradiol et d'œstradiol sulfate dans la veine jugulaire au cours de la gestation chez la brebis [150]. 70
Figure 16 : Évolution temporelle des concentrations d'estrone, d'estrone sulfate et d'œstradiol sulfate dans le liquide allantoïdien et amniotique au cours de la gestation chez le fœtus ovin [150]. 72
Figure 17 : Chromatogram obtained in Flash chromatography displaying the separation of BPSG (9.5 CV) in sheep urine samples from urine interferences and from BPS eluted at 6 CV. 85
Figure 18 : MS/MS spectrum obtained for the collected BPSG fractions after flash chromatography purification. The parent ion of BPSG is observed at m/z 425. Product ions of BPSG are observed at m/z 249, corresponding to the BPS moiety, and at m/z 175, corresponding to the glucuronide moiety (Ecoll = 52 eV). 86
Figure 19 : Excrétion cumulée moyenne du BPSG, dans les urines maternelles, dans les 24 h après la dernière administration de BPS, c'est-à-dire à l'état d'équilibre, exprimée en pourcentage de la dose de BPS administrée de 5 mg/k par voie IV à deux brebis. 115
Figure 20 : Description schématique du principe de la dialyse à l'équilibre utilisé pour la détermination de la fraction libre et liée du BPS aux protéines plasmatiques. 117
Figure 21 : Vitesse d'hydrolyse du BPSG (nmol/h) et évolution temporelle des quantités cumulées de BPS formé (nmol) dans le liquide amniotique maintenu sous agitation à 37 °C. 120

Liste des figures

Figure 22 : Schéma du système de perfusion de cotylédon humain isolé en circuit ouvert. Les circulations fœtale et maternelle sont recréées expérimentalement en faisant circuler du milieu de Earle. Les conditions physiologiques de température, de pH et de débit cotylédonnaire maternels et fœtaux sont contrôlées, d'après [3]. 125
Figure 23 : Représentation schématique du premier protocole expérimental pour l'étude du transfert placentaire du BPS-d4 (A) et du BPSG (B). L'utilisation de BPS (BPSG) marqué au deutérium permet de distinguer dans les échantillons collectés le BPS (BPSG) qui provient de la circulation maternelle ou fœtale. L'antipyrine est un marqueur de diffusion passive permettant de vérifier l'intégrité du placenta et ainsi de valider l'expérience de perfusion. 126
Figure 24 : Représentation schématique du protocole d'étude du transfert placentaire du BPS marqué au deutérium (BPS-d4) et du BPSG simultanément, dans le sens materno-fœtal (A) ou fœto-maternel (B). L'utilisation de BPS marqué au deutérium permet de distinguer le BPS-d4 ajouté au liquide de perfusion, du BPS qui pourrait provenir de l'hydrolyse du BPSG. L'antipyrine est utilisée comme marqueur de diffusion passive. 126
Figure 25 : Comparaison du taux d'extraction et de la clairance transplacentaire du BPS (bleu) et du BPA (rouge) évalués sur un modèle de cotylédon humain isolé, les données concernant le BPA sont issues de Corbel et coll. [184]. 152
Figure 26 : Comparaison du taux d'extraction et de la clairance transplacentaire du BPSG (bleu) et du BPAG (rouge) évalués sur un modèle de cotylédon humain isolé les données concernant le BPA sont tirées de Corbel et coll. [184]. 152
Figure 27 : Protocole expérimental de l'étude de l'impact d'une exposition maternelle chronique au BPS sur l'équilibre stéroïdien dans l'unité materno-fœto-placentaire. GD : Gestation Day, LA : liquide amniotique, LCR : liquide céphalo-rachidien, n : nombre d'animaux. 157
Figure 28 : Représentation graphique de la décroissance des concentrations plasmatiques individuelles en BPS en fonction du temps pour la brebis 1 (en haut) et la brebis 2 (en bas) après administration d'une dose de 5 mg/kg de BPS par voie IV (A) ou IM (B). 160
Figure 29 : Comparaison des mécanismes qui déterminent la disposition du BPS (en haut) et du BPA (en bas) dans l'unité materno-fœto-placentaire dans le modèle ovin en fin de gestation. 224

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du BPS et du BPA. 25
Tableau 2 : Concentrations en BPS dans les papiers. 31
Tableau 3 : Concentrations en BPS dans les urines humaines. 40
Tableau 4 : Concentrations en BPS dans le sérum, le plasma, les globules rouges et le lait maternel humains. 42
Tableau 5 : Concentrations plasmatiques de progestérone (P4, ng/mL), d'estrone (E1, pg/mL), d'œstradiol (E2, pg/mL) et d'estrone sulfate (E1S, pg/mL) dans la veine utérine (UTV) et l'artère utérine (UA) au cours de la gestation chez la brebis [156]. Effet du jour de gestation, 1 p<0.05 ; 2 p<0.01 ; 3 NS. 71
Tableau 6 : Concentrations de progestérone (P), d'estrone (E1), d'œstradiol (E2) et d'estrone sulfate (E1S) dans le liquide allantoïdien au cours du dernier tiers de la gestation chez le fœtus ovin [156] 72
Tableau 7 : Évolution temporelle des concentrations d'œstrogènes dans le plasma fœtal de JG80 à JG140 [150]. 73
Tableau 8 : Méthodes de dosage du BPS et du BPS conjugué dans les matrices biologiques publiées dans la littérature jusqu'en 2016, année du développement du dosage simultané du BPS et du BPSG au laboratoire. 81
Tableau 9 : Principaux paramètres de la méthode de dosage du BPS et du BPSG ainsi que leurs composés deutérés (BPS-d4, BPS-d8 et BPSG-d8) dans les matrices biologiques. 97
Tableau 10 : Moyenne (± ET) des pourcentages de liaison du BPS et du BPA aux protéines plasmatiques sur des pools de plasma de brebis gravides et de fœtus ovins en fin de gestation. 118
Tableau 11 : Paramètres TK du BPS après une administration IV et une administration IM à deux brebis. 160
Tableau 12 : Comparaison des clairances placentaires du BPS, BPSG, BPA et BPAG chez la brebis et chez la femme. 227

Introduction générale

Dans les années 1990, la notion de perturbateur endocrinien est apparue suite à l'observation de troubles de la fonction reproductrice chez les animaux de la faune sauvage dans les pays industrialisés liés à la présence de substances chimiques dans l'environnement [1]. En parallèle, une dégradation de la fertilité chez l'homme a été mise en évidence dans plusieurs pays [2–4]. Ainsi chez l'homme, une oligospermie, une augmentation des malformations, telles que l'hypospadias et la cryptorchidie et une augmentation du cancer testiculaire ont été observés, sans étiologie clairement identifiée [5,6]. Ces différentes anomalies pourraient avoir comme origine un dysfonctionnement du développement testiculaire. L'hypothèse avancée pour expliquer ce syndrome dysgénésique testiculaire est l'exposition prénatale aux perturbateurs endocriniens pendant la fenêtre de masculinisation. C'est dans ce contexte que s'est tenue la conférence de Wingspread regroupant des biologistes de la faune sauvage et des endocrinologistes, qui ont pour la première fois dressé un état des lieux des substances chimiques présentes dans l'environnement susceptibles d'avoir un potentiel perturbateur endocrinien [7]. Ainsi, un lien a été fait entre l'augmentation croissante de l'utilisation de substances chimiques au cours du XXe siècle et l'apparition de troubles sans étiologie clairement identifiée.

En 1996, à la suite d'un workshop sur l'évaluation des risques pour la santé et des effets sur l'environnement des perturbateurs endocriniens, l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) a proposé de définir un perturbateur endocrinien comme *« une substance exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme »* [8]. En 2002, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a défini un perturbateur endocrinien comme *« une substance ou un mélange de substances exogènes altérant les fonctions du système endocrinien et induisant des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous) – populations »* [9].

Bien que moins précise que celle de l'USEPA, cette dernière définition a été reprise par la Commission européenne en 2017, suite à de nombreux débats. En effet, pour qu'une substance soit qualifiée de perturbateur endocrinien, il faut qu'elle exerce un effet néfaste

avéré via un mode d'action endocrinien. En réalité, le lien de cause à effet entre l'effet avéré et le mécanisme endocrinien est souvent difficile à démontrer et de ce fait, cette définition exclut un grand nombre de substances, dont les bisphénols. La Commission européenne a donc repris la définition de l'OMS en y ajoutant la dimension de perturbateur endocrinien présumé et celle de danger plausible bien que non avéré de ces substances pour la santé, ce qui rend possible la mise en place de mesures préventives au nom du principe de précaution [10].

La mise en évidence du potentiel perturbateur endocrinien d'une substance est un véritable challenge scientifique pour plusieurs raisons : (1) l'homme est généralement exposé à de nombreux contaminants, à faible dose, tout au long de sa vie, notamment pendant la période prénatale. (2) Les effets des perturbateurs endocriniens exercés pendant cette période peuvent se manifester de façon différée, à l'âge adulte. (3) Les effets des perturbateurs endocriniens s'expriment selon des schémas qui vont à l'encontre des concepts de la toxicologie classique partant du postulat que la dose fait le poison. En effet, une relation non monotone entre la dose et la réponse (courbe dose-réponse en « U » ou « U » inversé) existe pour les perturbateurs endocriniens [10,11]. Par ailleurs, la période fœtale est considérée comme une période à risque vis-à-vis de l'exposition à des perturbateurs endocriniens. Ainsi, une exposition prénatale même à bas bruit, au cours du développement est fortement suspectée d'être impliquée dans l'initiation d'effets biologiques exprimés de façon différés chez l'adulte.

Parmi les perturbateurs endocriniens, le Bisphénol A (BPA), très largement utilisé dans l'industrie plasturgique, a fait l'objet de nombreuses polémiques. Il a été progressivement interdit dans les contenants alimentaires dans différents pays [12] en raison de ses effets perturbateurs endocriniens observés chez l'animal et suspectés chez l'homme [13]. Pour remplacer le BPA dans ses applications industrielles, d'autres bisphénols, comme le Bisphénol S (BPS), sont de plus en plus utilisés, sans évaluation préalable de leur potentiel perturbateur endocrinien.

Quelques études de biosurveillance humaine ont mises en évidence une exposition au BPS à la fois chez l'adulte et le fœtus [14] et des études toxicologiques suggèrent que le BPS présente, à l'instar du BPA, un potentiel perturbateur endocrinien [15]. À l'heure actuelle, les données toxicocinétiques (TK) du BPS sont limitées et aucune ne concerne l'exposition fœtale.

Ainsi, le développement d'un modèle TK capable de prédire l'exposition interne du fœtus au BPS est critique pour une évaluation du risque lié à l'exposition des femmes enceintes et de leur fœtus au BPS. En effet, une analyse éclairée des implications en termes de santé humaine des études toxicologiques réalisées chez l'animal nécessite de caractériser l'exposition interne fœtale humaine et de la comparer aux concentrations plasmatiques associées à un effet biologique chez les animaux exposés *in utero*.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient de déterminer les mécanismes d'exposition fœtale au BPS et de caractériser des biomarqueurs phénotypiques d'exposition fœtale et/ou d'effet du BPS à partir d'une signature stéroïdienne.

Ce travail de recherche a été réalisé sous la direction de Nicole Hagen-Picard et de Marlène Lacroix, dans l'équipe « Gestation et Perturbateurs Endocriniens » et au sein de la plateforme « Axiom » qui appartiennent à l'Unité Mixte de Recherche 1331, Toxalim, centre de recherche en toxicologie alimentaire, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). L'équipe « Gestation et Perturbateurs Endocriniens » s'intéresse à l'exposition fœtale à des xénobiotiques dans le but de contribuer à l'évaluation du risque pour la santé humaine lié à l'exposition aux xénobiotiques. La plateforme « Axiom » développe des méthodologies principalement basées sur l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire et de la spectrométrie de masse pour la caractérisation de l'exposition à des contaminants, seuls ou en mélange, et de leurs effets.

Ce projet de thèse fait partie intégrante d'un projet intitulé « BPS FetalExpo » financé par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) dans le cadre d'un appel à projets « PNR-EST 2015 ». La bourse de thèse adossée au projet a été cofinancée par l'INRA et par la Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche du Ministère de l'Agriculture.

Le premier chapitre de ce manuscrit synthétise les données bibliographiques nécessaires à la compréhension de ce projet. Tout d'abord, une première section est consacrée au BPS. Elle décrit ses utilisations en tant que substitut du BPA, à l'origine de sa présence ubiquitaire dans notre environnement. Les modes d'action perturbateur endocrinien du BPS et ses effets adverses sont ensuite envisagés. L'introduction documente également les voies d'exposition et les estimations des niveaux d'exposition de la population humaine, et fait la synthèse des quelques données TK sur le BPS. La deuxième partie décrit les

caractéristiques physiologiques fœtales et placentaires nécessaires à la compréhension des mécanismes déterminant l'exposition fœtale aux xénobiotiques. La troisième partie décrit la stéroïdogenèse et ses particularités dans l'unité materno-fœto-placentaire.

Après ce premier chapitre bibliographique, les objectifs du projet et le choix des stratégies expérimentales utilisées pour atteindre ces objectifs sont présentés.

Le chapitre deux décrit les quatre études expérimentales réalisées au cours de la thèse. Dans un premier temps, il a été nécessaire de développer des outils analytiques pour le dosage simultané du BPS et de son principal métabolite, le BPS Glucuronide (BPSG) dans les matrices biologiques. La deuxième étude expérimentale décrit la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire sur le modèle intégratif de la brebis gravide instrumentée. Compte tenu des différences interspécifiques de placentation entre le modèle ovin et l'homme, la troisième partie expérimentale concerne l'étude du transfert placentaire bidirectionnel du BPS et du BPSG sur le modèle de cotylédon humain perfusé. La dernière étude expérimentale porte sur la caractérisation de biomarqueurs phénotypiques d'exposition fœtale et/ou d'effet du BPS à partir d'une signature stéroïdienne dans l'unité materno-fœto-placentaire ovine.

L'ensemble de ses résultats sont mis en perspective dans la discussion générale du manuscrit pour déterminer si la substitution du BPA par le BPS est une alternative acceptable en termes de risque pour la santé lié à son potentiel d'exposition fœtale.

Chapitre 1 :
Étude bibliographique

Chapitre 1 : Étude bibliographique

Partie 1 : Le bisphénol S, un substitut majeur du Bisphénol A

I. Historique

Le BPA, 2.2 – bis (hydroxyphenyl) propane, a fait l'objet de nombreuses recherches pour des applications à visée contraceptive à la fin du XIXe siècle [16]. Cependant, son activité œstrogénique étant relativement faible par rapport à celle de l'œstradiol, l'industrie pharmaceutique lui préféra le diéthylstilbestrol, connu en France sous le nom de distilbène [17].

Le BPA est ensuite apparu dans l'industrie plasturgique suite à la mise au point en 1953 par H. Schnell, L. Bottenbruch, et H. Krimm, pour la société Bayer, d'un polymère de plastique, nommé polycarbonate, synthétisé à partir de monomère de BPA [18]. Il a alors été produit à hauteur de plusieurs millions de tonnes par an [19,20] et utilisé dans la fabrication d'un grand nombre de produits de consommation courante [21].

Cependant, le BPA a fait l'objet de nombreuses polémiques, notamment au sein de la communauté scientifique et des agences d'évaluation, liées notamment à la divergence entre les concentrations plasmatiques prédites par les données TK (de l'ordre du pg/mL), et certaines des valeurs rapportées dans les études de biosurveillance (de l'ordre du ng/mL). Suite aux rapports des agences d'évaluation européenne et française qui mettent en lumière des incertitudes sur les effets sanitaires potentiels d'une exposition prénatale au BPA, la Dose Journalière Admissible (DJA)[1], évaluée initialement à 50 µg/kg/jour a été réduite à 4 µg/kg/jour en 2015 [22].

Parallèlement à ces évaluations, différents pays ont, par mesure de précaution, interdit certains usages du BPA. Le Canada est le premier pays à légiférer sur le BPA et à avoir interdit son utilisation dans les vaisselles pour enfant en 2008, puis dans tous les contenants alimentaires en 2010. L'Union européenne, en 2011, puis les États-Unis, en 2012, ont pris des mesures similaires en interdisant le BPA dans la vaisselle à destination des enfants [12,19]. En

[1] Dose Journalière Admissible : dose qu'un individu peut ingérer quotidiennement tout au long de sa vie, sans effet adverse pour sa santé.

France, la directive européenne a été mise en application en 2013 et le BPA est maintenant interdit dans tous les contenants alimentaires [23].

Plus récemment, différentes agences ont souhaité définir et prendre en compte des critères d'évaluation des perturbateurs endocriniens. Ainsi, en juin 2017, le BPA a été classé parmi les substances extrêmement préoccupantes (SVHC) par l'agence européenne des produits chimiques (ECHA), au titre de ses propriétés de perturbateur endocrinien pour l'homme [24,25].

Ces interdictions ont obligé les industriels à remplacer progressivement le BPA par des analogues structuraux, tels que le BPS, qui ont des propriétés plastifiantes et thermiques similaires au BPA. Ainsi, le BPS a été utilisé pour la fabrication de polymères de plastiques à partir des années 2000 [12,18], alors que sa synthèse avait déjà été décrite en 1869 pour son usage en tant que colorant, soit quelques décennies avant celle du BPA (1891).

II. Caractéristiques physico-chimiques, utilisation et règlementation du BPS

A. Structure et propriétés physico-chimiques du Bisphénol S

Le BPS, 4.4' – sulfonyldiphénol, est une substance chimique de la famille des bisphénols. Il se distingue du BPA par son groupement sulfonyle qui relie les deux cycles phénoliques, communs à l'ensemble des bisphénols (Figure 1).

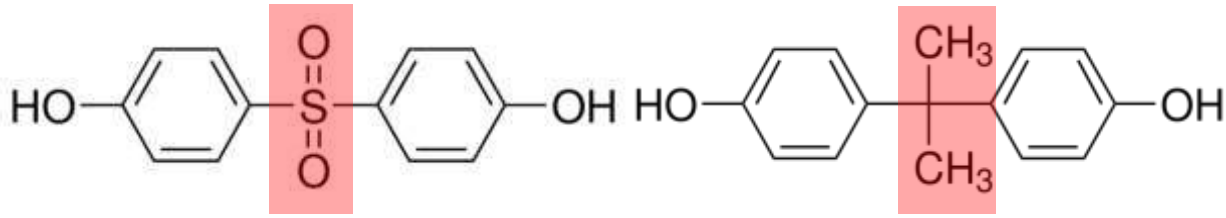


Figure 1 : Structures chimiques du BPS et du BPA.

Le BPS est synthétisé à partir d'un phénol qui réagit *in situ* avec un acide sulfurique pour former l'acide phénolsulfonique qui, avec un autre phénol, va former le BPS avec un taux de rendement de l'ordre de 70 %. Le BPS prend la forme d'une poudre blanche cristalline et inodore [26]. De par son groupement sulfonyle, il présente des propriétés physico-chimiques différentes du BPA (Tableau 1) [19,27,28]. En effet, le BPS est moins lipophile que le BPA et à pH physiologique (7.4), il se trouve à l'équilibre entre sa forme ionique (basique) et non ionique (acide) alors qu'à ce pH, le BPA est majoritairement sous sa forme non ionique.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du BPS et du BPA.

Propriété	Bisphénol S	Bisphénol A
Formule brute	$C_{12}H_{10}O_4S$	$C_{15}H_{16}O_2$
Masse molaire	250.27	228.29
Coefficient de partage n-octanol/eau (Log P_{ow})	1.65	3.32
Constante d'ionisation (pKa1-pKa2)	7.42-8.03	9.63-10.4

B. Utilisation du BPS

Le BPS est utilisé pour la fabrication de polymères de plastiques tels que les résines polyéthersulfones, polycarbonates et époxy. Les résines polycarbonates sont des plastiques transparents et résistants aux chocs. Les résines polyéthersulfones et époxy ont en plus l'avantage d'être thermiquement stables. Les résines époxy possèdent en plus une résistance à la corrosion. En tant que co-monomère, le BPS entre dans la fabrication de résines phénoliques et polyesters. Ces polymères de plastiques trouvent des applications dans divers secteurs, dont l'industrie alimentaire (revêtement protecteur des emballages alimentaires), l'automobile (vitrage de sécurité, peintures), l'électricité, l'électronique (fabrication de circuits imprimés) et le secteur médical (instruments de laboratoire et matériel médical). Ils servent également à la fabrication de vaisselles et produits de consommation courante.

De plus, le BPS est utilisé comme additif dans le revêtement des papiers thermiques tels que les tickets de caisse et les reçus bancaires dans lesquels il agit en tant que révélateur d'encre lorsque le papier est chauffé. Dans l'industrie chimique, le BPS est un intermédiaire chimique dans la production de teinture et intervient dans la fabrication de retardateurs de flamme [29,30].

L'INERIS fait l'hypothèse que la répartition des usages du BPS est identique à celle du BPA [30], c'est-à-dire une utilisation principalement pour la fabrication de plastiques de type polycarbonate (Figure 2). Cette répartition ne prend pas en compte des utilisations propres au BPS telles que la fabrication de résines polyéthersulfones qui est à l'origine de l'utilisation du BPS dans les secteurs de l'électricité, l'électronique, l'automobile, l'optique, l'industrie alimentaire, le domaine médical, l'aviation, l'aérospatiale et dans le domaine militaire. En conséquence, bien que les domaines d'utilisation du BPS soient documentés, nous ne sommes pas en mesure à l'heure actuelle de quantifier cette répartition.

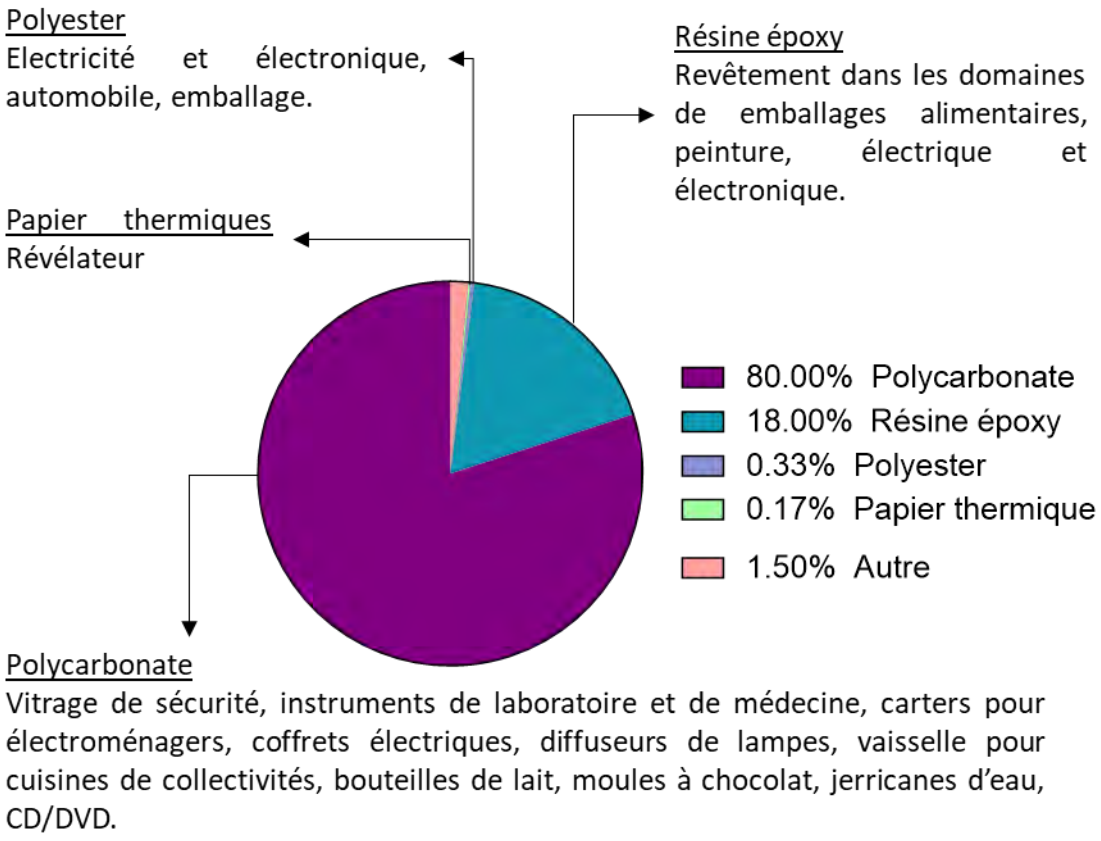


Figure 2 : Répartition de l'utilisation du BPS dans les différents secteurs industriels, sur la base de la répartition de l'utilisation du BPA, d'après [30].

C. Règlementation du BPS

À ce jour, les données concernant la production et l'importation mondiale de BPS sont peu précises. Aux États-Unis, la production et/ou l'importation de BPS sont estimées entre 450 et 5000 tonnes par an [29,30]. L'ECHA estime que la production et/ou l'importation de BPS dans la zone économique européenne varient de 10 000 à 100 000 tonnes par an [31]. Le BPS est soumis à la règlementation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals) et dans ce cadre, il a été enregistré par les industriels (fabricants et/ou utilisateurs) en 2010 auprès de l'ECHA.

L'utilisation du BPS dans l'industrie agroalimentaire est soumise à la règlementation UE n° 10/2011 sur l'utilisation des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires. Cette règlementation fixe une limite de migration spécifique (LMS) correspondant à la quantité maximale autorisée d'une substance donnée cédée par un matériau ou objet aux denrées alimentaires ou aux simulants de denrées

alimentaires. Le BPS étant capable de migrer depuis le revêtement intérieur des boîtes de conserve et des cannettes vers leur contenu [32], sa LMS a été fixée à 0.05 mg/kg [33].

De plus, des études toxicologiques réalisées chez le rat ont permis d'estimer une dose sans effet nocif observé de 60 mg/kg/jour par voie orale (DSENO ou NOAEL (Non Observable Adverse Effect Level)) pour les effets reprotoxiques, et une Dose Minimale avec Effet Nocif observé de 20 mg/kg/jour par voie sous-cutanée (DMENO ou LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level)), pour des effets utéro-trophiques [29]. À ce jour, ce composé n'est pas réglementé car aucune évaluation du risque lié à l'exposition au BPS n'est disponible et par conséquent la DJA n'a pas été établie.

III. Effets toxicologiques du BPS

Le BPS présente un potentiel perturbateur endocrinien œstrogéno-mimétique et anti-androgénique. Il est capable de se lier aux récepteurs nucléaires aux œstrogènes et plus faiblement aux récepteurs aux androgènes (hAR) [34]. À des concentrations très faibles (de l'ordre du picomolaire), sur un modèle de cellules hypophysaires de rat, la liaison du BPS aux récepteurs membranaires de l'œstradiol induit des effets similaires à ceux du BPA. Le BPS perturbe la signalisation cellulaire et conduit à une prolifération cellulaire altérée et à la mort cellulaire [35].

Sur la base de données *in vivo* limitées, le BPS exerce un effet œstrogénique révélé par son effet utéro-trophique, mis en évidence chez le rat pour la plus faible dose testée (20 mg/kg/jour par voie sous-cutanée pendant 3 jours) [36]. Cependant, même s'il présente qualitativement les mêmes effets que le BPA sur les récepteurs aux œstrogènes, le BPS présente un plus faible potentiel d'activité œstrogénique ou anti-androgénique [15,37,38].

Des effets du BPS sur la stéroïdogenèse, comparables à ceux du BPA ont été mis en évidence *in vitro* et *ex vivo*. Sur un modèle de lignée cellulaire de carcinome surrénalien humain (H295R) ou sur un modèle de cellules de Leydig murine MA10, l'exposition au BPS inhibe la production de testostérone, d'androstènedione et de déhydroépiandrostérone (DHEA), mais également de cortisol et de corticostérone. Le BPS stimule la production de progestagènes en inhibant l'expression de la 5α-réductase et du CYP17A1 [15,37,39,40].

Des effets similaires ont été observés *ex vivo* sur des explants de testicules fœtaux humains (à des concentrations supérieures ou égales à 10 nM de BPS) et de souris (à des

concentrations supérieures ou égales à 1000 nM). Sur les explants testiculaires fœtaux de souris, le BPS (10 000 nM) réduit l'expression de différents gènes impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes et notamment de la testostérone (Star, Hsd3b1, Cyp17a1), mais pas du CYP11A1 [41].

Chez le rat mâle, une exposition subchronique au BPS à la dose de 50 µg/kg/jour pendant 28 jours induit une diminution des concentrations de testostérone intratesticulaire et plasmatique [42].

Des effets du BPS sur le développement ont également été mis en évidence. Une étude réalisée chez le nématode C. Elegans a montré que le BPS, comme le BPA, a un effet délétère sur la fonction reproductive, en induisant l'apoptose des cellules germinales et la diminution de la viabilité embryonnaire [38].

Deux études réalisées chez le poisson-zèbre ont montré que l'exposition au BPS altérait la fonction reproductive en diminuant la production d'œufs, le poids des gonades ou encore la longueur du corps des nouveau-nés [43,44]. Une augmentation du sexe-ratio femelle/mâle a également été mise en évidence [44]. Le BPS augmente les concentrations plasmatiques d'œstradiol (pour des concentrations de BPS > 0.5 ng/mL chez les mâles et > 10 ng/mL chez les femelles) et diminue les concentrations de testostérone chez les mâles (pour des concentrations de BPS > 10 ng/mL). Ces effets sont associés à une augmentation de l'expression du gène de l'aromatase et à une diminution de l'expression des gènes codant pour les CYP17 et 17βHSD dans les gonades [43–45].

L'ensemble de ces études indiquent que le BPS pourrait avoir des effets œstrogéniques ou anti-androgéniques, et qu'il pourrait agir sur différentes enzymes de la stéroïdogenèse. Ces mécanismes d'action pourraient avoir des conséquences délétères sur la fonction de reproduction, notamment pendant la période critique du développement.

En raison du potentiel perturbateur endocrinien du BPS, des chercheurs alertent la communauté scientifique sur le fait que le remplacement du BPA par le BPS pourrait s'ajouter aux cas des « substitutions regrettables » [15,19,20,37,38].

IV. Exposition humaine au BPS

Le risque lié à l'exposition au BPS dépend d'une part de son potentiel perturbateur endocrinien, mais également du niveau de l'exposition humaine interne au BPS. La dose interne correspond à la quantité de BPS absorbé, c'est-à-dire ayant atteint la circulation systémique, que cela soit sous forme native (aglycone) ou sous forme métabolisée. Elle peut être évaluée par les concentrations plasmatiques ou urinaires en BPS total (BPS aglycone + BPS métabolisé) (Cf. Infra : V.Données toxicocinétiques du BPS chez l'animal et chez l'Homme et Figure 3).

La dose interne peut être estimée par les niveaux d'exposition externe au BPS associés aux différentes voies d'exposition, corrigée par leur coefficient d'absorption respectif comme cela a été fait pour le BPA par l'ANSES en 2013 [46] et par l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) en 2015 [47].

C'est l'exposition interne au BPS, évaluée par les concentrations plasmatiques de BPS aglycone, qui est pertinente pour la caractérisation du risque car le BPSG est dépourvu d'activité œstrogénique (Figure 3).

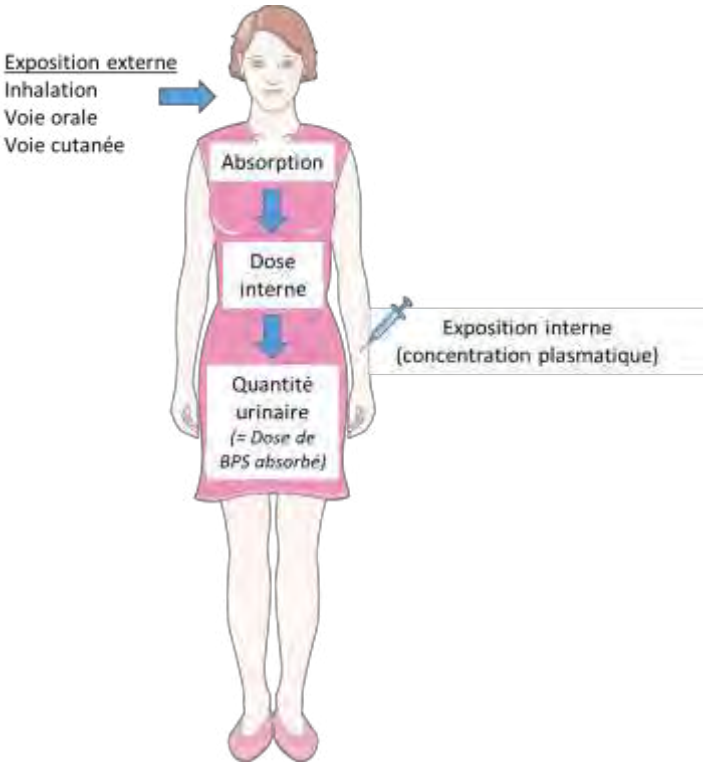


Figure 3 : Représentation schématique de l'exposition externe, de la dose interne et de l'exposition interne.

A. L'exposition humaine externe

1. Les papiers

Le BPS est présent dans tous types de papiers (Tableau 2). Dans les papiers thermiques, les concentrations de BPS peuvent varier de 0.000 013 8 µg/g (Limite de détection (LOD) = 0.000 01 µg/g) à 30.1 µg/g (LOD non précisée) [48,49]. Ces différences peuvent être liées à la grande diversité des échantillons collectés et à leur provenance, les différents pays n'ayant pas adopté la même politique de remplacement du BPA. En effet, en Allemagne, la fréquence de détection du BPS indique une faible utilisation du BPS, car le BPA a été principalement remplacé par le Pergafast® 201 ou PF201 dans les papiers [50]. À l'inverse, le BPS est largement retrouvé dans les tickets de caisse utilisés aux États-Unis et en Asie, car c'est le principal substitut du BPA [51]. Tous pays confondus, les concentrations en BPS retrouvées dans les papiers thermiques sont du même ordre de grandeur que celles en BPA avec une fréquence de détection moyenne du BPS (54 %) toutefois moins élevée que celle du BPA (93 %) [49].

Tableau 2 : Concentrations en BPS dans les papiers.

Type/catégorie d'aliment	Pays	n	Concentration médiane [étendue] (µg/g)	FD (%)	LOD/LOQ de la méthode (µg/g)	Référence
Tickets de caisse	Brésil	190	11.9 [11.0-22.0]	6.3	0.030	[52]
	USA Minnesota	19	11.0 [8.50-18.0]	47	100	[49]
	USA Missouri	50	23.2 [15.2-30.1]	52	ND	[53]
	USA Caroline du Nord	77	14.0 [0.030-26.2]	52	20	[54]
	USA New York	81	7.40 [0.0000138-22.0]	100	0.000 010	[51]
	USA 3 états	10	0.400 [0.00300-12.0]	100	0.000 010	[51]
	Japon	6	5.50 [0.000500-6.10]	100	0.000 010	[51]
	Corée du Sud	11	0.000800 [0.00009-0.0100]	100	0.000 010	[51]
	Vietnam	3	0.000300 [0.000100-0.000600]	100	0.000 010	[51]
	Suisse	124	10.0 [8.30-12.6]	3.2	2000	[39]
	Danemark	13	6.20 [0.00800-8.10]	62	7.0	[55]
	Estonie	60	0.00300 [0.000100-6.00]	85	1.0	[49]
	Finlande	10	0.0100 [0.000900-0.200]	40	0.1	[56]
	France	50	8.10 [5.10-10.1]	24	1.0	[29]
	Italie	50	0.0300 [0.0100-3.60]	56	0.040	[57]
	Pays-Bas	6	13.3 [13.1-13.4]	33	50	[58]
	Allemagne	311	0.0136 [ND]	9	3	[50]
Papier de copie non-carbone	Danemark	3	<LOD	0.0		[55]
Papier imprimé recyclé	Danemark	1	<LOD	0.0		[55]
Papier imprimé vierge	Danemark	1	<LOD	0.0		[55]
Reçus d'addition	États-Unis	52	0.0301 [<LOQ-4.04]	94	0.000 1	[51]
Flyers	États-Unis	30	0.0109 [<LOQ-5.41]	80	0.000 1	[51]
Magasine	États-Unis	5	0.000100 [<LOQ-0.0045]	40	0.000 1	[51]
Tickets	États-Unis	4	5.27 [0.183-5.93]	100	0.000 1	[51]
Enveloppes	États-Unis	5	0.870 [0.476-8.08]	100	0.000 1	[51]
Journaux	États-Unis	8	0.000100 [<LOQ-0.840]	25	0.000 1	[51]

Tableau 2 : Concentrations en BPS dans les papiers (suite).

Type/catégorie d'aliment	Pays	n	Concentration médiane [étendue] (µg/g)	FD (%)	LOD/LOQ de la méthode (µg/g)	Référence
Emballages alimentaires papier	États-Unis	12	0.000100 [<LOQ-0.0117]	8.3	0.000 1	[51]
Emballages alimentaires cartons	États-Unis	7	0.0922 [<LOQ-0.143]	57	0.000 1	[51]
Billet d'avion	États-Unis	4	2.76 [1.51-8.38]	100	0.000 1	[51]
Étiquette de bagage d'avion	États-Unis	4	3.84 [2.19-5.58]	100	0.000 1	[51]
Papier d'impression	États-Unis	3	<LOQ	0.0	0.000 1	[51]
Cartes de visite	États-Unis	6	0.000100 [<LOQ-0.0730]	33	0.000 1	[51]
Serviettes	États-Unis	8	0.000100 [<LOQ-1.53]	25	0.000 1	[51]
Serviettes en papier	États-Unis	3	<LOQ	0.0	0.000 1	[51]
Papier toilette	États-Unis	6	0.000100 [<LOQ-0.000900]	17	0.0001	[51]

n = nombre d'échantillons analysés, FD = Fréquence de détection, ND non déterminé

LOD = Limite de détection, LOQ = Limite de quantification

2. L'alimentation

La présence du BPS dans les denrées alimentaires a été étudiée sur des échantillons collectés aux États-Unis et en Chine par des méthodes d'analyses affichant la même limite de quantification (LOQ) (0.01 ng/g) [59,60]. Ces deux études montrent que les concentrations moyennes de BPS les plus élevées (0.610 ng/g aux États-Unis et 2.16 ng/g en Chine) sont retrouvées dans les viandes et produits à base de viande. Le BPS était le plus fréquemment détecté dans les viandes aux États-Unis (43 %) et dans les poissons et fruits de mer en Chine (72 %). La concentration moyenne de BPS retrouvée dans toutes les catégories d'aliments confondues était environ deux fois plus élevée en Chine comparativement aux États-Unis alors que les fréquences de détection globales étaient équivalentes (Figure 4).

Dans les aliments de manière générale, les concentrations en BPS (0.130 ng/g aux États-Unis et 0.287 ng/g en Chine) sont nettement inférieures à celles de BPA (3.00 ng/g aux États-Unis et 4.94 ng/g en Chine) [59,60].

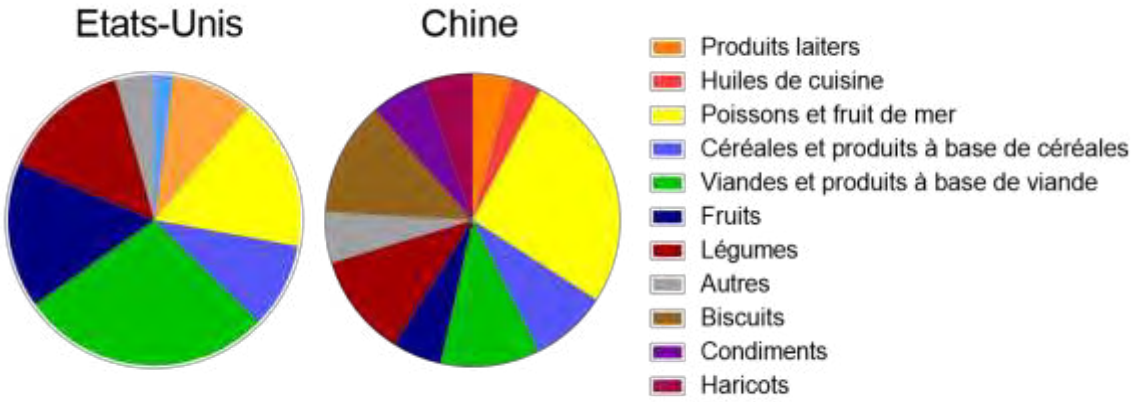


Figure 4 : Répartition des denrées alimentaires aux États-Unis (à gauche) et en Chine (à droite) en fonction de leur fréquence de détection du BPS [59,60].

La consommation journalière de BPS par voie alimentaire a été estimée selon l'équation suivante :

$$Consommation\ journalière\ estimée = \Sigma Concentration_{BPS} \times quantité\ de\ nourriture\ ingérée$$

La consommation journalière de BPS pour un adulte, calculée à partir des échantillons d'aliments collectés aux États-Unis a été estimée à 1.31 ng/kg/jour et est bien inférieure à celle de Chine (9.55 ng/kg/jour) [59,60].

Les concentrations de BPS retrouvées dans les aliments et boissons conditionnés en boîtes de conserve et en cannettes vont de quelques dixièmes à quelques dizaines de ng/g [32,61,62] et restent inférieures à la LMS de 50 ng/g. En revanche, les concentrations retrouvées dans le surnageant sont systématiquement supérieures aux concentrations dans les aliments. La même observation a été faite pour le BPA qui présente globalement des concentrations plus élevées dans les aliments et dans le surnageant que le BPS [32]. Cette différence s'explique probablement par le fait que l'étude a été réalisée en 2009, soit avant les restrictions de l'utilisation du BPA.

Les concentrations en BPS dans les boissons, quel que soit le type de conditionnement (cannette, verre, bouteille plastique), sont peu élevées ou inférieures aux LOD [62–64]. La présence de BPS a toutefois été observée dans du jus de noix de coco conditionné en cannette (0.019 ng/mL) ou en emballage en polyéthylène téréphtalate (0.036 ng/mL) [62]. En revanche, dans les boissons gazeuses conditionnées dans des bouteilles en polycarbonate, les concentrations en BPS atteignaient une dizaine de ng/mL et le BPS était détecté dans 100 % des échantillons testés (n=14) avec des concentrations plus élevées que celles du BPA ou d'autres analogues [65]. Encore une fois, la période de collecte des échantillons est déterminante dans les concentrations retrouvées qui sont en partie liées à la politique de remplacement du BPA adopté dans le pays au moment de la collecte. Cependant, le BPS étant plus hydrophile et ayant un pKa plus faible que celui du BPA, il est également possible qu'il migre plus efficacement que le BPA vers les boissons gazeuses, plutôt acides.

À l'heure actuelle, peu de données de migration du BPS vers le lait sont disponibles. La quantité de BPS retrouvée dans du lait chauffé dans des biberons en polypropylène, en polyéthersulfone, en polyamide et en polyéthylène téréphtalate a été évaluée, après chauffage dans des conditions d'utilisation domestique (micro-onde ou chauffe-biberon électrique) à 40 et 80 °C. Le BPS n'a pas été détecté dans les échantillons de lait analysés, mais le BPA a été détecté dans deux biberons en polyéthersulfone sur 3 aux concentrations de 13.8 et 23.2 ng/mL. En revanche, les performances analytiques de la méthode LC-UV pour détecter le BPS étaient insuffisantes comparées à celles pour détecter le BPA (LOQ = 260 ng/mL pour le BPS *versus* LOQ = 12.51 ng/mL pour le BPA) pour rechercher des concentrations résiduelles en BPS et ne permettent donc pas de comparer la migration du BPA et du BPS [66]. Une étude de migration similaire réalisée sur 30 biberons en polyéthersulfone, avec un lait de synthèse

contenant 50 % d'éthanol) et une LOD à 0.1 µg/kg, n'avait pas non plus permis de détecter du BPS dans le contenant. Cette seconde étude incluait également des tests de migration du BPA depuis des biberons en polycarbonate et a montré que 8 de ces biberons sur 40 permettaient la migration du BPA dans le lait à des niveaux de concentration proches de la LOD (0.1 µg/kg) [67]. La différence de migration du BPA et du BPS pourrait être liée à une différence de stabilité des polymères. Le BPS est plus hydrophile que le BPA, il est donc cohérent que ce dernier migre plus facilement vers une matrice lipophile, telle que le lait, que son analogue le BPS.

En définitive, la politique de remplacement du BPA au moment de la collecte des échantillons est déterminante dans les concentrations retrouvées par la suite. De plus, même si le BPA et le BPS sont des analogues structuraux, les différences de propriétés physico-chimiques et de stabilité à la chaleur expliquent probablement les différences de migration observées entre le BPS et le BPA et donc de contamination des aliments.

3. L'environnement

Les concentrations de BPS dans les poussières intérieures ont été rapportées dans différents pays et s'élevaient en moyenne à 220 ng/g [68] et 340 ng/g [69]. Ces deux études ne révèlent pas de grands écarts de concentrations d'un pays à l'autre, mais de grandes variations (de 0.83 à 26 600 ng/g) en fonction du type d'environnement testé (laboratoire, voiture, bureau, etc) [68,69]. Les fréquences de détection du BPS comme du BPA s'élèvent à 100 %, mais les concentrations moyennes en BPA sont plus élevées, 1000 ng/g [68] et 1330 ng/g [69].

L'analyse d'échantillons d'air intérieur prélevés dans divers lieux tels que les ateliers de garagiste et de barbier, les voitures, les espaces publics et les maisons a montré la présence de BPS à une concentration moyenne de 0.16 ng/m^3 (*versus* 0.79 ng/m^3 pour le BPA) avec une fréquence de détection moyenne de 15.7 % qui est, contrairement aux poussières intérieures, moins élevée que celle du BPA (86.8 %). Là encore des différences en fonction des environnements ont été constatées [70].

Les valeurs d'apport journalier en BPS par l'ingestion des poussières ont pu être estimées à partir de l'équation suivante :

$$Apport\ journalier\ estimé = \frac{Concentration_{BPS} \times (quantité\ d'air\ inhalé \times fraction\ de\ temps\ passé\ en\ intérieur)/\ jour}{Poids}$$

L'apport journalier par ingestion de poussières, estimé à partir des échantillons prélevés en Chine (0.59 ng/kg/jour) est inférieur à celui estimé aux États-Unis (2.2 ng/kg/jour) [69].

4. Les produits d'hygiène corporelle et les vêtements

Des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle ont fait l'objet d'une étude démontrant la présence de BPS dans 11 % des échantillons à une concentration moyenne de 0.415 ng/g, c'est-à-dire proche de la LOQ (0.5 ng/g) de la méthode analytique. Les concentrations en BPS sont équivalentes à celles en BPA, mais le BPS est moins fréquemment détecté que le BPA (pour des LOQ identiques) [71]. Par ailleurs, aux États-Unis, le BPS a été quantifié, avec une teneur moyenne de 15 ng/g et une fréquence de détection de 53 %, dans des textiles pour enfants, de différentes matières, couleur et provenance. Cette étude montre également que le BPA est plus fréquemment détecté et en plus forte concentration que le BPS dans les vêtements (pour des LOQ identiques) [72].

5. Conclusion

En conclusion, les données disponibles actuellement montrent qu'il existe de nombreuses sources d'exposition humaine au BPS dont l'importance relative varie en fonction des pays et que les concentrations de BPS mesurées sont inférieures à celles de BPA. Les voies majeures d'exposition sont l'alimentation et la voie cutanée (notamment par la manipulation des papiers), ce qui est cohérent avec le remplacement du BPA par le BPS, plus particulièrement dans les papiers thermiques et les emballages alimentaires.

B. Exposition interne humaine

Dans l'organisme, le BPS est majoritairement métabolisé en BPSG qui est éliminé dans les urines [73,74]. Par conséquent, la majorité des études de biosurveillance ont évalué la dose interne humaine de BPS, à partir des quantités de BPS total retrouvées dans les urines.

Le Tableau 3 synthétise les données de concentrations urinaires en BPS actuellement disponibles. Les concentrations en BPS dans les urines sont de l'ordre de quelques dixièmes à

quelques dizaines de ng/mL. Une seule étude a été conduite en France, elle n'a pas permis de détecter de BPS dans les urines de 8 femmes enceintes [75].

Une augmentation de la fréquence de détection et de la moyenne des concentrations en BPS dans les échantillons urinaires a été constatée aux États-Unis entre 2000 et 2014 [76] (Figure 5). Entre 2010 et 2014, une diminution des concentrations urinaires en BPA et de sa fréquence de détection (seulement en 2014) ont été constatées. Ces résultats témoignent de la substitution progressive du BPA à partir du début des années 2000. En 2014, les concentrations urinaires en BPA et en BPS ainsi que leur fréquence de détection étaient équivalentes et légèrement plus faibles que les concentrations et fréquences de détection du BPF, un analogue structural du BPA, utilisé également comme substitut du BPA [76].

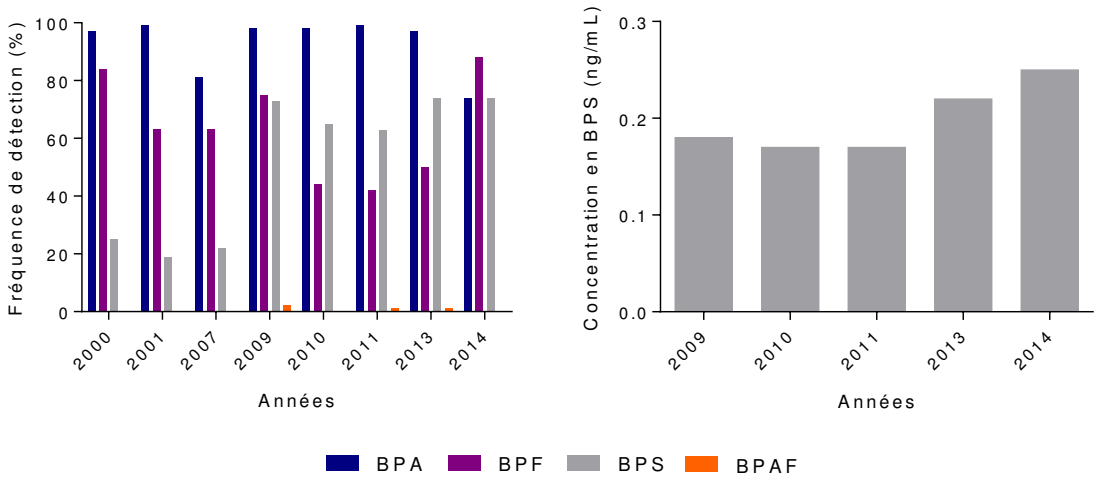


Figure 5 : Fréquence de détection du BPA, BPF, BPS et BPAF dans 42 urines de la population générale et concentrations moyennes urinaires en BPS entre 2000 et 2014, d'après [76].

Le Tableau 4 synthétise les concentrations en BPS rapportées dans le plasma, le sérum et les globules rouges chez l'Homme. Quatre études sur six ont détecté du BPS dans le sérum et/ou le plasma. Deux études ont retrouvé du BPS dans des échantillons plasmatiques collectés dans la population générale à des concentrations de l'ordre du dixième de ng/mL [77,78], soit du même ordre que les concentrations plasmatiques de BPA ou dix fois inférieures à certaines des valeurs élevées rapportées dans les études de biosurveillance [79].

Même si les données de biosurveillance sur les urines et les plasmas sont relativement disparates et insuffisantes, différents facteurs, comme le pays, l'année de réalisation de l'étude, les catégories de populations en fonction de l'âge (enfants) ou les populations sensibles (femmes enceintes, exposition professionnelle) ont été étudiés. Toutefois, compte

tenu des fortes variations interindividuelles, il est difficile de mettre en évidence des différences d'exposition interne entre ces sous-groupes.

La comparaison des concentrations urinaires ou plasmatiques de BPS de populations exposées dans le cadre du travail à celles de la population générale n'a pas permis de montrer de surexposition chez cette sous-population [54,80]. Alors que l'étude de Thayer et coll. a montré une augmentation de l'exposition interne au BPA significative à la fin de la période de travail chez les caissières qui manipulent les tickets de caisse contenant du BPA comparativement aux non-caissières, ce qui n'a pas été mis en évidence pour le BPS [54]. Ce résultat suggère que l'absorption du BPS après une exposition par voie cutanée serait plus faible que celle du BPA.

Les concentrations urinaires de BPS d'enfants âgés de 2 à 14 ans sont similaires à celle de la population générale, mais est nettement inférieures à l'exposition au BPA [81–83].

L'exposition des femmes enceintes n'est pas différente de celle de la population générale [84–86]. Sur 11 couples mères-nouveau-nés, le BPS a été détecté dans 11 échantillons et plus particulièrement dans 2 paires d'échantillons mère-fœtus. Pour ces deux couples mère-fœtus, la concentration en BPS dans le sérum de cordon (0.08 et 0.04 ng/mL) était équivalente à la concentration de BPS mesurée dans le sérum maternel correspondant (0.07 et 0.03 ng/mL). Bien que les fréquences de détection du BPS dans le sérum maternel et de cordon soient faibles, cette étude est la première à démontrer l'exposition du fœtus humain au BPS [14]. Une autre étude a rapporté la présence de BPS dans 83 % d'échantillons urinaires de femmes enceintes, alors que le BPS n'a pas été détecté dans le sang de cordon prélevé [84], probablement en raison d'une LOD trop élevée, environ 10 fois plus élevée que les niveaux de concentration en BPS retrouvés dans le sang de cordon de l'étude de Liu et coll. [14]. Les concentrations plasmatiques de BPS chez la mère et le fœtus semblent être comparables à celles de BPA ou 10 à 100 fois inférieures à certaines valeurs élevées de concentration de BPA, de l'ordre du ng/mL [14,79,84–86].

Le BPS a été très faiblement détecté dans le lait maternel dans une étude française (un échantillon sur 30 avec une concentration de 0.23 ng/g) [87] et une étude chinoise (un seul échantillon (0.683 ng/mL) sur 20) [88]. Même si le nombre d'échantillons est relativement faible, ces données suggèrent que le BPS, moins lipophile que le BPA, est peu excrété dans le lait. Toutefois, pour conclure sur le passage du BPS dans le lait, il serait indispensable de

vérifier que ces femmes en phase d'allaitement étaient bien exposées au BPS. En comparaison, le BPA a été détecté dans le lait maternel à des concentrations de l'ordre du ng/mL, similaires aux concentrations plasmatiques, ce qui est cohérent avec la différence de lipophilicité entre les deux bisphénols [79].

En conclusion, les données sur l'exposition humaine au BPS sont disparates et insuffisantes et ne permettent pas d'évaluer les facteurs (âge, état physiologique, populations sensibles, etc.) qui pourraient prédisposer à l'exposition au BPS. Quoi qu'il en soit, le BPS est retrouvé dans les urines, le plasma/sérum et le lait maternel à des concentrations qui restent inférieures à celles du BPA, quelle que soit la catégorie de population. L'augmentation de la concentration et de la fréquence de détection du BPS dans les urines, constatée entre 2000 et 2014, est la preuve de l'utilisation croissante du BPS en remplacement du BPA.

En considérant une concentration urinaire moyenne de BPS de 0.336 ng/mL, la dose interne de BPS a pu être estimée à 504 ng/jour, ce qui est assez proche de la dose interne calculée à partir des expositions agrégées par Wu et coll. (383 ng/jour en moyenne) en considérant de manière maximaliste que 100 % de la dose est absorbée [19]. Ce résultat suggère une forte absorption du BPS par voie orale.

Tableau 3 : Concentrations en BPS dans les urines humaines.

Pays	Nombre d'échantillons	Population	Concentration moyenne [étendue] (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Fréquence de détection (%)	Référence
ND	20	Population générale	Non détecté	0.1	0.3	0	[89]
ND	20	Population générale	Non détecté	0.1	0.4	0	[90]
Brésil	50	Population générale	<LOQ	0.01	0.04	10	[91]
États-Unis et Asie	315	Population générale	0.168 [<LOQ-21]	0.01	0.02	81	[92]
États-Unis	100	Population générale	ND* [<LOD -12.3]	0.03	ND	78	[93]
Chine	94	Population générale	0.029 [<LOD-2.511]	0.01	0.032	40	[94]
Arabie Saoudite	130	Population générale	13.3 [0.077-630]***	0.035	0.105	100	[95]
États-Unis	42	Population générale	0.25 [ND]	0.1	ND	74	[76]
États-Unis	32	Caissières avant la prise du service	0.23 [<LOD - 3.99]	0.01	0.02	ND	[54]
	32	Caissières après la prise du service	0.54 [0.53-9.50]				
Chine	21	Population générale	0.41 [<LOD-11.04]	ND	0.12	97	[80]
	116	Population vivant proche d'une station de traitement de déchets plastiques	0.361 [<LOQ-1.38]				
	22	Population rurale	0.388 [0.192-1.07]			100	
	20	Population urbaine	0.652 [0.113-1.57]			100	
Brésil	50	Enfant (6-14 ans)	0.54 [<LOQ-2 .27]	0.02	0.07	14	[81]
Inde	76	Enfant (2-14 ans)	0.04 [0.01-12.2]	0.01	0.02	70	[82]
Chine	283	Enfant (3-11 ans)	0.06 [<LOQ-0.96]	ND	0.02	89	[83]
Australie	30	Femmes enceintes	ND [0.22-8.1]	0.067	0.1	10	[96]
États-Unis	30	Femmes enceintes	0.847 [0.004-8.883]	1.41	ND	60	[84]

Tableau 3 : Concentrations en BPS dans les urines humaines (suite).

Pays	Nombre d'échantillons	Population	Concentration moyenne [étendue] (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Fréquence de détection (%)	Référence
France	8	Femmes enceintes	ND	0.1	ND	92	[75]
États-Unis	439	Femmes enceintes	<LOD	0.1	ND	0	[97]
Pays-Bas	1396	Femmes enceintes	0.36 [0.17-1.08]**	ND	ND	67.8	[85]
Chine	985	Femmes enceintes	0.16 [ND]	0.02	ND	93.7	[86]
États-Unis	476	Femmes enceintes	ND	0.4	ND	26.7	[98]

*ND = Non disponible, **Médiane [étendue interquartile], *** La concentration urinaire moyenne particulièrement élevée dans cette étude pourrait être liée à la contamination d'un échantillon dans lequel la concentration urinaire de BPS atteint 630 ng/mL

Tableau 4 : Concentrations en BPS dans le sérum, le plasma, les globules rouges et le lait maternel humains.

Matrice	Pays	Nombre d'échantillons	Population	Concentration moyenne [étendue] (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ	Fréquence de détection (%)	Référence
Sérum	Chine	240	Population générale	0.22 [<LOQ-169]	ND*	0.04	98	[78]
Plasma	République tchèque	58	Population générale	<LOQ	ND	0.055	0	[99]
Plasma	Chine	81	Population générale	0.15 [<LOD-0.62]	0.017	ND	56	[77]
Globule rouge				0.035 [<LOD-0.624]	0.015		76	
Sérum	États-Unis	32	Caissière avant la prise du service	<LOQ	0.002	0.01	16	[54]
		32	Caissière après la prise du service	<LOQ			41	
Sérum	Chine	61	Femmes enceintes	ND	0.03	ND	7	[14]
Sérum de cordon	Chine	61	Nouveau-nés	ND	0.03	ND	12	[14]
Sérum de cordon	États-Unis	30	Nouveau-nés	<LOD	0.5	ND	0	[84]
Lait maternel	France	30	Femmes enceintes	ND	0.001**	0.003**	3.33	[87]
Lait maternel	Chine	20	Femmes enceintes	ND	0.003	0.01	5	[88]

*ND = Non disponible, ** en ng/g

V. Données toxicocinétiques du BPS chez l'animal et chez l'Homme

Lorsque ce projet de thèse a commencé, aucune donnée TK *in vivo* du BPS n'était disponible dans la littérature et seul le métabolisme *in vitro* du BPS avait été étudié. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, quelques études TK ont été publiées, sur le poisson-zèbre, chez la souris et chez l'homme.

A. Métabolisme *in vitro*

La contribution de la glucuronoconjugaison et de la sulfoconjugaison au métabolisme du BPS varie en fonction des modèles cellulaires utilisés. Sur les modèles cellulaires de poisson-zèbre, seul le BPSG a été identifié comme métabolite du BPS. En revanche, les lignées d'hépatocytes humains (HepaRG, HepG2, MELN et T47D-Kbluc) métabolisent le BPS en BPSG et en BPS sulfate (BPSS) principalement. La lignée cellulaire HepaRG, qui exprime les enzymes de phase I et II de manière comparable aux hépatocytes humains, a présenté les plus fortes capacités de métabolisation. Elle produit 85 % de BPSG et 10 % de BPSS, ce qui montre que la glucuronoconjugaison est la voie majeure de métabolisation du BPS.

Ces différences de métabolisation en fonction des modèles cellulaires, précédemment observées pour le BPA, s'expliquent par des différences d'expression des enzymes et soulignent les limites de l'interprétation des données de métabolisme à partir de ces modèles *in vitro*.

La glucuronoconjugaison du BPS par les UDP-Glucuronosyltransférases (UGT) a été étudiée *in vitro* pour les sous-familles 1A, 2A et 2B. La glucuronoconjugaison du BPS par les microsomes hépatiques humains atteint quasiment les 100 % alors qu'elle est seulement de 20 % avec des microsomes intestinaux humains [100]. Ces données indiquent une métabolisation du BPS essentiellement hépatique comme pour le BPA. Sur les 17 isoformes recombinantes humaines utilisées dans l'étude, le BPS est majoritairement glucuronoconjugué par l'UGT 1A9 hépatique et l'UGT 2A1 exprimée de manière prépondérante dans l'appareil respiratoire [101]. Alors que pour le BPA, ce sont essentiellement les UGT 2B15 et 2B7 hépatiques, mais également l'UGT 2A1 et l'UGT 1A10 intestinale qui contribuent majoritairement à la métabolisation du BPA [102,103].

B. Données toxicocinétiques du BPS *in vivo*

In vivo, la métabolisation du BPS a été étudiée chez le poisson-zèbre (forme larvaire et adulte) ainsi que chez la souris. Chez le poisson-zèbre, le principal métabolite produit par les larves comme par les adultes est le BPSG suivi du BPSS. Cependant, le taux de métabolisation chez la larve après 72 h d'incubation en présence de BPS, est plus faible que chez l'adulte (34.2 % *versus* 87.9 %) [104].

Le BPS, administré par voie orale à la souris est majoritairement excrété dans les urines sous sa forme glucuronoconjuguée, son excrétion fécale étant inférieure à 10 % de la dose administrée. Dans les 48 h après l'administration, 70 à 80 % de la dose de BPS est retrouvée dans les urines, 50 % sous forme glucuronoconjuguée, 8 à 21 % sous forme sulfoconjuguée et 2 à 9 % sous forme inchangée. De plus, la quantité de BPS total dans les tissus (tube digestif, le foie, les reins et les intestins) 48 h après l'administration représente moins de 1 % du bilan massique [73]. Ces données *in vivo* indiquent que le BPS est quasiment totalement absorbé par voie orale et confirment que le BPS est principalement glucuronoconjugué et éliminé dans les urines.

La première étude TK du BPS par voie orale a été publiée chez l'homme, très récemment en janvier 2018 [105]. Après l'administration orale d'une dose de 8.75 µg de BPS-d4/kg de poids corporel dans un cookie à 7 volontaires sains (4 hommes et 3 femmes), le BPS est largement glucuronoconjugué. En effet, 82 % de la dose de BPS est retrouvée dans les urines, majoritairement sous forme de BPSG (97 %), dans les 48 h après l'ingestion du cookie. Les auteurs ont estimé une clairance plasmatique[2] de 17.9 L/h, en considérant une biodisponibilité[3] de 100 %. Cette valeur de clairance du BPS est environ 5 fois plus faible que celle du BPA également [106,107]. Le temps de demi-vie d'élimination du BPS est de 4.06 h, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que celui du BPA (5.6 h) [108].

Ces données TK confirment bien que le BPS est largement métabolisé en BPSG, et excrété dans les urines. Toutefois, le calcul de la clairance doit être considéré avec prudence, car il est fondé sur l'hypothèse peu probable d'une biodisponibilité du BPS de 100 %. En outre, les performances analytiques ne sont pas optimales pour évaluer la gamme de concentrations

[2] Clairance plasmatique : volume de plasma épuré par unité de temps.
[3] Biodisponibilité : proportion de la dose administrée qui atteint la circulation générale sous forme aglycone.

de BPS et de BPSG observées dans cette étude. Les principales limites de cette l'étude ont été expliquées dans une lettre à l'éditeur que nous avons écrite (Annexe 1).

C. La liaison du BPS aux protéines plasmatiques

Les données sur la liaison du BPS aux protéines plasmatiques sont indispensables pour interpréter correctement les concentrations plasmatiques de BPS, qui correspondent à la somme de la fraction libre et de la fraction liée aux protéines plasmatiques. En effet, il est généralement admis que seule la fraction libre du BPS, c'est-à-dire non liée à des protéines plasmatiques, est active et peut exercer son effet biologique. Ce paramètre est également essentiel pour l'extrapolation *in vitro-in vivo* et interespèce des effets du BPS.

Le BPA est majoritairement lié à l'albumine. La fraction libre en BPA varie selon les espèces (Homme [109], brebis [110], rat [111], macaque Cynomologus [112]) entre 4 et 7 %.

L'interaction du BPS à l'albumine sérique bovine et humaine a été étudiée par spectrométrie de masse et fluorescence [113], par spectroscopie et par modélisation moléculaire [114]. Les liaisons hydrogène, les liaisons hydrophobes et les forces électrostatiques jouent un rôle dans la liaison du BPS à l'albumine [113]. Par ailleurs, des études *in silico* ont montré que le BPS, comme le BPA, est capable de se lier à la transthyrétine, une protéine de transport spécifique des hormones thyroïdiennes, avec une forte affinité (Kd de 52 µM)[115]. Cependant, il n'existe actuellement aucune étude publiée sur le pourcentage de liaison du BPS aux protéines plasmatiques, qu'il s'agisse de la liaison non spécifique à l'albumine ou de la liaison spécifique.

En raison du potentiel perturbateur endocrinien du BPA, plusieurs pays ont progressivement interdit son utilisation et l'ont remplacé dans ses applications industrielles par ses analogues structuraux, dont le BPS. À l'instar du BPA, le BPS présente un potentiel perturbateur endocrinien. Il a des effets délétères sur le développement chez les nématodes et les poissons-zèbres. Une partie de ces effets pourraient être liés à des perturbations de la stéroïdogenèse.

Le BPS est aujourd'hui ubiquitaire dans notre environnement. L'Homme pourrait être exposé au BPS par voie transcutanée, par voie orale et par inhalation. Les données de biosurveillance indiquent une augmentation de l'exposition humaine au BPS ces dernières années. Mais, l'exposition fœtale est actuellement très peu documentée.

Le BPS est majoritairement métabolisé en BPSG et éliminé principalement dans les urines comme le BPA. Cependant, à l'heure actuelle, il existe très peu de données TK du BPS chez l'animal et l'Homme et les processus physiologiques déterminant l'exposition interne humaine au BPS en termes de concentrations plasmatiques n'ont pas été identifiés.

En outre, la gestation constitue une période à risque vis-à-vis de l'exposition aux perturbateurs endocriniens. La suite de ce chapitre bibliographique apporte des éléments de physiologie fœtale nécessaires à la compréhension des déterminants de l'exposition fœtale aux xénobiotiques.

Partie 2 : Mécanismes de l'exposition fœtale

L'exposition du fœtus à un xénobiotique dépend de nombreux facteurs physiologiques (Figure 6) :

- Tout d'abord de l'exposition de sa mère, et donc de la TK maternelle, en particulier de sa clairance et de la liaison aux protéines plasmatiques.
- Du passage placentaire materno-fœtal et fœto-maternel du xénobiotique, qui dépend de la liaison aux protéines plasmatiques, à la fois chez la mère et chez le fœtus.
- De la capacité métabolique du fœtus vis-à-vis du xénobiotique.
- De la recirculation du xénobiotique et/ou de son métabolite entre le fœtus et le liquide amniotique.

Les particularités physiologiques fœto-placentaires sont décrites chez l'Homme ainsi que chez le mouton, modèle animal que nous avons utilisé au cours de cette thèse, car c'est le modèle de référence pour l'étude de la physiologie fœtale [116–119].

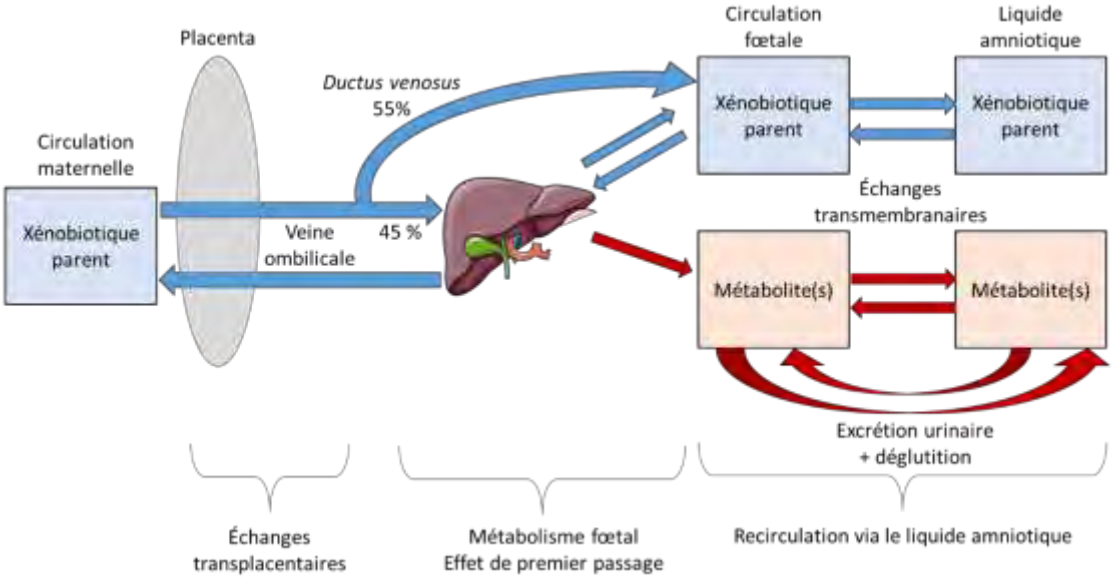


Figure 6 : Représentation schématique des déterminants de l'exposition fœtale aux xénobiotiques.

Chez le fœtus, le placenta capte l'oxygène de la circulation maternelle. Le sang enrichi quitte le placenta par la ou les veines ombilicales et remonte vers le cœur via le ductus venosus qui permet l'apport du sang oxygéné au cœur en court-circuitant la circulation hépatique. Ainsi, environ 55 % du débit placentaire ne passe pas par le foie et rejoint directement le cœur [120,121].

I. Développement des capacités métaboliques chez le fœtus

A. Le métabolisme hépatique fœtal

Comme chez l'adulte, l'organe principalement impliqué dans le métabolisme chez le fœtus est le foie. Il se met en place chez le fœtus humain ou ovin au cours du premier mois de grossesse. Cependant, les capacités métaboliques du foie se développent plus ou moins précocement au cours de la vie fœtale, en fonction des voies de métabolisation considérées.

Les réactions de phase I catalysées par les cytochromes P450 (CYP 450) permettent la fonctionnalisation de la molécule par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. La présence de CYP450 dans le foie fœtal humain et ovin a été mise en évidence sur des microsomes hépatiques fœtaux isolés dès le premier trimestre de gestation [122,123]. L'évolution du niveau d'expression des différentes classes de CYP450 est variable au cours du développement du fœtus, mais le niveau d'expression reste généralement inférieur à celui rapporté chez l'adulte [124].

Les enzymes de phase II catalysent des réactions de conjugaison avec un groupement glucuronide, glutathion, acétyle, sulfate, méthyle ou avec des acides aminés. Ces réactions de conjugaison conduisent à la formation de métabolites plus hydrophiles que le composé parent, qui sont ensuite éliminés par voie urinaire ou biliaire.

L'expression des UGTs, dans le foie fœtal humain, commence dès le premier trimestre chez le fœtus humain, mais augmente surtout à partir de la seconde moitié du deuxième semestre de grossesse. Les niveaux d'expression de la plupart des isoformes des UGTs hépatiques chez le fœtus humain sont inférieurs à ceux observés chez l'adulte [124]. De façon générale, les capacités de sulfoconjugaison sont égales voire supérieures, chez le fœtus humain comparativement à celles de l'adulte et semblent être en place dès le troisième mois de grossesse [125–128].

Ces différences du développement des enzymes du métabolisme indiquent qu'en fonction de l'affinité du substrat considéré pour telle ou telle enzyme ou pour telle ou telle isoforme, le fœtus aura une capacité de métabolisation plus ou moins précoce et plus ou moins importante. En particulier, pour le BPS, les travaux *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et le rongeur adulte, indiquent que les UGTs, sont majoritairement impliqués dans la métabolisation du BPS [73,74], mais aucune donnée n'est disponible pour le fœtus.

Toutefois, il faut considérer que les niveaux relatifs d'expression des UGTs et des sulfotransférases chez le fœtus par rapport à l'adulte ne permettent pas à eux seuls de prédire les clairances de glucuronoconjugaison et de sulfoconjugaison chez le fœtus ainsi que leurs contributions respectives à la détoxification du xénobiotique. En effet, la clairance hépatique dépend également du débit sanguin hépatique et de la fraction du xénobiotique non liée aux protéines plasmatiques, selon l'équation suivante :

$$Cl_H = \frac{Q_H \times f_u \times (B \times Cl_{int})}{Q_H + f_u \times (B \times Cl_{int})}$$

Avec Cl_H la clairance hépatique (en $L.h^{-1}.kg^{-1}$), Q_H le débit sanguin hépatique (en $L.h^{-1}$), f_u la fraction de la molécule non liée aux protéines plasmatiques et Cl_{int} la clairance intrinsèque hépatique (en $L.h^{-1}$ par kg) évaluée *in vitro* et B le ratio entre le poids du foie et le poids corporel.

Or, le débit sanguin hépatique rapporté à son poids, est plus élevé chez le fœtus ovin en fin de gestation que chez l'adulte (75 et 50 mL/kg.min, respectivement) [120,129]. Ainsi, pour le BPA, la capacité de glucuronoconjugaison du fœtus en fin de gestation est similaire à celle de l'adulte.

B. Le métabolisme placentaire

Bien que l'activité métabolique placentaire soit minoritaire par rapport à celle du foie, le placenta présente des capacités de métabolisation de Phase I et de Phase II [130]. Une fraction du composé parent peut ainsi être transférée dans le compartiment fœtal directement sous forme métabolisée, avant même son passage dans le foie fœtal.

Le placenta humain exprime plusieurs enzymes de phase I qui participent au métabolisme des xénobiotiques (CYP 1A1, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7 et 4B1), mais également des CYP 450 impliquées dans la synthèse des stéroïdes endogènes (CYP 11A1, CYP 19)[131]. Cependant, l'expression de ces enzymes varie en fonction du stade de grossesse, mais aussi de l'état de santé de la mère et de son environnement. Les enzymes de phase I sont particulièrement exprimées en début de grossesse, lors des premières étapes du développement et de la croissance du fœtus. Ensuite, leur expression est maintenue en situation physiopathologique (exposition à des drogues, médicaments, polluants environnementaux et contaminants alimentaires), et diminuée en situation physiologique.

Les enzymes de Phase II sont exprimées dans le placenta humain. Les UGTs et les sulfotransférases (SULTs) jouent un rôle important dans la métabolisation placentaire des xénobiotiques et des stéroïdes endogènes. Les UGT 2B sont exprimées au cours du premier trimestre et dans le placenta à terme, mais aucune information n'est disponible sur leur expression entre ces deux périodes. Alors que les UGT 1A n'ont été détectées qu'au cours du premier trimestre, les Glutathions S transférase (GST) sont actives tout au long de la grossesse pour protéger le fœtus, notamment contre le stress oxydant. Mais l'implication des GSTs dans le métabolisme des xénobiotiques est peu documentée. Les SULTs sont exprimées dans le placenta et sont fortement impliquées dans la métabolisation des stéroïdes endogènes. En revanche, peu d'informations concernant leur rôle dans le métabolisme des xénobiotiques ont été décrites dans la littérature [130,131].

II. Transfert placentaire des xénobiotiques

A. Placentation ovine *versus* placentation humaine

Le placenta humain et le placenta ovin ont une structure histologique différente. Chez la brebis, la placentation est dite syndesmochoriale, la circulation fœtale est séparée de la circulation maternelle par plusieurs couches cellulaires, alors que le placenta humain est dit hémochorial, le trophoblaste est en contact direct avec le sang maternel [130]. Cependant, chez les ruminants, il existe une érosion partielle de la muqueuse utérine, diminuant localement le nombre de couches cellulaires séparant les deux circulations. Par ailleurs, au niveau de ces villosités maternelles, on peut observer des lacs sanguins où s'accumule du sang maternel directement en contact avec le trophoblaste au niveau des zones d'érosion de la muqueuse utérine et de l'endothélium vasculaire maternel, ce qui réduit localement la distance qui sépare la circulation maternelle et fœtale. Cette caractéristique histologique permet de rapprocher la placentation ovine syndesmochoriale de la placentation humaine hémochoriale [119,132].

Au cours de la grossesse, la structure du placenta humain évolue. Le cytotrophoblaste, qui forme une couche continue en début de grossesse va progressivement s'affiner. En outre, le développement continu des ramifications villositaires, conduit à une augmentation progressive de la surface d'échange materno-fœtale de 3-4 m² à 28 semaines de grossesse à 12-15 m² à terme. Parallèlement, le débit sanguin utérin s'accroit de 50 mL/min en début de

grossesse à 600 mL/min à terme. Ces modifications physiologiques entraînent une augmentation des échanges entre la mère et le fœtus du début à la fin de la gestation.

Le passage de molécules à travers le placenta peut se faire selon quatre mécanismes : la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif et l'endocytose. Les mécanismes d'endocytose sont lents et sont des processus de transport mineurs par rapport à la diffusion ou au transport actif, ils ne seront donc pas abordés dans cette section [130,133].

B. La diffusion passive et facilitée

La diffusion passive constitue le mécanisme de transfert placentaire de la plupart des molécules. Le transfert d'une molécule est dépendant de son gradient de concentration, des propriétés physico-chimiques du xénobiotique et des propriétés intrinsèques du placenta énoncées ci-dessus (surface d'échange et finesse de la couche cytotrophoblastique). Il ne nécessite pas d'énergie. Ce mécanisme de transport n'est donc pas saturable et il n'existe pas de phénomène de compétition entre les substrats.

Ce mécanisme de transport concerne notamment l'oxygène et des molécules présentant les caractéristiques physico-chimiques suivantes : molécules de petite taille (<500 Da), non liées aux protéines plasmatiques, lipophiles et non ionisées, comme le BPA [130].

La diffusion facilitée nécessite la présence d'un transporteur spécifique, elle est donc saturable, mais ne requiert pas d'énergie. Au niveau placentaire, la diffusion facilitée est complémentaire de la diffusion passive. Elle permet d'augmenter le taux de transfert d'une molécule lorsque la diffusion passive seule ne suffit pas à subvenir aux besoins du fœtus. C'est notamment le cas du transport du glucose qui met en jeu des protéines spécifiques présentes au niveau de l'endothélium fœtal et du syncytiotrophoblaste chez l'homme et le mouton [134].

C. Le transport actif

Le transport actif est médié par des protéines de transport et nécessite de l'énergie, généralement produite par l'hydrolyse de l'ATP ou provenant d'un gradient électrochimique. Ce transport peut donc agir à l'inverse du gradient de concentration. En revanche, c'est un système saturable, avec des compétitions possibles avec d'autres substrats. Les substances

ionisées, relativement hydrosolubles ou de poids moléculaire élevé nécessitent la liaison à ces transporteurs pour franchir la barrière placentaire.

Sur la barrière placentaire, chez l'Homme, plus de 30 protéines transporteurs ont été identifiées et sont exprimées au niveau du syncytiotrophoblaste, de la bordure en brosse (membrane apicale face à la circulation maternelle), de la membrane basolatérale et de l'endothélium vasculaire fœtal (Figure 7) [135]. Ces transporteurs sont peu documentés chez le mouton.

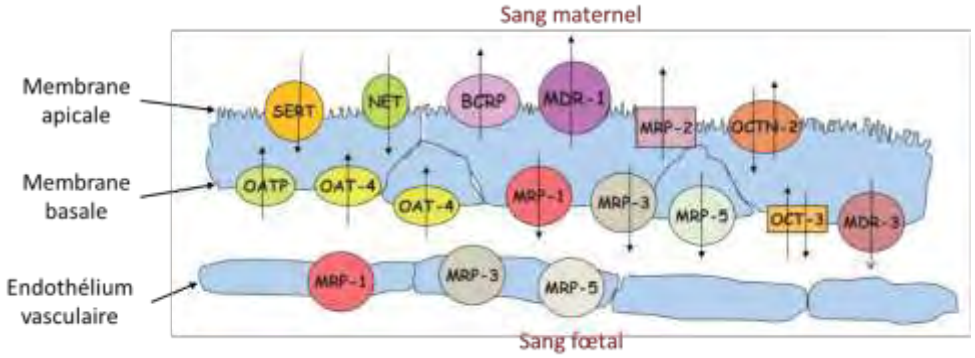


Figure 7 : Localisation des principales protéines de transport exprimées dans le placenta humain d'après [136].

Deux grandes familles de transporteurs ont été mises en évidence sur la barrière placentaire à la fois du côté maternel et du côté fœtal : les transporteurs à ATP Binding Cassette (ABC) et les transporteurs Solute Carrier (SLC) (Figure 7).

Les transporteurs ABC sont des transporteurs d'efflux qui permettent de protéger le fœtus vis-à-vis des xénobiotiques en limitant leur entrée dans le compartiment fœtal. Ces transporteurs permettent également l'élimination des déchets fœtaux vers le compartiment maternel. Ainsi, la majorité des transporteurs d'efflux ABC sont exprimés au niveau de la membrane apicale des syncytiotrophoblastes (Figure 7).

Parmi les transporteurs ABC, les protéines d'efflux les plus importantes sont les P-glycoprotéines (P-gp aussi appelés MDR-1 ou ABCB1), les protéines de la famille Multidrug resistance protein (MRP ou ABCC) et les Breast Cancer Resistant Protein (BCRP ou ABCG). Les P-gp et BCRP sont les transporteurs d'efflux les plus exprimés au niveau de la membrane apicale. Toutefois, leur expression varie en fonction du stade de gestation, celle des P-gp diminue de moitié entre le début et la fin de la gestation, alors que l'expression de la MRP2 augmente au cours de la gestation.

Les P-gp, les MRP-1, MRP-2 et BCRP2 ont un large spectre de substrats, dont certains sont communs. Les P-gp acceptent comme substrat des molécules organiques non chargées, faiblement basiques et d'une taille comprise entre 200 et 1900 Dalton [137].

Les BCRP prennent en charge un spectre large de molécules, des anions organiques, des composés conjugués exogènes et endogènes comme certains sulfoconjugués ou glucuronoconjugués stéroïdiens. Les BCRP facilitent le transfert bidirectionnel des stéroïdes conjugués [138].

Les MRP transportent activement les conjugués d'hormones stéroïdes ou d'autres xénobiotiques, en plus des composés parents. MRP2 est présent sur la membrane apicale des syncytiotrophoblastes, en regard de la circulation maternelle. Les MRP1 et MRP3 sont localisés au niveau de l'endothélium capillaire fœtal et sur la membrane apicale des syncytiotrophoblastes (Figure 7).

Les transporteurs SLC sont représentés par les membres de la famille des OATP (Organic Anion-transporting polypeptide), des OAT (Organic anion transporter) et par des transporteurs de cations organiques (Noradrenaline transporter (NET), serotonin transporter (SERT), organic cation transporter (OCTN) (Figure 7). Les transporteurs de la famille des OAT permettent notamment l'efflux des stéroïdes sulfates produits par le fœtus vers la circulation maternelle [136,139].

III. Échange sang-liquide amniotique

Le liquide amniotique est un liquide entourant le fœtus et contenu dans la cavité amniotique. C'est au départ un transsudat maternel.

En début de gestation, une partie du liquide amniotique est absorbé par la peau fœtale. Lorsque le rein fœtal devient fonctionnel, les urines sont excrétées dans le liquide amniotique et allantoïdien. Elles participent ainsi à la production du liquide amniotique, à raison d'un litre par jour en fin de gestation. À cette période, le fœtus boit des volumes de liquide amniotique de 500 à 700 mL par jour (Figure 8). Ce liquide est ensuite absorbé au niveau du tube digestif. Ce cycle d'excrétion et de réabsorption du liquide amniotique par voie cutanée et intestinale favorise la réentrée de molécules dans la circulation fœtale et pourrait ainsi prolonger l'exposition fœtale aux xénobiotiques.

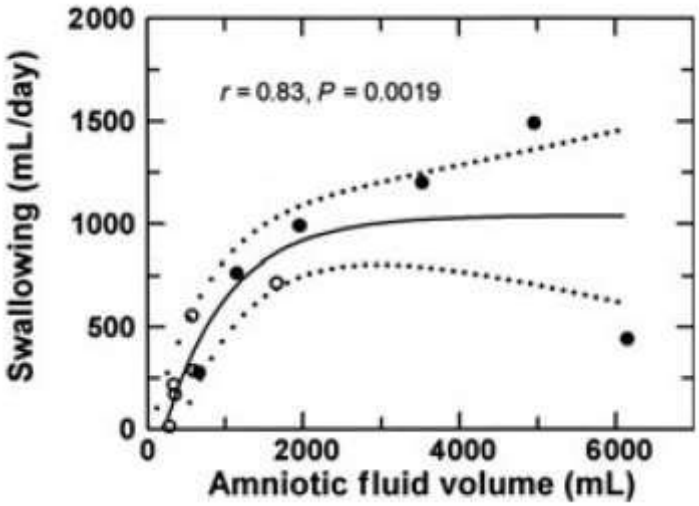


Figure 8 : Volume de liquide amniotique bu par le fœtus ovin chaque jour en fonction du volume de liquide amniotique présent dans le compartiment fœtal, d'après [140].

Il est également important de considérer que le liquide amniotique n'est pas biochimiquement inerte. Il contient des glucuronidases qui peuvent hydrolyser les métabolites de phase II, et participer ainsi à leur réactivation [141].

En dépit des différences de placentation existantes entre l'espèce ovine et humaine, le modèle ovin reste adapté à la réalisation d'études pharmacocinétiques puisqu'il offre la possibilité d'étudier *in vivo* l'ensemble des déterminants de l'exposition fœtale à un xénobiotique et n'est pas limitant en termes de volume de prélèvement.

Dans la partie suivante est décrite la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire.

Partie 3 : La stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire.

La stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire met en jeu des interactions complexes entre les systèmes endocriniens maternels, fœtaux et placentaires. Ce processus dynamique est indispensable au maintien de la gestation, au développement embryonnaire et fœtal et au déclenchement de la parturition [142–144]. Dans un premier temps, nous présenterons les principales voies de la stéroïdogenèse, puis les particularités de la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire. Enfin, compte tenu du fait que le BPS pourrait perturber plus particulièrement la voie de synthèse et de métabolisation de la testostérone, nous détaillerons les étapes de la biosynthèse des androgènes chez le fœtus.

I. Description générale de la stéroïdogenèse

La stéroïdogenèse est définie par l'ensemble des processus par lesquels le cholestérol est converti en hormones stéroïdes biologiquement actives. Elle présente des variations spécifiques en fonction des organes ou du type cellulaire comme c'est le cas dans la surrénale et les gonades. Les hormones stéroïdes sont toutes synthétisées à partir du cholestérol, présentant une structure cyclopentanophénanthrène (Figure 9).

Parmi les hormones stéroïdes, les composés Δ^5 portent une double liaison entre C5 et C6. Par l'action de la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase/isomérase, cette double liaison est déplacée entre C4 et C5. C'est ainsi que sont formés les composés Δ^4, qui représentent la plupart des hormones stéroïdes biologiquement actives (Figure 9).

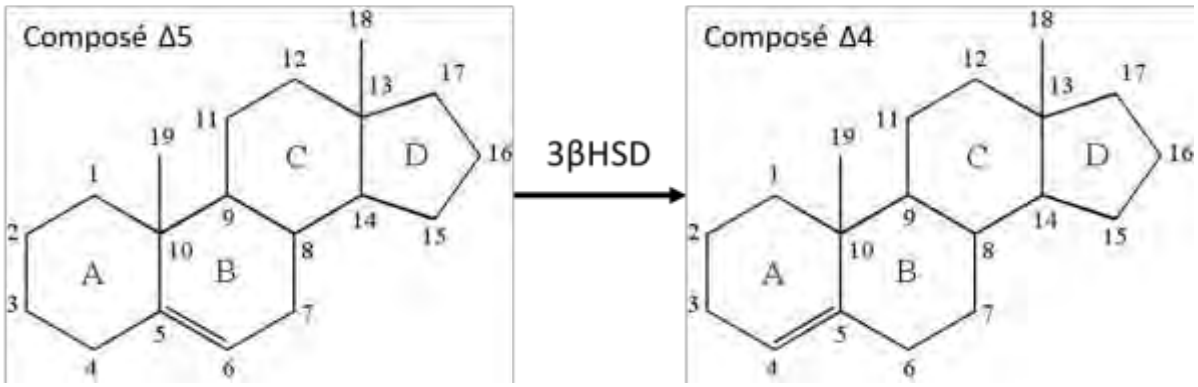


Figure 9 : Structure cyclopentanophénanthrène caractéristique des hormones stéroïdes et transformation des stéroïdes Δ^5 en Δ^4.

Les stéroïdes chez les mammifères sont classés en plusieurs groupes : les progestagènes, les androgènes, les œstrogènes, les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Parmi ces classes, les stéroïdes sexuels sont :

- ❖ Les œstrogènes, qui comptent 18 atomes de carbone. Ils sont produits essentiellement par les ovaires et par l'unité fœto-placentaire pendant la gestation. Ils comprennent l'œstradiol, l'estrone et l'œstriol.
- ❖ Les androgènes qui comportent 19 atomes de carbone et sont produits essentiellement dans les testicules (testostérone) et la corticosurrénale (DHEA et androstènedione). Ils sont les précurseurs des œstrogènes.
- ❖ Les progestagènes qui se composent de 21 atomes de carbone et sont produits par les ovaires et le placenta [145,146].

A. Approvisionnement en cholestérol des cellules stéroïdogéniques

La première étape de la stéroïdogenèse consiste en l'acheminement du cholestérol vers les glandes sécrétrices d'hormones stéroïdiennes. La surrénale humaine peut synthétiser le cholestérol *de novo*, mais la plus grande partie de l'approvisionnement des cellules stéroïdogéniques en cholestérol provient du cholestérol apporté par l'alimentation et transporté par les lipoprotéines de basse densité (LDL). Les enzymes contenant un domaine START (StAR related lipid transfer) participent au passage du cholestérol des gouttelettes lipidiques vers la membrane externe de la mitochondrie.

Le passage du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie est médié par une protéine, la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein). Cette étape constitue la première étape limitante de la stéroïdogenèse, car les cellules stéroïdogéniques stockent de très petites quantités de stéroïdes. En conséquence, une réponse stéroïdogénique nécessite une régulation rapide de la protéine StAR. Dans le placenta, le transport mitochondrial du cholestérol n'est pas médié par la protéine StAR, qui n'y est pas exprimée, mais par la protéine MLN64, qui est structurellement proche de la protéine Star.

B. Les enzymes de la stéroïdogenèse

1. Les CYP450

Les CYP 450 peuvent être de type 1 (dans les mitochondries, il s'agit uniquement de la P450 side chain clivage) ou de type 2 (dans le réticulum endoplasmique). Les CYP P450 catalysent des réactions d'hydroxylation et le clivage des liaisons carbone carbone, qui sont mécanistiquement et physiologiquement irréversibles. C'est la raison pour laquelle les CYP

450 fonctionnent de façon unidirectionnelle, le retour au précurseur n'est pas possible, même lors d'accumulation du produit.

2. Les hydroxystéroïdes déhydrogénases

Les hydroxystéroïdes déhydrogénases (HSD), contrairement aux CYP 450, catalysent des réactions mécanistiquement réversibles. La direction est déterminée par l'abondance en forme réduite et oxydée de cofacteurs et par l'affinité relative de chaque enzyme pour NAD (H) versus NADP(H).

Les 3βHSDs catalysent la conversion des stéroïdes Δ^5 en stéroïdes Δ^4. Elles convertissent ainsi la prégnénolone en progestérone, qui est le premier stéroïde important dans la voie de la stéroïdogenèse d'un point de vue biologique. Les 3βHSDs assurent également la conversion de la 17α-hydroxyprégnénolone en 17α-hydroxyprogestérone, de la DHEA en androstènedione et de l'androstènediol en testostérone, avec la même efficacité quelle que soit la réaction.

À l'inverse, les 3αHSDs, aussi appelées aldo-céto réductases (AKR), catalysent des réactions de réduction. Elles sont retrouvées notamment dans le cerveau pour la réduction de la 5α-dihydroprogestérone en allopregnanolone ou encore dans le foie, les reins et les gonades.

Les 17β-HSDs, qui comptent 12 isoformes, catalysent un ensemble de réactions bidirectionnelles d'oxydation et de réduction. Leur rôle est de convertir des stéroïdes en position 17 afin de moduler l'activité biologique des œstrogènes et des androgènes [147]. Elles prennent en charge, par exemple, l'interconversion androstènedione/testostérone et œstrone/œstradiol.

3. Les sulfatases

Les stéroïdes sulfoconjugué peuvent être synthétisés directement à partir du cholestérol sulfate, ou bien par sulfoconjugaison des stéroïdes par des SULTs cytosoliques qui possèdent 44 isoformes différentes. La SULT1E1 sulfoconjugue les œstrogènes. La SULT2A1 est la principale enzyme exprimée dans la surrénale, elle sulfoconjugue le groupement 3β-hydroxyl des stéroïdes $\Delta^{5,}$ mais pas du cholestérol. La SULT2B1a sulfoconjugue également la prégnénolone alors que le cholestérol est sulfoconjugué par la SULT2B1b. Même si le rôle des

stéroïdes sulfoconjugués n'est pas complètement élucidé, la sulfoconjugaison entraine une inactivation des stéroïdes, régulant ainsi l'exposition de l'organisme aux stéroïdes actifs [145].

C. Les voies de biosynthèse des stéroïdes

La Figure 10 décrit de façon schématique les voies de la stéroïdogenèse.

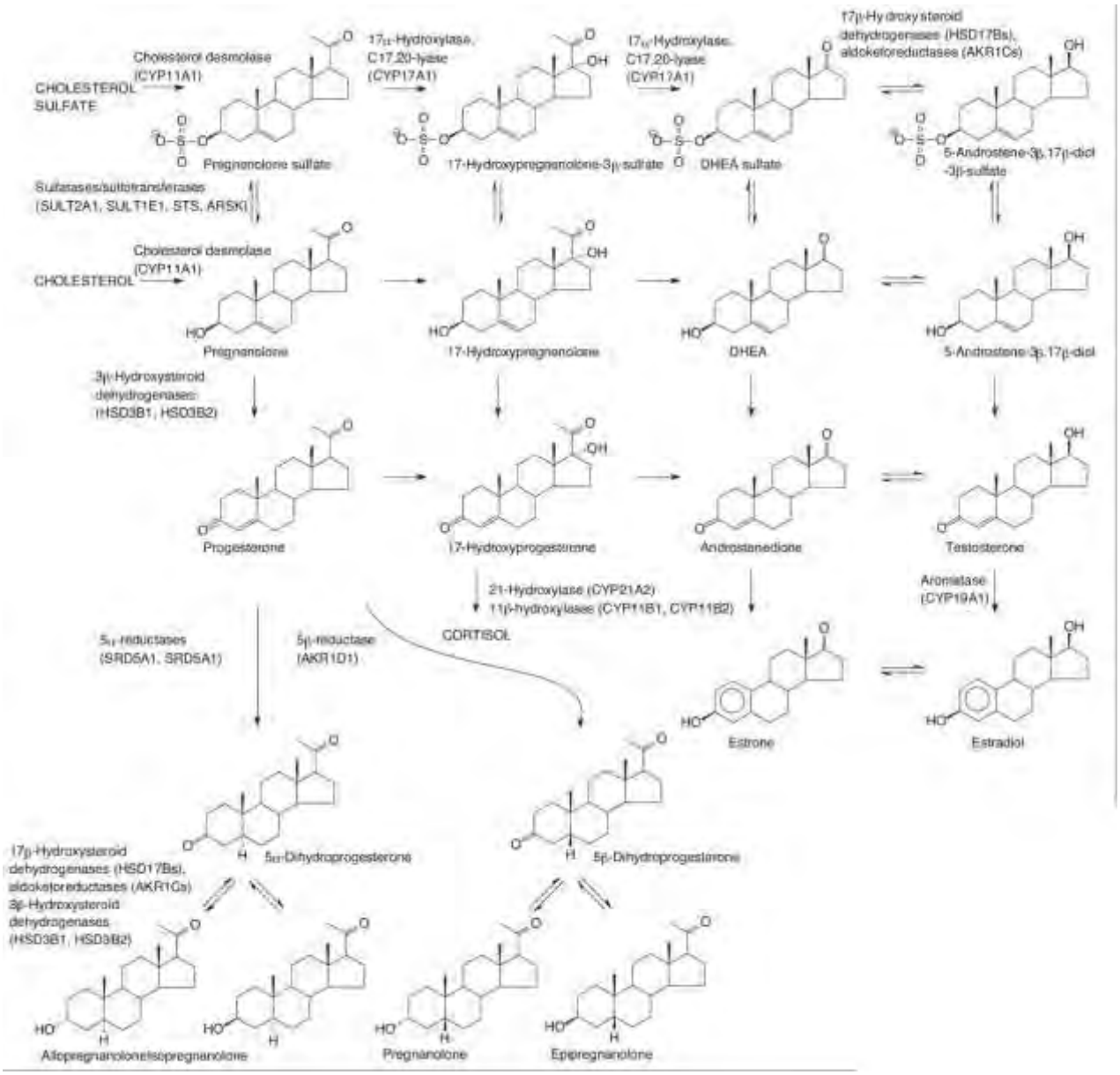


Figure 10 : Schéma des voies de la stéroïdogenèse

1. Du cholestérol à la prégnénolone

La première étape de la stéroïdogenèse se situe dans la mitochondrie, c'est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par la P450scc (scc = side chain cleavage) aussi connue sous le nom de CYP 11A1. Cette enzyme catalyse la conversion du cholestérol en

prégnénolone, étape limitante de la stéroïdogenèse, et soumise à de multiples mécanismes de régulation.

2. Voie de synthèse de la progestérone

La prégnénolone est transformée en progestérone par la déshydrogénation du groupement 3β-hydroxy et l'isomérisation de la double liaison du cycle B (stéroïdes $\Delta 5$) vers le cycle A (stéroïdes $\Delta 4$). Cette étape est catalysée par la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD).

3. Voie de synthèse des androgènes

La biosynthèse des androgènes est assurée par un complexe enzymatique, la CYP 17A1 qui catalyse à la fois l'activité 17α-hydroxylase et 17.20 – lyase. Cette enzyme est principalement exprimée dans la surrénale et les gonades. Elle assure la 17α-hydroxylation de la prégnénolone et de la progestérone pour donner la 17α-hydroxyprégnénolone et la 17α-hydroxyprogestérone. La 17-20 lyase entraîne la coupure de la chaine latérale de la 17α-hydroxyprégnénolone entre C17 et C20 et l'oxydation de la fonction OH en C17 pour donner une cétone, la DHEA. La DHEA est oxydée et isomérisée en C4-5 pour donner de l'androstènedione.

La 17β-HSD5 catalyse également la réduction de l'androstadione et de l'androstérone respectivement en dihydrotestostérone (DHT) et testostérone dans les tissus stéroïdogènes ou les tissus cibles des androgènes. Lors de la différenciation sexuelle, c'est dans la surrénale fœtale que cette enzyme est la plus abondamment exprimée et participe donc probablement à la production de testostérone. Bien qu'elle soit toujours présente après la naissance, son expression est réduite, tout comme la production de testostérone [145,146].

L'activité 17,20 – lyase est 50 fois plus efficace pour la conversion de la 17α-hydroxyprégnénolone en DHEA que pour la conversion de la 17α-hydroxyprogestérone en androstènedione, ce qui explique la grande quantité de DHEA sécrétée par la surrénale chez l'adulte et le fœtus. L'androstènedione est convertie en testostérone par l'action de la 17β-HSD. La testostérone est transformée en DHT dans les organes cibles de la testostérone par la 5α-réductase de type 2 (SDR5A2).

4. Voie de synthèse des corticostéroïdes et des minéralocorticostéroïdes

La 17α-hydroxyprogestérone formée à partir de la progestérone par hydroxylation en C17, ou à partir de la 17α-hydroxyprégnènolone, est le précurseur du cortisol. La CYP21A2 microsomale catalyse l'hydroxylation en position 21 des stéroïdes Δ^4. Ainsi, la progestérone est convertie en 11-déoxycorticostérone et la 17α-hydroxyprogestérone en 11-déoxycortisol. La dernière enzyme nécessaire à la biosynthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes est la CYP11B qui, chez les ovins, permet la production de cortisol à partir de la 11-déoxycortisol, mais également d'aldostérone à partir de 11-déoxycorticostérone. En revanche, chez l'homme, ces deux réactions sont catalysées par deux enzymes différentes : la 11 β-hydroxylase et l'aldostérone synthase [145,146].

5. Voie de synthèse des œstrogènes

L'aromatisation des androgènes en œstrogènes est assurée par l'aromatase (aussi appelée P450aro et CYP19A1). Cette enzyme est exprimée dans les tissus stéroïdogéniques tels que l'ovaire, le placenta et le cerveau, mais aussi dans des tissus non stéroïdogéniques tels que la graisse et l'os [145].

II. Stéroïdogenèse et interrelations materno-fœto-placentaires

L'équilibre stéroïdien au cours de la gestation joue un rôle important dans la programmation fœtale. Il est déterminé par des interrelations materno-fœto-placentaires complexes [142–144] (Figure 11).

La première étape de la stéroïdogenèse correspond à l'approvisionnement en cholestérol. Même si le foie fœtal peut synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate, le cholestérol maternel constitue le contributeur majeur de la stéroïdogenèse fœto-placentaire. Le placenta produit la prégnénolone et la progestérone à partir du cholestérol maternel. Ces deux précurseurs sont sécrétés dans la circulation maternelle et fœtale. Dans la circulation maternelle, la progestérone est transformée en prégnandiol, qui est excrétée dans les urines. Une grande quantité de progestérone est sécrétée dans la circulation fœtale.

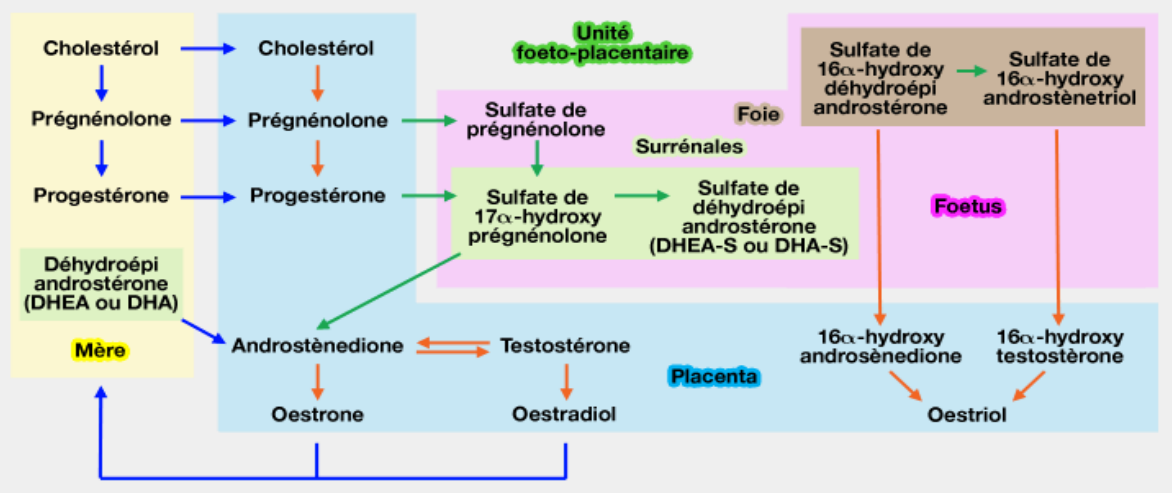


Figure 11 : Schéma général de la stéroïdogenèse au sein de l'unité materno-fœto-placentaire.

La surrénale fœtale (développée chez le fœtus humain à partir de la 4e semaine de gestation) est dépourvue d'activité 3β-HSD. Elle ne peut donc synthétiser la 17α-hydroxyprogestérone, précurseur du cortisol, qu'à partir de la progestérone d'origine placentaire. En revanche, la surrénale fœtale possède une forte activité sulfotransférase et sécrète principalement des sulfates de stéroïdes, notamment le sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA-S) à partir de la prégnénolone d'origine placentaire.

Le placenta est dépourvu de CYP17A1. Il utilise le DHEA-S d'origine maternelle et fœtale pour assurer sa production d'œstrogènes. Le DHEA-S subit une 16 – α hydroxylation dans le foie fœtal. Le produit de la réaction est le 16 – α hydroxy-DHEA-S, précurseur de l'œstriol sécrété par le placenta et de l'œstriol sulfate. Ce stéroïde constitue un excellent marqueur de la viabilité fœtale (Figure 12) [145,148].

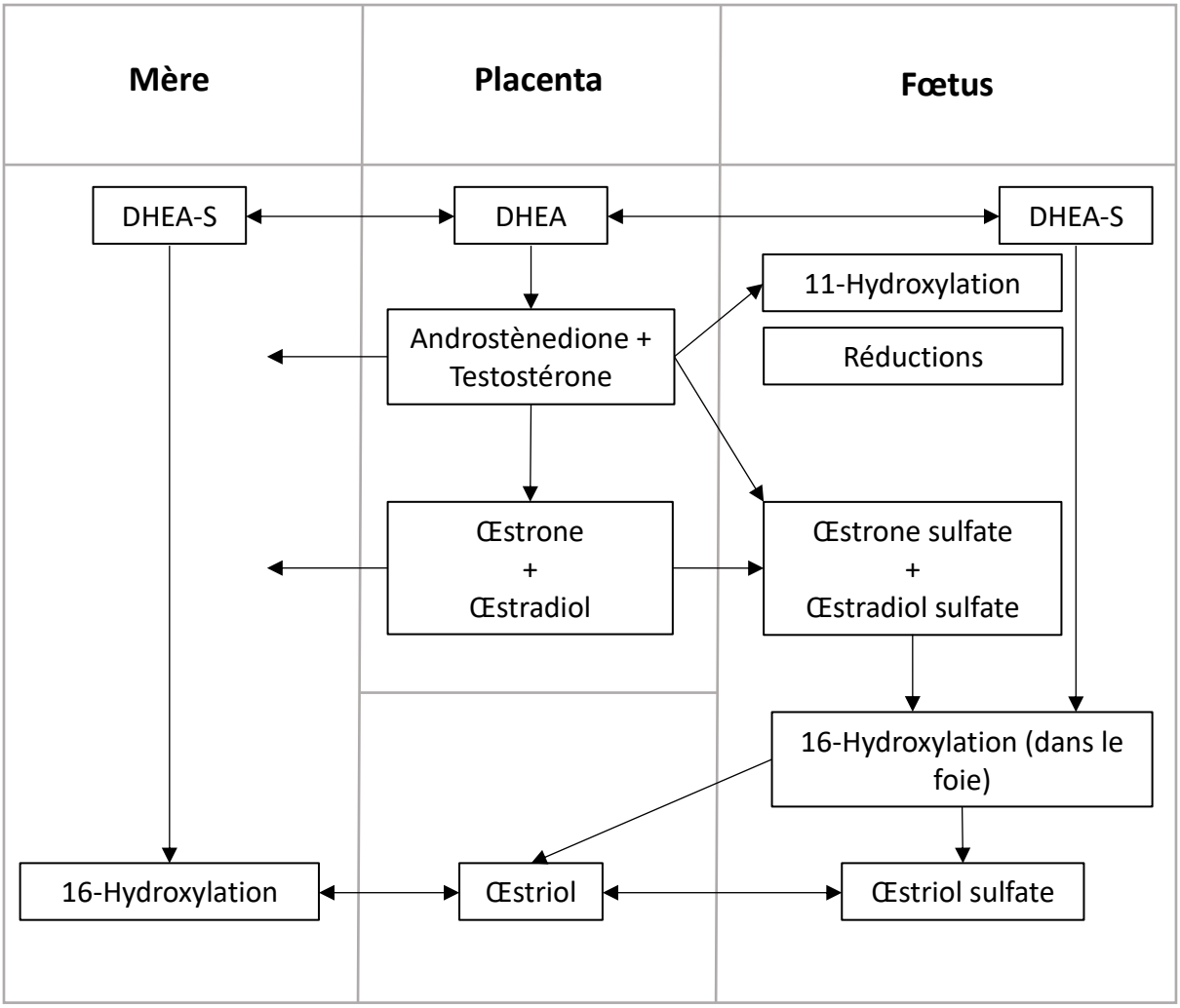


Figure 12 : Représentation schématique du métabolisme de la DHEA-S par l'unité fœto-placentaire au milieu de la gestation [149].

L'œstradiol et l'œstrone, dont la synthèse provient à égalité de la DHEA d'origine maternelle et fœtale, sont produits essentiellement par le placenta. L'œstradiol et l'oestrone sont sulfoconjugués par l'endomètre utérin. Ils constituent ainsi des biomarqueurs pertinents de l'intégrité placentaire. Dans le compartiment fœtal, les œstrogènes (estrone et œstradiol) circulent à la fois sous forme non conjuguée et conjuguée. La forme sulfoconjuguée étant prépondérante [150], ses concentrations de l'ordre du ng/mL sont 30 à 100 fois plus élevées que celles des œstrogènes non conjugués. Ceci s'explique par le fait que les formes non conjuguées passent plus facilement la barrière placentaire que les formes conjuguées, ce qui permet leur élimination maternelle. Le passage placentaire des formes sulfoconjuguées est trois fois plus important que celui des formes glucuronoconjuguées, en raison probablement de la forte activité sulfatase du placenta, qui permet la formation de stéroïdes non conjugués.

Dans le cerveau fœtal, des stéroïdes sulfatases sont présentes en grande quantité, notamment des œstrogènes sulfatases. Les œstrogènes sulfoconjugués pourraient passer la barrière hématoencéphalique fœtale et la déconjugaison par la stéroïde sulfatase du sulfate d'œstradiol et d'estrone, localement dans le cerveau ou dans l'hypophyse du fœtus, pourrait induire des effets biologiques. Ainsi, les œstrogènes sulfoconjugués, qui sont éliminés plus lentement que les formes déconjuguées, pourraient être considérés comme un réservoir circulant d'œstrogènes actifs, produits sous l'action des sulfatases [151].

Bien que l'unité fœto-placentaire produise de grandes quantités de stéroïdes, en particulier les DHEA, DHEA-S et œstriol, leur rôle biologique reste à clarifier. Le maintien de la grossesse jusqu'à son terme est largement dépendant de la progestérone dont la biosynthèse est régulée par l'œstradiol [152]. À l'inverse, la production de minéralocorticoïdes n'est pas indispensable avant la naissance. Les œstrogènes placentaires sont de bons biomarqueurs de l'intégrité placentaire, mais n'ont pas de rôle essentiel pendant la grossesse. Quant aux androgènes, ils jouent un rôle fondamental dans la différenciation sexuelle.

A. La voie de synthèse et de métabolisation de la testostérone dans l'unité fœto-placentaire.

Chez le fœtus, la synthèse de la testostérone a majoritairement lieu dans les cellules de Leydig [153,154]. Quatre enzymes sont impliquées dans la synthèse de la testostérone par la voie dite « classique ». Le CYP11A1 catalyse les trois réactions enzymatiques successives nécessaires à la formation de la prégnénolone. Cette dernière diffuse ensuite vers le réticulum endoplasmique lisse où se trouvent la 3βHSD, le CYP17A1 et la 17βHSD3.

Les cellules de Leydig expriment abondamment la 3βHSD2 et la 17βHSD3, mais pas la SULTA1. De ce fait, la DHEA produite dans les testicules n'est pas sulfatée en DHEA-S, mais est convertie en androstènedione puis en testostérone (Figure 13). La voie de synthèse préférentielle de la testostérone dans les testicules passe par les stéroïdes Δ^5 conduisant à la production de DHEA alors que celle des Δ^4 conduisant à la production de 17-hydroxyprogestérone est minoritaire.

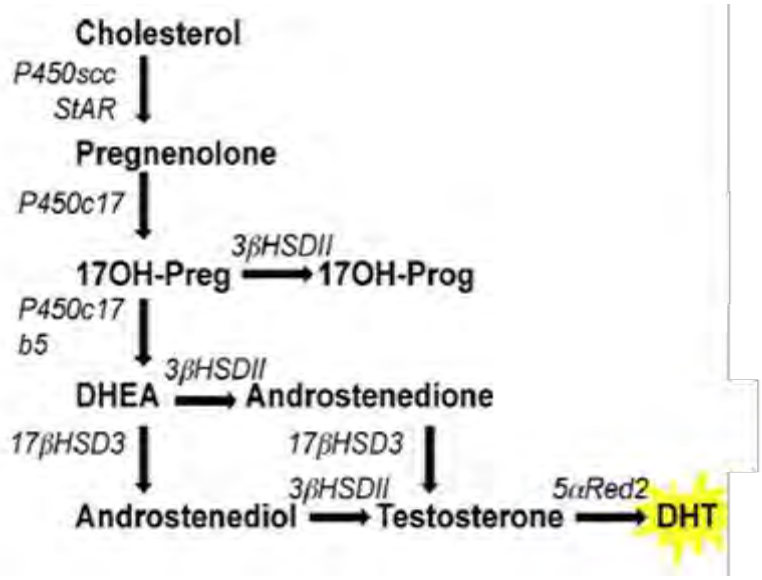


Figure 13 : Voie classique de biosynthèse de la testostérone dans les testicules fœtaux, d'après [153].

La testostérone circulante est ensuite transformée en DHT grâce à la SDR5A2 exprimée dans le scrotum et la prostate. La DHT est environ 10 fois plus affine pour le récepteur aux androgènes que la testostérone (Figure 13).

Une voie alternative nommée « backdoor pathway » permet la production de DHT depuis la 17 – hydroxyprogestérone. Cette voie, démontrée chez le tamar wallaby et le rongeur, n'a pas été mise en évidence chez l'homme ni chez l'ovin, bien qu'elle soit probablement présente.

Chez le fœtus, la testostérone peut aussi être synthétisée au niveau placentaire à partir de la DHEA (Figure 12) et dans la surrénale à partir de l'androstènedione dans la *Zona Reticularis* (Figure 14). Dans le placenta, la testostérone peut également être métabolisée en œstradiol et œstrone par l'aromatase.

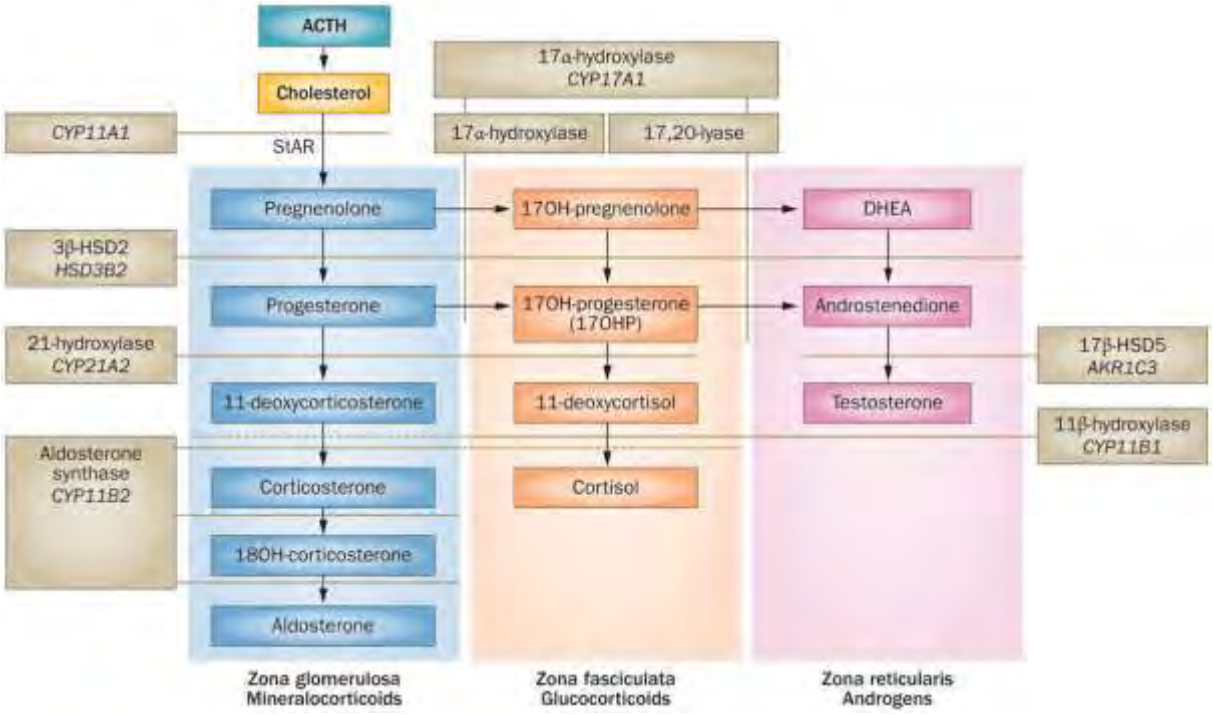


Figure 14 : Synthèse de la testostérone dans la surrénale fœtale d'après [155].

B. Évolution des stéroïdes sexuels dans le compartiment maternel au cours de la gestation

Au cours de la gestation, la production des œstrogènes dans l'unité fœto-materno-placentaire peut être divisée en trois stades : 0-55, 55-120 jours de gestations et la fin de la gestation. La Figure 15 et le Tableau 5 décrivent l'évolution des concentrations plasmatiques des stéroïdes sexuels au cours de la gestation dans la circulation générale chez la brebis.

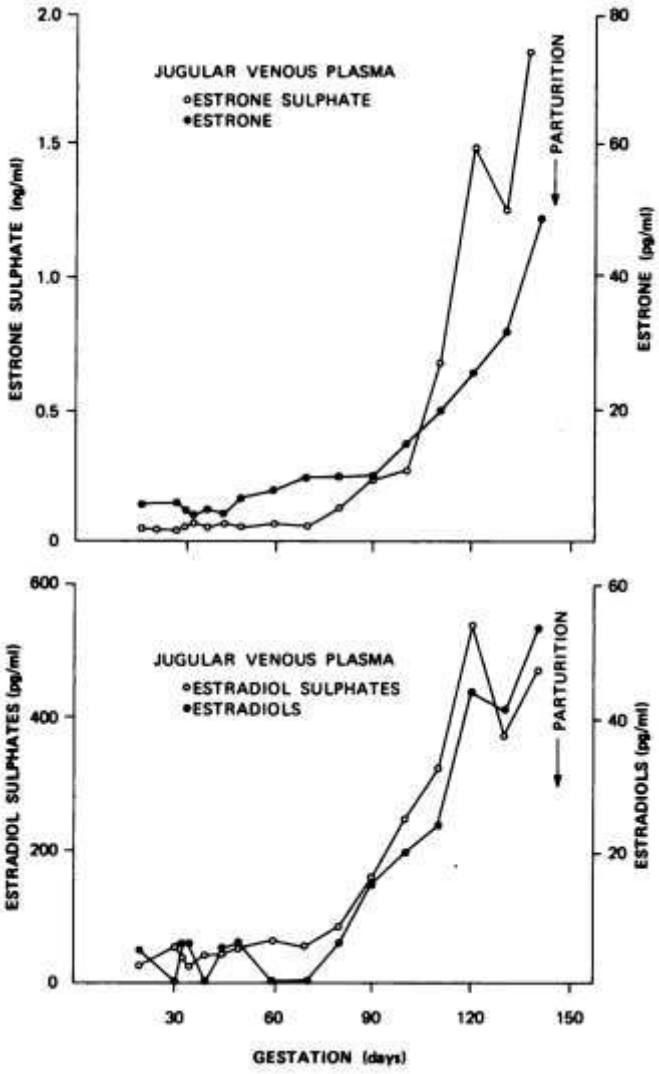


Figure 15 : Évolution temporelle des concentrations d'estrone et d'estrone sulfate, d'œstradiol et d'œstradiol sulfate dans la veine jugulaire au cours de la gestation chez la brebis [150].

Tableau 5 : Concentrations plasmatiques de progestérone (P4, ng/mL), d'estrone (E1, pg/mL), d'œstradiol (E2, pg/mL) et d'estrone sulfate (E1S, pg/mL) dans la veine utérine (UTV) et l'artère utérine (UA) au cours de la gestation chez la brebis [156]. Effet du jour de gestation, 1 p<0.05 ; 2 p<0.01 ; 3 NS.

Jour de gestation	UTV P4[1]	UA P4[1]	UTV E1[2]	UA E1[3]	UTV E2[1]	UA E2[3]	UTV E1S[2]	UA E1S[2]
25	3	4	10	8	13	55	111	60
30	3	3	13	7	13	25	66	187
35	6	3	9	16	21	26	187	183
40	2	3	8	7	39	9	44	77
50	3	5	13	12	38	18	24	43
60	5	5	8	9	25	28	319	170
70	8	4	4	3	15	22	341	374
80	9	9	11	22	26	17	267	148
90	ND	5	ND	12	21	15	315	339
100	ND	5	17	16	28	50	759	900
110	4	3	44	14	101	16	805	379
120	9	3	22	16	23	45	971	1 225
130	5	5	19	39	40	38	956	709
140	6	7	15	27	27	66	ND	ND
SEM	0.5	0.3	2	4	3	6	290	26

Les concentrations d'œstrogènes décrivent le même décours temporel dans la circulation utérine et générale. Elles sont faibles dans la circulation maternelle en début de gestation et augmentent progressivement pendant la deuxième moitié de gestation. Les concentrations d'estrone sulfate et d'œstradiol sulfate augmentent du jour de gestation (JG) 60 au JG140, pour atteindre des valeurs élevées en fin de gestation (estrone sulfate = 2 ng/mL). Les concentrations en œstrone et œstradiol sont faibles en début de gestation, deviennent détectables vers le JG110 (estrone = 75 pg/mL en fin de gestation). Les concentrations de progestérone dans la circulation utérine varient au cours de la gestation entre 2 et 9 ng/mL.

C. Évolution des stéroïdes sexuels dans le compartiment fœtal

1. Liquide allantoïdien et amniotique

La Figure 16 et Tableau 6 décrivent l'évolution des stéroïdes sexuels au cours de la gestation dans le liquide amniotique ou le liquide allantoïdien chez la brebis.

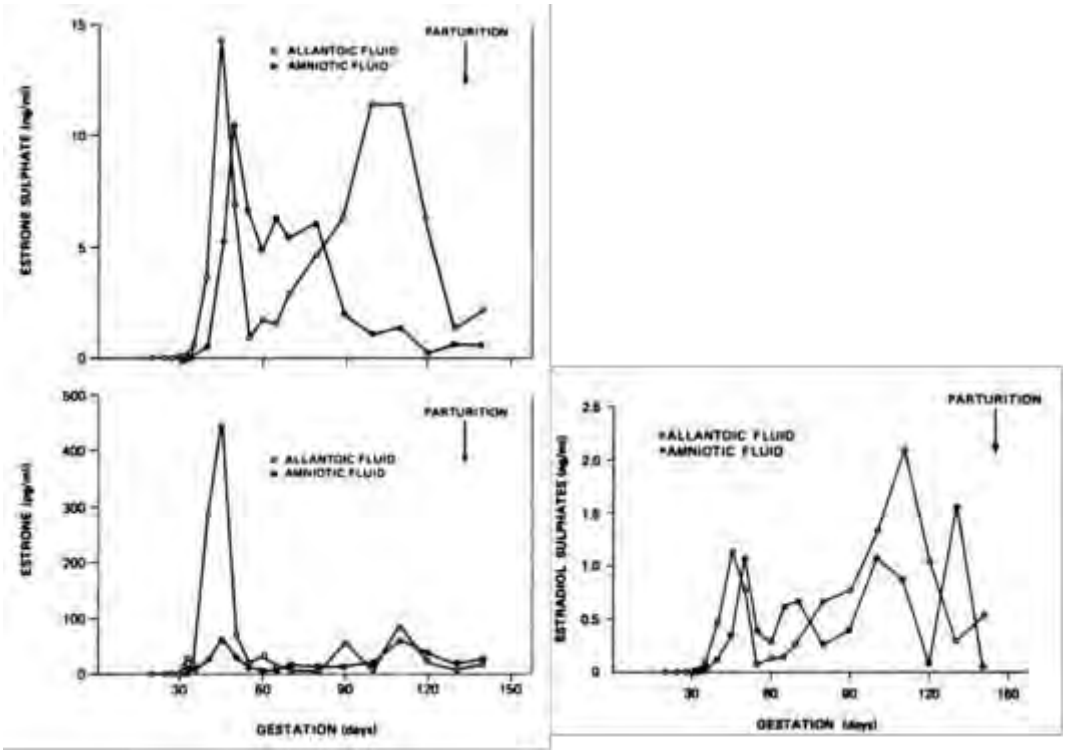


Figure 16 : Évolution temporelle des concentrations d'estrone, d'estrone sulfate et d'œstradiol sulfate dans le liquide allantoïdien et amniotique au cours de la gestation chez le fœtus ovin [150].

Tableau 6 : Concentrations de progestérone (P), d'estrone (E1), d'œstradiol (E2) et d'estrone sulfate (E1S) dans le liquide allantoïdien au cours du dernier tiers de la gestation chez le fœtus ovin [156].

Jour de gestation	P[1] ng/mL	E1[1] pg/mL	E2[1] pg/mL	E1S[2] pg/mL
90	1.2	247	113	3772
100	1.5	142	82	2504
110	2.6	51	67	2460
120	4	264	92	2738
130	1.7	180	100	1637
140	1.2	156	72	1681

Jour de gestation, [2] $p<0.05$; [1] NS

Un pic de sécrétion d'estrone, d'estrone sulfate et d'œstradiol sulfate est observé entre le 30e et le 60e jour de gestation, suivi par une diminution importante vers 50-60 jours de gestation dans le liquide allantoïdien, puis par une deuxième augmentation d'estrone sulfate et d'œstradiol sulfate pendant la deuxième moitié de la gestation. Dans le liquide amniotique, la diminution d'œstradiol sulfate est progressive jusqu'à la fin de la gestation.

Les concentrations de progestérone, d'estrone, d'œstradiol dans le liquide allantoïdien varient peu à la fin de la gestation, alors que les concentrations d'estrone sulfate et d'œstradiol sulfate diminuent avant la parturition.

La proportion des formes α et β de l'œstradiol sulfoconjuguée ou non conjuguée peut varier au cours de la gestation dans les différents compartiments fœtal et maternel.

2. Plasma fœtal

Le Tableau 7 décrit l'évolution des stéroïdes sexuels durant la deuxième moitié de la gestation dans le plasma fœtal.

Tableau 7 : Évolution temporelle des concentrations d'œstrogènes dans le plasma fœtal de JG80 à JG140 [150].

Brebis	Jour de gestation	gestation Simple/double	Sexe	E1 (pg/mL)	E1S (ng/mL)	E2 (pg/mL)	E2S (ng/mL)
73-8327	80	S	M	36	1.35	20	0.54
09-8145	90	S	M	28	2.25	20	1.58
09-8066	100	D	F	39	4.09	73	2.63
72-8084	110	S	F	139	4.43	89	11.4
73-8088	120	D	M	35	4.06	83	3.49
73-8098	130	S	F	78	2.63	86	4.19
50	140	D	M	32	3.20	84	2.14

Les concentrations plasmatiques fœtales d'estrone sulfate, d'œstradiol sulfate et d'œstradiol augmentent entre JG80 et JG100 et restent élevées (de l'ordre du ng/mL pour les formes conjuguées) et variables durant la deuxième moitié de la gestation. Même si le nombre d'échantillons est réduit, il ne semble pas y avoir de différence en fonction du sexe. Sur cette période, les concentrations fœtales d'estrone sulfate et d'œstradiol sulfate sont toujours plus élevées que les concentrations maternelles [150].

En définitive, la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire met en jeu des relations complexes, permettant soit de maintenir l'homéostasie stéroïdienne ou de permettre son évolution au cours de la gestation.

Objectifs et stratégies de la thèse

Notre synthèse bibliographique montre la présence ubiquitaire du BPS dans des produits de consommation courante et dans notre environnement suite à l'interdiction progressive du BPA en raison de son potentiel perturbateur endocrinien. La prévalence et les niveaux d'exposition de la population générale au BPS sont en augmentation constante depuis les années 2000. De plus, la mise en évidence du BPS dans le sang de cordon du nouveau-né démontre le passage placentaire du BPS [14]. Or, le BPS présente, comme le BPA, un potentiel perturbateur endocrinien [15].

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient : (1) d'évaluer les mécanismes déterminants l'exposition fœtale au BPS et à son principal métabolite, le BPSG et de les comparer à ceux qui déterminent l'exposition fœtale au BPA et (2) de caractériser des biomarqueurs phénotypiques d'exposition fœtale et/ou d'effet du BPS à partir d'une signature stéroïdienne.

Tout comme le BPA, le BPS est principalement métabolisé en BPSG. Des études sur le BPA ont démontré que son métabolite, le BPA Glucuronide (BPAG), était un marqueur de l'exposition fœtale au BPA car il reflète l'exposition chronique au BPA et est moins soumis aux variations temporelles [110,157]. En outre, son dosage ne peut pas être biaisé par des contaminations environnementales éventuelles, qui pourraient survenir lors de la collecte ou de l'analyse des échantillons [157]. Pour s'assurer d'une bonne évaluation de l'exposition fœtale au BPS, il est donc nécessaire de déterminer les paramètres TK du BPS, mais aussi de son principal métabolite, le BPSG. Une des premières étapes de la thèse a donc été de purifier une quantité de BPSG de l'ordre de plusieurs grammes afin de déterminer ses propriétés TK sur le modèle intégratif ovin.

Une méthode en chromatographie liquide ultra performance (UPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permettant le dosage simultané du BPS et du BPSG a été développée et validée dans le plasma de brebis puis appliquée aux différentes matrices biologiques (plasma, urine, liquide amniotique, tissus, milieux de perfusion placentaire), pour évaluer l'exposition interne au BPS.

Au sein de l'unité materno-fœto-placentaire, l'exposition fœtale au BPS est déterminée par :

- ❖ l'exposition maternelle, incluant les capacités de métabolisation maternelle du BPS et du BPSG,
- ❖ les capacités de métabolisation du BPS et du BPSG du fœtus,
- ❖ la liaison du BPS aux protéines plasmatiques dans le compartiment maternel et fœtal,
- ❖ le transfert placentaire du BPS et du BPSG,
- ❖ les échanges entre le sang fœtal et le liquide amniotique.

Pour prendre en compte l'ensemble de ces déterminants de l'exposition fœtale simultanément, des études TK du BPS et du BPSG ont été réalisées sur le modèle de brebis gravide dont le fœtus a été cathétérisé au dernier tiers de la gestation et qui a été précédemment développé au laboratoire [110]. La brebis gravide est un modèle intégratif couramment utilisé car il est pertinent vis-à-vis de l'homme en termes de physiologie de la gestation [116–119].

Ce modèle permet le prélèvement de sang maternel peu limité en termes de volume et fréquence. En outre, l'insertion de cathéters dans la veine jugulaire et l'artère carotide du fœtus au cours d'une chirurgie permet de réaliser des administrations et des prélèvements sériés de sang fœtal sur animal vigile pendant quelques semaines après la chirurgie [110]. Ce type de chirurgie n'est pas envisageable sur un modèle d'aussi petite taille que le rongeur. Ce modèle de brebis gravide nous a ainsi permis d'évaluer les déterminants de l'exposition fœtale au BPS et au BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire sur (Article 2).

Cependant, il existe des différences interspécifiques de placentation, qui est de type syndesmochorial pour l'espèce ovine et hémochoriale pour l'espèce humaine. Pour extrapoler les résultats obtenus chez la brebis gravide à l'Homme, le transfert placentaire du BPS et du BPSG a été étudié sur un modèle de placenta humain perfusé *ex vivo*, en collaboration avec le service de Gynécologie Obstétrique de l'hôpital Paule de Viguier à Toulouse. Cette étude nous a permis d'évaluer les clairances placentaires humaines du BPS et du BPSG dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel et de les comparer à celles du BPA et du BPAG (Article 3).

Cette première partie du projet sur la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire a montré que le BPS s'accumule dans le compartiment fœtal lors d'exposition chronique, ce qui pourrait conduire, sur toute la durée de la gestation, à des effets adverses sur le développement fœtal. Pour évaluer l'hypothèse selon laquelle

l'exposition au BPS pourrait modifier l'équilibre stéroïdien nécessaire au développement normal du fœtus, une approche globale fondée sur une signature stéroïdienne a été développée sur le modèle de brebis gravide. La dernière étape de ce projet a donc été d'étudier l'impact d'une exposition maternelle quotidienne au BPS pendant 28 jours au cours de la gestation sur l'équilibre stéroïdien dans l'unité materno-fœto-placentaire en collaboration avec le LABERCA à Nantes (Article 4).

Chapitre 2 :
Études expérimentales

Chapitre 2 : Études expérimentales

Mise au point des outils analytiques nécessaires à l'étude de la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire

I. Contexte et objectifs

La prévalence élevée de l'exposition humaine au BPS est préoccupante en raison de son potentiel perturbateur endocrinien [15]. Dans ce contexte, l'étude des mécanismes TK déterminant l'exposition au BPS et à son principal métabolite, le BPSG, dans l'unité materno-fœto-placentaire est nécessaire à l'évaluation du risque pour la santé humaine lié à l'exposition fœtale au BPS. Cette étude nécessite le développement préalable d'outils analytiques adaptés aux études TK, c'est-à-dire une méthode de dosage en direct des substances d'intérêt sur une large gamme de concentrations avec un débit d'analyse permettant de doser efficacement les centaines d'échantillons générés.

Le BPSG est disponible commercialement sous forme de standard analytique en conditionnement de 10 mg pour plusieurs centaines d'euros. Lors d'une étude TK, plusieurs grammes de BPSG sont nécessaires pour administrer, à des brebis gravides d'environ 80 kg, des doses permettant un suivi cinétique des concentrations plasmatiques quantifiables sur une période suffisamment longue pour évaluer les paramètres TK d'intérêt. Il a donc été nécessaire dans un premier temps de produire de grandes quantités de BPSG à moindre coup et dans un délai raisonnable, pour étudier la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire. Le BPSG étant excrété dans les urines, une méthode de purification du BPSG dans les urines de brebis a été développée par chromatographie flash. Pour cela, une forte dose de BPS (100 mg/kg) a été administrée à des brebis par voie orale et les urines ont été collectées et purifiées. (cf. II.Annexe de l'article 1 : Production du BPSG en chromatographie flash).

De nombreuses méthodes ont été développées pour doser le BPS dans les papiers [48,50–52,54,56–58,158–161] et les emballages alimentaires [32,59–66,162,163], dans l'eau [164–167], les sédiments [167–170], les poussières et l'air intérieur [68–70], les végétaux [171] ou encore les boues de station d'épuration [172,173]. En ce qui concerne les matrices biologiques, il existe également des méthodes pour doser le BPS dans les urines [54,76,80–

86,89–94,96,174], le sérum [14,54,77,84] et le lait maternel [87,88]. L'ensemble de ces méthodes utilisent l'hydrolyse enzymatique qui permet de déterminer la concentration en BPS total (BPS aglycone + BPS conjugué). La concentration en BPS conjugué est ensuite obtenue par soustraction de la concentration en BPS aglycone (avant hydrolyse enzymatique) à la concentration en BPS total (après hydrolyse enzymatique). Cette évaluation impliquant un double dosage de chaque échantillon, les concentrations de BPS total sont le plus souvent rapportées dans la littérature, comme en atteste le Tableau 8.

Tableau 8 : Méthodes de dosage du BPS et du BPS conjugué dans les matrices biologiques publiées dans la littérature jusqu'en 2016, année du développement du dosage simultané du BPS et du BPSG au laboratoire.

Référence	Pré-traitement	Analyse	Analyte	LOD	LOQ	Calibration	Matrice
[92]	Hydrolyse enzymatique SPE hors ligne	HPLC-MS/MS	BPS total	0.01 ng/mL	0.02 ng/mL	0.02-20 ng/mL	Urine humaine
[93]	Hydrolyse enzymatique SPE en ligne	HPLC-MS/MS	BPS et BPS conjugué *	0.03 ng/mL	NA	0.03-100 ng/mL	Urine humaine
[89]	Hydrolyse enzymatique DLLME	UHPLC – MS/MS	BPS et BPS conjugué *	0.1 ng/mL	0.3 ng/mL	0.3-40 ng/mL	Urine humaine
[94]	Hydrolyse enzymatique Extraction liquide-liquide	UHPLC – MS/MS	BPS et BPS conjugué *	0.01 ng/mL	0.032 ng/mL	0.032-1.25 ng/mL	Urine humaine
[90]	Hydrolyse enzymatique DLLME	GC – MS/MS	BPS et BPS conjugué *	0.1 ng/mL	0.4 ng/mL	0.4-40 ng/mL	Urine humaine
[87]	Hydrolyse enzymatique Extraction à l'acétone SPE hors ligne	GC-MS/MS	BPS total	0.001 µg/kg	0.003 µg/kg	0 -5 µg/kg	Lait maternel
[82]	Hydrolyse enzymatique Extraction liquide-liquide	HPLC-MS/MS	BPS total	NA	0.02 ng/mL	0.02-5 ng/mL	Urine humaine
[54]	Hydrolyse enzymatique Extraction liquide-liquide SPE en ligne	UHPLC – MS/MS	BPS et BPS conjugué *	Urine : 0.01 ng/mL Sérum : 0.002 ng/mL	NA	0-10 ng/mL	Urine et sérum humain
[76]	Hydrolyse enzymatique SPE en ligne	HPLC-MS/MS	BPS et BPS conjugué*	0.1 ng/L	NA	0.01-100 ng/mL	Urine humaine
[80]	Hydrolyse enzymatique Extraction à l'acétate d'éthyl	UHPLC – MS/MS	BPS total	NA	0.12 ng/mL	0.12-50 ng/mL	Urine humaine

Tableau 8 : Méthodes de dosage du BPS et du BPS conjugué dans les matrices biologiques publiées dans la littérature jusqu'en 2016, année du développement du dosage simultané du BPS et du BPSG au laboratoire (suite).

Référence	Pré-traitement	Analyse	Analyte	LOD	LOQ	Calibration	Matrice
[96]	Hydrolyse enzymatique Filtration SPE en ligne	UHPLC-MS/MS	BPS total	0.067 ng/mL	0.1 ng/mL	0.1-100 ng/mL	Urine humaine
[91]	Hydrolyse enzymatique DLLME	HPLC-MS/MS	BPS total	0.01 ng/mL	0.04 ng/mL	0.5-20 ng/mL	Urine humaine

*Par soustraction de la concentration en BPS non conjugué à la concentration en BPS total

DLLME = Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction, GC = Gaz Chromatography, HPLC = High Performance Liquid Chromatography, LOD = Limit Of Detection, LOQ = Limit Of Quantification, SPE = Solid Phase Extraction, UPLC = Ultra Performance Liquid Chromatography

Toutes ces méthodes, adaptées à des études de biosurveillance, permettent de rechercher des traces de BPS dans l'environnement ou l'organisme et conviennent peu pour des applications en TK. En effet, en raison du nombre important d'échantillons générés par les études TK, le temps d'analyse doit être réduit au minimum pour assurer un débit d'analyse suffisant pour éviter les effets dosage sur une même série d'échantillons. De plus, il faut pouvoir suivre le décours temporel des concentrations en BPS et BPSG sur des gammes de concentrations très étendues de quelques ng/mL en fin de cinétique à plusieurs µg/mL en début de cinétique, ce qui nécessite une gamme de concentration la plus large possible afin d'éviter 1) la dilution excessive des échantillons de fortes concentrations, qui apporte une imprécision supplémentaire à la mesure et 2) une mauvaise estimation des paramètres TK du fait d'une LOQ trop élevée pouvant masquer la pente terminale de l'élimination du BPS et/ou du BPSG.

Pour répondre à tous ces critères, une méthode de dosage simultanée du BPS et du BPSG dans le plasma ovin a été développée et validée selon les lignes directrices décrites pour la validation de méthode bioanalytique par l'Agence Européenne du Médicament (EMA)[175].

Cette méthode a été, dans un premier temps, appliquée pour estimer les paramètres TK du BPS et du BPSG chez des brebis non gravides. Ce travail est présenté dans l'article 1 publié en octobre 2017 dans une édition spéciale du « Journal of chromatography A » dédiée aux conférences sélectionnées pour le 12e congrès francophone sur les sciences séparatives et les couplages de l'association francophone des sciences séparatives.

II. Annexe de l'article 1 : Production du BPSG en chromatographie flash

Several grams of BPSG are required for its use in TK studies. The estimated cost of such an amount of BPSG is more than $50 000, which on the one hand would be too expensive to conduct our experiments and on the other hand could not be provided by our supplier with reasonable delay. Therefore we adapted a method involving flash chromatography for the production and purification of BPSG from urine after BPS administration to sheep [176].

A. Materials and methods

1. Animal treatment and sample collection

This experiment was designed to purify a large amount of BPSG from urine of five ewes that received an oral administration of BPS at the dose of 100 mg/kg body weight (bw) using a naso-esophageal tube. BPS was extemporaneously dissolved in EtOH/H_2O/PG (10/11/79, v/v/v) at a concentration of 100 mg/mL. Total urine was collected via a Foley catheter aseptically placed in the urethra of the ewes. Urine was collected 2, 4, 6, 8 and 10 hours after the BPS oral administration and immediately chilled in ice and centrifuged for 10 min at 3000 × g at 4 °C. A total volume of approximately 400 mL of urine was collected from each ewe and used for BPSG isolation by flash chromatography.

2. BPSG purification from sheep urine by flash chromatography

Pooled urine samples were concentrated using a Rotavapor® (Büchi, Rungis, France) at 50°C to obtain a volume of approximately 40 mL. Pre-concentrated urine samples (2 mL) were injected into the flash chromatographic system (Combiflash, Teledyne ISCO, Lincoln, NE, USA) and separated on C18 cartridges (Chromabond® Flash RS 25 C18 ec, 25g, Macherey-Nagel, Hoerdt, France) with a H_2O, 0.1% AA/MeOH gradient elution : column volume (CV) 0 : 20 % MeOH ; CV 0 → 10: 40% MeOH; CV 10 → 18: 40% MeOH with a flow rate of 20 mL/min. The UV detection and visualization wavelengths were set at 230 and 260 nm, respectively. The BPSG fractions collected were pooled and dried under a stream of air at 70°C. The product was then lyophilized overnight and stored at 4°C.

3. Identification and quantification of BPSG and residual BPS in purified urine collected after oral administration of BPS to sheep.

The BPSG fractions collected by flash chromatography were eluted on the HSST3 column (2.1 mm ×30 mm, 1.8 µm ; Waters) with H_2O/AcN gradient elution. BPSG was identified by MS full scan ranging from *m/z* 50 to 600. The BPSG identification was carried out by MS/MS (*m/z* 425) daughter ion scan. The retention times and MS/MS fragmentation of purified BPSG were compared with those of BPSG analytical standard purchased from TRC.

Standard calibrators ranging from 0.1 to 20 µg/mL and 1 to 200 ng/mL for BPSG and BPS, respectively, were prepared in H_2O. For each BPSG fraction purified from urine by flash

chromatography, 10 mg of lyophilized extract were diluted in 10 mL of water. Each solution was then diluted 100 fold in H_2O in triplicate and analyzed by UPLC-MS/MS to measure the amount of BPSG and the potential BPS contamination in each purified fraction.

B. Results

1. Optimization of flash chromatography

Collected urine samples were injected on a C18 cartridge and eluted with a MeOH/H_2O gradient. However, BPSG was not correctly separated from the solvent front and urine interferences due to the higher polarity of BPSG compared to BPAG. The method was therefore adapted by acidifying the mobile phase to increase the retention on the C18 cartridge and by optimizing the elution gradient to obtain the best separation of BPSG from impurities. Finally, BPSG was collected at 9.5 Column Volume (CV) to ensure its separation from urine interferences and from BPS eluted at 6 CV (Figure 17).

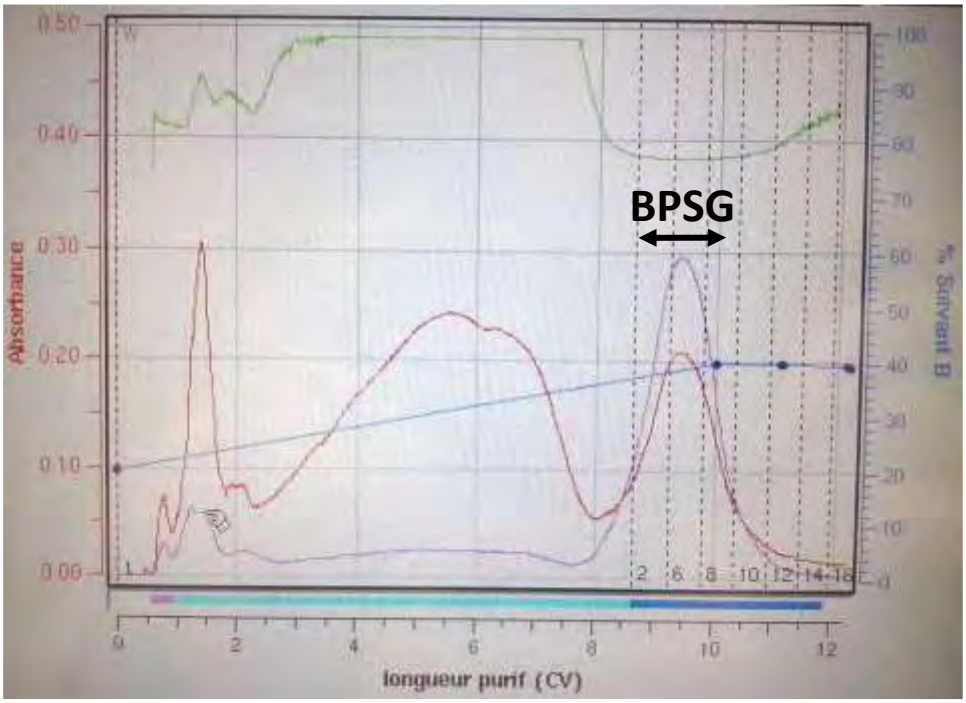


Figure 17 : Chromatogram obtained in Flash chromatography displaying the separation of BPSG (9.5 CV) in sheep urine samples from urine interferences and from BPS eluted at 6 CV.

2. BPSG identification

Fractions purified by flash chromatography were analyzed by UPLC-MS and compared to BPS and BPSG analytical standards. A major peak was observed at the same retention time

as BPSG analytical standard (t_R = 1.59 min). The MS spectrum at 1.59 min gave a major peak at *m/z* 425 corresponding to the deprotonated molecular ion $[M-H]^-$ of BPSG. MS/MS was then performed on the *m/z* 425 precursor ion. The same characteristic fragment ions as those of BPS were observed at *m/z* 249 and *m/z* 175, corresponding to the BPS and glucuronic acid moieties, respectively (Figure 18) [74]. A minor peak was observed at the same retention time as BPS analytical standard, t_R = 2.49 min, corresponding to the deprotonated parent ion $[M-H]^-$ of BPS at *m/z* 249 [177]. These results showed that although BPSG can be isolated from urine fractions by flash chromatography, a small proportion of free BPS remains present in the BPSG fraction. This BPS contamination may originate either from some BPS residue in the purified BPSG fraction or from BPSG hydrolysis during the purification process. Indeed, the collected fractions were dried under acidic conditions and at a high temperature to evaporate the mobile phase. These conditions may be conducive to BPSG hydrolysis into BPS [178].

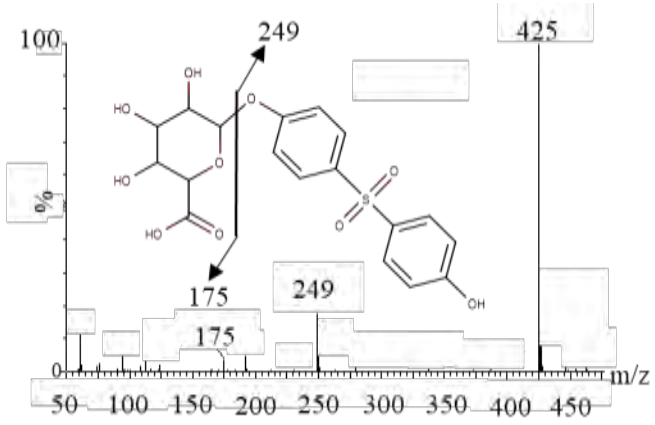


Figure 18 : MS/MS spectrum obtained for the collected BPSG fractions after flash chromatography purification. The parent ion of BPSG is observed at m/z 425. Product ions of BPSG are observed at m/z 249, corresponding to the BPS moiety, and at m/z 175, corresponding to the glucuronide moiety (Ecoll = 52 eV).

3. BPSG quantification

The amounts of purified BPSG and potential BPS contamination in the various purified fractions were determined by quantifying both BPSG and BPS by UPLC-MS/MS in the collected fractions previously diluted to 10 µg/mL. In all the collected fractions, the BPSG concentrations ranged from 6.8 to 8.5 µg/mL and the BPS concentrations were below 0.3 µg/mL, corresponding to a maximum contamination of the fraction, in relation to BPSG, of 4.4%.

Finally, 2.8 g of BPSG were purified by flash chromatography with suitable purity for use in TK studies.

III. Article 1

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Development of an on-line solid phase extraction ultra performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: Applicability to toxicokinetic investigations☆

Flore Grandin[a,b], Nicole Picard-Hagen[a], Véronique Gayrard[a], Sylvie Puel[a], Catherine Viguié[a], Pierre-Louis Toutain[a], Laurent Debrauwer[a,b], Marlène Z. Lacroix[a,b,*]

[a] Toxalim, Université de Toulouse, INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), INP (Institut National Polytechnique de Toulouse) – ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), Toulouse France
[b] INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Axiom Platform, MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics, 31027 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 April 2017
Received in revised form 8 August 2017
Accepted 6 October 2017
Available online xxx

Keywords:
Bisphenol S
Bisphenol S glucuronide
Toxicokinetic
Liquid chromatography
Mass spectrometry

ABSTRACT

Regulatory measures and public concerns regarding bisphenol A (BPA) have led to its replacement by structural analogues, such as Bisphenol S (BPS), in consumer products. At present, no toxicokinetic investigations have been conducted to assess the factors determining human internal exposure to BPS for subsequent risk assessment. Toxicokinetic studies require reliable analytical methods to measure the plasma concentrations of BPS and its main conjugated metabolite, BPS-glucuronide (BPS-G).

An efficient on-line SPE-UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of BPS and BPS-G in ovine plasma was therefore developed and validated in accordance with the European Medicines Agency guidelines for bioanalytical method validation. This method has a limit of quantification of 3 ng mL^{-1} for BPS and 10 ng mL^{-1} for BPS-G, an analytical capacity of 200 samples per day, and is particularly well suited to toxicokinetic studies.

Use of this method in toxicokinetic studies in sheep showed that BPS, like BPA, is efficiently metabolized into its glucuronide form. However, the clearances and distributions of BPS and BPS-G were lower than those of the corresponding unconjugated and glucuroconjugated forms of BPA.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Owing to regulatory actions and serious concerns regarding widespread human exposure to Bisphenol A (BPA) and its adverse effects on human health, BPA is gradually being replaced by other bisphenol analogues in many consumer products [1,2]. Bisphenol S (BPS) is commonly used as an alternative to BPA in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins for various industrial applications [1]. Despite its high thermal stability, BPS can be found in canned foodstuffs, thermal paper and personal care products [3–8].

Humans are exposed to BPS by the same routes as described for BPA, including dietary exposure [3–6,9], inhalation of indoor dust [10], and transcutaneous route [7,8,11]. In humans, BPS is mainly metabolized in the liver into bisphenol S glucuronide (BPS-G) and eliminated in urine [12,13]. Different studies suggest that BPS exposure may be increasing because of BPA prohibition in some countries [14]. The estimated median daily dietary intake of BPS is 9.55 ng kg^{-1} bw (body weight) per day [9] and biomonitoring studies recently conducted in several countries found that BPS was detected in 81% of 315 urine samples, at a geometric mean concentration of 0.168 ng mL^{-1} [15,16].

Due to its structural similarity with BPA and its widespread use, concern about the safety of BPS has become an important issue

☆ Selected paper from the 12ème Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages Analytiques (SEP 2017), 29–30 March 2017, Paris, France.

* Corresponding author at: UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France.
E-mail addresses: flore.grandin@inra.fr (F. Grandin), n.hagen-picard@envt.fr (N. Picard-Hagen), v.gayrard@envt.fr (V. Gayrard), sylvie.puel@inra.fr (S. Puel), c.viguie@envt.fr (C. Viguié), pl.toutain@envt.fr (P.-L. Toutain), laurent.debrauwer@inra.fr (L. Debrauwer), m.lacroix@envt.fr (M.Z. Lacroix).

https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020
0021-9673/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

[14,16]. Indeed, BPS has a similar toxicity profile to BPA [17] but, compared with the numerous studies of BPA, toxicological investigations of BPS remain limited. Understanding the factors which determine maternal internal exposure to BPS constitutes a critical initial step in assessing the health risk of BPS and will require accurate estimation of the toxicokinetic (TK) parameters characterizing the disposition of BPS and BPS-G [18]. Development of a reliable method for quantifying BPS and BPS-G over a wide range of concentrations in biological matrices is therefore crucial to estimate the TK parameters with a high level of confidence. However, even though an analytical standard of BPS-G is now commercially available, it is too expensive for use in TK studies which require several grams of compound. We have already developed a method for BPA-G purification from ewe urine by using flash chromatography [19], that could be adapted to produce large quantities of BPS-G for TK purposes.

Bisphenols are usually extracted from matrices by solid phase extraction (SPE) and quantified by gas or liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC or LC–MS/MS) [20]. Numerous methods have already been described for BPS assay in environmental matrices such as indoor dust, sludge, water, soil, sediment [10,21,22], consumer products [7] and foodstuffs [5,6,9,23], but few have been developed for biological fluids [24,25]. In these complex matrices, BPS has systematically been measured after enzymatic hydrolysis which provides a measure of total BPS concentrations, i.e. the concentrations of both BPS and its conjugated metabolites. With this kind of method, BPS-G concentrations can only be assayed by subtracting the unconjugated BPS assayed prior to hydrolysis from the total BPS found after hydrolysis. Such a method is not optimal since a large sample volume is required (which is time-consuming), the use of enzyme constitutes a biological source of variability and specificity for BPS-G is lacking as the usual enzymes target not only BPS-G but other BPS conjugates [26]. Consequently, enzymatic hydrolysis is not a suitable method for TK studies.

The main goal of this study was therefore to develop and validate an original method for the simultaneous quantification of BPS and BPS-G in plasma by on-line SPE-LC–MS/MS. The suitability of this method for TK applications was evaluated by simultaneously monitoring BPS and BPS-G in ovine plasma following intravenous BPS and BPS-G administrations.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bisphenol S (BPS), acetonitrile (AcN), propylene glycol (PG), formic acid (FA) and acetic acid (AA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ethanol (EtOH) and methanol (MeOH) were purchased from Fischer Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Water was provided by an ultrapure water system (Elga Labwater Veolia, Anthony, France). The solvents and acids used for flash chromatography were HPLC grade and those used for liquid chromatography were at least LC–MS grade.

Zinc sulfate ($ZnSO_4$) was purchased from Prolabo (Paris, France). Bisphenol S d8 (BPSd8), bisphenol S glucuronide (BPS-G, used as analytical standard) and bisphenol S glucuronide d8 (BPS-Gd8) were obtained from Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto, Canada).

The same stock solutions of BPS and BPS-G in H_2O/AcN were used to prepare separate working solutions in drug-free sheep plasma for standard curve calibrators and quality control (QC) samples. For the standard curve, the first working solution contained BPS and BPS-G at 10 and 100 $\mu g\,mL^{-1}$, respectively. This first working solution was then diluted in BPS-free sheep plasma to obtain the second working solution at 100 and 1000 $ng\,mL^{-1}$. These working solutions were subsequently diluted in BPS-free sheep plasma to obtain concentrations for the standard curve calibrators ranging from 3 to 5000 $ng\,mL^{-1}$ and 10–50000 $ng\,mL^{-1}$ for BPS and BPS-G, respectively.

QC samples were prepared at concentrations of 9, 250 and 3750 $ng\,mL^{-1}$ and 30,2500 and 37500 $ng\,mL^{-1}$ for BPS and BPS-G, respectively. Calibrators and QC solutions were stored at −20 °C in 100 µL aliquots.

The working solutions of the internal standards (IS, BPSd8 and BPS-Gd8) were prepared using stock solutions of BPSd8 and BPS-Gd8 in H_2O/AcN at 1 $mg\,mL^{-1}$ to obtain a solution at 10 $\mu g\,mL^{-1}$ for BPSd8 and 100 $\mu g\,mL^{-1}$ for BPS-Gd8 in AcN/$ZnSO_4$ (50/50, v/v), and stored at −20 °C. A new IS solution was prepared each week by diluting 100-fold the previous working solution of BPSd8/BPS-Gd8 in AcN/$ZnSO_4$ to obtain concentrations of 100 $ng\,mL^{-1}$ and 1000 $ng\,mL^{-1}$ for BPSd8 and BPS-Gd8, respectively.

2.2. Animal treatment and sample collection

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of humane animal care under agreement number 31-2016-167 from the French Ministry of Agriculture and validated by the ethics committee from the French Ministry of Higher Education and Research (project number: 216-167).

The first experiment was designed to purify a large amount of BPS-G from urine of five ewes that received an oral administration of BPS at the dose of 100 $mg\,kg^{-1}$ bw. Total urine was collected and BPS-G was isolated by flash chromatography, then identified and quantified by LC–MS/MS (see supplementary data).

The TK experiment was carried out on four Lacaune ewes with a mean (± SD) body weight of 59.6 ± 13.5 kg. Each ewe received both BPS (5 $mg\,kg^{-1}$ bw) and BPS-G (2 $mg\,kg^{-1}$ bw) intravenously during two different periods four days apart, according to a cross-over design.

BPS was extemporaneously dissolved in EtOH/H_2O/PG (10/11/79, v/v/v) at 50 $mg\,mL^{-1}$. Purified BPS-G was extemporaneously dissolved in NaCl 0.9% at a concentration of 50 $mg\,mL^{-1}$. BPS and BPS-G were intravenously administered via an indwelling catheter inserted into the left jugular vein just prior to the administration.

Serial blood samples were collected before and at 2, 4, 8, 15, 20, 30 min and 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 21, 24, 34, 48 and 72 h after administration.

Blood samples were obtained by direct puncture of the right jugular vein. They were collected in heparinized tubes, immediately chilled in ice and centrifuged for 10 min at 3000g at 4 °C. The supernatant plasma was aliquoted (100 µL) and stored at −20 °C until assayed.

2.3. Instrument and analytical conditions

2.3.1. Instrument

BPS and BPS-G identification and quantification were performed with a 2D Acquity ultra performance liquid chromatography system (2D-UPLC®) coupled to a Xevo® triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The first UPLC pump was used for sample extraction and the second was used as the analytical pump, both pumps being connected with the autosampler and the mass spectrometer by two 6-port valves integrated in the column heater. Samples were ionized in negative electrospray ionization mode (ESI−). The capillary voltage and source temperature were set at 3.1 kV and 150 °C, respectively. The desolvation temperature and nitrogen flow rate were set at 600 °C and 1000 L

hr^{-1}, respectively. Argon was used as collision gas at a flow rate of 0.15 mL min^{-1}.

2.3.2. Simultaneous quantification of BPS and BPS-G in ovine plasma

BPS and BPS-G plasma samples (100 µL) were extracted from the matrix by adding 100 µL of a $ZnSO_4$/AcN mixture containing IS, to precipitate the proteins. The mixture was shaken at 10 °C for 1 min at 3000 rpm (MB-102, Bioer, Hangzhou, China) and centrifuged for 10 min. The supernatant (10 µL) was first concentrated on an XBridge® C8 Direct Connect HP cartridge (2.1 mm × 30 mm, 10 µm; Waters) at 1 mL min^{-1} flow with 100% H_2O, 0.1% FA for 0.7 min and then eluted on an Acquity CSH C18 column (2.1 mm × 100 mm; 1.7 µm; Waters) at 0.35 mL min^{-1} with an H_2O/AcN linear gradient (0 min, 80% H_2O; 0.7 min 80% H_2O; 3.5 min 40% H_2O). The on-line SPE cartridge and column temperatures were both set at 40 °C. BPS and BPS-G were detected in ESI^- by multiple reactions monitoring (MRM) mode. MRM transitions of BPS, BPS-G and IS with their respective retention times, cone voltages and collision energies are given in Table 1. Chromatographic data were monitored by Masslynx 4.1® software (Waters, Milford, MA, USA).

2.4. Validation procedure

The method was validated according to the European Medicines Agency (EMA) guidelines for bioanalytical method validation [27] in terms of linearity, intra-day and inter-day repeatabilities, sensitivity (low and high) and dilution. Selectivity was tested by comparing six blank plasma chromatograms with chromatograms at the lower limits of quantification (LLOQ). The LLOQs were defined as the lowest concentrations of the calibration curve that could be quantified with less than 20% precision and within an accuracy range of 80–120%. As blank plasma was systematically contaminated by BPS, a limit of blank (LOB) was estimated by measuring 6 replicates of blank plasma and calculating the mean residual BPS and the standard deviation (SD). For both compounds, the LOD (limit of detection) was first estimated from blank plasma with a signal to noise ratio (S/N) of 3 and then verified using 6 replicates of plasma samples spiked at the concentration estimated from the blanks (1 ng mL^{-1}). For the BPS and BPS-G calibration curves, both simple ($Y = aX + b$) and quadratic ($Y = aX^2 + bX + c$) models were tested after applying appropriate weighting: 1, 1/X and $1/X^2$ (X = nominal concentration). Three approaches were adopted to assess the linearity of the calibration curve: (1) calculation of the relative concentration residuals (RCR%) between the nominal concentration and the concentration obtained with the model, which should be lower than ± 15% (except at the LLOQ, ±20%), (2) visual inspection of the residual distribution which should be randomized around the mean and (3) application of a lack of fit test to check the goodness-of-fit of the model. The ULOQ was defined as the highest concentration of the calibration curve that could be quantified without sample dilution. Within-day and between-day precisions and accuracies of BPS and BPS-G were calculated on three different days and with six replicates of QC samples at three concentration levels (low, middle and high) covering the range of the calibration curve concentrations. Precision and accuracy were calculated for twofold and tenfold dilutions to allow sample quantification above the ULOQ. Recovery was evaluated by comparing the analytical response of plasma QC samples obtained after protein precipitation with that of aqueous QC samples diluted in H_2O/AcN (50/50) for the experiment without on-line SPE. For the on-line SPE recovery assay, the response of extracted QC plasma samples eluted on the on-line SPE was compared with aqueous QC samples diluted in H_2O/AcN and eluted without on-line SPE. Matrix effects were assessed by comparing extracted QC plasma samples with extracted aqueous QC samples, and were determined with and without on-line SPE.

2.5. Toxicokinetic analysis

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

The BPS and BPS-G concentrations were converted into molar concentrations. The area under the plasma concentration-time curve (AUC_{last}) from dosing time to the last sampling time was calculated using the linear-up/log-down rule. The AUC from t = 0 to infinity (AUC_{inf}) was obtained by adding to AUC_{last}, the area extrapolated from the last observation to infinity by dividing the last observed quantifiable plasma concentration by the slope of the terminal phase as estimated by linear regression, using the best fit option of Phoenix®.

The clearance (Cl), mean residence time (MRT), terminal half-life ($t_{1/2}$) and steady-state volume of distribution (V_{ss}) of BPS (BPS-G) were computed with AUC_{inf} using classical pharmacokinetic equations [28].

For each ewe, the extent of BPS glucuronoconjugation over the sampling period was first calculated as the ratio of BPS-G AUC_{last} obtained after BPS and BPS-G administration, after normalizing by the administered molar doses of BPS and BPS-G (equation 1), assuming that the BPS-G clearance was the same after both BPS and BPS-G administration.

$$BPS\ glucuronoconjugation = \frac{AUC_{last\ BPS-G\ after\ BPS}}{AUC_{last\ BPS-G\ after\ BPS-Gly}} \times \frac{Dose_{BPS-Gly}}{Dose_{BPSly}} \quad (1)$$

However, equation 1 indicated that mean BPS glucuronidation was higher than 100%, suggesting that BPS-G clearances varied between the two periods [29]. To take this factor of variation into account, the ratio of the half-lives of BPS-G after BPS and BPS-G administration was incorporated as a surrogate of the clearance in Eq. (1) to correct the BPS glucuronidation rate in equation 2 [30].

$$BPS\ glucuronoconjugation = \frac{AUC_{last\ BPS-G\ afterBPSly}}{AUC_{last\ BPS-G\ afterBPS-Gly}} \times \frac{Dose_{BPS-Gly}}{Dose_{BPSly}} \times \frac{t_{1/2BPS-Gafter\ BPS-Gly}}{t_{1/2BPS-Gafter\ BPSly}} \quad (2)$$

3. Results and discussion

3.1. Production of BPS-G from sheep urine

Considering the large amount of BPS-G required for its use in TK studies and the high cost of this metabolite, BPS-G was produced from sheep urine by adapting a method previously used to purify several grams of BPA-G [19]. Briefly, BPS was administered orally to the sheep to be metabolized to BPS-G and subsequently eliminated in the urines that were collected and purified by flash chromatography. The resulting fractions were identified and quantified by UPLC–MS/MS (see supplementary data). Finally, 2.8 g of BPS-G was isolated with a purity ranging from 68 to 85%, which is suitable for use in TK studies.

3.2. Simultaneous quantification of BPS and BPS-G

A major limitation of bisphenol assays in biological matrices is the potential background contamination from solvents, SPE cartridges, the evaporation process or plastic ware [31], which can lead to erroneous measurements of concentrations when dealing with the ng mL^{-1} range. For this reason, sample handling and contact

Table 1
BPS and BPS-G molecular properties and mass data.

Molecule	Molar weight	Retention time (min)	Parent ions	Daughter ions	Cone voltage (V)	Ecoll (eV)
BPS	250	3.04	249.10	92	42	33
				108[a]		26
BPSd8	258	3.07	257.10	95	40	34
				112[a]		28
BPS-G	426	2.55	425.16	108	26	46
				249[a]		28
BPS-Gd8	434	2.55	433.16	112	26	56
				257[a]		28

[a] MRM transition used for quantification.

with potentially contaminated material were minimized as much as possible by pretreating the plasma samples by simple protein precipitation.

Firstly, BPS and BPS-G were eluted on a C18 BEH column with AcN, as previously described for the simultaneous quantification of BPA and BPA-G [19]. However, despite their similar structures, neither BPS nor BPS-G were correctly eluted and detected under these conditions. Indeed, BPS-G (LogP = −0.33) is much more polar than BPA (LogP = 3.43) and BPA-G (LogP = 1.12), and so the resulting supernatant obtained by AcN precipitation was insufficiently polar to correctly elute BPS-G on this C18 column, leading to split peaks (Fig. 1). Therefore, a completely new method was developed for simultaneous BPS and BPS-G quantification.

First of all, other precipitant mixtures using a more polar solvent (MeOH), acidified water (TFA) or metallic ions ($ZnSO_4$) were tested in different proportions to determine the best elution conditions for both BPS and BPS-G. MeOH precipitation gave the same results as those obtained with AcN and precipitation under acidic conditions hindered the subsequent negative ionization of BPS and BPS-G. The combined use of $ZnSO_4$ with AcN made it possible to reduce the volume of organic solvent without disturbing protein precipitation and MS detection. Finally, the best peak symmetry and sensitivity for both compounds was obtained with the AcN/$ZnSO_4$ (1/1, v/v) combination. Recovery for BPS was 108%, but very low for BPS-G (2%) with few matrix effects for BPS (106%) and considerable ion suppression plus matrix effects for BPS-G (4%) (Table 2). Under these conditions, BPS-G could be differentiated from the baseline above a concentration of 50 ng mL^{-1}. Contrary to BPA and BPA-G, the use of protein precipitation alone was insufficient to provide good sensitivities and consistent recoveries, particularly for BPS-G.

On-line SPE liquid chromatography is an appropriate extraction process to minimize sample treatment and therefore limit sample contamination, and to maximize analyte recovery [32,33]. Thus, different SPE cartridges (C8, C18 and polymeric phase) were tested and the washing solvent composition and elution time were optimized to concentrate BPS and BPS-G and obtain consistent recoveries. The best results were obtained by using a C8 cartridge with a loading time of 0.7 min with 100% of water acidified with 0.1% formic acid. Although formic acid can reduce negative ionization, its presence considerably improved the peak symmetry of BPS and BPS-G (Fig. 2). Extraction efficiency was 31 and 106% for BPS and BPS-G, respectively with a matrix effect of about 45% for BPS and 71% for BPS-G. Oddly, an increase in the matrix effects was observed for BPS when the on-line SPE system was used (Table 2). The preconcentration of BPS and BPS-G generated by the SPE system might also result in simultaneous pre-concentration of the plasma impurities. However, this system does allow the improvement of BPS and BPS-G peak symmetry and significantly enhances BPS-G detection. Indeed, the peak area of BPS-G was 56-fold higher when on-line SPE was used (Table 2).

Different analytical columns and gradients were then tested to see which provided suitable BPS and BPS-G elution within the shortest run time. The best separation was obtained in 4.5 min on a CSH C18 column, with retention times of 3.0 min and 2.5 min, for BPS and BPS-G, respectively. Two MRM transitions were optimized for each compound, namely 249 > 92 and 249 > 108 for BPS (corresponding to the loss of $C_6H_5SO_3$ and $C_6H_5SO_2$ respectively) [34], and 425 > 249 and 425 > 108 for BPS-G (loss of the glucuronide moiety and $C_6H_5SO_2$, respectively). The MRM transition yielding the highest signal to noise ratio and the highest intensity was selected for quantification and the second MRM transition was used for confirmation (Table 1).

3.2.1. Validation of the method

3.2.1.1. Linearity, ULOQ, dilution. For BPS, calibration curves with concentrations ranging from 3 to 5000 ng mL^{-1} was validated using a simple model weighted by $1/X^2$. For BPS-G, calibration curves with concentrations ranging from 10 to 50 000 ng mL^{-1} was validated using a quadratic model weighted by $1/X^2$. Due to the very wide range of concentrations required for TK studies, both the ULOQ and dilution were assessed by injecting 6 standard samples at 5000 and 50 000 ng mL^{-1} for BPS and BPS-G, respectively, and 6 QC samples out of the concentration range diluted two fold and tenfold. The accuracies of all the concentrations, for both BPS and BPS-G, ranged from 84% to 103% with CV precision lower than 13%. These results fulfilled the acceptability criteria designated in the EMA guidelines as suitable for TK investigations [37].

3.2.1.2. Sensitivity. In blank plasma, a residual peak was systematically observed for BPS, likely due to BPS contamination during plasma collection, sample processing or owing to the presence of BPS in the LC system [31,35]. Therefore, the LOB was first evaluated. The residual BPS concentration found in blank plasma was 0.5 ± 0.5 ng mL^{-1}. The mean concentration calculated after injection of 6 samples at 1 ng mL^{-1}, was 1.2 ± 0.7 ng mL^{-1}. This concentration was different from LOB and was designated LOD. No BPS-G peak was detected in the blank plasma samples at the BPS-G retention time. According to the S/N = 3 principle, the estimated LOD was close to 1 ng mL^{-1}. After 6 injections of BPS-G at 1 ng mL^{-1}, the mean concentration was 1.4 ng mL^{-1} (CV% = 39%) [37]. The LLOQs were set and validated at the lowest value of the calibration curve chosen for its relevance, with acceptable precision and accuracy, to TK investigations. According to these criteria, the LLOQs determined for BPS and BPS-G were 3 and 10 ng mL^{-1}, respectively (Table 3). The BPS LLOQ was much higher than values published elsewhere [36]. Further optimizations would be necessary to increase the sensitivity of our method such as adding an isolator column between the injector and the analytical column to prevent the BPS background contamination generated by the LC-MS/MS system [35] or using dansyl derivatization to improve the ionization and elution of BPS and BPS-G [36,37]. Nevertheless, this method is not designed for human biomonitoring and its LLOQs are totally suitable for our TK investigations.

3.2.1.3. Precision and accuracy. Intra- and inter-day precisions were systematically lower than 8% for BPS and 15% for BPS-G and

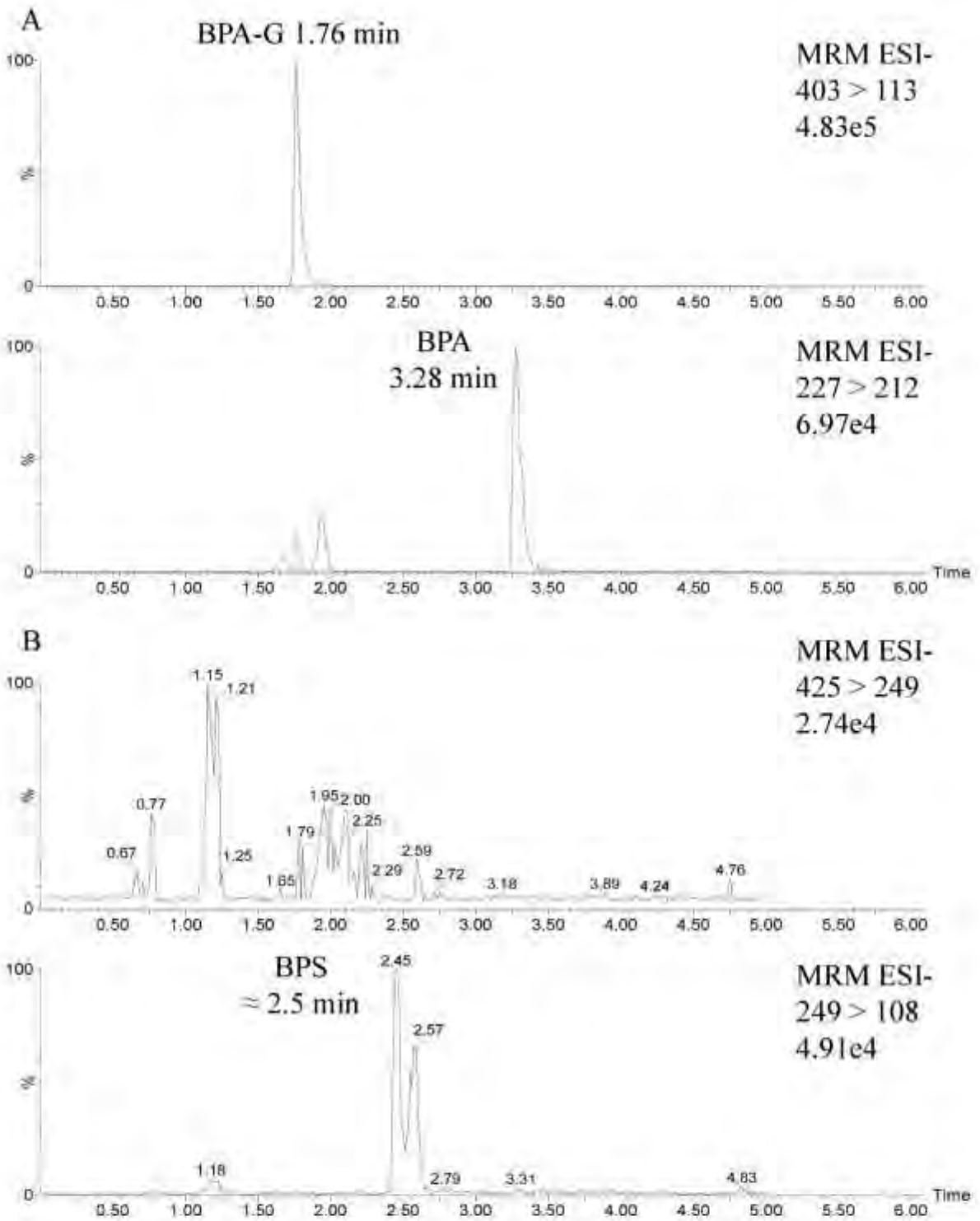


Fig 1. Chromatograms obtained after acetonitrile precipitation of plasma containing BPA and BPA-G (A), BPS and BPS-G (B) at 100 ng mL^{-1} following by elution on BEH C18 column [19]. These conditions do not allow the detection of BPS-G. BPS is very poorly eluted with a split peak.

accuracy ranged from 100 to 113% for BPS and from 96 to 105% for BPS-G (Table 3). Both parameters therefore satisfied the acceptance criteria in the EMA guidelines [27].

3.2.1.4. Stability. The long-term stability of BPS and BPS-G stock solutions in H_2O/AcN (1/1, v/v) was checked by comparing the analytical response of the stock solution stored at 4 °C with that of freshly prepared stock solutions of BPS and BPS-G. Stock solutions of BPS were found to remain stable at 4 °C for at least one year, and those of BPS-G for at least 4 months, the variation in analytical response being lower than 5% and 1% for BPS and BPS-G, respectively. The long-term stability of BPS and BPS-G in plasma was assayed by comparing the concentrations of six plasma samples stored at −20 °C with those of six freshly-prepared plasma samples.

Table 2
Contribution of the on-line SPE system to method performances.

Parameters	Mode of evaluation	Mean QC BPS (%)	Mean QC BPS-G (%)
Recovery without on-line SPE	plasma with PP/H_2O without PP	108	7
Matrix effect without on-line SPE	plasma with PP/H_2O with PP	106	4
Matrix effect with on-line SPE	On-line SPE plasma with PP/On-line SPE H_2O with PP	45	71
Global recovery (SPE + PP + matrix effect)	On-line SPE plasma with PP/H_2O without PP	31	106
Sensitivity gain without vs with on-line SPE	On-line SPE plasma with PP/plasma with PP	29	5600

PP = protein precipitation.

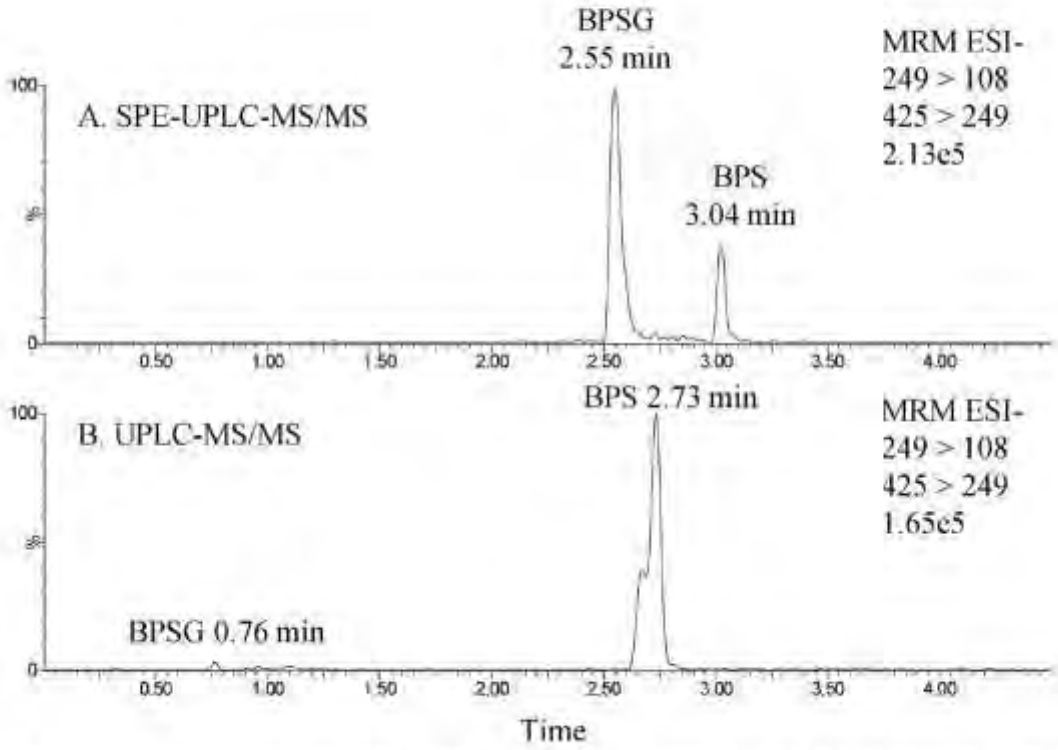


Fig. 2. Comparison of two chromatograms of low QC samples of BPS and BPS-G (9 and 30 ng mL^{-1}, respectively): (A) BPS (RT = 3.04 min) and BPS-G (RT = 2.55 min) analyzed by SPE-UPLC-MS/MS and (B) BPS (RT = 2.73 min) and BPS-G (RT = 0.76 min) analyzed by UPLC-MS/MS.

Table 3
Validation results of BPS and BPS-G in sheep plasma.

BPS nominal concentration (ng mL^{-1})	Mean (ng mL^{-1})	Accuracy (%)	Precision CV (%)		BPS-G nominal concentration (ng mL^{-1})	Mean (ng mL^{-1})	Accuracy	Precision CV (%)	
			Intra-day	Inter-day				Intra-day	Inter-day
LLOQ 3 (n = 18)	2.79	93	13	13	LLOQ 10 (n = 6)	8.4	84	14	–
ULOQ 5 000 (n = 6)	4 348	87	13	–	ULOQ 50 000 (n = 6)	51 500	103	10	–
Dilution (n = 6)					Dilution (n = 6)				
1/2 4 000	3354	84	3	–	1/2 40 000	38 548	96	3	–
1/10 800	727	91	3	–	1/10 8 000	8 047	101	4	–
QC (n = 18)					QC (n = 18)				
9	10.2	113	8	8	30	31	105	11	15
250	264	106	7	6	2 500	2 411	96	3	7
3 750	3 734	100	6	9	37 500	36 264	97	6	7

The QC concentrations were within ±15% of their nominal value. Plasma samples can be stored at -20 °C for at least 3 months as the difference between the concentrations of freshly QC and stored QC was less than 5% and 8% for BPS and BPS-G, respectively. Stability during the residence time in the autosampler at 10 °C was evaluated by assaying BPS and BPS-G in QC samples (low, middle and high) at t0, 6 h and 10 h after extraction. The resulting QC concentrations were close to their nominal values for BPS and BPS-G (±15% and ±14%, respectively) for at least 10 h. This stability means that numerous plasma samples can be assayed by batch analysis.

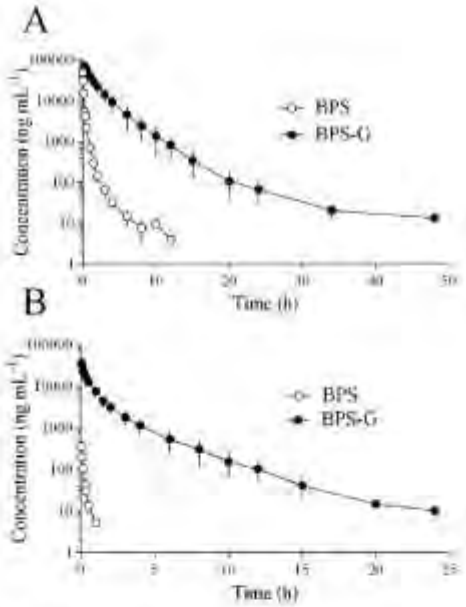


Fig. 3. Mean ± SD of plasma concentrations of BPS (□) and BPS-G (■) versus time after an intravenous administration of BPS (5 mg kg^{-1} bw) (A) or after an intravenous administration of BPS-G (2 mg kg^{-1} bw) (B) in four sheep. The profile of BPS concentrations observed after the BPS-G intravenous administration (B) could be due to contamination (1.94%) of the BPS-G dose purified from sheep urine.

Table 4
Mean (± SD) toxicokinetic parameters of BPS and BPS-G, BPA and BPA-G [18] from sheep after an iv administration. (Cl: plasma clearance, Vss: Volume of distribution at steady state, MRT: Mean residence time, t1/2: half-life).

Toxicokinetic parameters	BPS (n = 4)	BPS-G (n = 4)	BPA (n = 8)	BPAG (n = 7)
Cl (L/(kg.h))	0.57 ± 0.13	0.08 ± 0.02	1.75	0.33
Vss (L kg^{-1})	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.03	1.28	0.32
MRT (h)	0.30 ± 0.04	1.7 ± 0.4	0.75	0.84
$t_{1/2}$ (h)	1.80 ± 0.44	2.8 ± 0.6	1.6	0.9

3.3. Applicability of the method for toxicokinetic studies of BPS and BPS-G

The validated method permitting the simultaneous quantification of BPS and BPS-G in ovine plasma was then applied to a TK experiment. Fig. 3 shows the time course of mean plasma concentrations (±SD) of BPS and BPS-G in ewes after an intravenous administration of BPS (5 mg kg^{-1} bw, Fig. 3A) or BPS-G (2 mg kg^{-1} bw, Fig. 3B).

After an intravenous administration of BPS, BPS could be quantified up to 12 h with concentrations decreasing from 50 μg mL^{-1} to LLOQ. As shown in Fig. 3, BPS was rapidly metabolized into BPS-G, the levels of this latter attaining 10–20 μg mL^{-1} as early as two minutes post injection and a maximum concentration 15 min after injection. BPS-G could be quantified up to 48 h with concentrations ranging from 70 μg mL^{-1} to LLOQ.

After an intravenous administration of purified BPS-G, BPS-G concentrations decreased over 24 h from 50 μg mL^{-1} to LLOQ. BPS could also be detected with concentrations decreasing from 350 ng mL^{-1} at 2 min post-injection to LLOQ up to one hour after BPS-G administration (Fig. 3B). BPS contamination of the BPS-G dose purified from urine was below 4.4% (see section 2.4.3). The putative contamination of the administered BPS dose was calculated by multiplying the BPS AUC_{last} obtained after intravenous BPS-G administration by the clearance of BPS (Table 4). The estimated back-calculated amount of BPS contamination was 23.2 μg kg^{-1} bw, which corresponds to 1.94 ± 0.26% of the BPS-G dose (2 mg kg^{-1} bw). This result is in agreement with the estimated BPS contamination in purified BPS-G, but a potential *in vivo* hydrolysis of BPS-G into BPS cannot be excluded.

Finally, we demonstrated the suitability of our analytical method for determining the time course of both BPS and BPS-G concentrations in plasma in the same run without resorting to enzymatic hydrolysis. This direct method offers two main advantages since it can be considered as more reliable than enzymatic hydrolysis and is also less time-consuming and definitely cheaper [15,37].

The TK parameters describing the disposition of BPS-G in sheep are shown in Table 4. The plasma clearance of BPS-G was 7-fold lower than that of BPS, and the BPS-G half-life was consistently 1.5-fold higher. BPS was extensively conjugated into BPS-G after BPS administration, with glucuronoconjugation of 75 ± 4% over 72 h, a value in agreement with the mean percentage conjugation of BPS (97%) measured in human urine [38]. Moreover, *in vitro* metabolism studies showed that the BPS glucuronoconjugate was the main metabolite in the HepaRG cell line [12].

In adult sheep, BPS (like BPA) was rapidly and mainly metabolized into its glucuronide form, which is devoid of estrogenic activity [13,39,40]. The volumes of distribution of BPS and BPS-G (0.17 and 0.13 L kg^{-1}, respectively) were of the same order of magnitude as the extravascular volume (0.245 L kg^{-1} [41]), suggesting that their distribution in tissues would be limited to the interstitial space. The lower steady state distribution volumes, compared to those of BPA (ten-fold for BPS) and BPA-G (three-fold for BPS-G), were consistent with their lower lipophilicities.

Furthermore, the BPS and BPS-G plasma clearances are respectively about 2-fold and 4-fold lower than those of BPA and BPA-G [18,40], suggesting that the capacity to eliminate BPS is less than for BPA. Even though BPS is a structural analog of BPA, it clearly displays a different disposition within the organism, which highlights the importance of BPS and BPS-G TK investigations.

4. Conclusion

The present paper describes a novel on-line SPE-UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of BPS and BPS-G in plasma. This method, validated according to the EMA guidelines, proved to be especially suitable for TK studies. Therefore, the first TK parameters of BPS and BPS-G were estimated and compared with TK parameters of BPA. The main advantage of this method is its ability to rapidly quantify both BPS and BPS-G, within 4.5 min, which allows the analysis of 200 samples per day including sample preparation.

Competing financial interests

The authors declare no conflicts of interest.

Funding sources

This work was supported by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses [grant number 2015/1/112, 2015].

Acknowledgments

The authors thank the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses for funding this project [grant number 2015/1/112, 2015] and C. Lacassagne and N. Deschamps for their assistance and involvement in animal care.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020.

References

[1] ANSES, Environmental and Occupational Health & Safety on the Assessment of the Risks Associated with Bisphenol A for Human Health, and on Toxicological Data and Data on the Use of Bisphenols S, F, M, B, AP, AF and BADGE, OPINION of the French Agency for Food, 2013. Available at: https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-1.pdf (Accessed 19 July 2016).

[2] United States Environmental Protection Agency, Bisphenol A alternatives in thermal paper, 2014. http://www2.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf. (Accessed 26 January 2017).

[3] S.S. Andra, P. Charisiadis, M. Arora, J.V. van Vliet-Ostaptchouk, K.C. Makris, Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A, Environ. Int. 85 (2015) 352–379, http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.011.

[4] C. Liao, K. Kannan, Concentrations and profiles of bisphenol a and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 4655–4662, http://dx.doi.org/10.1021/jf400445n.

[5] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 683 (2011) 227–233, http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.034.

[6] J. Regueiro, T. Wenzl, Development and validation of a stable-isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of bisphenols in ready-made meals, J. Chromatogr. A 1414 (2015) 110–121, http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.037.

[7] C. Liao, K. Kannan, A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 67 (2014) 50–59, http://dx.doi.org/10.1007/s00244-014-0046-8.

[8] C. Liao, F. Liu, K. Kannan, S. Bisphenol, A new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 6515–6522, http://dx.doi.org/10.1021/es300876n.

[9] C. Liao, K. Kannan, A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China, Food Addit. Contam. Part A 31 (2014) 319–329, http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.868611.

[10] C. Liao, F. Liu, Y. Guo, H.-B. Moon, H. Nakata, Q. Wu, K. Kannan, Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several asian countries: implications for human exposure, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 9138–9145, http://dx.doi.org/10.1021/es302004w.

[11] K.A. Thayer, K.W. Taylor, S. Garantziotis, S.H. Schurman, G.E. Kissling, D. Hunt, B. Herbert, R. Church, R. Jankowich, M.I. Churchwell, R.C. Scheri, L.S. Birnbaum, J.R. Bucher, A. Bisphenol, Bisphenol S, and 4-hydroxyphenyl 4-isopropoxyphenyl sulfone (BPSIP) in urine and blood of cashiers, Environ. Health Perspect. 124 (2016) 437–444, http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1409427.

[12] V. Le Fol, S. Ait-Aissa, N. Cabaton, L. Dolo, M. Grimaldi, P. Balaguer, E. Perdu, L. Debrauwer, F. Brion, D. Zalko, Cell-Specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-S in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 3860–3868, http://dx.doi.org/10.1021/es505302e.

[13] D. Gramec Skledar, L. Peterlin Mašič, Bisphenol A and its analogs: do their metabolites have endocrine activity, Environ. Toxicol. Pharmacol. 47 (2016) 182–199, http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.014.

[14] X. Ye, L.-Y. Wong, J. Kramer, X. Zhou, T. Jia, A.M. Calafat, Urinary concentrations of bisphenol a and three other bisphenols in convenience samples of U.S. adults during 2000–2014, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 11834–11839, http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b02135.

[15] C. Liao, F. Liu, H. Alomirah, V.D. Loi, M.A. Mohd, H.-B. Moon, H. Nakata, K. Kannan, Bisphenol S in urine from the United States and seven asian countries: occurrence and human exposures, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 6860–6866, http://dx.doi.org/10.1021/es301314j.

[16] D. Chen, K. Kannan, H. Tan, Z. Zheng, Y.-L. Feng, Y. Wu, M. Widelka, Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 5438–5453, http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b05387.

[17] J.R. Rochester, A.L. Bolden, S.F. Bisphenol, A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes, Environ. Health 123 (2015) 643–650, http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1408989.

[18] G. Gauderat, N. Picard-Hagen, P.-L. Toutain, T. Corbel, C. Viguié, S. Puel, M.Z. Lacroix, P. Mindeguia, A. Bousquet-Melou, V. Gayrard, Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fecal exposure to bisphenol A, Environ. Int. 86 (2016) 52–59, http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.006.

[19] M.Z. Lacroix, S. Puel, S.H. Collet, T. Corbel, N. Picard-Hagen, P. Toutain, C. Viguié, V. Gayrard, Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations, Talanta 85 (2011) 2053–2059, http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.040.

[20] N. Caballero-Casero, L. Lunar, S. Rubio, Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids, A Rev. Anal. Chim. Acta 908 (2016) 22–53, http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.034.

[21] L. Lu, Y. Yang, J. Zhang, B. Shao, Determination of seven bisphenol analogues in reed and calitrichaceae by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B 953–954 (2014) 80–85, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.001.

[22] Y. Yang, L. Lu, J. Zhang, Y. Yang, Y. Wu, B. Shao, Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1328 (2014) 26–34, http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.074.

[23] J. Regueiro, T. Wenzl, Determination of bisphenols in beverages by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 2015 (1422) 230–238, http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.046.

[24] Y. Yang, J. Guan, J. Yin, B. Shao, H. Li, Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China, Chemosphere 112 (2014) 481–486, http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.004.

[25] J. Liu, J. Li, Y. Wu, Y. Zhao, F. Luo, S. Li, L. Yang, E.K. Moez, I. Dinu, J.W. Martin, Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum, Environ. Sci. 51 (2017) 2456–2463, http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b05718.

[26] S.S. Andra, C. Austin, J. Yang, D. Patel, M. Arora, Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: exposure biomarker perspectives, Sci. Total Environ. 572 (2016) 770–781, http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.062.

[27] European Medicines Agency – Guideline on bioanalytical method validation (2011), http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. (Accessed 23 March 2017).

[28] M. Gibaldi, D. Perrier, Pharmacokinetics, 2nd ed., Marcel Dekker, New York NY, 1982.

[29] M.O. Karlsson, L.B. Sheiner, Estimating bioavailability when clearance varies with time, Clin. Pharmacol. Ther. 55 (1994) 623–637, http://dx.doi.org/10.1038/clpt.1994.79.

[30] P.L. Toutain, A. Bousquet-Mélou, Bioavailability and its assessment, J. Vet. Pharmacol. Ther. (2004) 455–466, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x.

[31] N. Gabriel, M.Z. Lacroix, S. Chanthavisouk, N. Picard-Hagen, V. Gayrard, J. Parinaud, R.D. Léandri, Bisphenol A in culture media and plastic consumables used for ART, Hum. Reprod. 31 (2016) 1436–1444, http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dew116.

[32] X. Ye, Z. Kuklenyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, Automated on-line column-switching HPLC–MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine, Anal. Chem. 77 (2005) 5407–5413, http://dx.doi.org/10.1021/ac0503904.

[33] A. Cariot, A. Dupuis, M. Albouy-Llary, B. Legube, S. Rabouan, V. Migeot, Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC–MS/MS method, Talanta 100 (2012) 175–182, http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.034.

[34] H. Zhao, L. Xiang, J. Li, Z. Yang, J. Fang, C. Zhao, S. Xu, Z. Cai, Investigation on fragmentation pathways of bisphenols by using electrospray ionization orbitrap mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 30 (2016) 1901–1913.

[35] J. Y. Niu, Y. Wu Zhang, Simoltaneous determination of bisphenol A and alkylphenol in plant oil by gel permeation chromatography and isotopic dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5248–5253, http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.005.

[36] J. Liu, J. Li, Y. Wu, Y. Zhao, F. Luo, S. Li, L. Yang, E.K. Moez, I.A. Dinu, J.W. Martin, Bisphenol A metabolites and Bisphenol S in paired maternal and cord serum, Environ. Sci. Technol. (2017), http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b05718.

[37] B.A. Rocha, B.R.B. da Costa, N.C.P. de Albuquerque, A.R.M. de Oliveira, J.M.O. Souza, M. Al-Tameemi, A.D. Campiglia, F. Barbosa Jr., A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Talanta 154 (2016) 511–519, http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.098.

[38] X. Zhou, J.P. Kramer, A.M. Calafat, X. Ye, Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine, J. Chromatogr. B 944 (2014) 152–156, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.009.

[39] D.G. Skledar, J. Schmidt, A. Fic, I. Klopčič, J. Trontelj, M.S. Dolenc, M. Finel, L.P. Mašič, Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S, Chemosphere 157 (2016) 152–159, http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.027.

[40] S.H. Collet, N. Picard-Hagen, M.Z. Lacroix, S. Puel, C. Viguié, A. Bousquet-Melou, P.-L. Toutain, V. Gayrard, Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A, Toxicol. Appl. Pharmacol. 284 (2015) 323–329, http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.024.

[41] J.P. Coghlan, J.S. Fan, B.A. Scoggins, A.A. Shulkes, Measurement of extracellular fluid volume and blood volume in sheep, Aust. J. Biol. Sci. 30 (1977) 71–84, http://dx.doi.org/10.1071/BI9770071.

IV. Conclusion

Le développement des outils analytiques nécessaires à la purification du BPSG ainsi qu'au dosage du BPS et du BPSG, qui constituait une étape préalable à l'étude de la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire, a été réalisé avec succès et valorisé sous forme d'une publication et d'une communication orale.

Environ 2.8 g de BPSG ont été collectés avec une pureté allant de 68 à 85 %. Une légère contamination en BPS s'élevant au maximum à 4.4 % de la quantité de BPSG a été observée dans certaines fractions de BPSG purifié. Le BPSG produit a ensuite été utilisé pour l'évaluation de la disposition du BPSG pour les différentes études TK du projet. Le faible niveau de contamination du BPSG par le BPS n'a pas eu d'impact sur nos analyses TK.

La méthode de dosage simultané du BPS et du BPSG a été validée selon les lignes directrices de l'EMA. Cette méthode permet la séparation en UPLC et la détection en MS/MS du BPS et du BPSG dans le plasma ovin en moins de 5 min avec une gamme de concentration qui s'étend de 3 à 5000 ng/mL pour le BPS et de 10 à 50 000 ng/mL pour le BPSG assurant un débit d'analyse de 250 échantillons/jour.

Cette méthode a été appliquée à une étude TK préliminaire du BPS et du BPSG chez la brebis. Les clairances plasmatiques respectives du BPS et du BPSG étaient de 0.57 et 0.08 L/(kg*h), soit respectivement 2 et 4 fois plus faibles que celles déterminées pour le BPA (1.75 L/(kg*h)) et le BPAG (0.33 L/(kg*h))[157]. Le taux de glucuronoconjugaison du BPS a été estimé à 75 % ; cette valeur est cohérente avec le taux de glucuronoconjugaison déterminé *in vitro* sur les cellules HepaRG [74] et *in vivo* chez le zebrafish adulte [104] et la souris [73] et confirme le caractère majoritaire de cette voie de métabolisation.

Par la suite, la méthode présentée dans l'article 1 a été appliquée à des formes deutérées du BPS et du BPSG (BPS-d8 et BPSG-d8) utilisées sans les études TK sur la brebis gravide, pour discriminer le BPS et le BPSG issus de la mère de ceux issus du fœtus.

Cette méthode a été validée dans le plasma, le liquide amniotique, l'urine, le milieu de perfusion placentaire et les tissus (foie, hypothalamus, hippocampe, hypophyse, cotylédon, surrénale, gonade) (Tableau 9) afin de déterminer les concentrations en BPS et BPSG dans les échantillons collectés au cours des trois études expérimentales présentées ci-après.

Tableau 9 : Principaux paramètres de la méthode de dosage du BPS et du BPSG ainsi que leurs composés deutérés (BPS-d4, BPS-d8 et BPSG-d8) dans les matrices biologiques.

Matrice biologique	LLOQ (ng/mL)					ULOQ (ng/mL)				
	BPS	BPS-d8	BPS-d4	BPSG	BPSG-d8	BPS	BPS-d8	BPS-d4	BPSG	BPSG-d8
Plasma	3	1	-	10	10	5000	5000	-	50 000	50 000
Liquide amniotique	1	1	-	10	10	5000	5000	-	50 000	50 000
Urine	100	50	-	100	100	10 000	10 000	-	100 000	100 000
Milieu de perfusion	1	-	1	5	-	100	-	100	1000	-
Tissus	5	-	-	5	-	1000	1000	-	1000	-

LLOQ = Lower Limit Of Quantification, ULOQ = Upper Limit Of Quantification.

Dans cette première étude expérimentale, les outils analytiques nécessaires à l'étude de la disposition du BPS et du BPSG ont été développés. Le BPSG a été produit et purifié en grande quantité. Une méthode adaptée au dosage du BPS et du BPSG dans des échantillons de plasma collectés au cours d'une étude TK a été mise au point et validée. L'applicabilité de cette méthode a été confirmée par l'estimation des paramètres TK du BPS et du BPSG chez la brebis adulte. De plus, cette méthode a été adaptée et validée afin de permettre le dosage du BPS et du BPSG dans l'ensemble des échantillons collectés au cours des études suivantes, quelle que soit la matrice biologique.

L'objectif de la deuxième partie de nos études expérimentales est de déterminer les paramètres TK du BPS et du BPSG sur le modèle intégratif de la brebis gravide et sur le modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé et de les comparer à ceux du BPA et du BPAG afin d'évaluer les mécanismes déterminant l'exposition fœtale au BPS et au BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire.

Disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire ovine

I. Contexte et objectifs

La présence du BPS peut être considérée comme ubiquitaire dans l'environnement comme en témoigne la détection de BPS dans 81 % des échantillons urinaires issus de la population générale dans sept pays asiatiques et aux États-Unis [92]. L'augmentation de la fréquence de détection du BPS dans des échantillons d'urine collectés entre 2000 et 2014 chez des volontaires adultes aux États-Unis illustre le caractère effectif de la substitution du BPA par le BPS [76]. De plus, du BPS a été détecté dans des échantillons de sérum maternel et de sérum de cordon, montrant ainsi que le BPS peut passer la barrière placentaire [14].

À l'instar du BPA, le BPS a fait l'objet d'études *in vitro* et *in vivo* indiquant un potentiel perturbateur endocrinien œstrogénomimétique [15,37,38]. Or, la période de la gestation est considérée comme une période à risque au cours de laquelle le fœtus en développement est particulièrement sensible aux perturbateurs endocriniens. À ce jour, les données toxicologiques concernant l'exposition du fœtus ou du nourrisson au BPS sont inexistantes.

Dans ce contexte, l'étude de la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire est indispensable pour contribuer à évaluer le risque, pour la santé humaine, lié à l'exposition au BPS. Les objectifs de cette étude étaient d'estimer les paramètres TK du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire ovine afin d'évaluer les mécanismes de l'exposition fœtale au BPS et de les comparer à ceux qui contrôlent l'exposition fœtale au BPA.

Les particularités de la TK fœtale du BPS et du BPSG dont la persistance du BPSG associée à sa réactivation dans le compartiment fœtal nous ont conduits à étudier l'accumulation du BPS dans ce compartiment (Article 2). Ces résultats ont été valorisés sous forme de communications orales, de communications affichées et d'un article publié dans la revue « Environment International ».

II. Article 2

Environment International 120 (2018) 584–592

Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint

Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit

Flore C. Grandin[a], Marlène Z. Lacroix[c], Véronique Gayrard[a], Glenn Gauderat[a], Hanna Mila[a], Pierre-Louis Toutain[b], Nicole Picard-Hagen[a,*]

[a] Toxalim, INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Université de Toulouse, ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), EIP (Ecole d'Ingénieurs de Purpan), UPS (Université Paul Sabatier), Toulouse, France
[b] The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom
[c] INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Handling Editor: Lesa Aylward

Keywords:
Bisphenol S
Bisphenol S Glucuronide
Toxicokinetic
Fetal exposure
Bisphenol A analogue

ABSTRACT

Bisphenol S (BPS) is widely used as a substitute for Bisphenol A in consumer products. Despite its potential endocrine-disrupting effects and widespread exposure, toxicokinetic data, particularly during the critical period of pregnancy, are not available for BPS. The objectives of our study were to evaluate the mechanism determining fetal exposure to BPS and to BPS-glucuronide (BPSG) and to compare them with those prevailing for BPA.

The disposition of BPS and BPSG was evaluated in the materno-fetal unit of the catheterized pregnant ewe model, following intravenous administrations of BPS and BPSG to mothers and their fetuses. In a second experiment, the rate of BPS accumulation in the fetal compartment was determined under steady-state conditions after repeated intravenous BPS administrations to the mother.

In the maternal compartment, BPS was mainly metabolized into BPSG and totally eliminated in urine. Only 0.40% of the maternal dose was transferred to the fetus. However, once in the fetal compartment, 26% of the fetal dose was rapidly eliminated through placental transfer, while 46% of BPS was metabolized into BPSG which remained trapped in the fetal compartment. Thus, the elimination of BPSG from the fetal compartment required its back-conversion into bioactive BPS, leading to an 87% enhancement of the fetal BPS exposure.

Our findings demonstrate that, despite the low materno-fetal placental transfer of BPS, this substitute for BPA is able to accumulate in the fetal compartment after repeated maternal exposure, leading to chronic fetal exposure to BPS in a range of concentrations similar to those of BPA.

1. Introduction

Owing to regulatory actions and serious concerns regarding widespread human exposure to Bisphenol A (BPA) and its adverse effects on human health, BPA has been replaced with structurally similar compounds such as Bisphenol S (BPS) (ANSES, 2013; USEPA, 2014). Due to its higher thermal stability, BPS is increasingly being used as an intermediate for the production of polycarbonate plastics and epoxy resins in a range of consumer products including canned foodstuffs, thermal paper and personal care products (Wu et al., 2018).

BPS is now ubiquitous in the environment and is found worldwide. As for BPA, human exposure to BPS may occur mainly through ingestion, but also by inhalation and transcutaneous routes (Wu et al., 2018). The estimated median daily dietary intake of BPS is 9.55 ng/kg body weight/day (Liao and Kannan, 2014). In humans, BPS is mainly metabolized in the liver into bisphenol S glucuronide (BPSG) and eliminated in urine (Gramec Skledar and Peterlin Mašič, 2016; Le Fol et al., 2015).

Human biomonitoring studies recently conducted in the general population of the USA and seven Asian countries revealed the presence of BPS in 81% of the 315 urine samples, consistent with its widespread exposure (Chen et al., 2016; Liao et al., 2012; Wu et al., 2018). Furthermore, the urinary concentrations as well as the detection rate of BPS in adults was reported to have increased from 2000 to 2014 in the

Abbreviations: BPS, Bisphenol S; BPA, Bisphenol A; BPSG, Bisphenol S glucuronide; BPAG, Bisphenol A glucuronide; TK, Toxicokinetic; LLOQ, lower limit of quantification; AUC, Area under curve; MRT, Mean residence time; $t_{1/2}$, half-time; Cl, clearance; V_{ss}, steady state volume of distribution

* Corresponding author at: UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 3, France.
E-mail addresses: flore.grandin@inra.fr (F.C. Grandin), m.lacroix@envt.fr (M.Z. Lacroix), v.gayrard@envt.fr (V. Gayrard), h.mila@envt.fr (H. Mila), n.hagen-picard@envt.fr (N. Picard-Hagen).

https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019
Received 27 April 2018; Received in revised form 3 August 2018; Accepted 7 August 2018
0160-4120/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/).

U.S., reflecting the increasing replacement of BPA with BPS (Ye et al., 2015).

More recently, BPS was found in four maternal and seven cord serum samples collected from China at low concentrations ranging from < 0.03 to 0.12 ng/mL (Liu et al., 2017), thus demonstrating a placental transfer of BPS from the mother to the fetus.

Due to the structural similarity of BPS with BPA and its widespread use, concerns about the safety of BPS have become an important issue. Some limited *in vitro* and *in vivo* data suggest that BPS may have endocrine disrupting properties similar to BPA (Eladak et al., 2015; Goldinger et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015; Roelofs et al., 2015; Rosenmai et al., 2014). Furthermore, recent toxicological investigations in zebrafish, rodents and sheep have demonstrated that exposure to BPS during development can disrupt reproductive, metabolic and developmental endpoints through the endocrine pathways (Liu et al., 2017; Ji et al., 2018; Naderi et al., 2018; Pu et al., 2017; Qiu et al., 2016) indicating the vulnerability of the gestation period to BPS exposure.

The reliance on findings from animal studies to determine the human health consequences of BPS exposure during prenatal life emphasizes the importance of toxicokinetic (TK) approaches in animal models for predicting human fetal BPS exposure. The factors determining fetal exposure provide key information to determine if BPS is an acceptable alternative to BPA. The pregnant ewe is an acknowledged model frequently used to characterize drug disposition in the materno-feto-placental unit (Corbel et al., 2013; Kumar et al., 1997; Szeto, 1982; Yoo et al., 1992).

The aim of our study was to evaluate the toxicokinetic parameters determining the disposition of BPS and its main metabolite, BPSG, in the materno-feto-placental unit in the model of pregnant ewe and to compare them with those of BPA. The levels of BPSG sustained in the fetal compartment after a single maternal BPS administration in the first experiment prompted us to evaluate the rate of BPS accumulation in the fetal compartment after repeated maternal administrations.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of humane animal care under agreement number 31-2011-142 from the French Ministry of Agriculture. The protocol was approved by the regional ethical committee (Midi-Pyrénées; protocol APAFiS #11899 - 2017102313532843).

The first experiment was carried out on eight pregnant Lacaune ewes with a mean (± SD) body weight of 79 ± 15 kg and the second experiment on 3 pregnant Lacaune ewes with a mean (± SD) body weight of 74 ± 3 kg. All animals received two commercial pelleted rations daily and hay and water were given *ad libitum*. For each experiment, one fetus per ewe was chronically catheterized between 109 and 113 days of gestation (pregnancy length 147 days) as previously described (Corbel et al., 2013).

2.2. Experimental design

2.2.1. Experiment 1: BPS and BPSG feto-maternal toxicokinetics

This first experiment was designed to evaluate the mechanisms determining fetal exposure to BPS and BPSG (Fig. 1).

During the first period, pregnant ewes received an intravenous (IV) bolus administration of non-labelled BPSG (6.3 μmol/kg, 2.7 mg/kg) and simultaneously, the catheterized fetus received an IV administration of BPS-d8 (19.4 μmol, 5 mg). During the second period, three days apart, simultaneous IV administrations of non-labelled BPS (20.0 μmol/kg, 5 mg/kg) to the mother, and of BPSG-d8 (40.3 μmol, 17.5 mg) to the fetus were given. BPS and BPSG were administered in deuterated forms (BPS-d8 and BPSG-d8) to the fetus so that the BPS and BPSG in the maternal and fetal compartments, resulting from maternal or fetal administrations, could be distinguished. These doses were selected on the basis of a previous TK study performed in ewes (Grandin et al., 2017) to allow correct estimation of TK parameters in the materno-fetal unit.

During both periods, fetal arterial and maternal jugular blood samples and amniotic fluid samples were drawn before and at 7, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 34, 48, 58 and 72 h after IV administrations. Total maternal urine was collected over 24 h with collections at 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 and 24 h after BPS/BPS-d8 and BPSG/BPSG-d8 administrations.

2.2.2. Experiment 2: repeated BPS dosing in pregnant ewe

This experiment was designed to evaluate the rate of BPS accumulation in the fetal compartment resulting from repeated maternal BPS administrations (Fig. 1). The feto-maternal TK results obtained in the first experiment revealed the long persistence of BPS in the fetal compartment, determined from the rate of BPSG hydrolysis, which indicated that for both maternal and fetal BPS plasma concentrations to rapidly reach steady-state, an initial loading dose of BPS was required. A rough simulation of the time course of fetal concentrations led to selection of the following dosing protocol with a loading dose of BPS (75 mg/kg) infused for 1 day at a flow rate of 2.3 mL/h to the pregnant ewe, followed by seven daily IV boluses of BPS maintenance doses (5 mg/kg).

Fetal and maternal blood samples were drawn before and at 5, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 h after the BPS infusion, and every 15 min during the last hour of the infusion to determine the steady-state concentrations. Fetal and maternal blood samples were then drawn daily just before BPS administrations and at 5, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 24 h after the 7th IV bolus administration.

2.3. Solution preparation and animal treatments

All materials for the preparation of solutions, including materials used for sampling, processing and analysis, were in glass or Bisphenols-free plastic (polypropylene). BPS (purity ≥98%) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). BPS-d8 (purity ≥98%) and BPSG-d8 (purity ≥97%) were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). For experiment 1 and bolus administrations in experiment 2, BPS and BPS-d8 were extemporaneously dissolved in ethanol/ultrapure water/propylene glycol (10/11/79, vol/vol/vol) at concentrations of 50 and 5 mg/mL, respectively. For infusion in experiment 2, BPS was extemporaneously dissolved in ethanol/propylene glycol (1/49, vol/vol) at concentration of 100 mg/mL.

For experiment 1, fractions of BPSG purified (68–85%) as previously described (Grandin et al., 2017) were used for maternal administrations. These fractions contained a small amount of BPS (< 4.4%). BPSG and BPSG-d8 were extemporaneously dissolved in 0.9% NaCl buffer at concentrations of 50 and 10 mg/mL, respectively.

For maternal administrations, the volumes of BPS and BPSG solutions were adjusted to the body weights recorded on the three previous days. Maternal intravenous doses were administered into the left jugular vein *via* an indwelling catheter and fetal intravenous doses were administered *via* a catheter chronically implanted in the jugular vein. For intravenous infusions, the catheter was connected to a portable syringe pump (Graseby® MS 32), as previously described (Collet et al., 2010).

2.4. Sample collection

Maternal blood samples (3 mL) were obtained by direct puncture of the right jugular vein. Fetal blood samples (0.7 mL) were collected *via* an indwelling catheter chronically implanted in the fetal carotid. Amniotic fluid samples (1 mL) were drawn *via* an indwelling catheter permanently implanted in the amniotic sac. Total urine was collected

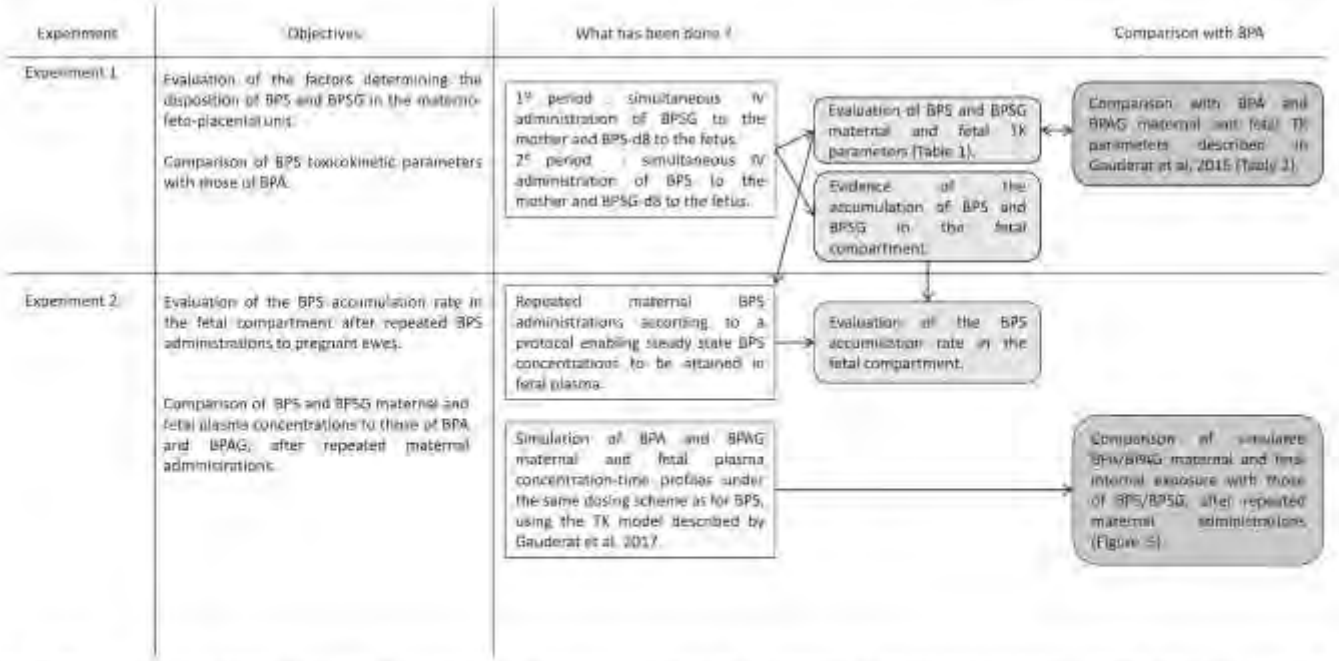


Fig. 1. Workflow diagram of the main steps in the toxicokinetic investigations to evaluate the mechanisms determining the disposition of BPS and its main metabolite in the materno-fetal unit.

via a Foley catheter aseptically placed in the urethra of the ewes.

Blood samples were collected in heparinized tubes, immediately chilled in ice and centrifuged for 10 min at 3000g and 4 °C. Plasmas were separated and stored at −20 °C until assayed.

Amniotic fluid and urine samples were collected in polypropylene tubes, immediately chilled in ice, centrifuged for 10 min at 3000g and 4 °C and the supernatants were stored at −20 °C until assayed.

2.5. Sample analysis

The BPS, BPS-d8, BPSG and BPSG-d8 in the samples were simultaneously quantified by on-line solid phase extraction with ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Acquity-2D UPLC® Xevo® TQ, Waters, Milford, MA, USA) according to a method validated in compliance with European Medicines Agency guidelines (Grandin et al., 2017). This method was adapted and validated for urine samples and for amniotic fluid samples. Briefly, 100 µL of plasma or amniotic fluid samples were precipitated with 100 µL of acetonitrile/zinc sulphate containing internal standard BPS-d4 (100 ng/mL). Urine samples (100 µL) were diluted with 200 µL of the above-mentioned mixture containing internal standard at 1000 ng/mL. Both BPS and its metabolite were extracted with an on-line C8 SPE cartridge and separated on a CSH C18 column with water/acetonitrile gradient elution. The multiple reaction monitoring transitions used to quantify BPS, BPS-d8, BPSG and BPSG-d8 were 249 > 108, 257 > 112, 425 > 249, 433 > 257, respectively.

Blank samples were used to check the absence of contamination during assays. The accuracy and the intra- and inter-day precisions of the method were evaluated from quality control samples at three concentration levels.

The precisions, expressed by the coefficients of variation were below 15% at each concentration level and for the four analytes. The lower limits of quantification (LLOQ) were validated at 3 ng/mL for BPS and 1 ng/mL for BPS-d8 in plasma and at 1 ng/mL for both analytes in amniotic fluid. The LLOQ were validated in urine at 100 ng/mL for BPS and 50 ng/mL for BPS-d8. For BPSG and BPSG-d8, LLOQ were validated at 10 ng/mL in plasma and amniotic fluid and at 100 ng/mL in urine.

2.6. Toxicokinetic analysis

The plasma concentrations-times profiles of BPS, BPS-d8, BPSG and BPSG-d8 observed in the first experiment were analyzed with a sparse-data non-compartmental approach using Phoenix® NLME™ (version 6.4; Pharsight, Mountain view, CA, USA). The sparse data approach computes the mean concentration *versus* time curve of data, based on the mean concentration value for each nominal time value (Gabrielsson and Weiner, 2012; Nedelman et al., 1995). All plasma, amniotic fluid and urine concentrations were converted into molar concentrations.

In the first experiment, the area under the plasma concentration time-curve (AUC_{last}) from dosing time to the last sampling time was calculated using the trapezoidal linear/log interpolation rule. The AUC from t = 0 to infinity was obtained by adding to AUC_{last}, the area extrapolated from the last observation to infinity by dividing the last observed quantifiable plasma concentration by the slope of the terminal phase as estimated by linear regression, using the best fit option of Phoenix®.

The clearance (Cl), mean residence time (MRT), terminal half-life ($t_{1/2}$) and the steady state volume of distribution (V_{ss}) of BPS (BPS-d8) and BPSG (BPSG-d8) were computed using classical pharmacokinetic equations described in Supplementary material (Gibaldi and Perrier, 1982). Because of the extent of BPSG deconjugation-reconjugation recycling, which led to an enhancement of BPS fetal exposure, the BPS fetal TK parameters were computed over 10 h post-administration, to estimate the first slope of elimination of BPS from the fetal compartment.

For each mother (fetus), the extent of BPS (BPS-d8) glucuronoconjugation over the sampling period was calculated by multiplying the maternal BPSG (fetal BPSG-d8) value of AUC from t = 0 to infinity obtained after IV maternal BPS (fetal BPS-d8) administration by the corresponding maternal (fetal) clearance of BPSG (BPSG-d8) (see Supplementary material).

The extent of BPSG-d8 hydrolysis over the sampling period was calculated by multiplying the BPS-d8 AUC_{last} value obtained after BPSG-d8 administration by the corresponding fetal BPS-d8 clearance (see Supplementary material).

The maternal to fetal transfer of BPS for each mother-fetus pair over the sampling period was estimated from the product of the fetal BPS value of AUC from $t = 0$ to infinity obtained after IV maternal BPS administration and the corresponding BPS-d8 fetal clearance divided by the IV maternal BPS dose administered (see Supplementary material).

The fetal to maternal transfer of BPS-d8 for each mother-fetus pair over the sampling period was estimated from the product of the maternal BPS-d8 value of AUC from $t = 0$ to infinity obtained after IV fetal BPS-d8 administration and the corresponding BPS maternal clearance divided by the IV fetal BPS-d8 dose administered (see Supplementary material).

The degree of Exposure Enhancement of BPS (EE_{BPS}) and BPSG (EE_{BPSG}), afforded by reversible metabolism of BPSG into BPS was calculated as follows (Chung and Jusko, 1993):

$$EE_{BPS} = EE_{BPSG} = 1 + \frac{Cl_{gluc} \times Cl_{BPSG}}{(Cl_{BPSG} + Cl_{BPSG/f}) \times Cl_{BPSG} - Cl_{BPS/f} \times Cl_{gluc}} \quad (1)$$

where $Cl_{f\text{-}BPS}$ is the fetal BPS glucuronoconjugation clearance, Cl_{BPSG} is the fetal clearance of BPSG, and $Cl_{BPS/f}$ is the fetal to maternal BPS clearance.

In experiment 2, the plasma concentrations-times profiles of BPS and BPSG were analyzed by using a sparse data non-compartmental approach. The terminal half-life of BPS and of BPSG was computed using classical pharmacokinetic equations (Gibaldi and Perrier, 1982). Assuming that BPS TK is linear, the BPS accumulation in the fetal compartment was calculated for each ewe as the ratio of the AUC_{ss} under steady-state conditions (7th bolus administration) divided by the $AUC_{0\text{-}24h}$ after the 24 h-infusion, normalized by doses (Toutain and Bousquet-Melou, 2004) (see Supplementary material).

3. Results

The concentrations of BPS, BPS-d8, BPSG and BPSG-d8 in all the control samples drawn before the first dosing were systematically below the LLOQ of the analytical method, thereby indicating that no sample contamination had occurred during sample collection, processing and assay.

3.1. Experiment 1: BPS and BPSG feto-maternal toxicokinetics

The experiment was performed on 7 fetuses (4 females 3 males) with a mean (± SD) body weight of 2.5 ± 0.4 kg. The average age of fetuses was 117 ± 0.5 gestation days at the beginning of the experiment.

Only the quantities of BPSG in maternal urine are reported since BPS represented < 0.5% of the total BPS recovered in urine. Cumulative amounts of BPSG excreted in maternal urine were successfully estimated after BPSG and BPS administrations to pregnant ewes for 8 ewes and 4 ewes out of 8, respectively.

3.1.1. Simultaneous fetal BPS-d8 and maternal BPSG IV administrations

Fig. 2 shows the time course of mean (± SD) BPS-d8, BPSG and BPSG-d8 concentrations in maternal (A) and fetal (B) plasma and in amniotic fluid (D) and the cumulative amounts of BPSG excreted in the urine (C) of pregnant ewes following simultaneous fetal BPS-d8 (19.4 μmol, 5 mg) and maternal BPSG (6.3 μmol/kg, 2.7 mg/kg) dosing (see Supplementary data, Tables S1, S3, S5 and S7).

After BPSG administration to adult ewes, the maternal plasma BPSG concentrations decreased to reach values close to the LLOQ about 34 h after BPSG administration. No BPS was detected in maternal plasma. Moreover, no BPSG was detected in fetal plasma or in amniotic fluid after BPSG maternal administration. The maximum BPSG transfer in the materno-fetal direction, estimated by multiplying the LLOQ of the BPSG assay (10 ng/mL) by the fetal BPSG clearance, was < 0.0001%.

Almost all the BPSG dose administered to the mother (94 ± 25%) was recovered in urine during the 24 h following BPSG administration, mostly (85 ± 8%) within the first 3 h after BPSG dosing (Fig. 2C).

After fetal BPS-d8 administration, the BPS-d8 fetal plasma concentrations decreased rapidly during 24 h post-administration and then tended to remain relatively constant. The fetal plasma BPSG-d8 concentrations, that attained maximum concentrations 4 h post-administration, decreased very slowly over the sampling period (Fig. 2B). In maternal plasma, the BPS-d8 concentrations that were maximal at 15 min post-fetal administration, decreased rapidly according to a single log linear process. Maternal BPSG-d8 concentrations peaked 1 h after BPS-d8 dosing to the fetus, after which the BPSG-d8 concentration-time profile showed biphasic decay, the BPSG-d8 concentrations reaching values below the LLOQ 10 h post-dosing (Fig. 2A).

In the amniotic fluid, BPS-d8 concentrations showed a transitory increase, reaching maximum values 2 h after the administration and then remained relatively constant and close to the plasma levels from 10 h post-dosing and throughout the sampling period. BPSG-d8 concentrations in amniotic fluid increased gradually to reach maximum values about 24 h post-dosing and then remained at a relatively constant level around ten times lower than the plasma levels over the sampling period (Fig. 2D).

3.1.2. Simultaneous fetal BPSG-d8 and maternal BPS IV administrations

Fig. 3 shows the time course of mean (± SD) BPS, BPS-d8, BPSG and BPSG-d8 concentrations in maternal (A) and fetal (B) plasma and amniotic fluid (D) and the cumulative amounts of BPSG excreted in urine (C) of pregnant ewes following simultaneous IV administrations of maternal BPS (20.0 μmol/kg, 5 mg/kg) and fetal BPSG-d8 (40.3 μmol, 17.5 mg) (see Supplementary data, Tables S2, S4, S6 and S8).

After BPS administration to adult ewes, maternal BPS concentrations decreased rapidly and reached values below the LLOQ 10 h post-administration (Fig. 3A). Maternal plasma BPSG concentrations that were maximal at 15 min post-BPS administration decreased rapidly to reach values below the LLOQ 72 h after BPS administration. Ninety (± 34) percent of the BPS dose administered to pregnant ewes was excreted in the maternal urine during the first 24 h post-dosing, mostly (68 ± 22%) during the first 3 h after BPS administration (Fig. 3C).

In the fetal compartment, BPS plasma concentrations peaked at the first sampling time (7 min), decreased rapidly until 10 h post-administration and then remained relatively steady over the sampling period. BPSG concentrations, resulting from fetal metabolism, reached maximum concentrations about 6 h post-dosing and then decreased very slowly over the sampling period (Fig. 3B).

In the amniotic fluid, both BPS and BPSG levels increased during the few hours post-dosing and then remained relatively constant over the sampling period (Fig. 3D).

After BPSG-d8 administration to the fetus, the slow decrease in fetal plasma BPSG-d8 concentrations was associated with low and relatively steady BPS-d8 concentrations (Fig. 3B). BPSG-d8 was detected in the maternal urine but at levels below the LLOQ (100 ng/mL for BPSG-d8), which means that < 0.6% of the fetal BPSG-d8 dose was transferred from the fetus to its mother during the first 24 h.

In the amniotic fluid, BPS-d8 and BPSG-d8 concentrations increased progressively during the few hours post-dosing and then remained relatively constant throughout the sampling period (Fig. 3D). The BPSG-d8 levels in amniotic fluid were constantly lower than those of plasma, whereas the BPS-d8 concentrations in plasma and amniotic fluid were similar.

Interestingly, the ratios of BPSG/BPS (BPSG-d8/BPS-d8) during the terminal phase were higher in fetal plasma (about 200 times) than in the amniotic fluid (about 25 times), whether after BPS-d8 or BPSG-d8 fetal administration or after BPS maternal administration.

3.2. Toxicokinetic parameters

The BPS and BPSG TK parameters from ovine fetuses and adult ewes

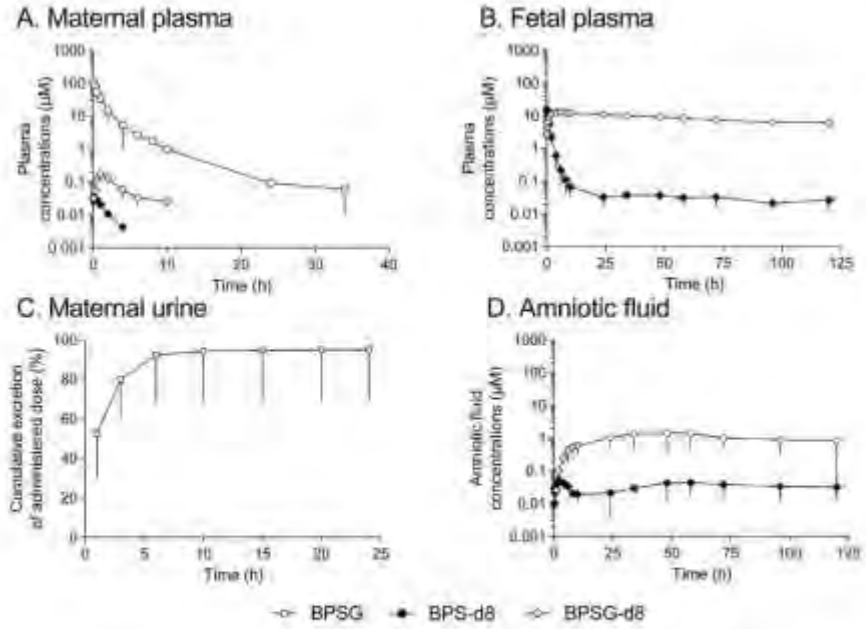


Fig. 2. Semilogarithmic plots of mean (± SD) concentration-time-profiles (µM) for BPS-d8 (closed diamonds), BPSG (open circles) and BPSG-d8 (open diamonds) in maternal (A), fetal (B) plasma and amniotic fluid (C) and for BPSG in maternal urine (D) following simultaneous IV administrations of BPSG (6.3 µmol/kg, 2.7 mg/kg, n = 8) to the mother and BPS-d8 (19.4 µmol, 5 mg, n = 7) to the fetus.

are summarized in Table 1. Among the BPS TK parameters measured in the mother-fetus pairs, BPS plasma clearance was about two times less in the fetus than in its mother. Fetal BPS half-life, which is influenced by both plasma clearance and volume of distribution, was similar to maternal BPS half-life (1.92 h and 2.37 h). Among the BPSG TK parameters measured in the mother-fetus pairs, BPSG plasma clearance was 25 times lower in the fetus than in the pregnant ewe. The BPSG half-life in the fetal compartment was 18 times higher than the maternal one (93.6 h *versus* 5.22 h).

The computation of TK parameters and the BPS and BPSG concentrations profiles described in the mother-fetus pairs in experiment 1 allowed evaluation of the transfer of BPS/BPSG from one compartment to the other. The estimated mean fraction of BPS transferred from the mother to the fetus was 0.40%. The mean fraction of BPS-d8 transferred from the fetus to the mother, estimated from the time course of plasma

Table 1
Mean toxicokinetic parameters of BPS and BPSG from ovine fetuses and pregnant sheep administered a single IV dose of BPS (BPS-d8) and BPSG (BPSG-d8).

Toxicokinetic parameters	BPS		BPSG	
	Fetus (n = 8)	Mother (n = 6)	Fetus (n = 4)	Mother (n = 9)
Cl (mL · (h · kg))	423	993	1.87	48.6
Vss (mL/kg)	597	380	251	121
MRT (h)	1.41	0.383	134	2.49
$t_{1/2}$ (h)	1.92	2.37	93.6	5.22

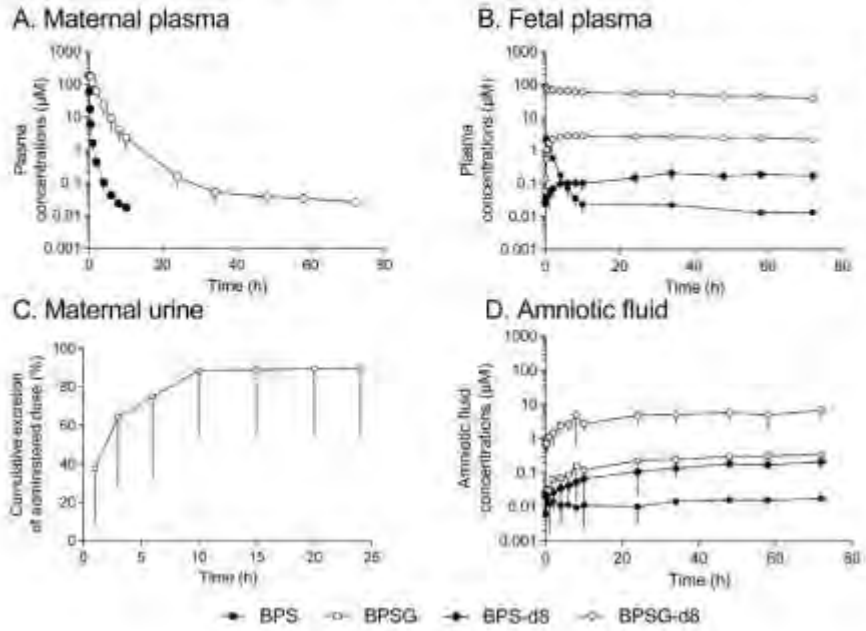


Fig. 3. Semilogarithmic plots of mean (± SD) concentration-time-profile (µM) for BPS (closed circles), BPS-d8 (closed diamonds), BPSG (open circles) and BPSG-d8 (open diamonds) in maternal (A), fetal (B) plasma and amniotic fluid (C) and for BPSG in maternal urine (D) following simultaneous IV administrations of BPS (20.0 µmol/kg, 5 mg/kg, n = 6) to the mother and of BPSG-d8 to the fetus (40.3 µmol 17.5 mg, n = 4).

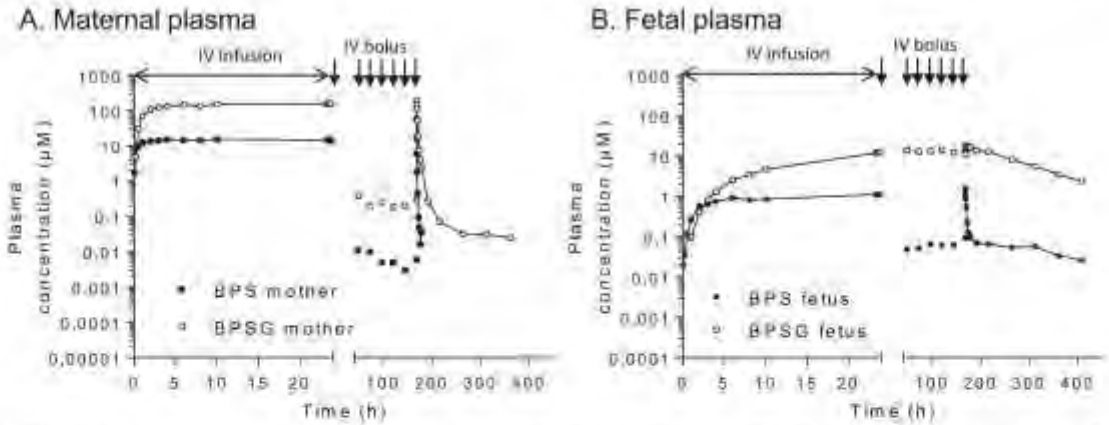


Fig. 4. Semilogarithmic plots of representative concentration-time-profiles (µM) for BPS (closed circles) and BPSG (open circles) in maternal (A) and fetal (B) plasma after an IV infusion loading dose of BPS (300 µmol/kg, 75 mg/kg) followed by the administration of 6 repeated BPS IV bolus maintenance doses (20 µmol/kg, 5 mg/kg) to the mother.

maternal BPS-d8 concentrations, was 26.3% over the 72 h sampling period.

The estimated fraction of BPS metabolized into BPSG in the maternal compartment was 96.7%. The fraction of BPS-d8 metabolized into BPSG-d8 in the fetal compartment calculated over the period of 72 h, was 24.9% but extrapolation of the AUC to infinity indicated that this fraction might attain 46.4%. The estimated fraction of BPSG-d8 hydrolysed into BPS-d8 in the fetal compartment was only 29.5% of the fetal dose over the sampling period of 72 h and reached 100% when the BPS-d8 AUC was extrapolated to infinity.

The degree of exposure enhancement of BPS and of BPSG due to recycling *per se*, estimated from the BPS and BPSG fetal clearances was 1.87.

3.3. Experiment 2: repeated BPS administrations to pregnant ewes

This experiment was performed on one female and 2 male fetuses with a mean (± SD) body weight of 3.5 ± 0.8 kg. The average age of the fetuses was 117 days at the beginning of the experiment. Fig. 4 shows a representative time course of maternal and fetal plasma BPS and BPSG concentrations after the administration of an IV infusion loading dose of BPS (75 mg/kg) followed by seven daily maintenance IV bolus doses (5 mg/kg) of BPS to pregnant ewes (see Supplementary data, Tables S9 and S10). The steady state conditions, evaluated from the intra-individual coefficients of variation of the trough BPS and BPSG fetal concentrations before the 6 daily maintenance IV bolus doses, were 20.7% for BPS and 4.7% for BPSG.

After a BPS loading dose administration to pregnant ewes, the fetal and maternal BPS and the maternal BPSG plasma concentration-time profiles were characterized by a plateau attained 6 h after the beginning of the BPS infusion, whereas the BPSG fetal plasma concentrations continued to increase until the end of the maternal BPS infusion. The fetal concentrations of BPS and BPSG were about ten times lower than those in maternal plasma. By contrast, trough BPS and BPSG concentrations in fetal plasma, associated with repeated maternal exposure dosing with BPS, were much higher than the corresponding pattern obtained for maternal plasma. The sustained fetal exposure to BPSG was reflected by the high ratio of around 75 between the basal fetal and maternal concentrations of BPSG at steady-state.

After the last BPS maternal administration, maternal BPS plasma concentrations dropped rapidly to values below the LLOQ 24 h post-dosing. Maternal BPSG and fetal BPS concentrations displayed biphasic decay, with a rapid decrease during the 10 h post-dosing. Thereafter, the maternal BPSG and fetal BPS and BPSG concentrations decreased slowly with terminal half-lives of the same order of magnitude (137 h, 118 h and 98.5 h, respectively), (Fig. 4A and B). The individually calculated accumulation ratios for BPS in the fetal compartment following repeated maternal BPS administrations were 5.82, 3.42 and 10.2.

4. Discussion

Pregnancy represents a period of vulnerability to BPS exposure (Catanese and Vandenberg, 2017; Grimaldi et al., 2018). Human exposure to BPS, particularly during fetal development is to date unknown. This highlights the urgent need to characterize the disposition of BPS and its main metabolite (BPSG) in the feto-maternal unit. The present study was based on concurrent determination of BPS and BPSG (or deuterated forms) TK in a maternal and late-stage fetal ovine model, relevant to human gestation. So far, this study is the first to report the factors controlling fetal exposure to BPS and BPSG and to compare BPS and BPSG fetal TK parameters with those of BPA and BPAG, previously described in the ovine model (Table 2, Gaudeni et al., 2016).

We have shown that only 0.40% of the maternal BPS dose was transferred to the fetus, which means that the fetus was exposed to a dose related to its body weight, that was ten times lower than the maternal BPS dose. However, once in the fetal compartment, only 26% of the BPS dose was rapidly eliminated through placental transfer, while at least 46% was glucurono-conjugated by the fetus. The very slow elimination of BPSG from the fetal compartment due to deconjugation-reconjugation recycling and to the restricted placental passage

Table 2
Mean (± SD) toxicokinetic parameters of BPA and BPAG in the ovine fetus and pregnant ewe (Gaudeni et al., 2016).

Toxicokinetic parameters	BPA		BPAG	
	Fetus (n = 8)	Mother (n = 6)	Fetus (n = 8)	Mother (n = 7)
Cl (mL/(h × kg))	14,840 ± 4071	1746 ± 380	20.4 ± 12.8	334 ± 76.0
Vss (mL/kg)	5090 ± 1424	1281 ± 302	701 ± 218	324 ± 95.7
MRT (h)	0.343 ± 0.0261	0.746 ± 0.148	28.3 ± 10.9	0.842 ± 0.343
$t_{1/2}$ (h)	0.307 ± 0.0302	1.55 ± 0.462	28.3 ± 6.41	3.17 ± 1.84

of BPS, leads to an accumulation of BPS in the fetal circulation. Indeed, BPS accumulated as BPSG in the fetal compartment has to be deconjugated into its active form before it can be ultimately eliminated by the placenta.

After maternal BPS administration, almost all the BPS dose entering maternal circulation was extensively glucurono-conjugated and rapidly eliminated in urine, *via* a non-placental route. This result is consistent with TK data obtained in mice (Song et al., 2018). Pregnancy did not modify the TK parameters of BPS (Grandin et al., 2017), which can be explained at least in part by the low placental BPS transfer from the mother to its fetus. The maternal BPS and BPSG clearances were twice and seven times lower than those of BPA and BPAG, respectively, indicating that the capacity of the mother to eliminate BPS and BPSG was lower than for BPA (Table 2, (Gaudeval et al., 2016)). Despite the structural similarity between these two bisphenols, the lower rate of BPS glucuronidation compared to that of BPA could be attributed to changes in molecular properties that affected their interactions with metabolic enzymes. Indeed, different UDP glucuronosyltransferases enzymes are involved in the glucuronidation of BPA and BPS (Gramec Skledar et al., 2014). The three times lower steady-state distribution volumes of BPS and BPSG compared to those of BPA and BPAG were consistent with their lower lipophilicities (LogP BPS = 1.65, LogP BPSG = −0.33 *versus* LogP BPA = 3.43, LogP BPAG = 1.12). This weak tissular distribution has already been reported in mice (Song et al., 2018).

BPS entering into the fetal circulation was slowly eliminated with a forty times lower fetal clearance than for BPA, resulting from the lower feto-maternal placental clearance (about 100 times lower) and glucuronidation clearance (about twenty times lower). These data support the assumption that bisphenol S and A are glucuronidated by different isoforms of UDP glucuronosyltransferases enzymes which could differ in the development of their expression during pregnancy (Gramec Skledar et al., 2014). The placental transfer of BPS from fetus to mother appeared to be extremely rapid with maximum BPS concentrations occurring in maternal plasma within the first 7 min after a fetal IV bolus administration. However, it was estimated that only 26% of the total fetal dose was eliminated by placental transfer during the first hours following a fetal BPS administration. By contrast, the BPS dose fraction glucuronidated by the fetus (46%) was eliminated very slowly, resulting in a much higher fetal exposure to BPSG than to BPS (ratio of about 200) due to the much lower fetal BPSG clearance. In our experiments, we only measured the glucuronidated form of BPS, and not BPS sulphate. Indeed, *in vitro* studies on human hepatocarcinoma cell line (Le Fol et al., 2015) or with human liver and intestine microsomes showed that glucuronidation is the predominant metabolic pathway for BPS in adults (Skledar et al., 2016). In addition, even if expression of liver phenol sulfoconjugation activities has already been reported in mid-gestation fetuses (Hines, 2008), we have previously demonstrated that the contribution of hepatic sulfoconjugation to BPA detoxification in the late pregnancy ovine fetus is low (Corbel et al., 2013).

The limited placental transfer of BPS, compared to BPA, both in materno-fetal (15 times lower) and in feto-maternal (three times lower) directions could be explained by its weak lipophilicity. But, considering the high doses of BPS used in our TK experiment, a saturation of the placental transfer cannot be ruled out. Furthermore, given the difference in placental structure between ovine and human (Barry and Anthony, 2008), with fewer barriers separating the human maternal and fetal blood compartments, the actual extent of BPS placental transport should be further investigated in a human placental perfusion model, as has already been evaluated for BPA (Corbel et al., 2014).

The fate of BPSG in the feto-maternal unit was evaluated after BPSG-d8 administration directly into the fetal circulation. The persistence of BPSG-d8 in the fetal compartment was long (terminal half-life of 93 h, three times higher than that of BPAG), associated with a low fetal BPSG clearance), ten times lower than that of fetal BPAG. The extremely limited BPSG placental transfer (< 0.0001%) in the materno-fetal direction was similar to those obtained for BPAG both in the sheep model and in the pregnant rat (Nishikawa et al., 2010). In addition, in the pregnant PBPK model in both rat and human (Kawamoto et al., 2003; Sharma et al., 2018), the diffusion coefficients of BPAG from the placenta to the fetus are low.

Moreover, using TK parameters, the estimated fraction of BPSG-d8 hydrolysed into BPS-d8 represented only 29.5% of the total fetal BPSG-d8 dose over the sampling period, and reached 100% when the BPS-d8 AUC was extrapolated to infinity. This suggests that almost all the BPSG has to be back-converted into its active form (BPS) in order to be ultimately eliminated by the placenta, which leads to the gradual re-entry of BPS into the fetal compartment. The degree of exposure enhancement to BPS in the fetal compartment was 1.87 (Chang and Jusko, 1993), indicating that back-metabolism of BPSG to BPS increased the fetal exposure to BPS by 87%.

The repeated BPS maternal administration protocol (experiment 2) enabled us to correctly estimate the terminal half-lives of both BPS (including back-formed BPS) and BPSG to better characterize the BPS accumulation in the fetal compartment. The highly prolonged BPS $t_{1/2}$ in the fetal compartment (118 h), about 50 times higher than the BPS $t_{1/2}$ estimated from a single fetal BPS administration and similar to that of fetal BPSG $t_{1/2}$, indicates that the very slow elimination of BPS from the fetal compartment is controlled by the reversible metabolism of BPSG. This process leads, in turn, to a prolonged maternal BPSG elimination half-life (about 25 times higher than the elimination half-life of BPSG calculated from a single maternal BPSG administration) because of the constant re-entry and glucuronoconjugation, within the maternal compartment, of the estimated 26% of the dose of back-converted BPS. These long terminal half-lives of fetal back-formed BPS and BPSG result in the accumulation and trapping of BPS in the fetal compartment, the mean BPS accumulation ratio being 6.5 after repeated maternal BPS administrations once daily under equilibrium conditions. The context of repeated maternal exposure to BPS, due to the very slow back conversion of BPSG to BPS and to the limited placental transfer, leads to a specific pattern of BPS and BPSG exposure characterized by much higher trough BPS and BPSG concentrations in the fetal plasma, compared to those in the maternal plasma.

The comparison of BPS/BPSG terminal phases of the concentration profiles in plasma and in amniotic fluid, either after maternal BPS or fetal BPS/BPSG administrations showed that the BPS levels in amniotic fluid were of similar magnitude to the corresponding levels in plasma. By contrast, the levels of BPSG were around six times higher in plasma than in the amniotic fluid. These data indicate that BPS and its metabolite may be excreted in the amniotic fluid and that the fetus can be re-exposed to this excreted BPS/BPSG either by swallowing the amniotic fluid or through dermal absorption. The lower ratio of the BPSG/BPS levels in amniotic fluid compared to that in plasma (around 30 *versus* 200) might be due to the local action of β-glucuronidases regenerating BPS in the amniotic fluid, placenta or fetal kidney and by the recirculation of BPS/BPSG between the placenta and the amniotic sac (Ginsberg and Rice, 2009; Kumagai and Matysek, 1980). Thus, BPSG should be viewed as a sustained precursor for BPS supply to sensitive fetal target tissue.

Finally, to compare BPS/BPSG and BPA/BPAG disposition in the materno-fetal unit, a compartmental TK model described previously for BPA (Gaudeval et al., 2017) was used to simulate the plasma concentration-time profiles of maternal and fetal free BPA and BPAG after repeated BPA maternal IV dosing under the same maternal exposure scenario as that used for BPS in experiment 2 (Fig. 5). Maximum maternal internal exposure (at the end of the infusion and for the last administration) to BPS and BPSG was around two times higher compared to the corresponding level of BPA and BPAG, due to the lower BPS and BPSG maternal clearances. However, the trough BPS and BPSG concentrations were of the same order of magnitude than the corresponding pattern observed for BPA and BPAG.

BPSG fetal exposure was much lower than that of BPAG (twenty times), reflecting the low placental materno-fetal transfer of BPS.

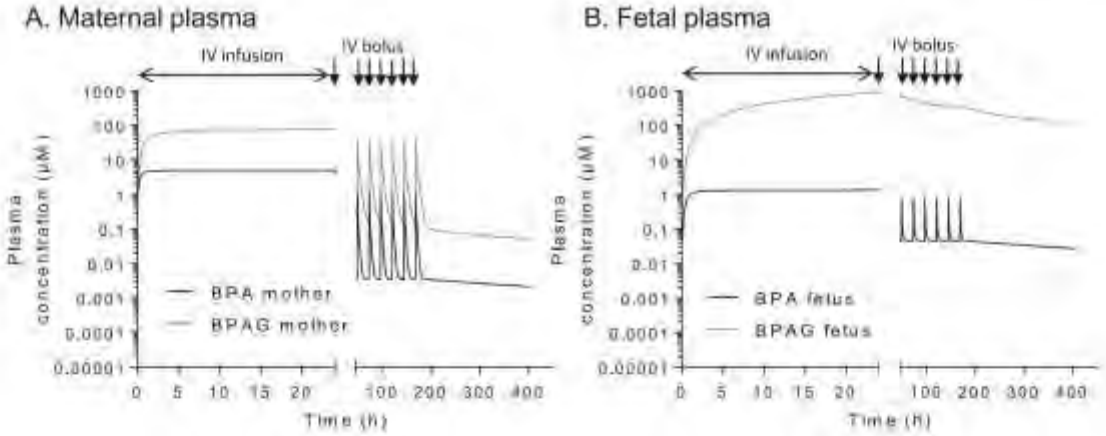


Fig. 5. Semilogarithmic plots of the simulated concentration-time-profiles (µM) for BPA (black line) and BPAG (grey line) in maternal (A) and fetal (B) plasma after an IV infusion loading dose of BPA (300 µmol/kg, 69.7 mg/kg) followed by the administration of repeated BPS IV bolus maintenance doses (20 µmol/kg, 4.65 mg/kg) to the mother. This dosing scheme was the same that was used for BPS in experiment 2 (see (Gaudriault et al., 2017) for the toxicokinetic model).

Nonetheless, the BPS levels in fetal compartment was of similar magnitude to the corresponding levels of BPA, and the persistence of BPS and BPSG in the fetal compartment and of BPSG in the maternal compartment was similar to those of BPA/BPAG. Indeed, the elimination of these conjugated bisphenols from the fetal compartment depends on the hydrolysis rate and on the feto-maternal placental transfer of the back-converted conjugates. However, only 26% of the BPS dose steadily re-entering the fetal circulation by this pathway was eliminated by placental transfer, compared with 70% for BPA. Thus, a large proportion of back-converted BPS can once again be reconjugated by the fetus, which would account for a long persistence of BPS, similar to that of BPA, in the fetal compartment.

5. Conclusions

This study provides new and critical information about the determinants of BPS fetal exposure and highlights differences with those prevailing for BPA. The limited materno-fetal placental transfer of BPS, ten times lower than for BPA (Gaudriault et al., 2016) might lead to the hasty conclusion that the fetus is better protected from exposure to BPS than to BPA. But this is not the case. Indeed, by using our pregnant ewe model, we have demonstrated that the slow elimination of fetal BPSG due to its prior hydrolysis by the fetus and the limited feto-maternal placental passage of BPS, lead to prolonged fetal exposure both to BPS and to BPSG, which might facilitate deconjugation-reconjugation recycling. These mechanisms increased the fetal exposure to bioactive BPS by 87%. Ultimately, although weakly transferred across the placenta, BPS was able to accumulate in the fetal compartment. This means that under steady state conditions, after repeated gestational BPS/BPA exposure, the BPS in the fetal compartment can attain similar persistently levels to those of BPA.

Predictive models of human fetal exposure to BPS should now be carried out to put into perspective our genuine *in vivo* results regarding the pregnant woman. To do this, placental and fetal BPS metabolism differences during pregnancy and between species should now be investigated to determine the relevance of this animal model when evaluating the danger of fetal exposure to BPS in humans. The health implications of sustained fetal exposure to BPS and BPSG need to be addressed, especially in sensitive target tissue.

Funding source

This work was supported by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses [grant number 2015/1/112, 2015].

Competing financial interests

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank JP Gau, C Lacassagne and N Deschamps for their assistance and involvement in animal care and Axiom platform for their technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019.

References

ANSES, 2013. Environmental and occupational health & safety on the assessment of the risks associated with bisphenol a for human health, and on toxicological data and data on the Use of bisphenols S, F, M, B, AP, AF and BADGE, opinion of the French Agency for Food. 2013. https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2008sa0091Ra.pdf Accessed July 19, 2016. [WWW Document]. URL

Barry, J.S., Anthony, R.V., 2008. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. Theriogenology 69, 55–67. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.031.

Catanese, M.C., Vandenberg, L.N., 2017. Bisphenol S (BPS) alters maternal behavior and brain in mice exposed during pregnancy/lactation and their daughters. Endocrinology 158, 516–530. https://doi.org/10.1210/en.2016-1722.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.-L., Wu, Y., Widelka, M., 2016. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review. Environ. Sci. Technol. 50, 5438–5453. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387.

Cheng, H., Jusko, W.J., 1993. Pharmacokinetics of reversible metabolic systems. Biopharm. Drug Dispos. 14, 721–766. https://doi.org/10.1002/bdd.2510140902.

Collet, S.H., Picard-Hagen, N., Viguié, C., Lacroix, M.Z., Toutain, P.-L., Gayrard, V., 2010. Estrogenicity of bisphenol A: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. Toxicol. Sci. 117, 54–62. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq186.

Corbel, T., Gayrard, V., Viguié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2013. Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. Biol. Reprod. 89, 11. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106088.

Corbel, T., Gayrard, V., Puel, S., Lacroix, M.Z., Berrebi, A., Gil, S., Viguié, C., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2014. Bidirectional placental transfer of bisphenol A and its main metabolite, bisphenol A-glucuronide, in the isolated perfused human placenta. Reprod. Toxicol. 47, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.001.

Crump, D., Chiu, S., Williams, K.L., 2016. Bisphenol S alters embryonic viability, development, gallbladder size, and messenger RNA expression in chicken embryos exposed via egg injection. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1541–1549. https://doi.org/10.1002/etc.3313.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.-J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. Fertil. Steril. 103, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.

505.
Gabrielsson, J., Weiner, D., 2012. Non-compartmental analysis. In: Reisfeld, B., Mayeno, A.N. (Eds.), Computational Toxicology. 1. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 377–389. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-050-2_16.
Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P.-L., Corbel, T., Viguié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Mindeguia, P., Bousquet-Mélou, A., Gayrard, V., 2016. Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. Environ. Int. 86, 52–59. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.006.
Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P.-L., Servien, R., Viguié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Corbel, T., Bousquet-Mélou, A., Gayrard, V., 2017. Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A and bisphenol A glucuronide from an ovine semi-physiological toxicokinetic model. Sci. Rep. 7, 15330. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15646-6.
Gibaldi, M., Perrier, D., 1982. Pharmacokinetics, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
Ginsberg, G., Rice, D.C., 2009. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? Environ. Health Perspect. 117, 1639–1643. https://doi.org/10.1289/ehp.0900810.
Goldinger, D.M., Demierre, A.-L., Zoller, O., Rupp, H., Reinhard, H., Magnin, R., Becker, T.W., Bourqui-Pittet, M., 2015. Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. Regul. Toxicol. Pharmacol. 71, 453–462. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.01.002.
Gramec Skledar, D., Peterlin Mašič, L., 2016. Bisphenol A and its analogs: do their metabolites have endocrine activity? Environ. Toxicol. Pharmacol. 47, 182–199. https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.014.
Gramec Skledar, D., Traberg, J., Lavdas, J., Peterlin Mašic, L., Fiael, M., 2014. Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. Xenobiotica 1–9. https://doi.org/10.3109/00498254.2014.980140.
Grandin, F., Picard-Hagen, N., Gayrard, V., Puel, S., Viguié, C., Toutain, P.-L., Debrauwer, L., Lacroix, M.Z., 2017. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: applicability to toxicokinetic investigations. J. Chromatogr. A 1526, 39–46. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020.
Hill, C.E., Sapouckey, S.A., Suvorov, A., Vandenberg, L.N., 2017. Developmental exposures to bisphenol S, a BPA replacement, alter estrogen-responsiveness of the female reproductive tract: a pilot study. Cogent Med. 4. https://doi.org/10.1080/2331205X.2017.1317690.
Hines, R.N., 2008. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. Pharmacol. Ther. 118, 250–267. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.02.005.
Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K., 2013. Effects of Bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. Environ. Sci. Technol. 47, 8793–8800. https://doi.org/10.1021/es400329r.
Kanarek, J., Matysek, F., 1988. Beta-glucuronidase activity in amniotic fluid. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18 (10), 611–614.
Kawamoto, Y., Matsuyama, W., Wada, M., Hishikawa, J., Chan, M.P.L., Nakayama, A., Morisawa, S., 2007. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for bisphenol A in pregnant mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 224, 182–191. https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.06.023.
Kumar, S., Toms, G.R., Kwon, E., Hall, C., Biggs, R.W., Axelson, J.F., Rurak, D.W., 1997. Estimation of transplacental and nonplacental diphenhydramine clearances in the fetal lamb: the impact of fetal first-pass hepatic drug uptake. J. Pharmacol. Exp. Ther. 282, 617.
Le Fol, V., Ait-Aissa, S., Sabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-S in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. Environ. Sci. Technol. 49, 3860–3868. https://doi.org/10.1021/es505302r.
Liao, C., Kannan, K., 2014. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. Food Addit. Contam., Part A 31, 319–329. https://doi.org/10.1080/19440049.2013.868611.
Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H.-B., Nakata, H., Kannan, K., 2012. Bisphenol S in urine from the United States and seven asian countries: occurrence and human exposures. Environ. Sci. Technol. 46, 6860–6866. https://doi.org/10.1021/es301734j.
Liu, J., Li, J., Wu, Y., Zhao, Y., Luo, F., Li, S., Yang, L., Moez, E.K., Dinu, I., Martin, J.W., 2017. Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum. Environ. Sci. Technol. 51, 2456–2463. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05716.
Naderi, M., Wong, M.Y.L., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. Aquat. Toxicol. 148, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.009.
Nedelman, J.R., Gibiansky, E., Lau, D.T.W., 1995. Applying Bailer's method for AUC confidence intervals to sparse sampling. Pharm. Res. 12, 124–128. https://doi.org/10.1023/A:1016255124336.
Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., Yokota, H., 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. Environ. Health Perspect. 118, 1196–1203. https://doi.org/10.1289/ehp.0901575.
Pu, Y., Gingrich, J.D., Steibel, J.P., Veiga-Lopez, A., 2017. Sex-specific modulation of fetal adipogenesis by gestational bisphenol A and bisphenol S exposure. Endocrinology 158, 3844–3858. https://doi.org/10.1210/en.2017-00615.
Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., Wayne, N.L., 2016. Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish. Endocrinology 157, 636–647. https://doi.org/10.1210/en.2015-1785.
Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. Environ. Health Perspect. 123, 643–650. https://doi.org/10.1289/ehp.1408989.
Ruiz, M.J.E., van den Berg, M., Bovee, T.F.H., Piersma, A.H., Va Duursen, M.B.M., 2015. Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. Toxicology 329, 10–20. https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.003.
Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B.M., Wedebye, E.B., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? Toxicol. Sci. 139, 35–47. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu030.
Sharma, R.P., Schuhmacher, M., Kumar, V., 2018. The development of a pregnancy PBPK Model for Bisphenol A and its evaluation with the available biomonitoring data. Sci. Total Environ. 624, 55–68. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.023.
Skledar, D.G., Schmidt, J., Fic, A., Klopčič, I., Trontelj, J., Dolenc, M.S., Finel, M., Mašič, L.P., 2016. Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. Chemosphere 157, 152–159. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.027.
Song, Y., Xie, P., Cai, Z., 2018. Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration. Rapid Commun. Mass Spectrom. 32, 495–502. https://doi.org/10.1002/rcm.8057.
Szeto, H.H., 1982. Pharmacokinetics in the ovine maternal-fetal unit. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22, 221–243. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.001253.
Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004. Plasma terminal half-life. J. Vet. Pharmacol. Ther. 27, 427–439. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x.
USEPA, 2014. Bisphenol A Alternatives in Thermal. https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf (Accessed January 26, 2017 [WWW Document]).
Wu, L.-H., Zhang, X.-M., Wang, F., Gao, C.-J., Chen, D., Palumbo, J.R., Guo, Y., Zeng, E.Y., 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review. Sci. Total Environ. 615, 87–98. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.190.
Ye, X., Wong, L.-Y., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T., Calafat, A.M., 2015. Urinary concentrations of bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of U.S. adults during 2000–2014. Environ. Sci. Technol. 49, 11834–11839. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02135.
Yoo, S.D., Rurak, D.W., Taylor, S.M., Axelson, J.E., 1993. Transplacental and non-placental clearances of diphenhydramine in the chronically instrumented pregnant sheep. J. Pharm. Sci. 82, 145–149. https://doi.org/10.1002/jps.2600820206.

Supplementary material

Bisphenol S instead of Bisphenol A: toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit

Flore C. Grandin[a], Marlène Z. Lacroix[c], Véronique Gayrard[a], Glenn Gauderat[a], Hanna Mila[a], Pierre-Louis Toutain[b] and Nicole Picard-Hagen[a*]

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

[b]The Royal Veterinary College, University of London, London

[c]INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

Flore C. Grandin : flore.grandin@inra.fr ; Marlène Z. Lacroix : m.lacroix@envt.fr ; Véronique Gayrard : v.gayrard@envt.fr ; Glenn Gauderat : glenn.gauderat@gmail.com ; Hanna Mila : h.mila@envt.fr ; Pierre-Louis Toutain : pltoutain@wanadoo.fr ; Nicole Picard-Hagen : n.hagen-picard@envt.fr

Corresponding author*: Nicole Picard-Hagen, UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87 614, 31076 Toulouse cedex 3, France, Tel. : +33 (0)5 61 19 38 61, E-mail : n.hagen-picard@envt.fr

Supplementary material, Toxicokinetic analysis

Experiment 1

The clearance (Cl), mean residence time (MRT), terminal half-life ($t_{1/2}$) and volume of distribution at steady state (V_{SS}) were computed using the classical equations indicated below (Gibaldi and Perrier, 1982):

$$Cl = \frac{Dose}{AUC_{0 \rightarrow inf}}$$

Equation 1

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

Equation 2

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k_e}$$

Equation 3

$$V_{ss} = \frac{MRT}{Cl}$$

Equation 4

Where $AUC_{0 \text{ -> inf}}$ is the area under curve from t=0 to infinity, AUMC is the area under the first moment curve and k_e is the rate constant of elimination.

For each mother (fetus), the extent of BPS (BPS-d8) glucuronoconjugation over the sampling period was calculated by multiplying the maternal BPSG (fetal BPSG-d8) value of AUC from t=0 to infinity obtained after IV maternal BPS (fetal BPS-d8) administration by the corresponding maternal (fetal) clearance of BPSG (BPSG-d8).

For the mother:

$$BPS\ glucuronoconjugation = AUC_{0-inf\ BPSG\ after\ BPS\ iv} \times Cl_{mBPSG}$$

Equation 5

For the fetus:

$$BPS - d8\ glucuronoconjugation = AUC_{0-inf\ BPSG-d8\ after\ BPS-d8\ iv} \times Cl_{fBPSG-d8}$$

Equation 6

The extent of BPSG-d8 hydrolysis over the sampling period was calculated by multiplying the BPS-d8 AUC_{last} value obtained after BPSG-d8 administration by the corresponding fetal BPS-d8 clearance, where AUC_{last} is the AUC from t0 to the last concentration observed.

$$BPSG - d8\ hydrolysis = AUC_{0-last\ BPS-d8\ after\ BPSG-d8\ iv} \times Cl_{fBPS-d8}$$

Equation 7

The maternal to fetal transfer of BPS for each mother-fetus pair over the sampling period was estimated from the product of the fetal BPS value of AUC from t=0 to infinity obtained after IV maternal BPS administration and the corresponding BPS-d8 fetal clearance divided by the IV maternal BPS dose administered.

$$BPS\ materno - fetal\ transfer\ (\%) = \frac{AUC_{0-\inf fetal\ BPS\ after\ maternal\ IV\ BPS} \times Cl_{fBPS-d8}}{Dose_{BPS\ mother}} \times 100$$

Equation 8

The fetal to maternal transfer of BPS-d8 for each mother-fetus pair over the sampling period was estimated from the product of the maternal BPS-d8 value of AUC from t=0 to infinity obtained after IV fetal BPS-d8 administration and the corresponding BPS maternal clearance divided by the IV fetal BPS-d8 dose administered.

$$BPS\ feto - maternal\ transfer\ (\%) = \frac{AUC_{0-\inf maternal\ BPS-d8\ after\ fetal\ IV\ BPS-d8} \times Cl_{mBPS}}{Dose_{BPS-d8\ fetus}} \times 100$$

Equation 9

Experiment 2

The accumulation ratio (R) of BPS in the fetal plasma was calculated as follows (Toutain and Bousquet-Mélou, 2004) :

$$R = \frac{AUC_{steady-state}}{AUC_{after\ the\ first\ administration}} \times \frac{Maintenance\ dose}{Loading\ dose}$$

Equation 10

References

Gibaldi, M., Perrier, D., 1982. Pharmacokinetics. 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY.

Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004. Plasma terminal half-life. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 27, 427–439. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x

III. Études complémentaires à l'article 2

A. Évaluation de l'excrétion urinaire du BPSG chez les brebis

Afin de compléter les données publiées dans l'article 2, les données urinaires maternelles obtenues au cours de l'étude de l'accumulation du BPS dans le compartiment fœtal sont présentées.

Les urines maternelles ont été collectées juste avant la dernière administration de BPS à la dose de 5 mg/kg par voie IV (intraveineuse) à la brebis, et pendant 24 h aux temps 1, 3, 6, 10, 15, 21 et 24 h après l'administration [179].

La quantité cumulée de BPSG excrétée dans les urines maternelles a pu être estimée pour deux brebis gravides sur 3, le volume total des urines de la troisième brebis n'ayant pas pu être déterminé en raison de fuites urinaires autour de sa sonde. Après la dernière administration maternelle de BPS, à l'état d'équilibre, la quantité de BPSG excrétée dans les urines sur 24 h s'élève à 75.8 ± 8.49 % de la dose journalière de BPS administrée, dont 80 % environ dans les 3 premières heures (Figure 19).

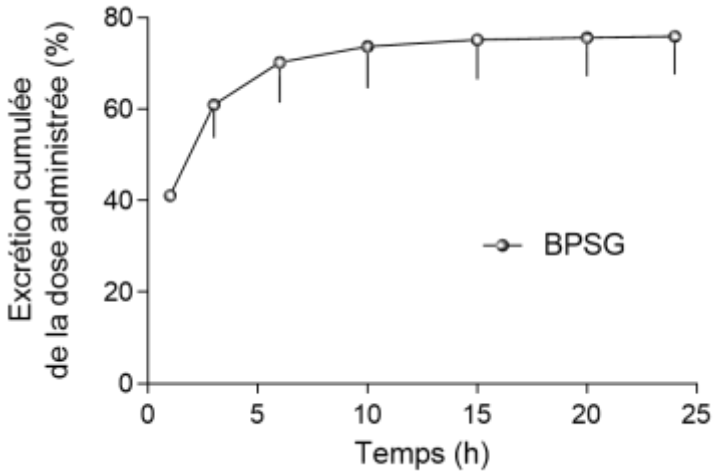


Figure 19 : Excrétion cumulée moyenne du BPSG, dans les urines maternelles, dans les 24 h après la dernière administration de BPS, c'est-à-dire à l'état d'équilibre, exprimée en pourcentage de la dose de BPS administrée de 5 mg/k par voie IV à deux brebis.

Ce résultat est cohérent avec celui obtenu dans l'étude de la disposition du BPS dans le compartiment materno-fœto-placentaire (Article 2, expérience 1). Le BPS entrant dans le compartiment maternel est donc majoritairement glucuronoconjugué et excrété dans les urines.

B. Détermination de la fraction libre du BPS chez la brebis et le fœtus ovin

Dans le cadre d'un projet sur les variations interspécifiques de la liaison du BPA et du BPS aux protéines plasmatiques, auquel j'ai participé, nous avons évalué par une méthode de dialyse à l'équilibre, la liaison du BPA et du BPS aux protéines plasmatiques chez la brebis vide, en début et en fin de gestation et chez le fœtus ovin.

1. Contexte et objectif

Dans l'étude de disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire, les concentrations mesurées en BPS correspondent à la somme des concentrations de BPS libre et de BPS lié aux protéines plasmatiques. En effet, l'extraction par précipitation des protéines plasmatiques dénature les protéines et par conséquent ne permet pas de différencier les formes de BPS liées des formes non liées aux protéines plasmatiques. Or seul le BPS libre est capable de se lier aux récepteurs, d'entrer dans les cellules et d'exercer son activité biologique.

Par ailleurs, des modifications des concentrations des protéines plasmatiques sont observées au cours de la gestation. Chez la femme, les concentrations plasmatiques en albumine diminuent au cours de la grossesse alors que les concentrations fœtales en albumine augmentent. Ainsi, le ratio des concentrations en albumine fœto-maternelle, à 0.3 au premier trimestre, est de 1.2 à terme [133,180]. De plus, au cours du dernier trimestre de la grossesse, la concentration en Sex Hormone-Binding Globuline (SHBG) augmente d'un facteur 5 à 10 chez la femme enceinte [181].

La différence de concentrations en protéines et de leur affinité entre le plasma maternel et fœtal a des conséquences sur l'importance relative des fractions libres du BPS et sur la distribution du BPS entre les circulations maternelle et fœtale qui doivent être prises en compte pour prédire l'exposition du fœtus humain à la forme active du BPS. Il est par conséquent important d'évaluer la liaison du BPS aux protéines plasmatiques, car la connaissance de la fraction libre est essentielle pour interpréter correctement une concentration plasmatique mesurée de BPS et pour l'extrapolation *in vitro in vivo* de ses effets. L'objectif de cette étude est donc de déterminer la fraction libre du BPS chez la brebis gravide en début et en fin de gestation et chez le fœtus ovin.

2. Méthode expérimentale

Le pourcentage de BPS libre (non lié aux protéines plasmatiques) a été déterminé sur des pools de plasma ovin fœtal (n = 27 échantillons poolés) et maternel (n = 36 échantillons poolés) blancs collectés à 117 ± 5 jours de gestation au cours d'expériences antérieures réalisées au laboratoire. La liaison du BPS aux protéines plasmatiques a été étudiée *in vitro* en duplicata pour plusieurs concentrations de BPS (5, 10, 50 et 250 nM) par dialyse à l'équilibre avec un système Dianorm (CH8135, Langenau, Zurich, Switzerland) en utilisant une membrane semi-perméable en cellulose qui retient les substances de poids moléculaire supérieur à 5000 Daltons. Cette méthode a préalablement été décrite par Gayrard et coll. [182].

Dix microlitres d'une solution de BPS [H] ^{3} à 1 h (1.7 Ci/mmol, pureté 99.3 % ; Moravek Biochemicals and Radiochemicals, Brea, California, USA) dans l'éthanol a été ajoutée à chaque millilitre de solution tampon de BPS comme traceur (de 19 000 à 45 000 dpm par cellule de dialyse). La fraction libre de BPS est déterminée par le rapport entre la radioactivité mesurée dans le tampon de dialyse sur la radioactivité mesurée dans le plasma de la cellule de dialyse (Figure 20).

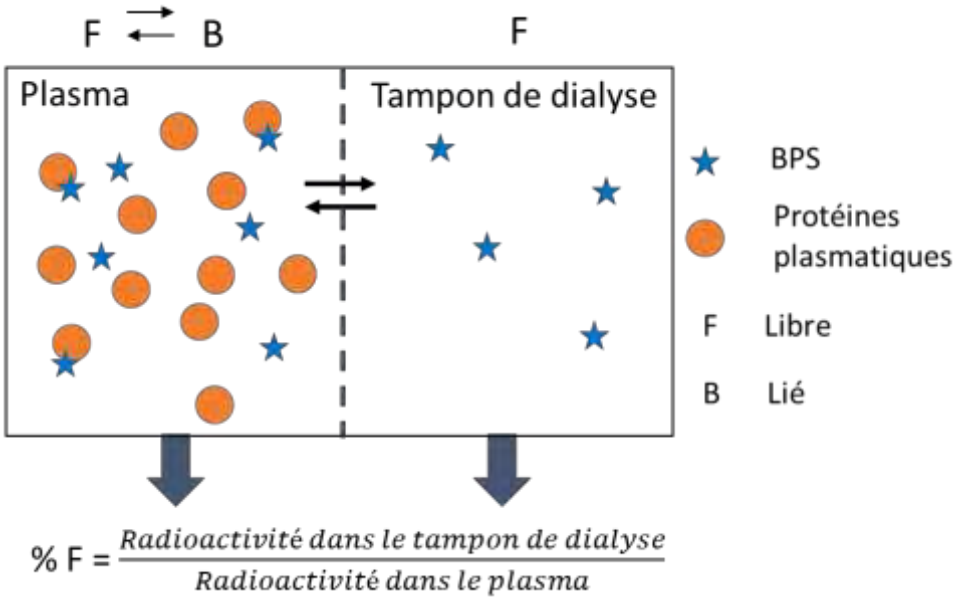


Figure 20 : Description schématique du principe de la dialyse à l'équilibre utilisé pour la détermination de la fraction libre et liée du BPS aux protéines plasmatiques.

3. Résultats et conclusion

Les pourcentages moyens de liaison du BPS aux protéines plasmatiques n'ont pas varié sur cette gamme de concentrations. Ils sont présentés et comparés à ceux du BPA dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Moyenne (± ET) des pourcentages de liaison du BPS et du BPA aux protéines plasmatiques sur des pools de plasma de brebis gravides et de fœtus ovins en fin de gestation.

	% fixation du BPS (moyenne ± écart-type)	**% fixation du BPA (moyenne ± écart-type)**
Brebis en fin de gestation	95.0 ± 0.62	96.2 ± 0.20
Fœtus ovin en fin de gestation	93.4 ± 0.62	90.7 ± 0.49

La fraction libre du BPS dans le plasma s'élève à 5.0 ± 0.6 % chez la brebis en fin de gestation et est du même ordre de grandeur chez le fœtus ovin (6.6 ± 0.6 %). Ce résultat signifie que la liaison du BPS aux protéines plasmatiques n'a pas d'influence sur le gradient de concentration entre le compartiment fœtal et le compartiment maternel, et donc sur le passage placentaire du BPS. Le pourcentage de BPS libre chez la brebis adulte est du même ordre de grandeur que celui du BPA, alors que le fœtus ovin est 1.5 fois plus exposé au BPA libre qu'au BPS ($p < 0.001$), pour une même concentration totale de bisphénol.

Ces résultats sur la liaison du BPS aux protéines plasmatiques des plasmas maternels et fœtaux humains et ovins seront exploités dans le cadre d'une comparaison interspécifique de liaison du BPS et du BPA aux protéines plasmatiques et feront l'objet d'une publication.

C. Étude préliminaire 1 : hydrolyse du BPSG dans le liquide amniotique *ex vivo*

1. Contexte et objectif

Dans l'étude TK présentée dans l'article 2, nous avons mis en évidence une hydrolyse du BPSG en BPS dans le compartiment fœtal. En effet, après une administration IV de BPSG-d8 au fœtus, on observe du BPS-d8 dans le compartiment fœtal (Article 2, Figure 3). Cette déconjugaison du BPSG semble relativement lente puisque les concentrations en BPS-d8 continuent à augmenter dans le compartiment fœtal jusqu'au dernier prélèvement, réalisé 72 h après l'administration de BPSG-d8.

Des glucuronidases sont présentes dans de nombreux tissus et liquides biologiques avec des activités similaires [183]. En particulier, une activité glucuronidase a été rapportée

dans le liquide amniotique [141] avec notamment une activité plus importante chez les fœtus mâles.

Le BPS dans le compartiment fœtal est métabolisé en BPSG au niveau hépatique et éliminé dans les urines fœtales elles-mêmes excrétées dans le liquide amniotique dans lequel baigne le fœtus. Notre hypothèse est que le BPSG pourrait être hydrolysé, au moins en partie, dans le liquide amniotique, et être ensuite absorbé par le fœtus, soit au niveau du tube digestif qui est très perméable ou par voie cutanée, pour rejoindre alors le compartiment central. Cette hypothèse a été mise à l'épreuve en évaluant *ex vivo* la déconjugaison du BPSG dans du liquide amniotique collecté extemporanément sur deux brebis à terme.

2. Méthode expérimentale

Un volume total de 10 mL de liquide amniotique a été prélevé stérilement, sur deux brebis gravides, par ponction à travers la membrane amniotique en début de césarienne. Le liquide amniotique collecté a été poolé, puis homogénéisé, et réparti en deux fractions de 5 mL placées dans une étuve à 37 °C sur une plaque à agitation oscillante. Deux fractions de 5 mL de sérum physiologique (NaCl) ont été traitées dans les mêmes conditions.

Une solution mère de BPSG à la concentration de 500 µg/mL a été préparée extemporanément dans du NaCl et conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation.

Cinquante microlitres de la solution mère de BPSG ont été ajoutés dans 5 mL de liquide amniotique ou de NaCl pour obtenir une concentration finale nominale de 5 µg/mL (0.020 0 µmol/mL ou 0.100 µmol *in toto*). Quatre cents microlitres de solution/liquide amniotique ont été prélevés au temps 10, 20, 30 minutes puis 1, 2, 4, 6, 18 et 24 heures après l'addition de BPSG.

Les échantillons collectés ont été immédiatement placés dans la glace afin de stopper toute réaction puis centrifugés (3000 x g, 4 °C, 10 min) et conservés à -20 °C jusqu'au dosage. Les concentrations en BPS et BPSG dans les échantillons ont été déterminées par UPLC-MS/MS.

3. Résultats et conclusion

Ni le BPS, ni le BPSG n'ont été détectés dans les échantillons de liquide amniotique et de NaCl collectés avant l'ajout du BPSG. Dans le NaCl, la concentration de BPSG est restée

stable tout au long de l'expérience et la présence de BPS n'a jamais été mise en évidence dans le NaCl au cours de l'incubation.

Dans le liquide amniotique, 4.2 % de la dose de BPSG a été déglucuronoconjugué sur la période de 24 h. Près de la moitié du BPS est formée au cours des 2 premières heures d'incubation. La vitesse de déconjugaison du BPSG est plus importante au cours des 10 premières minutes d'incubation (1.35 nmol/h), elle est ensuite relativement constante sur la période de 30 min à 4 h (0.11 à 0.38 nmol/h) et diminue ensuite jusqu'à 24 h. Cette diminution de la vitesse de déconjugaison du BPSG après 4 h d'incubation pourrait être liée à des conditions d'incubation (oxygénation) non optimales ou à une saturation de l'activité de la glucuronidase (Figure 21).

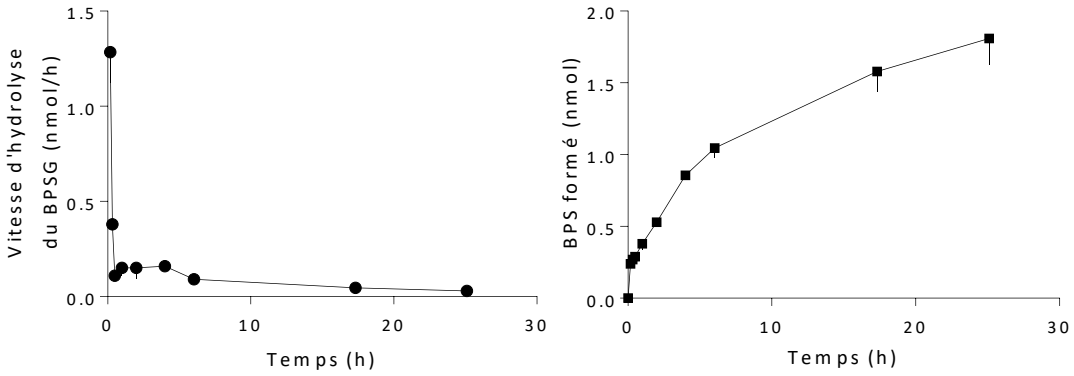


Figure 21 : Vitesse d'hydrolyse du BPSG (nmol/h) et évolution temporelle des quantités cumulées de BPS formé (nmol) dans le liquide amniotique maintenu sous agitation à 37 °C.

Cette expérience préliminaire d'étude de l'hydrolyse du BPSG dans le liquide amniotique *ex vivo* indique que le liquide amniotique possède une activité glucuronidase et constitue donc un site potentiel de l'hydrolyse périphérique du BPSG dans le compartiment fœtal.

IV. Conclusions

Pour étudier la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire, l'utilisation d'un modèle intégratif tel que la brebis gravide a permis de prendre en compte l'ensemble des déterminants de l'exposition fœtale pour évaluer les paramètres TK du BPS et du BPSG de la mère et du fœtus.

L'analyse non compartimentale des données a montré le taux de transfert materno-fœtal du BPS est faible, de 0.4 %, soit un taux de transfert 10 fois inférieur à celui du BPA. Ce faible taux de transfert pourrait signifier, à tort, que le fœtus est mieux protégé de l'exposition au BPS comparativement à celle au BPA. Cependant, la clairance fœtale du BPS est 30 fois inférieure à celle du BPA. La clairance placentaire fœto-maternelle du BPS est faible et la clairance métabolique du BPS qui prédomine conduit à la production de BPSG qui s'accumule dans le compartiment fœtal en raison d'un défaut de passage transplacentaire. L'élimination du BPSG, tout comme celle du BPAG, piégé dans le compartiment fœtal nécessite son hydrolyse en BPS. Ce phénomène d'hydrolyse entraîne une persistance du BPS dans le compartiment fœtal, déterminée par la demi-vie plasmatique du BPSG dans le compartiment fœtal, qui est de 86 h. Le taux d'accumulation du BPS dans le compartiment fœtal est de 6.5. Ainsi, même si le passage materno-fœtal du BPS est faible, l'accumulation du BPS dans le compartiment fœtal conduit à une exposition au BPS similaire à celle au BPA, pour un schéma d'exposition maternelle répétée similaire.

Le BPS et le BPSG sont distribués dans le compartiment fœtal et notamment dans le liquide amniotique où le ratio des concentrations en BPSG/BPS est plus faible que dans le plasma (30 versus 200). L'étude préliminaire menée *ex vivo* suggère que le liquide amniotique possède des β-glucuronidases capables d'hydrolyser le BPSG en BPS. Il est important de quantifier ce phénomène de réactivation du BPSG en BPS dans le liquide amniotique ou dans les tissus cibles pour évaluer le risque lié à l'exposition fœtale au BPS.

L'étude de la disposition du BPS et du BPSG chez la brebis gravide a permis d'estimer les paramètres TK du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire en prenant en compte tous les déterminants de l'exposition fœtale simultanément.

En raison des différences interspécifiques de placentation, l'extrapolation de ces résultats, obtenus chez la brebis, à l'Homme nécessitait d'évaluer le transfert placentaire du BPS et du BPSG chez l'Homme. Le modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé en circuit ouvert a ainsi été utilisé pour évaluer les clairances placentaires materno-fœtales et fœto-maternelles du BPS et du BPSG.

Étude du transfert placentaire du BPS et du BPSG sur le modèle de perfusion de cotylédon humain isolé

I. Contexte et objectifs

À ce jour, une seule étude a rapporté l'exposition du fœtus humain au BPS. Sur 61 couples mère-nouveau-né en Chine, des concentrations plasmatiques de BPS total ont été rapportées dans le plasma de 4 femmes (0.03-0.07 ng/mL) et dans le sang de cordon ombilical de 7 nouveau-nés (0.03-0.12 ng/mL)[14]. Cette étude suggère donc que le BPS a la capacité de passer la barrière placentaire.

Cependant, le transfert placentaire du BPS n'a encore jamais été évalué. Le but de notre étude était de caractériser le transfert placentaire du BPS et du BPSG dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel sur le placenta humain. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de perfusion de cotylédon humain isolé en circuit ouvert précédemment développé au laboratoire [184]. Ce modèle permet de quantifier le transfert placentaire de molécules d'intérêt sur une durée de 90 minutes compatible avec le maintien de la survie placentaire et d'évaluer les clairances placentaires dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel (Figure 22).

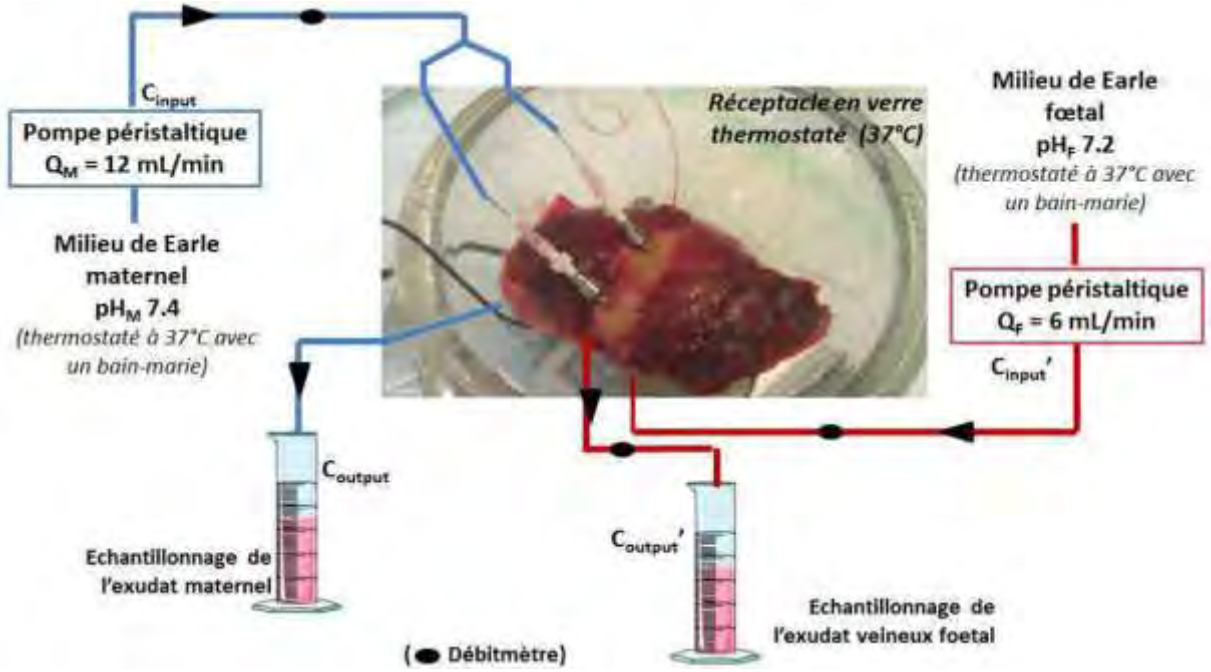


Figure 22 : Schéma du système de perfusion de cotylédon humain isolé en circuit ouvert. Les circulations fœtale et maternelle sont recréées expérimentalement en faisant circuler du milieu de Earle. Les conditions physiologiques de température, de pH et de débit cotylédonnaire maternels et fœtaux sont contrôlées, d'après [3].

Le protocole envisagé était dans un premier temps, comme nous l'avons fait sur le modèle ovin, d'évaluer simultanément le transfert placentaire du BPS (BPSG) dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel sur le même placenta en utilisant du BPS-d4 (BPSG) pour l'évaluation du transfert materno-fœtal et du BPS (BPSG) marqué au deutérium, le BPS-d8 (BPSG-d8), pour l'évaluation du transfert placentaire fœto-maternel (Figure 23).

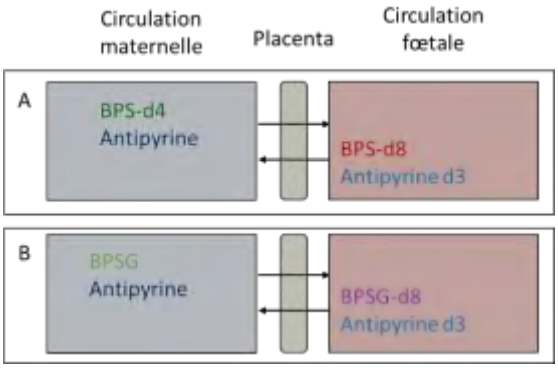


Figure 23 : Représentation schématique du premier protocole expérimental pour l'étude du transfert placentaire du BPS-d4 (A) et du BPSG (B). L'utilisation de BPS (BPSG) marqué au deutérium permet de distinguer dans les échantillons collectés le BPS (BPSG) qui provient de la circulation maternelle ou fœtale. L'antipyrine est un marqueur de diffusion passive permettant de vérifier l'intégrité du placenta et ainsi de valider l'expérience de perfusion.

Cependant, l'ajout de BPS-d4 (BPSG) et de BPS-d8 (BPSG-d8) simultanément dans la circulation maternelle et fœtale influence le gradient de concentration et donc le phénomène de diffusion passive. Par conséquent, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est plus long. Ce protocole n'était donc pas compatible avec la durée de perfusion de 90 min imposée par le modèle. Pour pallier ce biais méthodologique, le transfert placentaire du BPS-d4 et du BPSG a été évalué alternativement dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel (Figure 24).

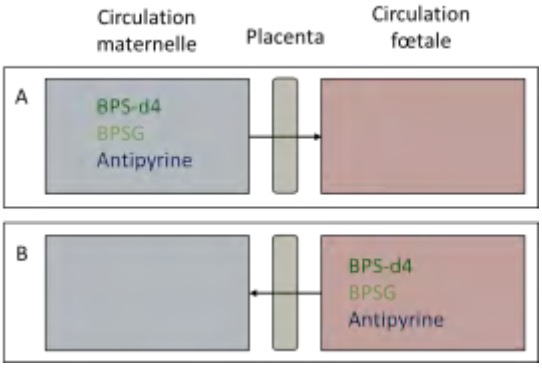


Figure 24 : Représentation schématique du protocole d'étude du transfert placentaire du BPS marqué au deutérium (BPS-d4) et du BPSG simultanément, dans le sens materno-fœtal (A) ou fœto-maternel (B). L'utilisation de BPS marqué au deutérium permet de distinguer le BPS-d4 ajouté au liquide de perfusion, du BPS qui pourrait provenir de l'hydrolyse du BPSG. L'antipyrine est utilisée comme marqueur de diffusion passive.

Les résultats montrent que le taux de transfert du BPS est faible, notamment dans le sens materno-fœtal, ce qui suggère l'implication d'un transport actif dans le transfert placentaire du BPS et du BPSG qui favoriserait l'efflux de ces deux substances vers la circulation maternelle. Dans la littérature, il n'existe pas de donnée sur les mécanismes de transport placentaire du BPS. Des études *in vitro* sur des cellules surexprimant certains transporteurs ont montré que le BPA stimule l'activité ATPase de différents transporteurs (chez l'Homme, MRP2, BCRP, MRP3) de la barrière placentaire, suggérant que le BPA est un substrat pour ces transporteurs [136,185]. La P-gp est le transporteur d'efflux le plus présent sur la barrière placentaire. Sur un modèle de cellules BeWo (lignée de cellules trophoblastiques humaines issues de choriocarcinome), l'ajout de 100 µM de Vérapamil, un inhibiteur des P-gp, diminue le rapport de perméabilité du BPA de la membrane basale vers la membrane apicale et dans les sens apical-basal (de 2 environ à 0.90), ce qui suggère que le transport du BPA implique la P-gp [186].

Compte tenu de l'analogie structurale entre le BPS et le BPA, notre hypothèse est que le BPS pourrait être un substrat des ABC transporteurs, limitant ainsi son passage materno-fœtal. Toutefois, les propriétés physicochimiques du BPS (pKa1 et pKa2 de 7.42 et 8.03) ne nous permettent pas d'exclure l'implication des transporteurs d'anions, comme les OATP car, au pH physiologique de 7.4, la forme anionique du BPS est présente en équilibre avec sa forme non ionique.

Notre objectif était donc d'examiner l'hypothèse selon laquelle les transporteurs d'efflux de la famille des ABC, notamment la P-gp, limitent le passage materno-fœtal du BPS. Ainsi, sur le modèle de placenta perfusé, nous avons étudié l'effet de l'addition d'un inhibiteur de la P-gp au milieu de perfusion maternel sur le passage placentaire du BPS dans le sens materno-fœtal.

Pour ne pas avoir à valider les conditions d'utilisation des inhibiteurs dans nos conditions expérimentales, nous avons choisi le PCS833 (Valspodar), un inhibiteur de P-gp qui a déjà été utilisé sur le modèle de placenta humain perfusé en circuit ouvert [187] pour inhiber le transfert de molécules à des concentrations de l'ordre du µM. Le PSC833, qui est un analogue de la cyclosporine, est utilisé à plus faible concentration que cette dernière (1-2 µM versus 10 µM) [187–190]. De plus, le PSC833 est un inhibiteur non compétitif des P-gp [191] plus efficace et moins cytotoxique que la cyclosporine [192].

L'étude du transfert placentaire bidirectionnel du BPS et du BPSG sur le cotylédon humain perfusé en circuit ouvert et l'implication de transporteurs d'efflux dans le transfert materno-fœtal du BPS sont décrits dans l'article 3. Ces résultats ont été valorisés sous la forme d'une communication orale et d'un article soumis dans la revue « Chemosphere ». L'ensemble du travail présenté dans cet article a été conduit en collaboration avec le service de Gynécologie Obstétrique de l'Hôpital Paule de Viguier situé à Toulouse.

II. Article 3

Is Bisphenol S a safe alternative to Bisphenol A in terms of potential fetal exposure ? Placental transfer across the perfused human placenta.

Flore C Grandin*, Marlène Z Lacroix†, Véronique Gayrard*‡, Catherine Viguié*, Hanna Mila*‡, Alice de Place§, Christophe Vayssière§¶, Mathieu Morin§, Julie Corbett*, Cécile Gayrard*, Clémence A Gely†, Pierre-Louis Toutain‖ and Nicole Picard-Hagen*‡

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

†INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31 076 Toulouse, France.

‡Université de Toulouse, ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), EIP (Ecole d'Ingénieurs de Purpan), UPS (Université Paul Sabatier), F-31076 Toulouse cedex 3, France.

§Service de gynécologie-obstétrique, Hôpital Paule de Viguier, CHU de Toulouse, Toulouse, France; UMR 1027 INSERM, Université Paul-Sabatier Toulouse III, Toulouse, France.

¶UMR 1027 INSERM, Université Paul-Sabatier Toulouse III, Toulouse, France.

‖The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom.

Flore C Grandin: flore.grandin@inra.fr ; Marlène Z Lacroix : m.lacroix@envt.fr; Véronique Gayrard : v.gayrard@envt.fr ; Catherine Viguié : c.viguie@envt.fr ; Alice De Place : urog-pdv@chu-toulouse.fr ; Christophe Vayssière : vayssiere.c@chu-toulouse.fr ; Mathieu Morin : morin.m@chu-toulouse.fr ; Pierre-Louis Toutain : pltoutain@wanadoo.fr ; Nicole Picard-Hagen : n.hagen-picard@envt.fr.

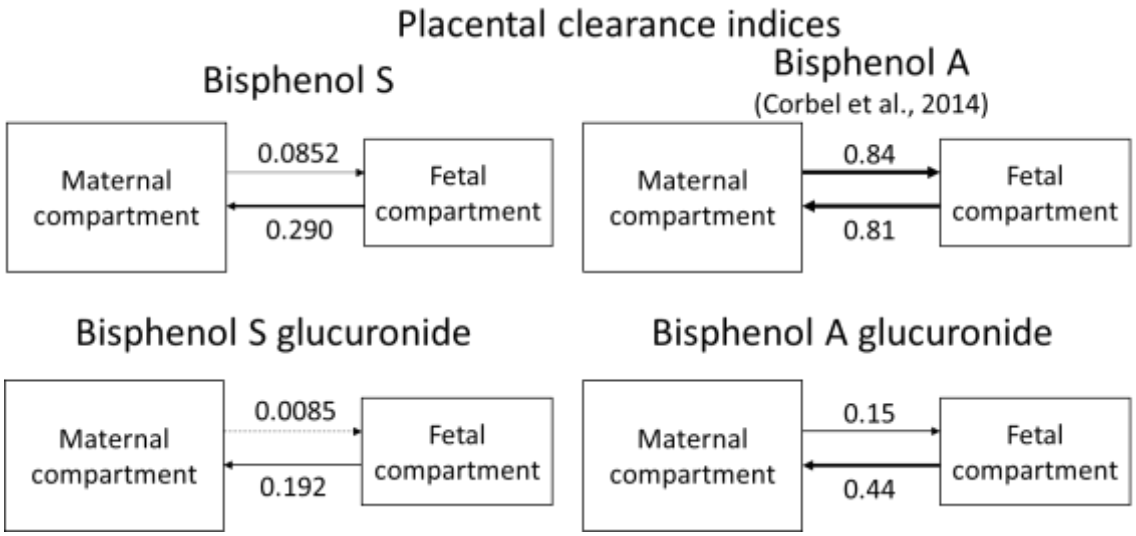
Corresponding author: Nicole Picard-Hagen, UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87 614, 31076 Toulouse cedex 3, France, Tel. : (0) 33 5 61 19 38 61, E-mail : n.hagen-picard@envt.fr

Declaration of interest : None.

Highlights

- The placenta is more efficient to restrict fetal exposure to BPS than to BPA.
- Materno-fetal transfer of Bisphenol S glucuronide was almost non-existent.
- It is likely that BPS and its metabolite are extruded from fetal compartment.

Graphical abstract



Abbreviations

BPS : Bisphenol S ; BPSG Bisphenol S glucuronide ; BPA : Bisphenol A ; BPAG : Bisphenol A glucuronide ; P-gp : P glycoprotein

Abstract

The aim of our study was to evaluate the bidirectional transfer of Bisphenol S (BPS) and its main metabolite, BPS Glucuronide (BPSG), using the model of perfused human placenta and to compare the obtained values with those of Bisphenol A (BPA) and BPA Glucuronide.

Fourteen placentas at term were perfused in an open dual circuit with deuterated BPS (1 and 5 µM) and non-labelled BPSG (2.5 µM) and a freely diffusing marker antipyrine (800 ng/ml) in the presence of albumin (25 mg/ml). In a second experiment, the potential role of P glycoprotein in the active efflux of BPS across the placental barrier was studied using the well established P-glycoprotein inhibitor, PSC833 (2 and 4 µM).

Placental transfer of BPS was much lower than that of BPA in both directions. The placental clearance index of BPS in the materno-fetal direction was three times lower than in the opposite direction, strongly suggesting some active efflux transport. However, our results show that P-glycoprotein is not involved in limiting the materno-fetal transfer of BPS. Placental transfer of BPSG in the fetal compartment was almost non-existent indicating that, in the fetal compartment, BPSG originates mainly from feto-placental metabolism. The feto-maternal clearance index for BPSG was 20-fold higher than the materno-fetal index.

We conclude that the blood-placental barrier is much more efficient in limiting fetal exposure to BPS than to BPA, indicating that the placenta has a crucial role in protecting the human fetus from BPS exposure.

Keywords : Bisphenol S, Bisphenol S Glucuronide, human placental transport, endocrine disruptor, Bisphenol A.

1.Introduction

Widespread human exposure to bisphenol A (BPA) and serious concern about its harmful effects on human health have led to the ban or restriction of BPA production and use (ECHA, 2017; French government, 2012; USEPA, 2014), and its replacement by structural analogues. Bisphenol S (BPS), one of the principal BPA-alternative chemicals, is increasingly used for the production of epoxy resins and paper products and as an anticorrosive agent in epoxy glues and a reagent in polymer reactions (Wu et al., 2018). Recent human biomonitoring studies revealed the presence of BPS in 89.4 % of urine samples from the general U.S. population (Lehmler et al., 2018), and in 67.8 % of urine samples from a large population (n=1396) of pregnant women in the Netherlands (Philips et al., 2018). In addition, BPS was found in four maternal (0.03-0.07 ng/ml) and seven cord serum samples (0.03-0.12 ng/ml) from a population of 61 mother-newborn pairs in China, suggesting that BPS can cross the placental barrier (Liu et al., 2017). Due to the structural similarity of BPS to BPA and its extensive use in our daily life, concern about the safety of BPS has become an important issue. Recent in vitro and in vivo data showed that BPS has equal or even greater toxicological effects, with an endocrine-disrupting effect similar, at least in part, to that of BPA (Eladak et al., 2015; Goldinger et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015; Roelofs et al., 2015; Rosenmai et al., 2014; Siracusa et al., 2018). Furthermore, in vivo exposure to BPS during development has been reported to disrupt reproductive, metabolic and developmental endpoints through endocrine pathways in zebrafish, rodents and sheep (Hill et al., 2017; Ji et al., 2013; Naderi et al., 2014; Pu et al., 2017; Qiu et al., 2016). This highlights the vulnerability of the developmental period to BPS exposure (Catanese and Vandenberg, 2017; Crump et al., 2016).

Data about human fetal exposure to BPS are to date extremely scarce. Toxicokinetic investigations in the pregnant ewe showed that only 0.4 % of the maternal dose was transferred to the fetus. During the late stage of pregnancy, the fetus is very efficient in metabolizing BPS into its main metabolite, BPS glucuronide (BPSG), that remains trapped in the fetal compartment because of its inability to cross the placenta. The elimination of fetal BPSG thus requires its back conversion into bioactive BPS in the fetal compartment. Furthermore, the restricted feto-maternal placental passage of BPS leads to an accumulation of both BPS and BPSG in the fetal compartment (Grandin et al., 2018). Thus, the placental transfers of BPS and BPSG are crucial in determining exposure of the fetus to BPS and its

conjugate. However, the direct extrapolation of animal studies to humans is hindered by structural differences in the placenta between species. This highlights the need to develop models to predict fetal exposure relevant to humans. An ex vivo system of perfused isolated human placenta in an open-circulating system had been used to quantify the transplacental transfer of BPA (Corbel et al., 2014). This relevant model was therefore used in the current study to investigate the placental transfer of BPS and its main metabolite, BPSG.

Our first objective in this study was to evaluate the transplacental transfer of BPS and BPSG in both the materno-fetal and feto-maternal directions, using the human perfused cotyledon and to compare these values with those of BPA and BPA glucuronide (BPAG) determined previously with the same model (Corbel et al., 2014). The limited materno-fetal transfer of BPS prompted us to examine, in a second experiment, the possible involvement of an efflux transporter in limiting the materno-fetal placental transfer of BPS. The P-glycoprotein (P-gp or ABCB1), the most abundant member of the ATP-binding cassette protein transporter family, is expressed in the apical membrane of the syncytiotrophoblast (Ceckova-Novotna et al., 2006), and is involved in the efflux transport of a wide variety of xenobiotics and thereby in protection of the fetus (Joshi et al., 2016; Syme et al., 2004). Our second objective in this study was therefore to test the hypothesis that P-gp might be involved in limiting BPS materno-fetal transfer (Mölsä et al., 2005; Rahi et al., 2009; Sudhakaran et al., 2005).

2.Materials and Methods

Placenta cotyledons were perfused in an open double circuit using a method modified from that of Schneider et al., (Schneider et al., 1972) as previously described (Corbel et al., 2014). Placentas (547 ± 132 g) were collected after uneventful pregnancy from HIV-seronegative women after vaginal (n=3) or caesarean (n=7) delivery in the CHU Paule de Viguier, Toulouse, France. The study received institutional approval (DC-2013-1950) and each patient gave written informed consent to participate in the study.

2.1.Chemicals

BPS-d4 (purity ≥ 97 %) and BPSG (purity ≥ 97 %) were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). BPS was dissolved in ethanol at a concentration of 1 mg/ml and BPSG was dissolved in isotonic saline at 10 mg/ml. Antipyrine and PSC833 (purity ≥ 98 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and were

dissolved at 10 mg/ml and 4.9 mg/ml in apyrogenic water and DMSO, respectively. All solutions were stored at -20°C until use. Bovine serum albumine (BSA, Fraction V, purity ≥ 96 %) and Earle's Balanced Salt solution were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France).

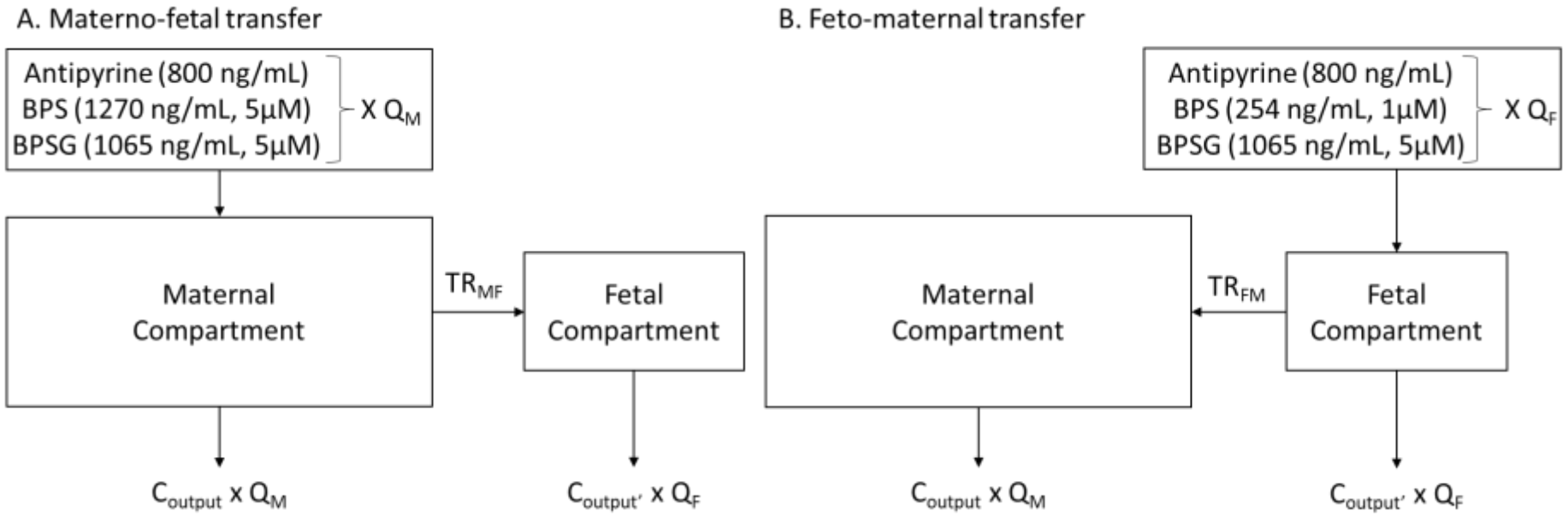
All materials for placenta perfusion, including the materials used for the preparation of solutions, sampling, processing and analysis, were in glass or BPS-free plastic.

2.2.Placental perfusion

The study was designed to evaluate the simultaneous placental transfer of BPS and BPSG, both in the materno-fetal and feto-maternal directions (Figure 1). The maternal and fetal perfusion solutions were prepared with Earle medium supplemented with 25 g/L of BSA to reflect the physiological plasma protein concentration at late pregnancy (Larsson et al., 2008). BPS was used in deuterated form (BPS-d4) in order to distinguish the d4-labelled BPS added to the media from non-labelled BPS potentially resulting from BPSG hydrolysis.

Antipyrine (800 ng/ml), a free passive diffusion reference substance which is not bound to plasma proteins, and the test substances, BPS-d4 and BPSG were added to the maternal or to the fetal reservoir to study the materno-fetal or feto-maternal transfers, respectively. BPS was infused at 1270 ng/ml (5 µM) and 254 ng/ml (1 µM) in the maternal and fetal medium, respectively, while BPSG was infused at the same concentration (1065 ng/ml, (2.5 µM)) in both compartments (Figure 1). Because a low BPS placental transfer was previously observed in the pregnant sheep model (Grandin et al., 2018), high nominal concentrations of both BPS-d4 and BPSG were used to ensure their effective detection in the opposite compartment after placental transfer.

Figure 1 : Two-compartment model of the open-configuration double circuit placental perfusion used to evaluate (A) the materno-fetal transfer (TRMF) and (B) the feto-maternal transfer (TRFM) of antipyrine (800 ng/mL), BPS-d4 (1270 ng/mL, 5µM or 254 ng/mL, 1µM) and BPSG (1065 ng/mL, 2.5 µM). Coutput and Coutput' were the maternal and fetal outflow concentrations, respectively. QM and QF were the maternal and fetal system flow rates, respectively.


A. Materno-fetal transfer
Antipyrine (800 ng/mL)
BPS (1270 ng/mL, 5µM)
BPSG (1065 ng/mL, 5µM)
X Q_M
Maternal Compartment
TR_{MF}
Fetal Compartment
C_{output} x Q_M
$C_{output'}$ x Q_F
B. Feto-maternal transfer
Antipyrine (800 ng/mL)
BPS (254 ng/mL, 1µM)
BPSG (1065 ng/mL, 5µM)
X Q_F
Maternal Compartment
TR_{FM}
Fetal Compartment
C_{output} x Q_M
$C_{output'}$ x Q_F

Each perfusion lasted 90 min. The pH was adjusted continuously throughout the perfusion to 7.41 ± 0.013 and 7.31 ± 0.011 for the maternal and fetal perfusion media, respectively. Maternal and fetal exudates were collected every 5 min after adding the test substances and the volumes were measured. BPS-d4 and BPSG materno-fetal (feto-maternal) transfers were determined after simultaneously adding antipyrine, BPS-d4 and BPSG to the maternal (fetal) reservoir at time 0. Control samples (1 ml) were collected from the fetal and maternal inflow reservoirs before addition of these substances. Samples were then collected from the maternal (fetal) inflow reservoir immediately after adding the test molecules and at 30, 60 and 90 min, from the maternal (fetal) outflow perfusate at 0, 30, 60 and 90 min, and from the fetal (maternal) outflow perfusate at time 0 and every 5 min up to 90 min, to evaluate the materno-fetal (feto-maternal transfer).

At the end of the perfusion, the isolated cotyledon was rinsed with phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 4°C for 20 min. This washing solution was collected. All samples were immediately chilled in ice and centrifuged for 10 min at 3000g and 4°C and the supernatant was collected and stored at -20°C until assayed.

The involvement of P-gp, in limiting the materno-fetal clearance of BPS, was determined by measuring the materno-fetal transfer of BPS-d4 before and after the addition of a P-gp inhibitor. PSC833 was selected because it is a specific inhibitor of P-gp efflux protein and its inhibitory effect during ex vivo placental open perfusion had already been observed within the range of concentrations used in this study (Rahi et al., 2007; Sudhakaran et al., 2008). It was added to the maternal reservoir after 40 min of perfusion. First, the placental passage of BPS-d4 and BPSG was evaluated before and after the addition of PSC833, at a concentration of 2µM (one placenta). As the materno-fetal transfers of BPS-d4 and BPSG were not affected by this inhibitor under these conditions, the experiment was repeated with a higher concentration of PSC833, 4µM, and only with BPS-d4.

Placental samples (about 1 g) were taken from a non-perfused cotyledon and from the perfused cotyledon (white area) after the washing perfusion and stored at -80°C, to determine the tissue concentrations of BPS and BPSG.

2.3.Placental tissue homogenization

Placental tissue was reduced to 1 to 9 mm² fragments and aliquoted into 100 mg-fractions. These fractions were then ground for 4 min at 30 Hz using a vibrating tissue

homogenizer (MM 400, Retsch, Eragny sur Oise, France) in liquid nitrogen-refreshed containers to avoid sample defrosting. Samples were stored at 80°C until assayed.

The extent of potential BPSG hydrolysis during the homogenization step was determined, in a preliminary experiment, by processing 5 blank liver samples spiked with BPSG-d8. The mean hydrolysis rate of BPSG-d8 after the tissue homogenization procedure was 1.27 ± 0.24 % and was therefore considered negligible. This tissue homogenization procedure was then applied to placenta samples.

2.4.Analytical procedure

BPS-d4, BPSG and antipyrine were extracted from the perfusion medium and placental tissue by adding 200 µL of an acetonitrile/zinc sulfate mixture (50:50, vol:vol) containing internal standards (BPS at 50 ng/ml, BPSG-d8 and antipyrine-d3 at 500 ng/ml in perfusion medium and BPS-d4 at 100 ng/mL and BPSG-d8 at 1000 ng/mL in placental tissue). Samples were mixed for 5 min at 10°C and 1400 rpm (MB-102, Bioer, Hangzhou, China) and then centrifuged at 20000g and 4°C for 20 min.

Antipyrine, BPS-d4 and BPSG concentrations in the perfusion medium and in placental tissue were determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection using a previously described adapted method (Grandin et al., 2017). In the perfusion medium, the calibration curves ranged from 10 to 1000 ng/ml, 1 to 100 ng/ml and 5 to 1000 ng/ml, for antipyrine, BPS and BPSG, respectively. In placental tissue, the calibration curves ranged from 5 to 1000 ng/ml for both BPS and BPSG. The mean intra- and inter-day coefficients of variation for the three concentration levels were below 15 %. In perfusion medium, the lower limits of quantification (LLOQs) were validated at 10 ng/ml for antipyrine, 1 ng/ml for BPS-d4 and 5 ng/ml for BPSG. In placental tissue, the LLOQs were validated at 5 ng/g for both BPS and BPSG.

BPS (but not BPS-d4) and BPSG were measured in cotyledon samples (around 100 mg) before and after perfusion.

Because of the very low passage of BPSG in the materno-fetal direction, an analytical method using dansyl chloride derivation, which enabled a highest sensitivity (LLOQ at 0.25 ng/ml) to be obtained (Wang et al., 2013), was developed to measure BPSG in the fetal outflow perfusate.

2.5.Calculation method and statistical analysis

Only the concentrations at steady-state for antipyrine, BPS-d4 and BPSG, were used to calculate the transfer rate, the extraction rate, the placental clearance and the clearance index, according to the Challier formulas (Challier, 1985; Challier et al., 1977), as previously described (Corbel et al., 2014). The transfer rate was calculated for each steady state time point as the ratio between the concentrations of BPS/BPSG in the receiving compartment to the concentration in the entrance compartment expressed as a percentage. The clearance index was the ratio of the transfer rate of BPS or BPSG to that of antipyrine. The transplacental clearance of BPS/BPSG was calculated as the ratio of the concentration in the receiving compartment multiplied by its flow rate to the concentration in the entrance compartment. The extraction rate was the fraction of the dose (corresponding to the concentration multiplied by its flow rate) transferred from the entrance compartment to the receiving one (Figure 1). In the materno-fetal direction, the perfusions were validated if the rate of antipyrine transfer was above the generally accepted threshold of 20 % (Gavard et al., 2009), whereas a threshold antipyrine transfer rate higher than the 15 %, previously reported by Challier et al. (1977), was chosen to validate the feto-maternal perfusions.

The mass balance was calculated as the ratio of the sum of the quantities of substrate in the perfusion media, the tissue (for BPSG only) and the PBS washings to the measured amount of the substrate in the maternal or fetal reservoir, as previously described (Corbel et al., 2014).

Data are expressed as means (± SD). The statistical analyses were done using the R®software (R development core team, 2005).

For both the feto-maternal and materno-fetal transfers, the mean placental transfers of BPS, BPSG and antipyrine at each time point along the experiment were compared by a three-way ANOVA with the substrate and the perfusion time as fixed effect factors, the placenta and the double interactions between substrate, perfusion time and placenta as random-effect factors.

For each substance, the materno-fetal and feto-maternal clearance indices were compared using a three-way ANOVA with the direction (materno-fetal and feto-maternal), the substrate and their interaction as fixed-effect factors and the placenta nested in the direction as a random-effect factor.

The BPS clearance indices in absence or presence of the P-gp inhibitor were compared using a three-way ANOVA with the inhibitor, the perfusion time and their interaction as fixed-effect factors, and with the placenta and the perfusion time nested in the inhibitor as random-effect factors.

3.Results

The overall mean transfer rates of antipyrine, for all the validated perfusions (n=10), were 34.2 ± 10.1 % and 20.7 ± 4.84 % in the materno-fetal and feto-maternal directions, respectively. The wet weight of perfused cotyledons was 29.5 ± 17.2 g. The average flow rates were 12.7 ± 1.2 ml/min in the maternal circulation and 5.3 ± 0.46 ml/min in the fetal circulation and remained stable throughout the perfusion.

Before perfusion, BPS was quantified in two placentas out of nine, at concentrations close to the BPS LOQ (6.66 and 5.90 ng/g), whereas no BPSG was detected in any placenta.

For all 10 placentas, the overall mean recovery (± SD) of infused substances at the end of the perfusion, in the fetal and maternal perfusates and in the cotyledon (BPSG only) were 85.8 ± 6.03 % (range 75.2-92.9 %) and 84.7 ± 5.12 % (range 79.9-90.1 %) for BPS-d4 perfusion and 90.2 ± 9.54 % (range 78.3-99.2 %) and 81.6 ± 1.22 % (range 80.6-83.0 %) for BPSG perfusions in the materno-fetal and in the feto-maternal directions, respectively.

BPS was never detected in any perfusate following BPSG perfusion in either the feto-maternal or materno-fetal directions.

3.1.Placental transfer of BPS and BPSG

Figure 2A depicts the mean (± SD) time courses of the materno-fetal placental transfer of BPS d4, BPSG and antipyrine at the concentrations of 1270 ng/ml, 1065 ng/ml and 800 ng/ml (n=7), respectively. The materno-fetal transfer rates (mean ± SD, range) of BPS (3.18 ± 2.64 %, 0.527-8.12 %, n=7) and BPSG (0.339 ± 0.264 %, 0.113-0.717 %, n=4) were about 10-fold lower for BPS and 100-fold lower for BPSG than the transfer of freely diffusible antipyrine (34.2 ± 10.1 %, 23.8-52.4 %, n=7, $p < 0.001$, Table 1). The mean ± SD (range) materno-fetal clearances were 0.174 ± 0.151 ml/min (0.0239-0.450 ml/min) and 0.0181 ± 0.0149 ml/min (0.006-0.0398 ml/min) for BPS and BPSG, respectively. In the materno-fetal experiment, 2.49 ± 2.36 % and 0.228 ± 0.221 % , respectively, of the BPS-d4 and the BPSG added to the maternal perfusate, were transferred across the placental barrier. A low fraction of the BPSG dose

(0.112 ± 0.0754 %, ranging from 0.0489 to 0.216 %) remained in the cotyledon after BPSG perfusion.

Figure 2B shows the time-courses (mean ± SD) for the feto-maternal placental transfer of BPS d4, BPSG and antipyrine. The feto-maternal transfer rates (mean ± SD, range) of BPS (5.85 ± 1.22 %, 4.73-7.15 %, n=3) and BPSG (3.97 ± 0.919 %, 3.02-4.85 %, n=3) were respectively about 3.5-fold and 5-fold lower than that of antipyrine (20.7 ± 4.84 %, 15.2-24.3 %, n=3, $p < 0.001$) (Table 1). The mean ± SD (range) feto-maternal clearances were 0.717 ± 0.144 ml/min (0.584-0.870 ml/min) for BPS and 0.487 ± 0.108 ml/min (0.374-0.590 ml/min) for BPSG. In the feto-maternal experiment, 4.46 ± 0.702 % of BPS and 13.2 ± 2.60 % of BPSG added to the fetal perfusate were transferred across the placental barrier. Only 0.360 ± 0.125 % (ranging from 0.244 to 0.492 %) of the BPSG dose remained in the perfused cotyledon.

The overall clearance indices of BPS and BPSG were much lower in the materno-fetal direction than in the opposite direction (3.4 and 23-fold, respectively, $p < 0.001$) (Table 1).

Figure 2 : Time courses of the mean (± SD) materno-fetal (A, n=7) and feto-maternal (B, n=3) transfer rates of antipyrine (○, left y axis), BPS-d4 (●) and BPSG (Δ) (right y axis) during the perfusion.

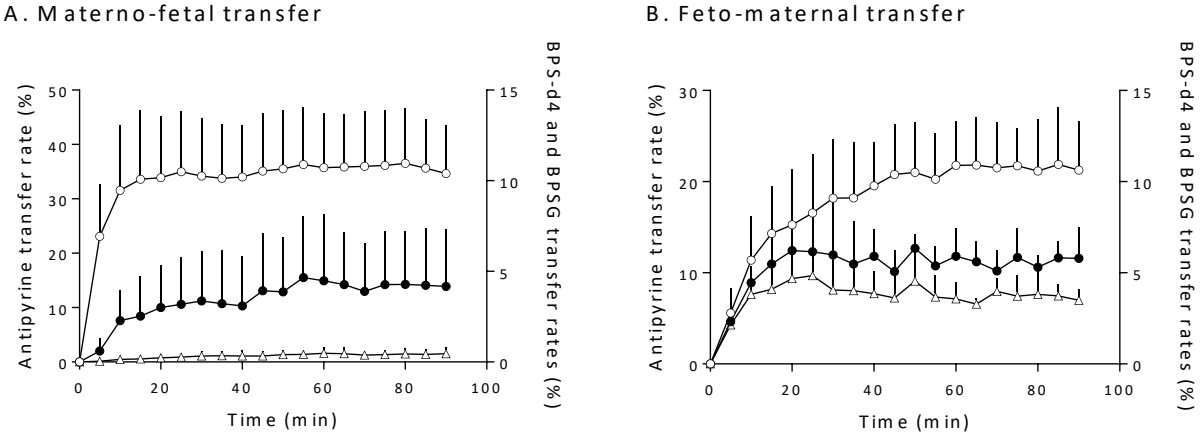


Table 1 : Materno-fetal and feto-maternal BPS and BPSG perfusion parameters.

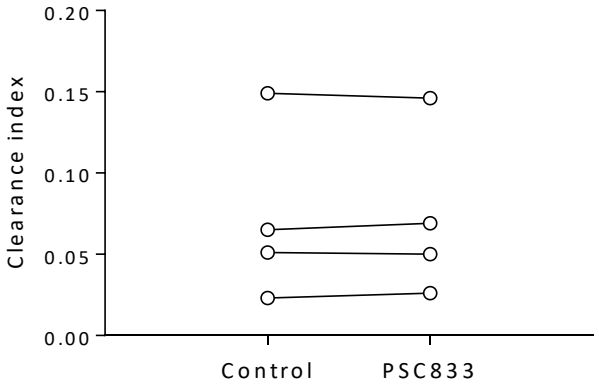
Direction	Placenta	Transfer rate (%) [1]			Clearance index[2]		Placental clearance (ml/min) [3]		
		Antipyrine	BPS	BPSG	BPS	BPSG	Antipyrine	BPS	BPSG
Materno-	Mean	34.2	3.18	0.339	0.0852	0.00852	1.83	0.174	0.0181
fetal	SD	10.1	2.64	0.264	0.0515	0.00479	0.619	0.151	0.0149
Feto-	Mean	20.7	5.85	3.97	0.290	0.196	2.53	0.717	0.487
maternal	SD	4.84	1.22	0.919	0.0469	0.0247	0.579	0.144	0.108

[1]The ratio of the concentration in the receiving compartment to the concentration in the entrance compartment expressed as a percentage. [2]The molecule-studied transfer rate divided by the antipyrine transfer rate. [3]The concentration in the receiving compartment multiplied by its flow rate to the concentration in the entrance compartment.

3.2.Effect of PSC833, a P-gp inhibitor, on the materno-fetal placental transfer of BPS

The materno-fetal rate of BPS transfer (2.56 ± 2.36 versus 2.30 ± 2.08 %, after and before the addition of PSC833, respectively), and consequently, its transplacental clearance (0.146 ± 0.137 versus 0.131 ± 0.126 ml/min) and clearance index (0.073 ± 0.051 versus 0.0717 ± 0.0543) were not significantly increased in the presence of PSC833, an inhibitor of P-gp (Figure 3). In addition, PSC833 had no significant effect on the transplacental transfer of antipyrine (31.7 ± 6.9 versus 29.5 ± 4.94 %).

Figure 3 : Mean materno-fetal placental clearance indices of BPS before (control condition) and after addition of the P-glycoprotein inhibitor, PSC833. The lines join the data from the same placenta (n=1 at 2 µM and n=3 at 4 µM of PSC833).



4.Discussion

Fetal life represents a critical window during which its developmental processes are extremely sensitive to endocrine disruption. The lack of data concerning exposure of the human fetus to BPS, a potential endocrine disruptor, highlights the urgent need to investigate the materno-feto-placental exchanges of BPS. In the present study, the open-circuit perfused cotyledon model was used to examine the passage of BPS and its main metabolite BPSG across the human placenta.

Antipyrine is a useful reference substance for assessing the transfer rate of lipid-soluble xenobiotics (Challier et al., 1983; Schneider et al., 1979). The rates of antipyrine transfer observed in this study, were similar to the values reported in previous studies (Berveiller et al., 2012; Ceccaldi et al., 2008; Corbel et al., 2014; Gavard et al., 2009). By expressing BPS clearance as a fraction of antipyrine clearance (clearance index), several hemodynamic factors in the perfusion system can be corrected, thus allowing comparisons between different substrates.

The results reported here show that the placental passage of BPS is very limited, with a feto-maternal BPS clearance index 3.4-fold higher than the materno-fetal clearance index (0.290 and 0.0852, respectively). Despite the structural similarities of BPS and BPA, these BPS clearance indices were about 3 and 10-fold lower than those of BPA (BPA feto-maternal

clearance index = 0.81, BPA materno-fetal clearance index = 0.84) (Corbel et al., 2014). These observations suggest that the efficiency of BPS transport differed from that of BPA which crosses the placenta by passive diffusion (Corbel et al., 2014). It can be hypothesized that BPS placental transport does not rely solely on weak diffusional permeability but might involve a differentially active transport.

The main physicochemical properties that determine the placental permeability of a substance are lipophilicity, polarity, size and hydrogen-binding capacity (Giaginis et al., 2009). The molecular weights of BPA and BPS are similar (228 and 250, respectively). Moreover, BPA is a highly lipid soluble molecule (LogP 3.43) that is unionized at physiological pH. Its placental transfer by passive diffusion is therefore rapid and solely limited by the placenta perfusion rate, independently of placental permeability. In contrast, the lipid solubility of BPS is low (LogP 1.65) and the ionized and unionized forms are in equilibrium at physiological pH (pKa1 = 7.42, pKa2 = 8.03, (Choi and Lee, 2017)). Thus, the low placental permeability of BPS compared to BPA could be due to its relative polarity and to its low lipophilicity (Garland, 1998; Syme et al., 2004).

Alternatively, the different materno-fetal and feto-maternal transfer of BPS across the placenta might be explained by the activity of an unidirectional efflux transporter. We hypothesized that the placental efflux transporter P-gp could be involved in the limited transfer of BPS to the fetal circulation. Indeed, P-gp facilitates the active efflux of a wide range of xenobiotics on the placental barrier (Ceckova-Novotna et al., 2006). Inter-individual variability in the expression of P-gp (Hutson et al., 2010; Pollex and Hutson, 2011) was taken into account by conducting the kinetic studies such that each placenta was used as its own control, by adding the P-gp non-competitive inhibitor, PSC833, at the middle time of the perfusion. PSC833 (valspodar), a cyclosporine D analog, has been shown to be one of the most potent and least toxic P-gp inhibitors (Friedenberg et al., 2006; May et al., 2008; Mölsä et al., 2005; Rahi et al., 2007; Sudhakaran et al., 2008). Despite these controlled experimental conditions, our data did not support the role of P-gp in the placental efflux of maternal BPS. However, we cannot rule out the impact of P-gp on the feto-maternal clearance of BPS or the involvement of other efflux transporters on the active efflux of BPS, such as the multidrug-resistance-associated proteins and Breast cancer-resistance proteins, located in the maternal-

facing brush border membrane. Further investigations are needed to identify the specific transporters responsible for protecting the fetus from exposure to BPS.

Taking into account the placental blood flows reported in the literature (Ferrazzi et al., 2001; Syme et al., 2004), the estimated maternal and fetal BPS placental clearances were 8.72 and 37.3 mL/min, respectively. The estimated human maternal placental clearance of BPS is close to that previously evaluated in vivo in the pregnant ewe (5.22 mL/min (Grandin et al., 2018)). By contrast, the placental clearance of BPS by the human fetus, which represents only about 12 % of the umbilical blood flow at term (Ferrazzi et al., 2001), is 8-fold higher than that estimated on the pregnant ewe (4.58 mL/min, corresponding to only 0.5 % of the umbilical blood flow) (Grandin et al., 2018). The lower fetal placental clearance in ovines compared to humans might be explained by a more limited placental permeability in sheep due to inter-species differences in placental structure and transport protein expression (Ceckova-Novotna et al., 2006; Joshi et al., 2016).

In the pregnant ewe in vivo, once BPSG attained the fetal compartment, it remained trapped and can be reactivated into BPS (Grandin et al., 2018). Characterizing the mechanisms underlying fetal exposure to BPSG is therefore critical. Our results using the human placental perfusion model indicated that the materno-fetal passage of BPSG is almost non-existent (mean BPSG materno-fetal clearance index of 0.0085). This result is consistent with the absence of BPSG transfer from mother to fetus demonstrated in the in vivo pregnant sheep model (Grandin et al., 2018). Therefore, the BPSG found in the fetal compartment in vivo might likely be of feto-placental origin. Moreover, the placental transfer of BPSG in the feto-maternal direction was about two-fold lower than that of BPAG (Corbel et al., 2014), consistently with the higher hydrophilicity of BPSG (LogP = -0.33) than that of BPAG (LogP = 1.12). Furthermore, the differential transfer of BPSG, twenty fold higher in the feto-maternal direction than in the opposite direction, suggests the involvement of a transport system that restricts the fetal exposure to BPSG. Several ATP-dependent transporters, including multi-drug resistance proteins 1 and 2 (MRP-1, MRP-2) and OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide) transporters, predominantly expressed in the syncytiotrophoblast, are known to transport glucuronide conjugates (Vähäkangas and Myllynen, 2009).

All together, our data suggest that fetal exposure to BPS and to BPSG could be more limited than to BPA and BPAG for the same maternal exposure, suggesting that the human

fetus might be better protected from exposure to BPS than to BPA. In agreement with this result, a biomonitoring study (Ihde et al., 2018) including 30 maternal/fetal pairs in the USA, showed that BPS was never detected in the fetal cord blood, even though 60 % of the mothers were exposed to BPS. However, our data need to be treated with caution, because this human isolated cotyledon model, unlike the in vivo sheep model, does not incorporate the nonplacental toxicokinetic factors that determine fetal exposure, such as maternal and fetal BPS metabolism and relative maternal and fetal BPS protein binding. Another limitation is that the present results refer to placenta at term and cannot necessarily be extrapolated to earlier stages of gestation. Indeed, the placenta undergoes considerable changes throughout gestation (Syme et al., 2004). At term, the placental transfer layer is at its thinnest. In addition, the expression of certain efflux transporters, such as P-gp, is modified throughout gestation (Ceckova-Novotna et al., 2006; Joshi et al., 2016). All these physiological processes that determine fetal exposure will therefore require further investigations to be able to predict fetal exposure to BPS and to BPSG.

5.Conclusions

In conclusion, this is the first study to document the placental transports of both BPS and its main metabolite, BPSG, and to compare it with those of BPA and BPAG, using the human placental perfusion model. BPS was shown to cross placenta bidirectionally, but to a much lower extent than BPA, particularly in the materno-fetal direction. This suggests the involvement of a membrane efflux transporter which impedes BPS transfer to the fetus. However, the implication of placental P-gp as a possible contributor to the low materno-fetal placental transfer of BPS could not be demonstrated, suggesting that BPS is probably effluxed by another transporter.

Although BPSG could be detected in vivo in the fetal compartment, our results indicate that materno-fetal transfer of BPSG is almost non-existent. This suggests that fetal exposure to the BPS conjugate could result from fetal metabolism, at least during late gestation. Once in the fetal compartment, it is likely that BPS and BPSG are extruded, albeit slowly, since the BPS and BPSG feto-maternal clearance indices were considerably higher than the corresponding materno-fetal clearance indices. All together, our data clearly show that fetal exposure to BPS is more efficiently limited by the blood-placental barrier than fetal exposure to BPA. Nevertheless, all the toxicokinetic factors, i.e. placental and non placental,

determining fetal exposure will need to be considered to ensure a meaningful evaluation of the risk of fetal exposure to BPS in humans and to determine whether the human fetus is better protected from exposure to BPS than to BPA.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES [grant number 2015/1/112].

The authors thank all the staff at the Gynecology-Obstetric Unit of Paule de Viguier Hospital, Toulouse, France. The authors would like to thank Noémie Deschamps for her technical support and Sophie Gil and Anne Lespine for their helpful suggestions.

Competing financial interests

The authors declare no conflicts of interest.

References

Berveiller, P., Mir, O., Vinot, C., Bonati, C., Duchene, P., Giraud, C., Gil, S., Treluyer, J.-M., 2012. Transplacental transfer of oseltamivir and its metabolite using the human perfused placental cotyledon model. American Journal of Obstetrics and Gynecology 206, 92.e1-92.e6. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.07.023

Catanese, M.C., Vandenberg, L.N., 2017. Bisphenol S (BPS) alters maternal behavior and brain in mice exposed during pregnancy/lactation and their daughters. Endocrinology 158, 516–530. https://doi.org/10.1210/en.2016-1723

Ceccaldi, P.-F., Ferreira, C., Gavard, L., Gil, S., Peytavin, G., Mandelbrot, L., 2008. Placental transfer of enfuvirtide in the ex vivo human placenta perfusion model. American Journal of Obstetrics and Gynecology 198, 433.e1-433.e2. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.10.802

Ceckova-Novotna, M., Pavek, P., Staud, F., 2006. P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. Reproductive Toxicology 22, 400–410. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.01.007

Challier, J., 1985. Criteria for evaluating perfusion experiments and presentation of results. Contributions to gynecology and obstetrics 13, 32.

Challier, J., d'Athis, P., Guerre-Millo, M., Nandakumaran, M., 1983. Flow-dependent transfer of antipyrine in the human placenta in vitro. Reproduction Nutrition Développement 23, 41–50.

Challier, J., Guerre-Millo, M., Richard, M., Schneider, H., Panigel, M., Olive, G., 1977. Antipyrine transfer and exchange in human placenta lobule during in vitro perfuion. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 17, 1107–1115. https://doi.org/10.1051/rnd:19770819

Choi, Y.J., Lee, L.S., 2017. Partitioning Behavior of Bisphenol Alternatives BPS and BPAF Compared to BPA. Environ. Sci. Technol. 51, 3725–3732. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05902

Corbel, T., Gayrard, V., Puel, S., Lacroix, M.Z., Berrebi, A., Gil, S., Viguié, C., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2014. Bidirectional placental transfer of bisphenol A and its main metabolite, bisphenol A-glucuronide, in the isolated perfused human placenta. Reproductive Toxicology 47, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.001

Crump, D., Chiu, S., Williams, K.L., 2016. Bisphenol S alters embryonic viability, development, gallbladder size, and messenger RNA expression in chicken embryos exposed via egg injection. Environ Toxicol Chem 35, 1541–1549. https://doi.org/10.1002/etc.3313

ECHA, 2017. Seven new substances added to the Candidate List, entry for bisphenol-A updated [WWW Document]. URL https://echa.europa.eu/fr/-/seven-new-substances-added-to-the-candidate-list-entry-for-bisphenol-a-updated-to-reflect-its-endocrine-disrupting-properties-for-the-environment (accessed 7.6.18).

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.-J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. Fertility and Sterility 103, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.005

Ferrazzi, E., Bellotti, M., Galan, H., Pennati, G., Bozzo, M., Rigano, S., Battaglia, F.C., 2001. Doppler Investigation in Intrauterine Growth Restriction—From Qualitative Indices to Flow Measurements. Annals of the New York Academy of Sciences 943, 316–325. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03812.x

French government, 2012. Le bisphénol A interdit dans les contenants alimentaires - Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer [WWW Document]. URL http://www.developpement-durable.gouv.fr/spip.php?page=article&id_article=30371 (accessed 3.30.16).

Friedenberg, W.R., Rue, M., Blood, E.A., Dalton, W.S., Shustik, C., Larson, R.A., Sonneveld, P., Greipp, P.R., 2006. Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95). Cancer 106, 830–838. https://doi.org/10.1002/cncr.21666

Garland, M., 1998. Pharmacology of frug transfer across the placenta. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America 25, 21–42. https://doi.org/10.1016/S0889-8545(05)70356-9

Gavard, L., Beghin, D., Forestier, F., Cayre, Y., Peytavin, G., Mandelbrot, L., Farinotti, R., Gil, S., 2009. Contribution and limit of the model of perfused cotyledon to the study of placental transfer of drugs. Example of a protease inhibitor of HIV: Nelfinavir. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 147, 157–160. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.08.007

Giaginis, C., Zira, A., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A., 2009. Application of quantitative structure–activity relationships for modeling drug and chemical transport across the human placenta barrier: a multivariate data analysis approach. Journal of Applied Toxicology 29, 724–733. https://doi.org/10.1002/jat.1466

Goldinger, D.M., Demierre, A.-L., Zoller, O., Rupp, H., Reinhard, H., Magnin, R., Becker, T.W., Bourqui-Pittet, M., 2015. Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. Regulatory Toxicology and Pharmacology 71, 453–462. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.01.002

Grandin, F., Picard-Hagen, N., Gayrard, V., Puel, S., Viguié, C., Toutain, P.-L., Debrauwer, L., Lacroix, M.Z., 2017. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: applicability to toxicokinetic investigations. Journal of Chromatography A 1526, 39–46. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020

Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Gauderat, G., Mila, H., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2018. Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. Environment International 120, 584–592. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019

Hill, C.E., Sapouckey, S.A., Suvorov, A., Vandenberg, L.N., 2017. Developmental exposures to bisphenol S, a BPA replacement, alter estrogen-responsiveness of the female reproductive tract: a pilot study. Cogent Medicine 4. https://doi.org/10.1080/2331205X.2017.1317690

Hutson, J.R., Koren, G., Matthews, S.G., 2010. Placental P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: Influence of polymorphisms on fetal drug exposure and physiology. Placenta 31, 351–357. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.02.010

Ihde, E.S., Zamudio, S., Loh, J.M., Zhu, Y., Woytanowski, J., Rosen, L., Liu, M., Buckley, B., 2018. Application of a novel mass spectrometric (MS) method to examine exposure to Bisphenol-A and common substitutes in a maternal fetal cohort. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 24, 331–346. https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1381831

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K., 2013. Effects of Bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. Environ. Sci. Technol. 47, 8793–8800. https://doi.org/10.1021/es400329t

Joshi, A.A., Vaidya, S.S., St-Pierre, M.V., Mikheev, A.M., Desino, K.E., Nyandege, A.N., Audus, K.L., Unadkat, J.D., Gerk, P.M., 2016. Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance. Pharmaceutical Research 33, 2847–2878. https://doi.org/10.1007/s11095-016-2028-8

Larsson, A., Palm, M., Hansson, L.-O., Axelsson, O., 2008. Reference values for clinical chemistry tests during normal pregnancy. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 115, 874–881. https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01709.x

Lehmler, H.-J., Liu, B., Gadogbe, M., Bao, W., 2018. Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014. ACS Omega 3, 6523–6532. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00824

Liu, J., Li, J., Wu, Y., Zhao, Y., Luo, F., Li, S., Yang, L., Moez, E.K., Dinu, I., Martin, J.W., 2017. Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum. Environ. Sci. Technol. 51, 2456–2463. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05718

May, K., Minarikova, V., Linnemann, K., Zygmunt, M., Kroemer, H.K., Fusch, C., Siegmund, W., 2008. Role of the Multidrug Transporter Proteins ABCB1 and ABCC2 in the Diaplacental Transport of Talinolol in the Term Human Placenta. Drug Metab Dispos 36, 740. https://doi.org/10.1124/dmd.107.019448

Mölsä, M., Heikkinen, T., Hakkola, J., Hakala, K., Wallerman, O., Wadelius, M., Wadelius, C., Laine, K., 2005. Functional role of P-glycoprotein in the human blood-placental barrier. Clinical Pharmacology & Therapeutics 78, 123–131. https://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.04.014

Naderi, M., Wong, M.Y.L., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. Aquatic Toxicology 148, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.009

Philips, E.M., Jaddoe, V.W.V., Asimakopoulos, A.G., Kannan, K., Steegers, E.A.P., Santos, S., Trasande, L., 2018. Bisphenol and phthalate concentrations and its determinants among pregnant women in a population-based cohort in the Netherlands, 2004–5. Environ Res 161, 562–572. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.051

Pollex, E.K., Hutson, J.R., 2011. Genetic polymorphisms in placental transporters: implications for fetal drug exposure to oral antidiabetic agents. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 7, 325–339. https://doi.org/10.1517/17425255.2011.553188

Pu, Y., Gingrich, J.D., Steibel, J.P., Veiga-Lopez, A., 2017. Sex-specific modulation of fetal adipogenesis by gestational bisphenol A and bisphenol S exposure. Endocrinology 158, 3844–3858. https://doi.org/10.1210/en.2017-00615

Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., Wayne, N.L., 2016. Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish. Endocrinology 157, 636–647. https://doi.org/10.1210/en.2015-1785

R development core team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.ISBN 3-900051-07-0.

Rahi, M., Heikkinen, T., Härtter, S., Hakkola, J., Hakala, K., Wallerman, O., Wadelius, M., Wadelius, C., Laine, K., 2007. Placental transfer of quetiapine in relation to P-glycoprotein activity. J Psychopharmacol 21, 751–756. https://doi.org/10.1177/0269881106074065

Rahi, M.M., Heikkinen, T.M., Hakala, K.E., Laine, K.P., 2009. The effect of probenecid and MK-571 on the feto-maternal transfer of saquinavir in dually perfused human term placenta. European Journal of Pharmaceutical Sciences 37, 588–592. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.05.005

Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. Environ Health Perspect 123, 643–650. https://doi.org/10.1289/ehp.1408989

Roelofs, M.J.E., Berg, M. van den, Bovee, T.F.H., Piersma, A.H., Duursen, M.B.M. va., 2015. Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. Toxicology 329, 10–20. https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.003

Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B.M., Wedebye, E.B., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? Toxicological Sciences 139, 35–47. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu030

Schneider, H., Möhlen, K.-H., Dancis, J., 1979. Transfer of Amino Acids across the In Vitro Perfused Human Placenta. Pediatric Research 13, 236.

Schneider, H., Pamgel, M., Daneis, J., 1972. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. Am. J. Obstet. Gynecol 114, 822–828.

Siracusa, J.S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., Yu, X., 2018. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. Reproductive Toxicology 79, 96–123. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005

Sudhakaran, S., Ghabrial, H., Nation, R.L., Kong, D.C., Gude, N.M., Angus, P.W., Rayner, C.R., 2005. Differential bidirectional transfer of indinavir in the isolated perfused human placenta. Antimicrobial agents and chemotherapy 49, 1023–1028.

Sudhakaran, S., Rayner, C.R., Li, J., Kong, D.C.M., Gude, N.M., Nation, R.L., 2008. Inhibition of placental P-glycoprotein: impact on indinavir transfer to the foetus. Br J Clin Pharmacol 65, 667–673. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03067.x

Syme, M.R., Paxton, J.W., Keelan, J.A., 2004. Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. Clinical Pharmacokinetics 43, 487–514. https://doi.org/10.2165/00003088-200443080-00001

USEPA, 2014. Bisphenol A alternatives in thermal.https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf. Accessed January 26, 2017. [WWW Document]. URL https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf (accessed 1.26.17).

Vähäkangas, K., Myllynen, P., 2009. Drug transporters in the human blood-placental barrier. Br J Pharmacol 158, 665–678. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00336.x

Wang, H., Wang, B., Zhou, Y., Jiang, Q., 2013. Rapid and sensitive analysis of phthalate metabolites, bisphenol A, and endogenous steroid hormones in human urine by mixed-mode solid-phase extraction, dansylation, and ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405, 4313–4319. https://doi.org/10.1007/s00216-013-6779-3

Wu, L.-H., Zhang, X.-M., Wang, F., Gao, C.-J., Chen, D., Palumbo, J.R., Guo, Y., Zeng, E.Y., 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review. Science of The Total Environment 615, 87–98. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.194

III. Conclusion

Nos expériences montrent que le BPS peut passer la barrière placentaire humaine dans le sens materno-fœtal et fœto-maternel. Cependant, les indices de clairance materno-fœtale et fœto-maternel du BPS sont respectivement 10 et 2.8 fois plus faible que ceux du BPA [184], ce qui est cohérent avec les résultats observés sur le modèle intégratif de brebis. Avec un taux d'extraction materno-fœtal 4 fois plus faible et une clairance 9 fois plus faible que celle du BPA, l'entrée de BPS dans le compartiment fœtal est limitée comparativement au BPA. De la même façon, dans le sens fœto-maternel, le taux d'extraction du BPS est 7.7 fois plus faible que celui du BPA et la clairance du BPS 2.6 fois plus faible que celle du BPA, ce qui indique que le fœtus humain élimine plus lentement le BPS vers le compartiment maternel que le BPA (Figure 25). Ces résultats sont cohérents avec ceux observés sur le modèle intégratif de brebis, sur lequel la clairance maternelle placentaire du BPS était 20 fois inférieure à celle du BPA et la clairance fœtale placentaire 100 fois inférieure à celle du BPA (Article 2). Ces résultats suggèrent que les mécanismes de passage placentaire du BPS et du BPA sont différents. En effet, les indices de clairances du BPA sont similaires dans les deux directions du placenta isolé caractérisant un passage placentaire par diffusion passive. Dans le cas du BPS, l'indice de clairance dans le sens materno-fœtal est 3 fois plus faible que dans le sens opposé, ce qui suggère un transfert placentaire du BPS impliquant des protéines de transport.

Nous avons étudié l'implication d'un transport actif dans le transfert materno-fœtal du BPS en se focalisant sur les P-gp qui sont des transporteurs d'efflux largement répandus au niveau de la membrane apicale [137,187]. Cependant, l'ajout d'un inhibiteur de la P-gp n'a pas permis de modifier le transfert materno-fœtal du BPS. Ce résultat indique donc que ces protéines de transport ne prennent pas en charge le BPS au niveau de la barrière placentaire.

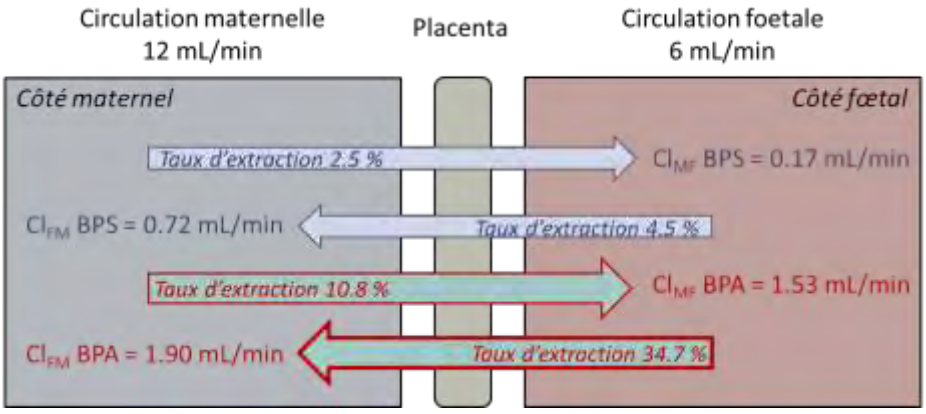


Figure 25 : Comparaison du taux d'extraction et de la clairance transplacentaire du BPS (bleu) et du BPA (rouge) évalués sur un modèle de cotylédon humain isolé, les données concernant le BPA sont issues de Corbel et coll. [184].

Les résultats obtenus pour le BPSG sont similaires à ceux précédemment obtenus pour le BPAG par Corbel et coll. [184]. L'indice de clairance materno-fœtale est extrêmement limité, 20 fois plus faible que l'indice de clairance fœto-maternelle, ce qui suggère que le BPSG ne passe pas la barrière placentaire dans le sens materno-fœtal. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus sur le modèle intégratif de la brebis gravide chez laquelle aucun transfert placentaire du BPSG n'a pu être observé (Article 2). Le transfert placentaire du BPSG, implique probablement, comme pour le BPS et le BPAG, un transport actif [184].

La clairance et le taux d'extraction du BPSG sont respectivement 7 et 2 fois plus faibles que ceux du BPAG dans le sens materno-fœtal et respectivement 2 et 10 fois plus faibles dans le sens fœto-maternel. Le transfert placentaire du BPSG est donc réduit comparé à celui du BPAG, quelle que soit la direction (Figure 26).

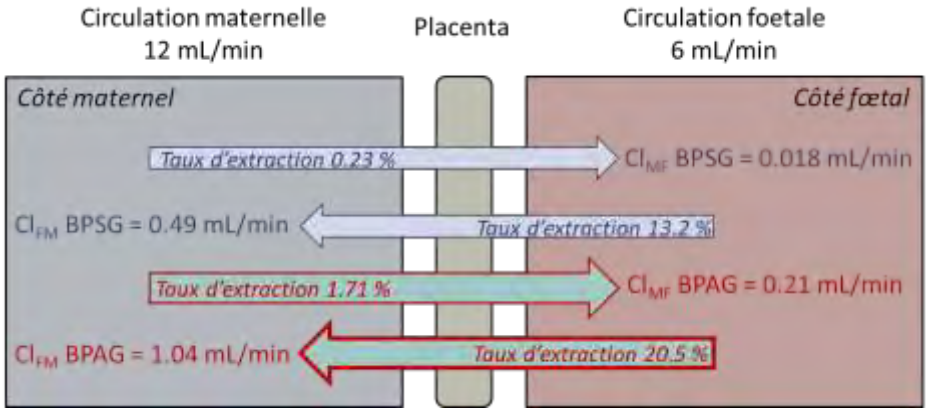


Figure 26 : Comparaison du taux d'extraction et de la clairance transplacentaire du BPSG (bleu) et du BPAG (rouge) évalués sur un modèle de cotylédon humain isolé les données concernant le BPA sont tirées de Corbel et coll. [184].

Dans cette troisième étude expérimentale, le transfert placentaire du BPS et du BPSG a été évalué pour la première fois sur un modèle *ex vivo* de cotylédon humain perfusé. Comme chez l'ovin, le BPS et le BPSG sont capables de passer la barrière placentaire humaine. Ce qui suggère que le BPS peut exercer son potentiel perturbateur endocrinien dans l'unité fœtale.

Compte tenu de l'importance de l'équilibre stéroïdien pour le maintien de la gestation et le développement fœtal, nous nous sommes intéressés, dans la dernière étude expérimentale, à l'effet d'une exposition maternelle quotidienne au BPS sur l'équilibre stéroïdien dans l'unité materno-fœto-placentaire.

Étude de l'effet du BPS sur la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire ovine.

I. Contexte et objectifs

L'étude TK précédente sur le modèle physiologique de la brebis gravide a montré que dans un contexte d'exposition chronique maternelle, le BPS présente un potentiel d'exposition fœtale similaire à celui du BPA, en raison de son accumulation dans le compartiment fœtal.

Des effets du BPS sur la production de certains stéroïdes et l'expression d'enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse ont été observés sur des modèles cellulaires [15,37,39,40], sur des explants de testicules fœtaux murins et humains [41] et *in vivo* sur le poisson-zèbre et le rat [42–45].

Des interrelations materno-fœto-placentaires complexes déterminent l'équilibre stéroïdien au cours de la grossesse (Figure 11), qui est indispensable au développement du fœtus et au maintien de la gestation [142]. Notre hypothèse est donc qu'une exposition maternelle chronique au BPS au cours de la gestation pourrait perturber l'homéostasie stéroïdienne dans l'unité materno-fœto-placentaire pendant la phase de programmation fœtale. Un grand nombre d'enzymes et de facteurs peuvent moduler l'équilibre stéroïdien, à la fois au niveau central et au niveau périphérique, dans les organes qui produisent des stéroïdes, qui régulent leur synthèse ou qui les métabolisent. C'est la raison pour laquelle une signature stéroïdienne pourrait permettre d'évaluer globalement l'effet du BPS et constituer un marqueur intégratif précoce de l'exposition prénatale et/ou des effets du BPS.

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'impact d'une exposition répétée maternelle au BPS sur la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire, en se focalisant plus précisément sur la voie de synthèse et de métabolisation de la testostérone. Cette étude a été conduite chez la brebis gravide, qui est un modèle pertinent vis-à-vis de l'homme en termes de programmation fœtale [142]. La période d'exposition au BPS se situe après la fin de l'organogenèse, entre le GD68 et le GD96 (Figure 27) car à cette période de la gestation, les concentrations en stéroïdes subissent moins de variations temporelles (Cf. Étude bibliographique – Partie 3 – II. Stéroïdogenèse et interrelations materno-fœto-placentaires). Le protocole expérimental est décrit dans la Figure 27.

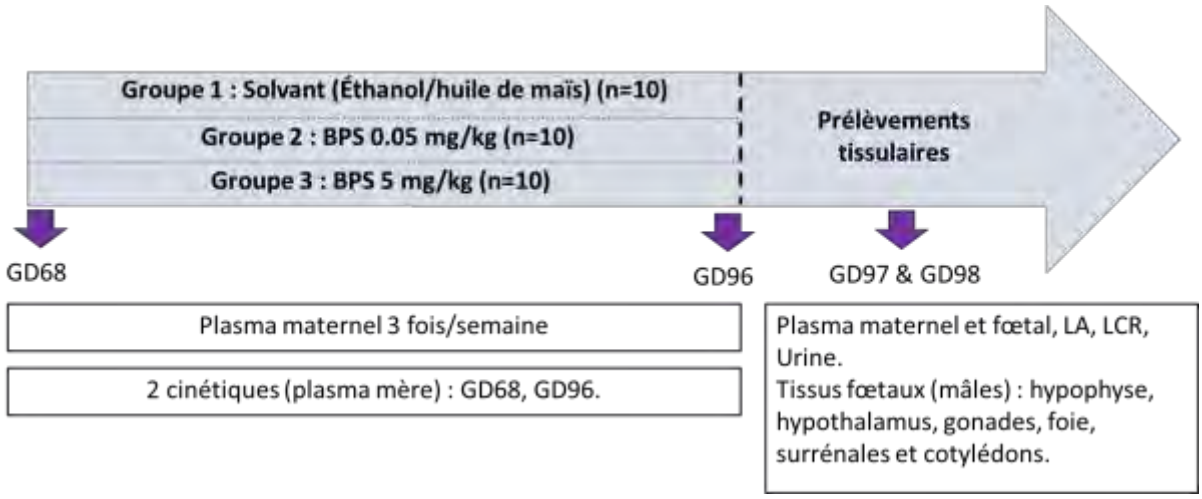


Figure 27 : Protocole expérimental de l'étude de l'impact d'une exposition maternelle répétée au BPS sur l'équilibre stéroïdien dans l'unité materno-fœto-placentaire. GD : Gestation Day, LA : liquide amniotique, LCR : liquide céphalo-rachidien, n : nombre d'animaux.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le LABERCA, laboratoire d'étude des résidus et des contaminants dans les aliments situé à Nantes, qui a déterminé les profils stéroïdiens par GC-MS/MS dans les différents tissus et liquides biologiques. Les expositions au BPS et au BPSG dans ces mêmes échantillons biologiques ont été déterminées par une analyse en UPLC-MS/MS. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans l'article 4 qui sera soumis dans un journal de toxicologie.

Préalablement à cette étude, une expérience préliminaire a été menée sur deux brebis afin d'évaluer les profils des concentrations et la biodisponibilité du BPS pour la voie d'administration choisie.

II. Expérience préliminaire : évaluation de la biodisponibilité du BPS administré par voie intramusculaire

A. Contexte et objectif

Le schéma posologique retenu pour l'expérience décrite dans l'article 4 est une exposition quotidienne par voie intramusculaire (IM). En effet, cette voie extravasculaire entraine des variations temporelles de concentrations plasmatiques moins importantes que la voie IV en raison de l'impact du processus d'absorption sur les cinétiques temporelles des concentrations.

L'objectif de cette étude pilote était de valider le choix de la voie IM pour l'administration quotidienne de BPS à des brebis gravides. Les profils de concentrations de

BPS ont été caractérisés, avec la concentration maximale (C_{max}), le temps d'occurrence de la concentration maximale (t_{max}) et la biodisponibilité absolue (F) du BPS a été évaluée.

B. Matériels et méthodes

1. Animaux

L'étude pilote a été réalisée sur deux brebis de race Lacaune. Pendant toute la durée de l'expérience, les brebis ont été placées ensemble dans un box sur la paille renouvelée quotidiennement. Elles ont reçu une ration quotidienne d'aliment concentré et le fourrage et l'eau à volonté.

Les paramètres TK du BPS après une administration IV, évalués sur ces deux brebis trois mois avant cette phase expérimentale (Article 1), ont été utilisés pour évaluer la biodisponibilté absolue par voie IM.

2. Protocole expérimental

La solution de BPS a été préparée dans un mélange éthanol/huile de maïs (1/6, volume/volume) à la concentration de 50 mg/mL. Afin d'éviter toute contamination, seul du matériel jetable a été utilisé pour la préparation de cette solution.

Chaque brebis a reçu un bolus de BPS à la dose de 5 mg/kg par voie IM dans la région de la croupe gauche. La cinétique de décroissance des concentrations de BPS et de BPSG a été suivie dans le compartiment plasmatique par prélèvements répétés de sang à la veine jugulaire aux temps 0, 2, 5, 10, 20, 30 minutes puis 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 34 et 48 et 72 heures après l'administration.

3. Conservation et analyse des échantillons

Le sang a été recueilli dans des tubes à héparinate de lithium. Les échantillons ont été centrifugés à 3000 x g et 4 °C pendant 10 minutes. Puis, le plasma a été conservé à -20 °C jusqu'au dosage. Les concentrations plasmatiques en BPS dans les échantillons ont été déterminées par UPLC-MS/MS selon la méthode de dosage décrite dans l'article 1.

4. Analyse des données

Les profils individuels des concentrations plasmatiques en BPS et BPSG ont été analysés à l'aide du logiciel Phoenix® (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA). Les concentrations massiques en BPS et BPSG ont été converties en concentrations molaires. L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPS de t=0 jusqu'au temps d'occurrence de la dernière concentration quantifiable ($AUC_{0\text{-}tlast}$) a été calculée avec la méthode des trapèzes arithmétiques et les C_{max} et t_{max} ont été évalués. La biodisponibilité absolue du BPS par voie IM a été calculée par l'équation suivante :

$$F(\%) = \frac{AUC_{IM}}{AUC_{IV}} \times \frac{Dose_{IV}}{Dose_{IM}} \times 100$$

Avec AUC_{IV} correspondant à l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPS en fonction du temps après une administration de BPS par voie IV, AUC_{IM} correspondant à l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPS en fonction du temps après une administration de BPS par voie IM, $Dose_{IV}$ correspondant à la dose administrée par voie IV et $Dose_{IM}$ correspondant à la dose administrée par voie IM [193]. L'AUC_{IV} a été déterminée, pour ces mêmes brebis, à partir de l'étude préalable de la TK du BPS après une administration IV de BPS décrite dans l'article 1.

C. Résultats et conclusion

Les concentrations en BPS dans les échantillons contrôles étaient inférieures à la LOQ de la méthode de dosage, indiquant l'absence de contamination pendant les processus de collecte, de traitement et d'analyse des échantillons.

Les profils de concentrations plasmatiques après administration de BPS par voie IM sont similaires pour les deux brebis, avec des concentrations maximales de BPS de 8.76 et 5.75 µM, observées 20 minutes après l'administration (Tableau 11). Les concentrations plasmatiques en BPS décroissent et deviennent inférieures à la LOQ 34h après l'administration (Figure 28). Pour les deux brebis, la biodisponibilité du BPS par voie IM a été estimée à 120 %, ce qui signifie qu'elle est quasiment totale. Cette valeur pourrait être surestimée en raison de l'intervalle important (de 3 mois) entre les deux administrations et à la variabilité analytique.

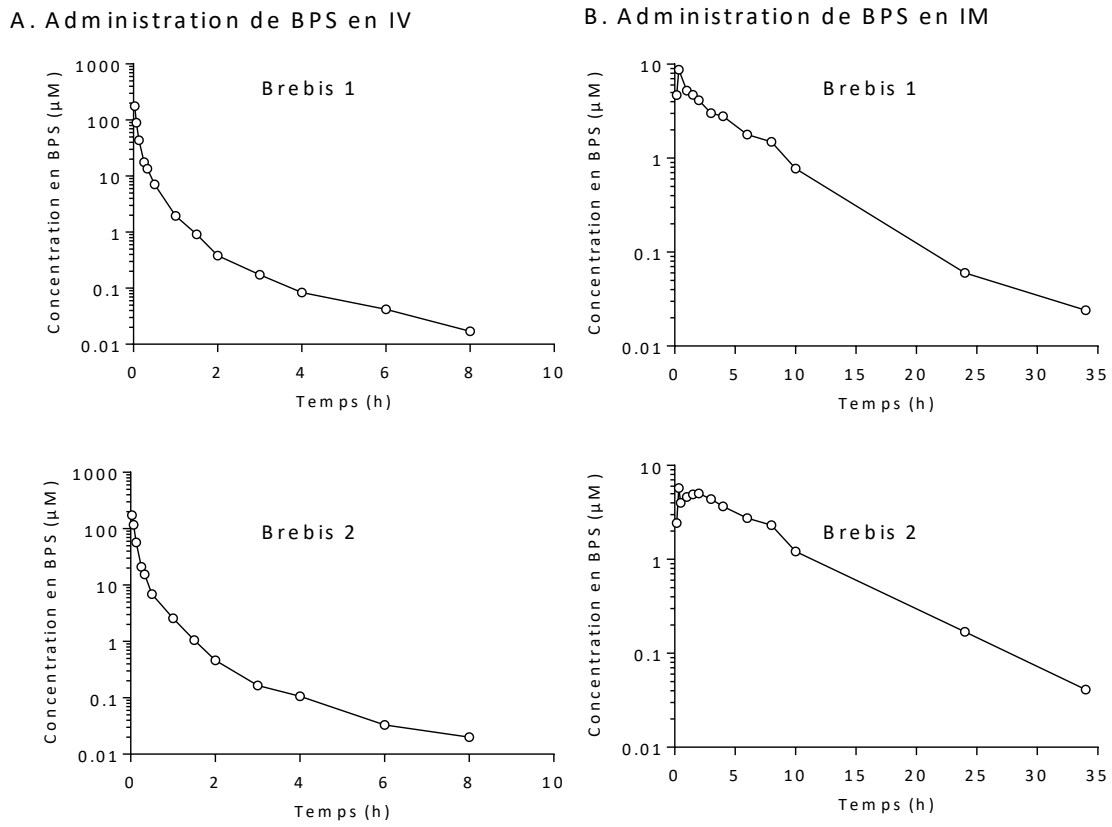


Figure 28 : Représentation graphique de la décroissance des concentrations plasmatiques individuelles en BPS en fonction du temps pour la brebis 1 (en haut) et la brebis 2 (en bas) après administration d'une dose de 5 mg/kg de BPS par voie IV (A) ou IM (B).

D'après cette étude, les concentrations plasmatiques de BPS obtenues après administration IM atteignent des maxima moins élevés qu'après une administration IV et du BPS est quantifié jusqu'à 34 h après administration, versus 10 h après la voie IV (Tableau 11). Bien que réalisée sur un nombre limité de sujets, cette étude pilote montre que la voie IM permet d'obtenir une biodisponibilité de 100 % et des variations temporelles des concentrations plasmatiques moins importantes que la voie IV. Cette voie d'administration est donc appropriée et plus simple à mettre en pratique que la voie IV pour la réalisation d'administrations quotidiennes pendant plusieurs semaines.

Tableau 11 : Paramètres TK du BPS après une administration IV et une administration IM à deux brebis.

Voie d'administration	**IV**			**IM**		
Paramètres TK	**$AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol/mL*min)**	**C_{max} (nmol/ml)**	**t_{max} (min)**	**$AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol/mL*min)**	**C_{max} (nmol/ml)**	**t_{max} (min)**
Brebis 1	1516	178	2	2072	8.76	20
Brebis 2	1689	173	2	2367	5.75	20

III. Article 4

Effect of a long-term BPS exposure during pregnancy on the materno-feto-placental steroidogenesis in a sheep model.

Flore C. Grandin[a], Marlène Z. Lacroix[b], Marie-Line Morvan[c], Jean-Philippe Antignac[c], Véronique Gayrard[a], Catherine Viguié[a], Hanna Mila[a], Rémi Servien[b], Marie Tremblay-Franco[a], Pierre-Louis Toutain[d], Bruno Le Bizec[c] et Nicole Picard-Hagen[a]

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

[b]INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31 076 Toulouse, France

[c]LABERCA UMR 1329, INRA, Oniris, 44 307, Nantes, France

[d]The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

Flore C. Grandin : flore.grandin@inra.fr ; Marlène Z. Lacroix : m.lacroix@envt.fr; Marie-Line Morvan : marie-line.morvan@oniris-nantes.fr ; Jean-Philippe Antignac : jean-philippe.antignac@oniris-nantes.fr ; Véronique Gayrard : v.gayrard@envt.fr ; Catherine Viguié : c. viguie@envt.fr ; Hanna Mila : h.mila@envt.fr ; Rémi Servien : remi.servien@inra.fr, Marie Tremblay-Franco : marie.tremblay-franco@inra.fr ; Pierre-Louis Toutain : pl.toutain@envt.fr ; Bruno Le Bizec : bruno.lebizec@oniris-nantes.fr ; Nicole Picard-Hagen : n.hagen-picard@envt.fr.

Corresponding author* : Nicole Picard-Hagen, UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87 614, 31076 Toulouse cedex 3, France, Tel. : +33 (0)5 61 19 38 61, E-mail : n.hagen-picard@envt.fr

Abstract

Bisphenol S (BPS) is widely used to replace Bisphenol A (BPA) in consumer products, leading to an ubiquitous and increasing human exposure to BPS. BPS was shown to disrupt steroidogenesis *in vitro* and *in vivo*. Yet steroid hormones are essential for maintenance of pregnancy and fetal development. The objective of our study was to determine, in pregnant sheep, a relevant model for human pregnancy, if a subchronic gestational exposure to BPS alters a steroid signature and to characterize at the same time the materno-feto-placental internal exposure to BPS and to its main metabolite, Bisphenol S Glucuronide (BPSG).

Pregnant ewes were treated intramuscularly from gestational day 68 to 96 with vehicle (n=10), BPS (0.05 mg/kg b.w., n=10), or BPS (5 mg/kg b.w., n=10). BPS and BPSG exposure and a steroid signature were determined in maternal and fetal plasma and amniotic fluid and in organs of steroid synthesis and of steroid metabolism collected on male fetuses.

The maternal internal BPS and BPSG exposure did not changed with repeated dosing and the internal exposure to BPS and BPSG in the materno-fetal unit was proportional to the dose. After 28 days of BPS exposure, the BPSG concentrations were always higher than BPS concentrations and were of the same order of magnitude both in fetal plasma, in maternal plasma and in amniotic fluid. All the organs of steroid synthesis and of steroid metabolism were exposed to BPS and BPSG, with BPSG tissue concentrations higher than fetal plasma concentrations, except for hypothalamus and hippocampus, which are protected by the brain blood barrier. However, the statistical analysis did not evidence any effect of BPS on the steroids profiles, whatever the tissue considered. The potential effect of BPS on steroidogenesis, if indeed it exists, could be counterbalanced *in vivo* by the redundancy of regulation of steroid pathways.

Introduction

Throughout our lives, we are exposed to cocktails of natural and manufactured chemicals. Some of them have an endocrine disrupting potential. Among them, Bisphenol A (BPA), a plastic monomer widely used in the manufacture of polycarbonate plastic and epoxy resin, was progressively banned from consumer products (Glausiusz J 2014; Wu et al. 2018) because of its ability to act as an endocrine disrupting compound and consequently cause adverse effects on human health (Rochester 2013). To overcome its interdiction in several countries, BPA structural analogues are used to replace BPA in its industrial application (ANSES 2013; USEPA 2014). One such BPA-alternatives, Bisphenol S (BPS), is increasingly used in the manufacture of polycarbonate plastic and epoxy resin in a range of consumer products including canned foodstuffs, thermal paper and personal care products (Wu et al. 2018).

Humans are exposed to BPS by different routes of exposure, mainly oral route, but also inhalation and transcutaneous routes (Wu et al. 2018). Human biomonitoring studies showed that BPS was detectable in 81% of urine samples (n=315) from the USA and seven asian countries (Chen et al. 2016; Liao et al. 2012; Wu et al. 2018). Furthermore, the BPS urinary concentrations in american adults increased between 2000 to 2014, reflecting the increasing replacement of BPA with BPS (Ye et al. 2015).

More recently, BPS was found in four maternal and seven cord serum samples collected from China at low concentrations ranging from < 0.03 to 0.12 ng/mL (Liu et al. 2017), thus demonstrating a placental transfer of BPS from the mother to the fetus.

Moreover, previous toxicokinetic investigations in the pregnant sheep model showed that only 0.4% of the maternal dose was transferred to the fetus. At late stage of pregnancy, the fetus was able to metabolize BPS into its main metabolite, Bisphenol S glucuronide (BPSG), which remained trapped in the fetal compartment because of its inability to cross the placenta. The elimination of fetal BPSG required its back-conversion into bioactive BPS in the fetal compartment. However, the restricted feto-maternal transfer of BPS leads to an accumulation of both BPS and BPSG in the fetal compartment (Grandin et al., 2018).

Due to the structural similarity of BPS with BPA and its extensive use in our daily life, concerns about the safety of BPS have become an important issue. Recent limited *in vitro* and *in vivo* data showed that BPS has equal or even greater toxicological effects, in particular on

the steroidogenesis. Thus, BPS treatment of human adrenal cortico-carcinoma cells (H295R) or murine Leydig cells (MA10) was reported to decrease testosterone, androstenedione and DHEA production and to stimulate the production of progesterone by inhibiting expression of 5α-reductase and CYP17A1 (Goldinger et al. 2015; Rochester and Bolden 2015; Roelofs et al. 2015; Rosenmai et al. 2014). BPS induced a decrease of testosterone secretion in human fetal testis and in mice fetal testis explants, associated with a lower expression of steroidogenic enzymes (Star, Hsd3b1, Cyp17a1) (Eladak et al. 2015).

In zebrafish, the increase of estradiol plasma concentrations induced by BPS (in male for BPS> 0.5 ng/mL and in female for BPS> 50 ng/mL) was associated with changes in the expression of steroidogenic enzymes in gonads (Ji et al. 2013; Kinch et al. 2015; Naderi et al. 2014). In rodent, a subchronic BPS exposure at the dose of 50 µg/kg/d decreased the intratesticular and plasma testosterone concentrations (Ullah et al. 2016). All together, these studies indicate that BPS could have a disrupting endocrine potential by impairing the steroidogenesis, and particularly the androgen pathway.

Steroid hormones are essential for maintenance of pregnancy and fetal development and impaired regulation of steroid hormones during critical windows of development contributes to the development and progression of several major diseases later in life (Padmanabhan et al. 2010). In this context, the objectives of our study were (1) to evaluate if a subchronic gestational exposure to BPS alters the steroidogenesis and (2) to characterize at the same time, the exposure to BPS and its main metabolite BPSG in the materno-feto-placental unit. Given the complexity of the regulation of steroidogenesis in the materno-feto-placental unit, our strategy is based on an integrative steroid signature for the identification of biomarker of BPS effect on steroidogenesis. To achieve this goal, we used the pregnant ewe model, an acknowledged model to study fetal development (Abi Salloum et al. 2015; Padmanabhan et al. 2010; Veiga-Lopez et al. 2016).

Materials and methods

1. Chemicals and solutions preparation

All materials for the preparation of solutions, including materials used for sampling, processing and analysis, were in glass or Bisphenols-free plastic (polypropylene). BPS (purity ≥ 98 %) and corn oil were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

BPS stock (350 mg/mL) and intermediate (3.5 mg/mL) solutions were prepared by dissolving BPS in absolute ethanol. Both solutions were kept at 4°C in sealed amber glass container throughout the experiment. The stock and intermediate solutions were diluted weekly in corn oil to obtain administration solutions in ethanol/Corn oil 1/3.7 v/v at 50 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively. Administration solutions were kept at 4°C until administration. Vehicle solutions were obtained by mixing ethanol with corn oil. The final BPS concentrations in stock, intermediate and administration solutions were monitored by SPE-UPLC-MS/MS.

For steroids assays, all solvents used were of analytical or HPLC quality (Fisher Scientific, Loughborough, UK; Acros Organics, NJ, USA). The derivatization reagents N-methyl-N-(trimethyl-ilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), trimethyliodosilane (TMIS), dithiothreitol (DTE), sulfatase *Helix pomatia* and β-glucuronidase from Patella Vulgata were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pure reference substances (standards) were purchased from CDN isotopes (Quebec, Canada), Steraloids (Wilton, NY, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Kenilworth, USA), and the Australian Government National Measurement Institute (Pymble, NSW, Australia). Deuterated surrogates including 17β-estradiol-16,16,17-d3, 5α-androstan-3α,17β-diol-16,16,17-d3, 5α-androstan-3β,17β-diol-d3 etiocholanolone-2,2,3β,4,4-d5,17β-testosterone-16,16,17-d3, 4-androsten-3,17-dione 19,19,19-d3, 5α-androstan-17β- o l - 3 -one-16,16,17-d3, and 17-methyltestosterone-d3 were used as internal standards for quantification according to the isotopic dilution method.

2. Animals

Animal procedures were carried out in accordance with accepted standard human animal care under agreement number 31-2016-167 from the French Ministry of Agriculture. The protocol was approved by the regional ethical committee (Midi-Pyrénées : protocol APAFiS #13438 - 201802081644813).

This experiment was carried out on 30 pregnant Lacaune ewes artificially inseminated with fresh semen from one Lacaune ram. The mean (±SD) body weight was of 69.8 ± 10.4 kg at the end of the administration period. All animals received two commercial pelleted rations daily, and hay and water were given *ad libitum*. Pregnant ewes were randomly allocated to three groups (n=10): vehicle or low-dose (0.05 mg/kg/d) and high dose (5 mg/kg/d) BPS-treated. All animals in the same group were kept together, with no direct contact between different groups, in particular for their access to water and food supplies.

3. Experimental design

From the gestational day (GD) 68 to 96, ewes received daily intramuscular (IM) injections of vehicle or BPS (0.05 or 5 mg/kg). A preliminary toxicokinetic experiment, carried out on two ewes, indicated a BPS absolute bioavailability of 100 % after an IM BPS administration of 5 mg/kg (data not shown). The IM route was chosen for convenience and because the oral route in ruminant is not relevant towards human. The dose of 50 µg/kg.d was used because it was demonstrated to decrease the production of testosterone in a rodent model (Ullah et al. 2016) and the high dose of 5 mg/kg/d corresponds to the NOAEL observed in an OCDE reprotoxicity study in rodent (ANSES 2013). The administered volume was adjusted weekly for the most recently recorded body weight.

In order to measure the BPS exposure, maternal blood samples were drawn before the first and the last administration for all 30 ewes. Maternal blood samples were drawn after the first and the last administration at 10, 30 min, 2, 6, 10 and 24h after administration on five ewes in each group and at 20 min, 1, 4, 8, 12 and 24h after administration on the five other ewes in each group. In the control group, only samples drawn before administration and at time 10 and 20 min after administration were kept in order to check the absence of contamination of samples. Maternal plasma samples were collected three times a week during the treatment period, just before the next administration.

The day after the last BPS/vehicle administration (GD 96), maternal blood samples were collected just before the caesarean section of ewes euthanized by intravenous overdose of sodium pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol SA, Lure, France). After the ceasarian section, the amniotic fluid was collected by direct puncture of the amniotic sac. Fetuses were immediately extracted and placenta and fetal blood and tissue samples were rapidly collected. Only male fetuses were included in the study to avoid the sex-related variability and because previous studies have demonstrated an effect of BPS on androgen pathway. In case of multiple pregnancy, fetal organs were collected at the most on two males.

4. Samples collection and processing

Maternal blood samples (3 mL) were obtained by direct puncture of the right jugular vein. After uterine extraction, the fetus was weighted and fetal blood sample was collected by direct intracardiac puncture, just before its euthanasia by intracardiac overdose of sodium

pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol SA, Lure, France). The organs of steroid synthesis and of steroid metabolism, i.e. placenta and fetal tissues (liver, testis, adrenal gland, hypothalamus and pituitary gland) and maternal liver were immediately removed and dissected on ice. Tissues were then quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

Blood and amniotic fluid samples were collected in heparinized and polypropylene tubes, respectively. All samples were immediately chilled in ice and centrifuged for 10 minutes at 3000 g and 4°C. Supernatants were separated and stored at -20°C until assayed.

5. BPS and BPSG assay

The homogeneization method was first validated by checking that the sample preparation did not lead to hydrolysis of BPSG added to blank tissue. For BPS and BPSG analysis in tissue samples, tissues were reduced in pieces of 1 to 3 mm side and aliquoted by 100 mg-fractions. Fractions were then grinded for 30 Hz and 4 min (MM 400, Retsch, Eragny sur Oise, France). These two steps were performed at low temperature (-80 °C) to avoid any defrosting phenomenon. Samples were then stored at -80°C until assay.

BPS and BPSG were simultaneously quantified in plasma samples by on-line solid phase extraction with ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Acquity-2D-UPLC Xevo TQD®, Waters, Milford, MA, USA) (Grandin et al. 2017). This method was adapted and validated for amniotic fluid and tissues samples following European Medicines Agency guidelines.

Briefly, 100 µL of plasma or amniotic fluid samples were precipitated with 100 µL of acetonitrile/zinc sulfate mixture containing internal standard BPS-d4 (100 ng/mL) and mixed 1 min at 10°C and 1400 rpm (MB-102, Bioer, Hangzhou, China). BPS and BPSG were extracted from 100 mg of freezed homogenized tissue sample by adding 200 µL of acetonitrile/zinc sulfate mixture containing internal standards (BPS-d4 at 100 ng/mL and BPSG-d8 at 1000 ng/mL) and mixed for 5 min at 10°C and 1400 rpm. Plasma, amniotic fluid and tissue samples were then centrifuged for 20 min at 4°C and 20 000 × g. Both BPS and BPSG were extracted with an on line C8 SPE cartridge and separated on CSH C18 column with a water/acetonitrile gradient elution. The multiple reaction monitoring transitions used to quantify BPS and BPSG were 249 > 108 and 425 > 249, respectively.

Blanks samples from control group (two samples per tissue) were used to check the absence of contamination during assay. The accuracy and the intra- and inter-day precisions of the method were evaluated with quality controls (QC) samples (100 mg blanks liver fractions) at three concentrations levels. The precisions, expressed by the coefficients of variation (CV%) were lower than 15% at each concentration levels for both analytes. The limits of quantification (LOQs) were validated at 3 ng/mL, 1 ng/mL and 5 ng/mL for BPS in plasma, amniotic fluid and tissue, respectively. For BPSG, LOQs were validated at 10 ng/mL in plasma and in amniotic fluid and at 5 ng/mL in tissue.

6. Toxicokinetic analysis

The maternal plasma concentrations-times profiles of BPS and BPSG observed after the first and the last IM administration of BPS at the dose of 5 mg/kg were analysed with a sparse-data non-compartmental approach using Phoenix® NMLE™ (version 6.4 ; Pharsight, Mountain view, CA, USA). All mass concentrations were converted into molar concentrations. The area under the plasma concentration time-curve (AUC_{last}) from dosing time to the last sampling time was calculated using the trapezoidal up/log down rule.

7. Steroids assay

Samples preparation

Biological fluids (0.4 to 0.5 mL) and tissues samples previously homogenized by using Precellys Lysing Kits, (6500 rpm, 2x15 sec) (8.6 to 108.41 mg) were spiked with 20 µL of internal standards (0.005 ng/µL for estrogens and 0.1 ng/µL androgens and progestagens). As total and aglycone concentrations of steroids were assayed, for each sample, an aliquot was submitted to an enzymatic deconjugation step using a mix of arylsulfatase from *Helix pomatia* and β-glucuronidase from *Patella vulgata* at 37 °C overnight, as described by Buisson et al (Buisson et al. 2005). Then, the pre-treatment protocol was the same for hydrolysed and non-hydrolysed samples. Steroids were then extracted twice by a liquid-liquid extraction with methyl tert-butyl ether. The pooled surpernatant was evaporated to dryness (N_2, 45 °C) and reconstituted in 200 µL of methanol. The extracted sample were homogenized with 4.5 mL of ultrapure water and purified by solid phase extraction (SPE) on a ChromP cartridge (Supelco, Bellefonte, Pa, USA). The collected eluate was evaporated to dryness (N_2, 45 °C) and reconstituted in 1 mL of NaOH 1 M. The androgens and progestagens were separated from estrogens by liquid-liquid extraction with pentane, this extraction was repeated twice. Then,

the remaining sample was acidified with glacial acetic acid to obtain a pH of 5.0±0.3 (pH controled with pH indicator paper) and the liquid-liquid extraction with pentane was performed twice in order to isolate estrogens steroids. Androgen/progestagen and estrogen fractions were evaporated to dryness (N_2, 45 °C) and reconstituted in 200 µL of dichloromethane. Both fractions were then purified by SPE on a SiOH catridge (Interchim, Montluçon, France). The estrogen fraction was then submitted to a preparative HPLC step. The collected fractions of androgens and estrogen were finally derivatized with 20 µL MSTFA/TMIS/DTE (1000:5:5, v/v/v) at 60°C for 40 min. Two microliters of each final extract was injected onto the GC-MS/MS systems.

GC-MS/MS measurement

The detection and quantification of androgens and progestogens were performed using a Bruker 456 gas chromatograph coupled to a EVOQ TQ triple quadrupole mass spectrometer (Bruker, Fremont, CA, USA) equipped with an electron impact ionization source (EI, 70 eV). Estrogens were determined on a 7890A gas chromatograph coupled to a Xevo TQS triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford Massachusetts) equipped with an atmospheric pressure ionization (API) source. Samples extracts were injected in splitless mode (250 °C) onto a DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm I.D., 25 µm film thickness, Agilent Technologies) and helium was used as a carrier gas. For the androgen and progestagen determination, the flow rate was 1 mL/min and the temperature program was set as follows: 120 °C (2 min), 10 °C/min to 235 °C (3 min), 1 °C/min to 240 °C, and 10 °C/min to 320 °C (2 min). The transfer line was set to 300 °C and the source temperature was set to 250 °C. For the estrogen determination, the flow was set to 2.5 mL/min and the following temperature program was applied: 120 °C (2 min), 40 °C/min to 235 °C (5 min), and 10 °C/min to 300 °C (4 min). The transfer line was heated to 350 °C and nitrogen was used as a make-up gas (350 L/h). The GC ACPI source was operated in positive ionization mode, at a cone voltage of 30 V and a temperature of 150 °C, no modifier added. The corona discharge, the conce gas, and the auxiliary gas flow were programmed as follows: 0–7 min = 20 µA, 0 and 300 mL/h; 7–20 min = 2 µA, 200 and 225 mL/h. Both mass spectrometers were operated in multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode.

Calibration curves were constructed at levels ranging from 0.02 to 2 ng/mL and 0.1 to 10 ng/g for estrogens and from 0.2 to 40 ng/mL and 1 to 200 ng/g for androgens and

progestagens. Retention times, diagnostic signals were monitored for the targeted compounds and internal standards. Identification of analytes was based on relative retention times and diagnostic signal (MRM transition) ratios. The LOD was defined at a signal to noise ratio (S/N) greater than three and the LOQ at a S/N greater than 10.

Figure 1 represents a simplified diagram of steroid synthesis and metabolism, indicating the steroids assayed in samples (Flück and Pandey 2014; Hill et al. 2014; Strajhar et al. 2017).

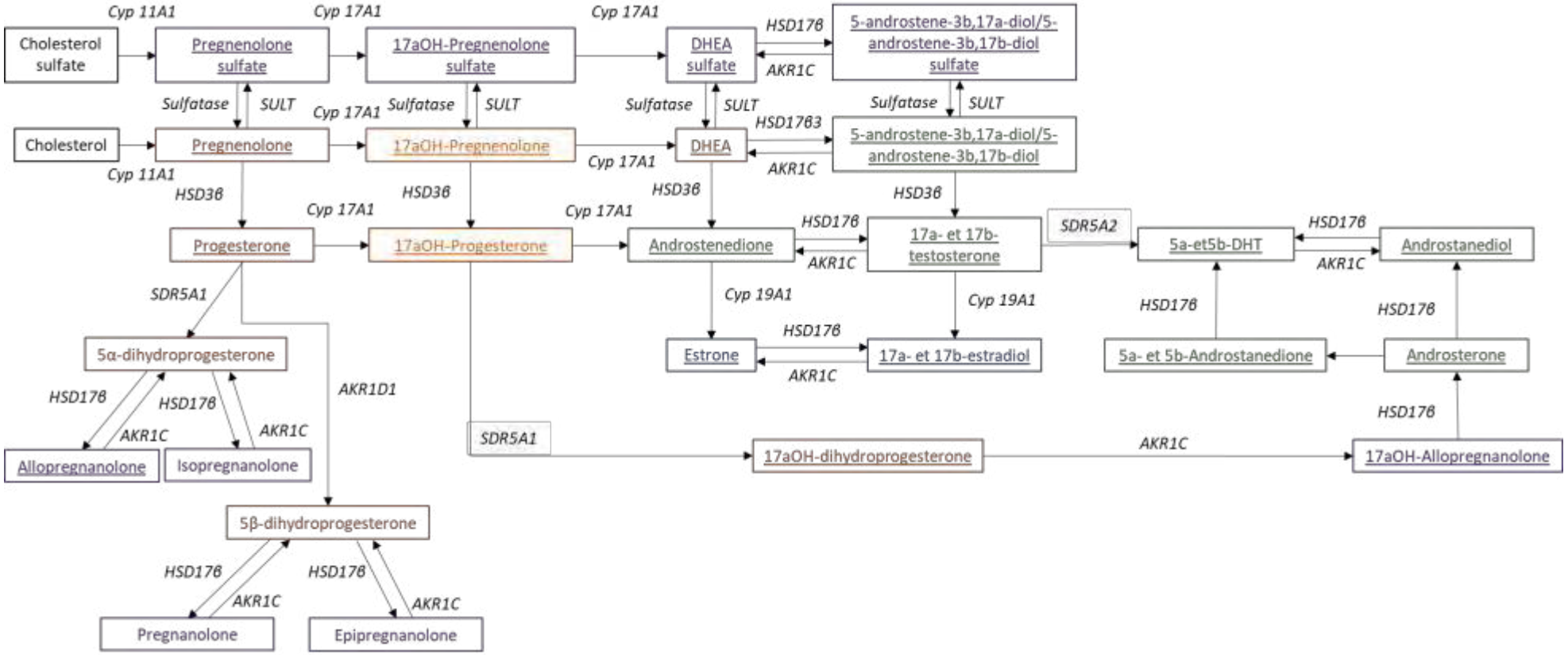


Figure 1 : Simplified diagram of progestagen synthesis (orange) and metabolism (purple), androgens (green) and estrogens (blue) synthesis (Flück and Pandey 2014; Hill et al. 2014; Strajhar et al. 2017). The *steroids assayed in out analytical method are underlined. HSD17β: 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase ; HSD3β: 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase ; SDR5A1: 5α-reductase 1 ; SDR5A2: 5α-reductase 2 ; AKR1C: aldoketoreductases ; SULT: sulfotransférase ; AKR1D1: 5β-reductase ; Cyp 11A1: cholesterol desmolase ; Cyp17A1 : 17α-Hydroxylase, C17, 20 – lyase ; Cyp19A1: aromatase.*

7. Steroidomic data analysis

Concentrations values below the limit of detection of the analytical method were considered equal to zero. For the data analysis, in each samples type, only steroids for which the detection rate was at least equal to 50% in at least one group were considered.

Univariate analysis

For each tissue, one-way analysis of variance (ANOVA) and False Discovery Rate (FDR) (Benjamini and Hochberg 1995) multiple-comparison test were performed to compare the steroid levels between the three groups using the freeware R (R development core team, 2005). P-values <0.05 were considered to be significant.

Multivariate data analysis

Given the complexity of the regulation of steroidogenesis in the materno-feto-placental unit, the 30 steroids investigated were first analyzed by a global approach using a principal component analysis (PCA). The score plot of the first two principal components served to explore any intrinsic patterns in the data set. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (O-PLS-DA) models were then applied with W4M (Guitton et al. 2017) to obtain regression models (Eriksson and Johansson 1996). In the O-PLS-DA, the group (control, BPS 0.05 mg/kg/d, BPS 5 mg/kg/d) were treated as response variable Y.

Seven-fold cross-validation was used to determine the number of latent variables to include in the PLS-DA model and to estimate the predictive ability (Q^2 parameter) of the adjusted model. A threshold of 0.4 was used to validate the model (McCombie et al. 2009). In addition, permutation tests (100 iterations) were applied to assess O-PLS-DA model robustness. The proposed model was considered robust if the Q^2-Intercept (intersection of the regression line and y-axis) is < 0.05 (Lapins et al. 2008).

The Variable Importance in Projection (VIP, weight of variables for each component; value > 0.8 –arbitrary threshold) was used to determine discriminant buckets. Comparisons between conditions were performed using Wilcoxon test corrected using FDR. Differences with $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results

The BPS and BPSG concentrations in maternal plasma drawn before the first dosing and in plasma, amniotic fluid and organs collected on ewes and fetuses from the control group were below the LOQs of the analytical method. Over the 14 assayed tissues samples collected to the control group, BPS (and not BPSG) was measurable in one sample at the level of 77.5 ng/g, thereby indicating a potential contamination of this sample during the sample collection, processing or assay.

1. Maternal BPS and BPSG exposures throughout pregnancy

Figure 2 shows the mean (± SD) BPS and BPSG plasma concentration time profiles from administration to 24h post administration after the first (GD68) and the last (GD96) administration in pregnant ewes treated with BPS (5 or 0.05 mg/kg b.w./d, IM). In the high dose group, BPS and BPSG concentrations were measurable all along the 24h post administration whereas in the low dose group, BPS concentrations dropped below the LOQ after 10h post-administration.

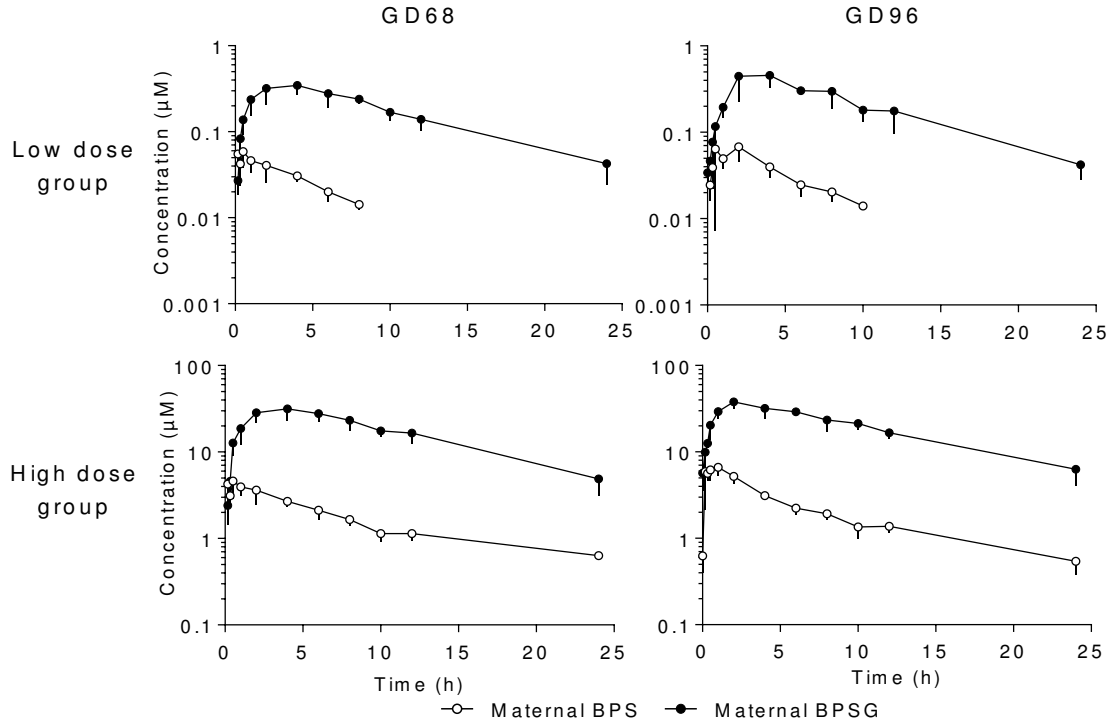


Figure 2 : Mean ± SD BPS and BPSG plasma concentrations times profiles after the first and the last administration in pregnant ewes treated with repeated IM administrations of BPS (5 or 0.05 mg/kg b.w./d) between GD 68 and GD96.

The mean area under curve of BPS ($AUC_{0\text{-}24h}$) and the maximal concentration (C_{max}) of BPS were similar between the first and the last administration and exhibited dose proportionality. The times to reach the maximal concentration (t_{max}) were similar between the low and high dose group (Table 1).

Table 1 : $AUC_{0\text{-}24h}$, C_{max} and t_{max} of BPS from pregnant ewes after the first administration at GD 68 and after the last administration at GD 96. During this period, pregnant ewes received daily IM BPS dose of 0.05 mg/kg b.w. (low dose group) or 5 mg/kg b.w. (high dose group).

Group	Administration	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*nmol/mL)	C_{max} (nmol/ml)	t_{max} (h)
Low dose Group	First (GD 68)	0.264	0.0587	0.500
	Last (GD 96)	0.335	0.067 7	2.00
High dose group	First (GD 68)	38.1	4.60	0.500
	Last (GD 96)	46.9	6.64	1.00

2. BPS and BPSG materno-fetal exposure

The mean (± SD) body weight of male fetuses at the end of the experiment were 725 ± 93.5 g, 794 ± 96.1 g and 751 ± 85.8 g for the control (n= 10), low BPS dose (n= 10) and high BPS dose (n= 6) groups, respectively and did not differ between treatment group.

Table 2 displays the mean (± SD) of the BPS and BPSG concentrations in the maternal and fetal plasma and amniotic fluid collected during the 48h after the last administration for the low and high dose group (see supplementary material tables S1 to S3 for individual values). In the low dose group, BPS concentrations were below the LOQ in all samples and BPSG concentrations were only measurable in the fetal plasma for 9 out of 10 fetus. In the high dose group, BPS and BPSG were quantifiable in fetal plasma and amniotic fluid. The mean BPSG fetal plasma concentration in the low dose group (0.085 6 ± 0.029 6 µM) was around 100 fold lower than those in the high dose group (7.81 ± 1.14), reinforcing the proportionality of the exposure to BPS in the feto-materno-placental unit. At the end of the experiment, in the high dose group, BPSG concentrations in fetal plasma were fivefold higher and two fold higher compared to those in amniotic fluid and in maternal plasma, respectively.

Table 2 : Mean (±SD) BPS and BPSG concentrations (µM) in the maternal and fetal plasma and in amniotic fluid from pregnant ewes treated with BPS from GD 68 to GD 96 at the low dose of 50 µg/kg.d and at the high dose of 5 mg/kg/d. LOQs were validated for BPS, at 3 ng/mL

(0.012 0 µM) in plasma, at 1 ng/mL (0.004 µM) in amniotic fluid, and for BPSG at 10 ng/mL (0.023 5 µM) in both matrices. Mean concentrations were noted as "< LOQ" when the concentrations in more than half the samples were below the LOQ, when BPS (BPSG) were measurable in at least half the samples, the non-measurable values were replaced by the LOQ/2 for the mean calculation.

Treatment		Fetal Blood		Amniotic fluid		Maternal blood	
		BPS (µM)	**BPSG (µM)**	**BPS (µM)**	**BPSG (µM)**	**BPS (µM)**	**BPSG (µM)**
Low dose	Mean	<LOQ	0.0856	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
50 µg/kg (b.w.)/d	SD		0.029 6				
0.2 µmol/kg (b.w.)/d	n/tot		9/10				
High dose	Mean	0.1523	7.81	0.282	1.612	0.327	3.06
5 mg/kg (b.w.)/d	SD	0.0123	1.14	0.202	0.895	0.188	1.75
20 µmol/kg (b.w.)/d	n/tot	3/3	3/3	6/6	6/6	10/10	10/10

Figure 3 shows the box plot of BPS and BPSG concentrations in fetal plasma, amniotic fluid and organs of steroid synthesis and of steroid metabolism collected from the high dose group at the end of the experiment (see supplementary material tables S4 for individual values). BPS and BPSG tissue concentrations were higher (ranging from 0.269 to 3.51 nmol/g for BPS and from 5.86 to 26.7 nmol/g for BPSG) than those in fetal plasma (ranging from 0.143 to 0.166 nmol/g for BPS and from 6.87 to 9.07 nmol/g for BPSG) except for hypothalamus and hippocampus (ranging from 0.0690 to 0.308 nmol/g for BPS and from 0.470 to 1.91 nmol/g for BPSG). The BPS and BPSG concentrations in amniotic fluid were low (range between 0.080 and 0.580 nmol/g (20.0-145 ng/g) for BPS and between 0.770-2.97 nmol/g for BPSG (193-743 ng/g)).

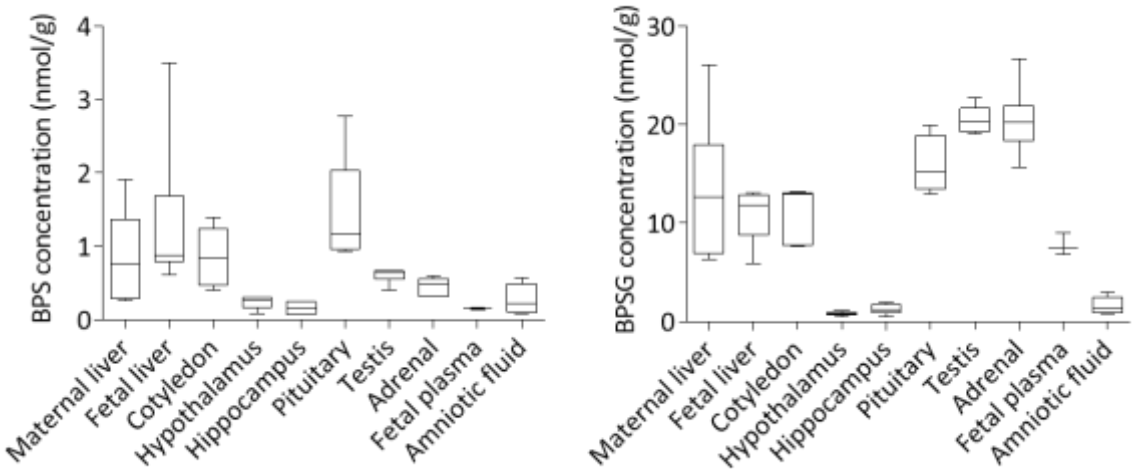


Figure 3 : Box plot of BPS (left) and BPSG (right) concentrations in organs of steroid synthesis or metabolism and in fetal plasma and amniotic fluid after the daily maternal IM administration of BPS (5 mg/kg b. w.) from GD 68 to GD 96 (expressed in nmol/g of tissue or nmol/mL of biological fluid).

In the low dose group samples, BPS concentration levels were systematically below the LOQ. BPSG concentrations (mean ± SD) were measurable in gonad (0.279 ± 0.101 nmol/g), adrenal (0.278 ± 0.116 nmol/g), cotyledon (0.167 ± 0.0358 nmol/g) and fetal liver (0.193 ± 0.0566 nmol/g) and were below the LOQ in the other tested tissues.

In the high dose group, the BPSG concentrations in biological samples were systematically higher than BPS concentrations, with a ratio of BPSG to BPS concentrations ranging from 3.42 to 16.3 except in gonad, adrenal and fetal plasma in which this ratio ranged from 33.8 to 51.3.

3. Steroid analysis

Mean ± SD, range, median and detection rate (%) of targeted steroids in fluid and tissue samples are shown in supplementary material (table S5 to S16).

Univariate analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) performed on the data set identified only eight steroids with different levels in fetal plasma, amniotic fluid or in fetal tissues of control and BPS-treated pregnant sheep (Table 3). But, taking into account the multiple comparison

correction by the FDR test, not any difference in these steroids levels were evidenced between treatment groups.

Table 3 : Steroids with differentially levels in fetal plasma, amniotic fluid and fetal tissues of control and BPS-treated pregnant sheep, sorted by p values determined by ANOVA.

Steroid	Aglycone/conjugate	Sample type	P value (ANOVA)	Corrected p value (FDR)
Pregnenolone	conjugate	testis	0.002	0.160
Pregnenolone	conjugate	amniotic fluid	0.002	0.160
17aOH-Pregnenolone	conjugate	amniotic fluid	0.011	0.473
DHEA	aglycone	amniotic fluid	0.048	0.708
Estrone	conjugate	fetal plasma	0.013	0.473
Estrone	aglycone	fetal plasma	0.014	0.473
Androstenedione	conjugate	adrenal	0.026	0.660
17b-estradiol	conjugate	adrenal	0.022	0.656

Multivariate analysis

Figure 4 and 5 show the PCA obtained in biological fluid and tissues samples, respectively. The PCA score plots initially established did not allow to differentiate the steroid profiles between groups, whatever the organ of steroid synthesis or metabolism considered. Consequently, the O-PLS-DA model built for all tissues did not allow the discrimination of differentially abundant steroids, whatever the biological fluids or tissues (Figure 4 and 5).

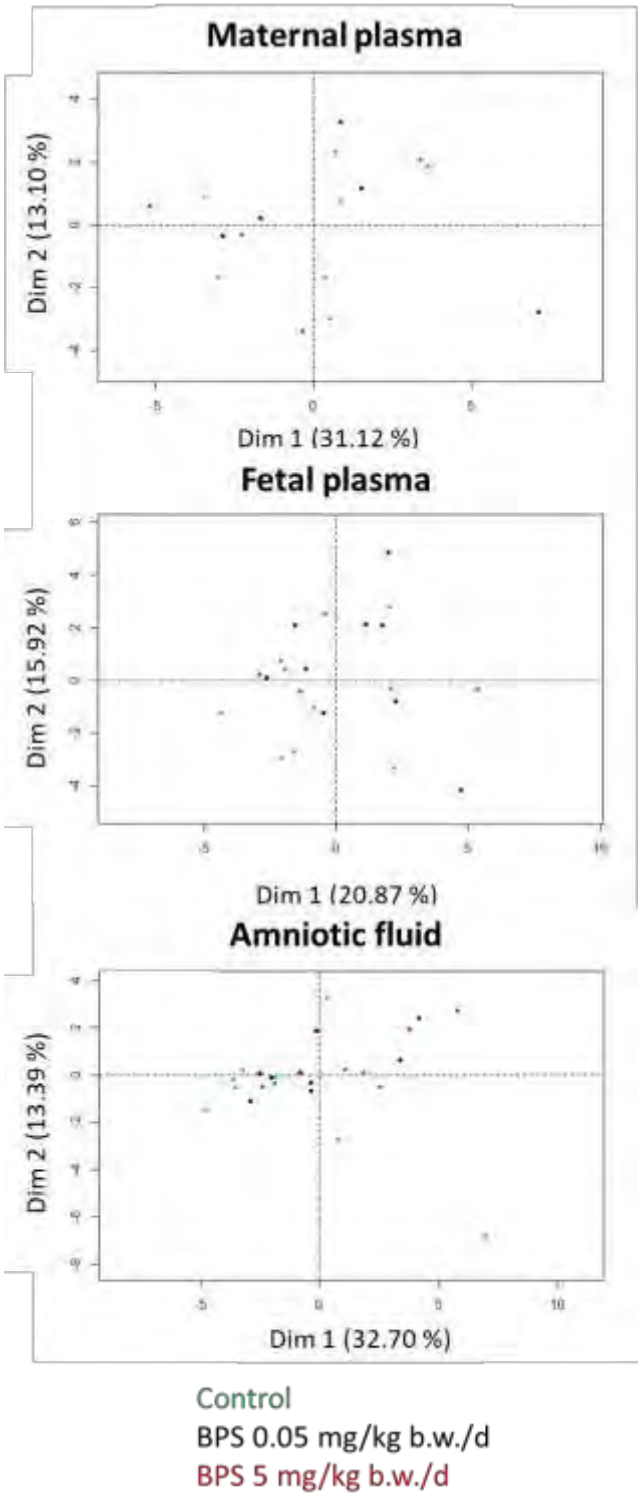


Figure 4 : Score plots of the PCA performed for the aglycone and conjugated steroid hormone profiles in maternal and fetal plasma and amniotic fluid collected from pregnant sheep treated with vehicle, or with BPS at the dose of 0.05 mg/kg/d and at the dose of 5 mg/kg/d from GD68 to GD96. Each dot represents the steroid profile of one animal.

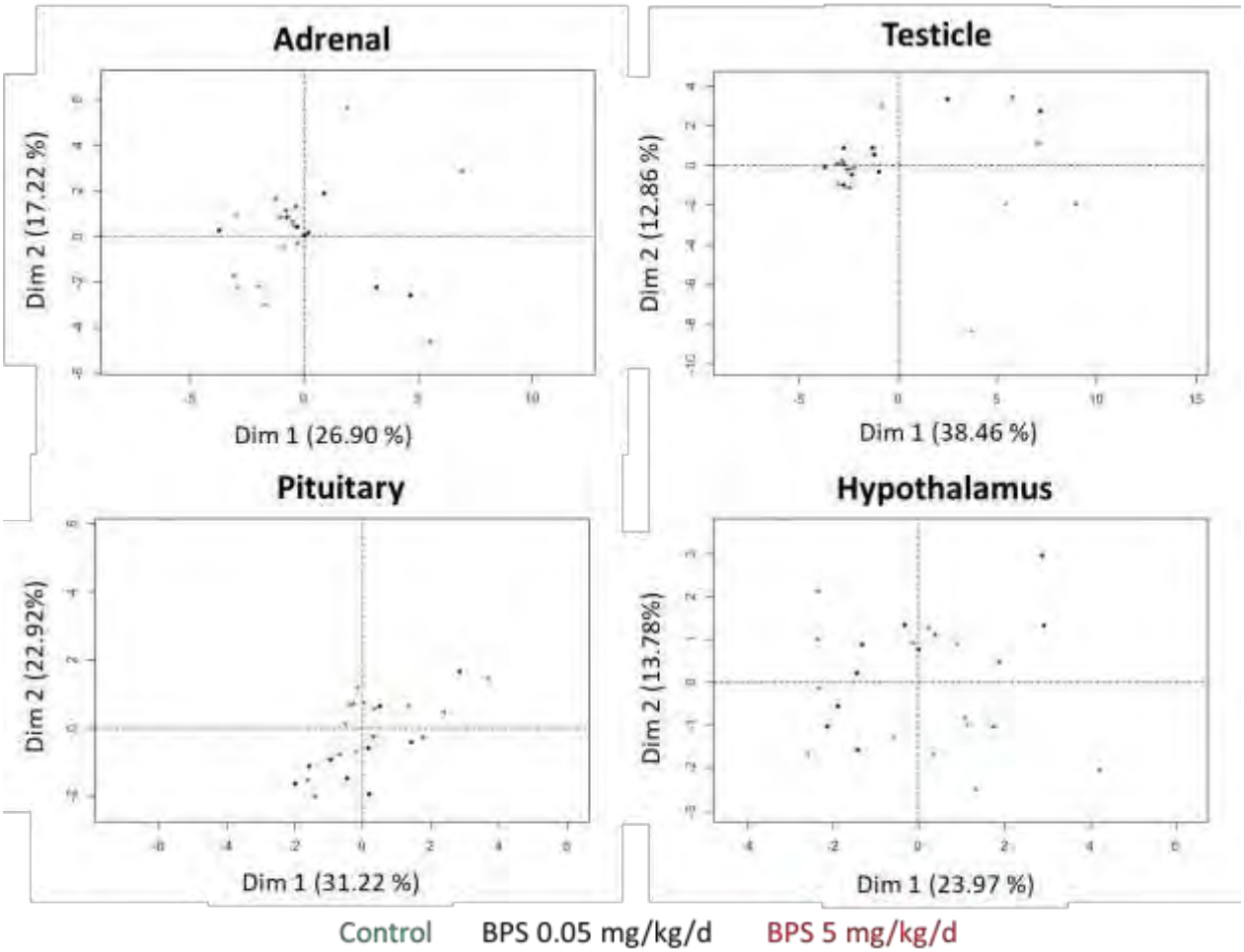


Figure 5 : Score plot of the PCA performed for the aglycone and conjugated steroid hormone profiles in adrenal and testis tissues and for the aglycone steroid hormone profiles in hypothalamus and pituitary tissues collected from pregnant sheep treated with vehicle or with BPS at the dose of 0.05 mg/kg/d and at the dose of 5 mg/kg/d from GD68 to GD96. Each dot represents the steroid profile of one animal.

Discussion

Biomonitoring and experimental data indicate that BPS can cross the placental barrier and is able to accumulate in the fetal compartment (Grandin et al., 2018 ; Liu et al. 2017), suggesting that the fetus could be at risk for overexposure to bioactive BPS. Yet, the complex steroidogenic materno-feto-placental interactions play an essential role in healthy pregnancy and fetal development (Hill et al. 2014; Morel et al. 2016; Zambrano et al. 2014). However, we have shown that, in the pregnant sheep, a relevant model for studying gestation, the steroidogenic signature was not altered by a BPS treatment in middle pregnancy.

The time course of BPS and BPSG in maternal plasma was exactly the same after the first and the last IM BPS administration, demonstrating that BPS did not accumulate in maternal compartment and that the exposure of the pregnant ewes was the same during the repeated BPS administrations. This is consistent with a short half-life of elimination of BPS in sheep (Grandin et al., 2018). Moreover, the BPS/BPSG exposure in the materno-feto-placental unit was proportional for the two BPS doses used, suggesting that the TK mechanism determining the fetal and maternal exposure and the BPS placental transfer were not saturated for the range of dose.

BPS and BPSG were well distributed in steroid sensitive (pituitary) or producer (testis, adrenal, placenta) or metabolic organs (liver), with levels of BPS and BPSG higher than those in fetal plasma and in amniotic fluid. By contrast the concentrations of BPS and BPSG were lower in hypothalamus and hippocampus compared to other tissues, probably because of the protection of the brain by the blood brain barrier (Rodríguez et al. 2010; Wilhelm et al. 2016), which is functional in the ovine fetus from GD60 (Dziegielewska et al. 1979).

BPS was mainly present in its glucuronoconjugated form in plasma and in steroidogenic tissues, demonstrating, as previously shown the capacities of the fetus to metabolize BPS into BPSG (Grandin et al., 2018). Even if BPS and BPSG concentrations in maternal plasma were difficult to interpret because of great temporal variation, in the *post mortem* plasma samples, the BPS and BPSG concentrations in the fetal plasma were of the same order of magnitude than in the maternal plasma despite its very low maternal to fetal transfer, reinforcing the accumulation of BPS and BPSG in fetal compartment previously demonstrated in TK study (Grandin et al., 2018).

Furthermore, the BPSG/BPS concentrations ratios ranged from 3 to 10 in all organs and amniotic fluid except in fetal adrenal, testis and fetal plasma for which the ratio was about 50. These variations could be attributed to a differentially tissue distribution of BPS and BPSG or to local glucuronidase activity. Previous toxicokinetic data in sheep model (Grandin et al., 2018) showed that deconjugation of BPSG into bioactive BPS is required prior its elimination from the fetal compartment because of the inability of BPSG to cross the placental barrier. The higher BPSG/BPS ratio in fetal plasma compared to those in tissue and amniotic fluid suggests that BPSG hydrolysis could occur in peripheral compartment rather than in central compartment. Indeed, β-glucuronidase was widely expressed in many tissues and body fluids

in humans (Sperker et al. 1997). Moreover, the hydrolysis of BPAG into BPA was previously demonstrated *ex vivo* in several ovine fetal tissues (cotyledon, gonad and liver, (Corbel et al. 2015)). Furthermore glucuronidase activity was demonstrated in the amniotic fluid (Kamarýt and Matýsek 1980) and preliminary results (data not shown) suggest that amniotic fluid could be in part a site of deconjugation of BPSG, which is consistent with its low BPSG/BPS concentrations ratio of 6. The consequences of this local reactivation of BPSG/BPS in sensitive tissue must be further investigated.

Steroidogenesis is a complex process during which the production and elimination of steroids is regulated at several levels and involves appropriate feto-placental communication (Miller and Auchus 2010; Pasqualini 2005; Payne and Hales 2004).

The subchronic gestational exposure of sheep in middle pregnancy led to significant BPS concentrations in fetal steroidogenic organs with values around 1 nmol/g for the high BPS dose and predicted levels of 0.01 nmol/g for the low BPS dosage. Despite that, BPS treatment did not modify steroidomic signature whatever the steroidogenic organ considered. Yet, BPS was demonstrated to decrease testosterone secretion on the *ex vivo* model of fetal testis in mice for BPS concentrations of 0.1 µM and in human for BPS concentrations of 1 µM, i.e. in the range of concentrations reached, in our study, in fetal testis in the low and high dose group. But the BPS effect on the expression of key enzymes involved in testosterone biosynthesis (Star, Hsd3b1, Cyp17a1) was only evidenced for higher BPS concentrations (10 µM) (Eladak et al. 2015). In the same way, in an *in vivo* study in male mice exposed to BPS during 60 postnatal days, an alteration of testosterone secretion was evidenced for a high BPS dose of 10 mg/kg given every 3 days, whereas the estradiol concentrations were increased both for 50 µg/kg and 10 mg/kg. Moreover, the effects were not associated with alteration of the expression of enzymes involved in steroidogenesis, whatever the dose (Shi et al. 2017).

Altogether, these results indicate that effects of BPS on steroidogenesis pathways may depend on the model used (species, physiological stage and window of exposure). That shows the difficulty to extrapolate the results from one model or species to another and from one stage of pregnancy to another.

Indeed, in our study, the absence of effect of the subchronic BPS treatment on steroids levels in materno-feto-placental unit could be explained by several factors. The materno-placento-fetal unit was exposed to BPS during 28 days, corresponding to only 20 % of

pregnancy, especially considering that fetal internal BPS and BPSG exposure increased during the treatment period because of its accumulation in fetal compartment, as previously demonstrated (Grandin et al., 2018). Moreover, in our study, the BPS exposure took place after the organogenesis in middle pregnancy, a period during which the steroid levels were relatively constant (Carnegie and Robertson 1978). However, given the establishment of steroidogenesis pathways in materno-feto-placental unit throughout the whole gestation (Klonisch et al. 2004; Pasqualini 2005), we cannot exclude that the steroid regulation pathways might be less sensitive to endocrine disruption during the window of exposure of middle pregnancy.

Another assumption is that the potential effect of BPS on steroidogenesis, if indeed it exists, could be counterbalanced *in vivo,* in our pregnant sheep model, by the redundancy of regulation of steroid pathways in the materno-feto-placental unit (Morel et al. 2016; Pasqualini 2005). Furthermore, the high individual variability of steroids levels could have masked the potential effect of BPS.

In conclusion, the maternal BPS and BPSG exposures of the pregnant ewes were the same during the repeated BPS administrations and the internal exposure to BPS and BPSG in the materno-fetal unit was proportional to the dose. After 28 days of BPS exposure, the BPSG concentrations were always higher than BPS concentrations and were of the same order of magnitude both in fetal plasma, in maternal plasma and in amniotic fluid. All the organs of steroid synthesis or steroid metabolism were exposed to BPS and BPSG, with BPSG tissue concentrations higher than those in fetal plasma, except for hypothalamus and hippocampus, which are protected by the brain blood barrier.

However, this BPS exposure in middle pregnancy, whether low or high dose, did not alter the steroid signature in the materno-feto-placental unit. But we cannot exclude that the potential effect of BPS on steroidogenesis, if indeed it exists, could be counterbalanced *in vivo* by the redundancy of regulation of steroid pathways. Further studies are needed to evaluate BPS effect on other stage of pregnancy and on female fetuses.

Acknowledgments

The authors thank the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses for funding this project **[grant number** 2015/1/112, 2015], C. Lacassagne and J-P. Gau for their assistance and involvement in animal care, Cécile Gayrard, Théo Dokhelar, Aude Cazanave, Claire Quintard, and Clémence Gely for their technical support in sample pre-treatment and analyses.

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

References

Abi Salloum B, Veiga-Lopez A, Abbott DH, Burant CF, Padmanabhan V. 2015. Developmental Programming: Exposure to Testosterone Excess Disrupts Steroidal and Metabolic Environment in Pregnant Sheep. Endocrinology 156:2323–2337; doi:10.121 0/en.2014-2006.

ANSES. 2013. Environmental and occupational health & safety on the assessment of the risks associated with bisphenol a for human health, and on toxicological data and data on the Use of bisphenols S, F, M, B, AP, AF and BADGE, opinion of the French Agency for Food, 2013.https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-1.pdf. Accessed July 19, 2016. Available: https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-1.pdf [accessed 19 July 2016].

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological) 57: 289–300.

Buisson C, Hebestreit M, Weigert AP, Heinrich K, Fry H, Flenker U, et al. 2005. Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17β-estradiol administration to cattle. Journal of Chromatography A 1093:69–80; doi:10.1016/j.chroma.2005.07.042.

Carnegie JA, Robertson HA. 1978. Conjugated and unconjugated estrogens in fetal and maternal fluids of the pregnant ewe: a possible role for estrone sulfate during early pregnancy. Biol Reprod 19: 202–211.

Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng Y-L, Wu Y, et al. 2016. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review. Environ Sci Technol 50:5438–5453; doi:10.1021/acs.est.5b05387.

Corbel T, Perdu E, Gayrard V, Puel S, Lacroix MZ, Viguié C, et al. 2015. Conjugation and Deconjugation Reactions within the Fetoplacental Compartment in a Sheep Model: A Key Factor Determining Bisphenol A Fetal Exposure. Drug Metabolism and Disposition 43: 467–476.

Dziegielewska KM, Evans CA, Malinowska DH, Møllgård K, Reynolds JM, Reynolds ML, et al. 1979. Studies of the development of brain barrier systems to lipid insoluble molecules in fetal sheep. J Physiol 292: 207–231.

Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin M-J, N'Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, et al. 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. Fertility and Sterility 103:11–21; doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.005.

Eriksson L, Johansson E. 1996. Multivariate design and modeling in QSAR. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 34:1–19; doi:10.1016/0169-7439(96)00023-8.

Flück CE, Pandey AV. 2014. Steroidogenesis of the testis – new genes and pathways. Annales d'Endocrinologie 75:40–47; doi:10.1016/j.ando.2014.03.002.

Glausiusz J. 2014. The plastics puzzle. Nature 508:306–308; doi:10.103 8/508 306 a.

Goldinger DM, Demierre A-L, Zoller O, Rupp H, Reinhard H, Magnin R, et al. 2015. Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. Regulatory Toxicology and Pharmacology 71:453–462; doi:10.1016/j.yrtph.2015.01.002.

Grandin F, Picard-Hagen N, Gayrard V, Puel S, Viguié C, Toutain P-L, et al. 2017. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and

bisphenol S glucuronide: applicability to toxicokinetic investigations. Journal of Chromatography A 1526:39–46; doi:10.1016/j.chroma.2017.10.020.

Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Gauderat, G., Mila, H., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2018. Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. Environment International 120, 584–592. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019

Guitton Y, Tremblay-Franco M, Le Corguillé G, Martin J-F, Pétéra M, Roger-Mele P, et al. 2017. Create, run, share, publish, and reference your LC–MS, FIA–MS, GC–MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 93:89–101; doi:10.1016/j.biocel.2017.07.002.

Hill M, Pašková A, Kančeva R, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, et al. 2014. Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 139:201–222; doi:10.1016/j.jsbmb.2013.03.008.

Ji K, Hong S, Kho Y, Choi K. 2013. Effects of Bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. Environ Sci Technol 47:8793–8800; doi:10.1021/es400329t.

Kamarýt J, Matýsek P. 1980. Beta-glucuronidase activity in amniotic fluid. J Clin Chem Clin Biochem 18 (10):611–4.

Kinch CD, Ibhazehiebo K, Jeong J-H, Habibi HR, Kurrasch DM. 2015. Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112:1475–1480; doi:10.1073/pnas.1417731112.

Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S. 2004. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. Developmental Biology 270:1–18; doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.018.

Lapins M, Eklund M, Spjuth O, Prusis P, Wikberg JE. 2008. Proteochemometric modeling of HIV protease susceptibility. BMC Bioinformatics 9:181; doi:10.1186/1471-2105-9-181.

Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon H-B, et al. 2012. Bisphenol S in urine from the united states and seven asian countries: occurrence and human exposures. Environ Sci Technol 46:6860–6866; doi:10.1021/es301334j.

Liu J, Li J, Wu Y, Zhao Y, Luo F, Li S, et al. 2017. Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum. Environ Sci Technol 51:2456–2463; doi:10.1021/acs.est.6b05718.

McCombie G, Browning LM, Titman CM, Song M, Shockcor J, Jebb SA, et al. 2009. ω-3 oil intake during weight loss in obese women results in remodelling of plasma triglyceride and fatty acids. Metabolomics 5:363–374; doi:10.1007/s11306-009-0161-7.

Miller WL, Auchus RJ. 2010. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. Endocrine Reviews 32:81–151; doi:10.1210/er.2010-0013.

Morel Y, Roucher F, Plotton I, Goursaud C, Tardy V, Mallet D. 2016. Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. Annales d'Endocrinologie 77:82–89; doi:10.1016/j.ando.2016.04.023.

Naderi M, Wong MYL, Gholami F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. Aquatic Toxicology 148:195–203; doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.009.

Padmanabhan V, Sarma HN, Savabieasfahani M, Steckler TL, Veiga-Lopez A. 2010. Developmental reprogramming of reproductive and metabolic dysfunction in sheep:

native steroids vs. environmental steroid receptor modulators. International journal of andrology 33:394–404; doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01024.x.

Pasqualini JR. 2005. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 97:401–415; doi:10.1016/j.jsbmb.2005.08.004.

Payne AH, Hales DB. 2004. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. Endocrine Reviews 25:947–970; doi:10.1210/er.2003-0030.

R development core team, (2005) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.ISBN 3-900051-07-0.Rochester JR. 2013. Bisphenol A and human health: A review of the literature. Reproductive Toxicology 42:132–155; doi:10.1016/j.reprotox.2013.08.008.

Rochester JR, Bolden AL. 2015. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. Environ Health Perspect 123:643–650; doi:10.1289/ehp.1408989.

Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M. 2010. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. Peptides 31:757–776; doi:10.1016/j.peptides.2010.01.003.

Roelofs MJE, Berg M van den, Bovee TFH, Piersma AH, Duursen MBM va. 2015. Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. Toxicology 329:10–20; doi:10.1016/j.tox.2015.01.003.

Rosenmai AK, Dybdahl M, Pedersen M, Alice van Vugt-Lussenburg BM, Wedebye EB, Taxvig C, et al. 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? Toxicological Sciences 139:35–47; doi:10.1093/toxsci/kfu030.

Shi M, Sekulovski N, MacLean JA, Hayashi K. 2017. Effects of bisphenol A analogues on reproductive functions in mice. Reproductive Toxicology; doi:10.1016/j.reprotox.2017.06.134.

Sperker B, Backman JT, Kroemer HK. 1997. The role of β-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. Clinical pharmacokinetics 33: 18–31.

Strajhar P, Tonoli D, Jeanneret F, Imhof RM, Malagnino V, Patt M, et al. 2017. Steroid profiling in H295R cells to identify chemicals potentially disrupting the production of adrenal steroids. Toxicology 381:51–63; doi:10.1016/j.tox.2017.02.010.

Ullah H, Jahan S, Ain QU, Shaheen G, Ahsan N. 2016. Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. Chemosphere 152:383–391; doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.125.

USEPA. 2014. Bisphenol A alternatives in thermal.https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf. Accessed January 26, 2017. Available: https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf [accessed 26 January 2017].

Veiga-Lopez A, Moeller J, Abbott DH, Padmanabhan V. 2016. Developmental programming: rescuing disruptions in preovulatory follicle growth and steroidogenesis from prenatal testosterone disruption. Journal of Ovarian Research 9:39; doi:10.1186/s13048-016-0250-y.

Wilhelm I, Nyúl-Tóth Á, Suciu M, Hermenean A, Krizbai IA. 2016. Heterogeneity of the blood-brain barrier. Tissue Barriers 4; doi:10.1080/21688370.2016.1143544.

Wu L-H, Zhang X-M, Wang F, Gao C-J, Chen D, Palumbo JR, et al. 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review. Science of The Total Environment 615:87–98; doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.194.

Ye X, Wong L-Y, Kramer J, Zhou X, Jia T, Calafat AM. 2015. Urinary concentrations of bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of U.S. adults during 2000–2014. Environ Sci Technol 49:11834–11839; doi:10.1021/acs.est.5b02135.

Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW. 2014. Fetal programming of sexual development and reproductive function. Molecular and Cellular Endocrinology 382:538–549; doi:10.1016/j.mce.2013.09.008.

Supplementary material

Effect of a long-term BPS exposure during pregnancy on the materno-feto-placental steroidogenesis in a sheep model.

Flore C. Grandin[a], Marlène Z. Lacroix[b], Marie-Line Morvan[c], Jean-Philippe Antignac[c], Véronique Gayrard[a], Catherine Viguié[a], Hanna Mila[a], Rémi Servien[b], Marie Tremblay-Franco[a], Pierre-Louis Toutain[d], Bruno Le Bizec[c] et Nicole Picard-Hagen[a]

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

[b]INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31 076 Toulouse, France

[c]LABERCA UMR 1329, INRA, Oniris, 44 307, Nantes, France

[d]The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

Flore C. Grandin : flore.grandin@inra.fr ; Marlène Z. Lacroix : m.lacroix@envt.fr; Marie-Line Morvan : marie-line.morvan@oniris-nantes.fr ; Jean-Philippe Antignac : jean-philippe.antignac@oniris-nantes.fr ; Véronique Gayrard : v.gayrard@envt.fr ; Catherine Viguié : c. viguie@envt.fr ; Hanna Mila : h.mila@envt.fr ; Rémi Servien : remi.servien@inra.fr, Marie Tremblay-Franco : marie.tremblay-franco@inra.fr ; Pierre-Louis Toutain : pl.toutain@envt.fr ; Bruno Le Bizec : bruno.lebizec@oniris-nantes.fr ; Nicole Picard-Hagen : n.hagen-picard@envt.fr.

Corresponding author* : Nicole Picard-Hagen, UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87 614, 31076 Toulouse cedex 3, France, Tel. : +33 (0)5 61 19 38 61, E-mail : n.hagen-picard@envt.fr

Table S1 : Individual BPS and BPSG post mortem concentrations in the maternal plasma for the low and high dose group.

Maternal plasma (*post mortem*)			
Group	**Animal identification**	**BPS concentration (nmol /mL)**	**BPSG concentration (nmol /mL)**
Low dose	B11	InfLOD	InfLOQ
	B12	InfLOD	0.030
	B13	InfLOD	0.031
	B14	InfLOD	InfLOQ
	B15	InfLOD	InfLOQ
	B16	InfLOD	InfLOQ
	B17	InfLOD	InfLOQ
	B18	InfLOD	InfLOQ
	B19	InfLOD	InfLOQ
	B20	InfLOD	InfLOQ
High dose	B21	0.68	6.10
	B22	0.46	4.55
	B23	0.34	3.18
	B24	0.14	1.31
	B25	0.50	4.13
	B26	0.35	4.64
	B27	0.16	1.46
	B28	0.10	0.88
	B29	0.16	1.73
	B30	0.38	2.58

InfLOD = below the limit of detection
InfLOQ = below the limit of quantification

Table S2 : Individual BPS and BPSG post mortem concentrations in the fetal plasma for the low and high dose group.

Fetal plasma (*post mortem*)			
Group	**Animal identification**	**BPS concentration (nmol /mL)**	**BPSG concentration (nmol /mL)**
Low dose	B11F1	InfLOD	0.091
	B12F1	InfLOD	0.111
	B13F1	InfLOQ	0.012
	B14F1	InfLOD	0.076
	B15F2	InfLOD	0.092
	B15F2	InfLOD	0.120
	B16F1	InfLOQ	0.083
	B17F1	InfLOQ	0.091
	B19F1	InfLOD	0.077
	B19F2	InfLOD	0.103
High dose	B24F1	0.147	6.863
	B25F1	0.143	9.065
	B29F1	0.166	7.488

InfLOD = below the limit of detection
InfLOQ = below the limit of quantification

Table S3 : Individual BPS and BPSG post mortem concentrations in the amniotic fluid for the low and high dose group.

Amniotic fluid (*post mortem*)			
Group	**Animal identification**	**BPS concentration (nmol /mL)**	**BPSG concentration (nmol /mL)**
Low dose	B11F1	InfLOD	InfLOQ
	B12F1	InfLOD	InfLOQ
	B13F1	InfLOD	InfLOQ
	B14F1	InfLOD	InfLOQ
	B15F1	InfLOD	InfLOQ
	B15F2	NA	NA
	B16F1	InfLOD	InfLOQ
	B17F1	InfLOD	InfLOQ
	B19F1	InfLOD	InfLOQ
	B19F2	InfLOD	InfLOQ
High dose	B22F1	0.115	0.932
	B24F1	0.291	1.681
	B25F1	0.576	2.968
	B27F1	0.169	0.965
	B28F1	0.082	0.769
	B29F1	0.464	2.364

InfLOD = below the limit of detection
InfLOQ = below the limit of quantification

Table S4 : Individual BPS and BPSG post mortem concentrations in tissues samples for the low and high dose group.

Tissues (*post mortem*)				
Tissue type	**Group**	**Animal identification**	**BPS concentration (nmol /g)**	**BPSG concentration (nmol /g)**
Maternal liver	Low dose	B11	InfLOD	0.182
		B12	InfLOD	0.443
		B13	2.09	NA
		B14	InfLOD	InfLOD
		B15	InfLOD	InfLOQ
		B16	InfLOD	InfLOQ
		B17	InfLOD	InfLOQ
		B19	3.54	InfLOD
	High dose	B22	0.764	15.3
		B24	0.325	7.11
		B25	1.91	26.0
		B27	0.269	6.28
		B28	NA	14.5
		B29	0.829	10.9
Fetal liver	Low dose	B11F1	0.903	0.128
		B12F1	1.72	0.270
		B13F1	1.68	InfLOQ
		B14F1	InfLOD	InfLOQ
		B15F1	0.190	0.110
		B15F2	0.234	0.174
		B16F1	InfLOQ	0.186
		B17F1	InfLOQ	0.211
		B19F1	3.80	0.260
		B19F2	1.10	0.203
	High dose	B22F1	0.856	12.0
		B24F1	1.09	11.6
		B25F1	0.908	13.1
		B27F1	0.615	12.8
		B28F1	0.863	9.80
		B29F1	3.51	5.86

Table S4 : Individual BPS and BPSG post mortem concentrations in tissues samples for the low and high dose group (continuation).

Tissues (*post mortem*)				
Tissue type	**Group**	**Animal identification**	**BPS concentration (nmol /g)**	**BPSG concentration (nmol /g)**
Cotyledon	Low dose	B11	InfLOQ	0.185
		B12	InfLOD	0.191
		B13	0.992	InfLOQ
		B14	2.42	0.109
		B15	0.219	0.144
		B16	InfLOD	0.193
		B17	InfLOD	0.208
		B19	0.905	0.143
	High dose	B22	NA	NA
		B24	0.535	13.0
		B25	1.09	13.2
		B27	0.405	7.63
		B28	0.841	13.1
		B29	1.39	7.87
Hypothalamus	Low dose	B11F1	InfLOQ	InfLOD
		B12F1	InfLOD	InfLOD
		B13F1	InfLOD	InfLOD
		B14F1	InfLOD	InfLOQ
		B15F1	InfLOD	InfLOD
		B15F2	InfLOD	InfLOD
		B16F1	InfLOD	InfLOD
		B17F1	InfLOD	InfLOD
		B19F1	InfLOD	InfLOD
		B19F2	InfLOD	InfLOD
	High dose	B22F1	58.3	0.532
		B24F1	76.4	0.725
		B25F1	77.1	1.10
		B27F1	InfLOQ	0.729
		B28F1	48.13	0.860
		B29F1	73.38	0.897

Table S4 : Individual BPS and BPSG post mortem concentrations in tissues samples for the low and high dose group (continuation).

Tissues (*post mortem*)				
Tissue type	**Group**	**Animal identification**	**BPS concentration (nmol /g)**	**BPSG concentration (nmol /g)**
Hippocampus	Low dose	B11F1	InfLOD	InfLOD
		B12F1	InfLOD	InfLOQ
		B13F1	InfLOD	InfLOQ
		B14F1	InfLOD	InfLOD
		B15F1	InfLOD	InfLOQ
		B15F2	InfLOD	InfLOQ
		B16F1	InfLOD	InfLOD
		B17F1	InfLOD	InfLOQ
		B19F1	NA	NA
		B19F2	InfLOD	InfLOD
	High dose	B22F1	0.069	0.470
		B24F1	0.248	1.13
		B25F1	0.206	1.10
		B27F1	0.244	1.72
		B28F1	0.088	1.91
		B29F1	0.071	1.40
Pituitary	Low dose	B12F2	0.473	0.303
		B13F2	InfLOD	InfLOQ
		B14F2	0.529	InfLOD
		B16F2	InfLOD	InfLOD
		B18F2	InfLOD	InfLOQ
	High dose	B22F2	1.14	13.7
		B26F2	2.78	18.5
		B25F2	1.21	14.7
		B27F2	1.78	15.9
		B29F2	0.981	13.0
		B30F1	0.936	20.0

Table S4 : Individual BPS and BPSG post mortem concentrations in tissues samples for the low and high dose group (continuation).

Tissues (*post mortem*)				
Tissue type	**Group**	**Animal identification**	**BPS concentration (nmol /g)**	**BPSG concentration (nmol /g)**
Testis	Low dose	B11F1	0.266	0.135
		B12F1	InfLOD	0.332
		B13F1	InfLOQ	InfLOD
		B14F1	InfLOD	0.188
		B15F1	3.14	0.391
		B15F2	InfLOQ	0.416
		B16F1	0.346	0.162
		B17F1	InfLOQ	0.352
		B19F1	InfLOD	0.265
		B19F2	InfLOD	0.274
	High dose	B22F1	0.409	21.3
		B24F1	0.660	19.2
		B25F1	0.639	22.8
		B27F1	0.671	19.9
		B28F1	0.606	20.9
		B29F1	0.664	19.4
Adrenal	Low dose	B11F1	0.394	0.323
		B12F1	InfLOQ	0.307
		B13F1	InfLOD	InfLOD
		B14F1	1.82	0.204
		B15F1	InfLOD	0.371
		B15F2	0.820	0.490
		B16F1	InfLOQ	0.158
		B17F1	2.44	InfLOD
		B19F1	InfLOD	0.161
		B19F2	0.830	0.210
	High dose	B22F1	0.315	20.2
		B24F1	0.545	20.2
		B25F1	0.324	20.4
		B27F1	0.482	26.7
		B28F1	0.604	19.2
		B29F1	0.480	15.7

InfLOD = below the limit of detection
InfLOQ = below the limit of quantification

Only steroids with at least 50% of detection rate in at least one group were shown on these tables.

Table S5 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted aglycone steroids in pituitary after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Pituitary - aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
Androsterone	0.427 ± 0.215 [0-0.740] 0.438 ; 90 %	0.211 ± 0.287 [0-0.770] 0 ; 44.4 %	0.226 ± 0.250 [0-0.491] 0.189 ; 50 %
DHEA	0.373 ± 0.623 [0-1.650] 0 ; 30 %	0.402 ± 0.623 [0-1.571] 0 ; 33.3 %	1.01 ± 1 408 [0-3.56] 0.439 ; 50 %
17a-testosterone	0.134 ± 0.151 [0-0.389] 0.0960 ; 50 %	0.0282 ± 0.0846 [0-0.254] 0 ; 11.1 %	0.137 ± 0.213 [0-0.435] 0 ; 33.3 %
17a-estradiol	0.662 ± 0.994 [0-0.748] 0.400 ; 100 %	0.303 ± 0.264 [0-0.435] 0.242 ; 88.9 %	0.0935 ± 0.083 7 [0-0.389] 0.0955 ; 66.7 %
Estrone	0.674 ± 1.10 [0-3.72] 0.401 ; 90 %	0.0783 ± 0.108 [0-0.302] 0.0205 ; 55.6 %	0.0823 ± 0.072 7 [0-0.180] 0.0888 ; 66.7 %
Allopregnanolone	26.3 ± 14.6 [8.96-58.9] 23.7 ; 100 %	20.8 ± 10.7 [5.84-40.3] 20.3 ; 100 %	30.4 ± 13.4 [13.2-43.8] 31.7 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	2.09 ± 0.722 [0.790-3.21] 2.15 ; 100 %	1.33 ± 0.875 [0-2.80] 1.14 ; 88.9 %	1.87 ± 0.651 [0.714-2.51] 2.00 ; 100 %
Pregnenolone	13.1 ± 3.12 [7.73-17.6] 13.2 ; 100 %	15.9 ± 7.19 [5.12-24.7] 17.9 ; 100 %	20.7 ± 8.11 [9.65-32.0] 20.1 ; 100 %
Progesterone	1.65 ± 0.881 [0.655-3.16] 1.71 ; 100 %	2.93 ± 2.29 [0.885-8.53] 2.08 ; 100 %	3.21 ± 2.57 [0.648-7.09] 2.90 ; 100 %

Table S6 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g); detection rate (%) of targeted aglycone steroids in hypothalamus after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Hypothalamus –aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5a-dihydrotestosterone	0.159 ± 0.216 [0-0.523] 0 ; 40.0 %	0.0844 ± 0.132 [0-0.332] 0 ; 33.3 %	0.191 ± 0.124 [0-0.359] 0.215 ; 83.3 %
Androsterone	0.189 ± 0.255 [0-0.660] 0 ; 40.0 %	0.184 ± 0.215 [0-0.587] 0.149 ; 55.6 %	0.254 ± 0.222 [0-0.559] 0.280 ; 66.7 %
DHEA	0.687 ± 0.683 [0-2.05] 0.856 ; 60.0 %	0.690 ± 0.858 [0-2.02] 0 ; 44.4 %	1.19 ± 1.03 [0-2.55] 1.35 ; 66.7 %
Androstenedione	0.0459 ± 0.0752 [0-0.268] 0 ; 30.0 %	0.0872 ± 0.113 [0-2.55] 0 ; 44.4 %	0.148 ± 0.130 [0-2.05] 0.163 ; 66.7 %
17b-testosterone	0.117 ± 0.232 [0-0.718] 0 ; 30.0 %	0.0749 ± 0.170 [0-0.503] 0 ; 22.2 %	0.233 ± 0.299 [0-0.751] 0.156 ; 50.0 %
17a-estradiol	0.0525 ± 0.034 4 [0-0.111] 0.0512 ; 90.0 %	0.0308 ± 0.032 5 [0-0.0850] 0.0370 ; 55.6 %	0.0309 ± 0.036 39 [0-0.08589] 0.0247 ; 50.0 %
Estrone	0.0408 ± 0.039 2 [0-0.0933] 0.0403 ; 60.0 %	0.0366 ± 0.051 1 [0-0.148] 0 ; 44.4 %	0.0340 ± 0.052 5 [0-0.103] 0 ; 33.3 %
17b-estradiol	0.00510 ± 0.008 49 [0-0.0221] 0 ; 30.0 %	0.00417 ± 0.008 28 [0-0.0190] 0 ; 22.2 %	0.0127 ± 0.014 6 [0-0.0326] 0.00948 ; 50.0 %
Allopregnanolone	34.8 ± 17.6 [11.7-71.2] 31.8 ; 100 %	24.5 ± 12.0 [10.1-44.0] 21.3 ; 100 %	33.1 ± 14.9 [18.4-55.5] 30.4 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	1.27 ± 0.613 [0.423-2.60] 1.14 ; 100 %	0.804 ± 0.293 [0.518-1.50] 0.754 ; 100 %	0.892 ± 0.295 [0.492-1.28] 0.892 ; 100 %
17aOH-dihydroprogesterone	18.4 ± 7.57 [0-0.602] 0.168 ; 50.0 %	0.283 ± 0.316 [0-1.08] 0.408 ; 55.6 %	0.251 ± 0.276 [0-0.677] 0.246 ; 50.0 %
Pregnenolone	17.4 ± 4.63 [9.88-26.6] 17.7 ; 100 %	18.4 ± 7.57 [7.09-30.4] 17.5 ; 100 %	22.8 ± 7.92 [14.9-32.4] 21.4 ; 100 %

Table S6 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g); detection rate (%) of targeted aglycone steroids in hypothalamus after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96 (continuation).

Hypothalamus –aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
17aOH-Pregnenolone	0.138 ± 0.181 [0-0.394] 0 ; 40.0 %	0.235 ± 0.200 [0-0.518] 0.267 ; 66.7 %	0.337 ± 0.289 [0-0.705] 0.375 ; 667 %
Progesterone	0.401 ± 0.222 [0.135-0.846] 0.369 ; 100 %	0.546 ± 0.335 [0.179-1.28] 0.425 ; 100 %	0.579 ± 0.402 [0.152-1.24] 0.560 ; 100 %

Table S7 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted aglycone steroids in amniotic fluid after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Amniotic fluid - aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5a-dihydrotestosterone	0.00406 ± 0.0128 [0.00-0.0406] 0.00 ; 10.0 %	0.0109 ± 0.0172 [0.00-0.0434] 0.00 ; 33.3 %	0.0211 ± 0.0235 [0.00-0.0477] 0.0177 ; 50.0 %
DHEA	0.0154 ± 0.048 6 [0.00-0.154] 0.00 ; 10.0 %	0.0751 ± 0.049 3 [0.00-0.133] 0.0803 ; 77.8 %	0.0477 ± 0.055 1 [0.00-0.121] 0.0329 ; 50.0 %
17a-estradiol	0.0174 ± 0.007 25 [0.00-0.0302] 0.0181 ; 90.0 %	0.0176 ± 0.007 88 [0.00-0.0284] 0.0178 ; 88.9 %	0.0196 ± 0.012 3 [0.00-0.0366] 0.0183 ; 83.3 %
Estrone	0.0126 ± 0.013 5 [0.00-0.0373] 0.0106 ; 50.0 %	0.0166 ± 0.013 4 [0.00-0.0366] 0.0213 ; 66.7 %	0.0180 ± 0.014 0 [0.00-0.0302] 0.0258 ; 66.7 %
Allopregnanolone	0.129 ± 0.058 4 [0.0366-0.218] 0.111 ; 100 %	0.121 ± 0.047 8 [0.0426-0.185] 0.119 ; 100 %	0.176 ± 0.048 1 [0.106-0.223] 0.190 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	0.0148 ± 0.013 6 [0.00-0.0329] 0.0179 ; 60.0 %	0.0123 ± 0.012 8 [0.00-0.0330] 0.0138 ; 55.6 %	0.0184 ± 0.011 7 [0.00-0.0324] 0.0197 ; 83.3 %
Pregnenolone	0.0172 ± 0.020 2 [0.00-0.0515] 0.00837 ; 50.0 %	0.0271 ± 0.011 1 [0.00-0.0389] 0.0308 ; 88.9 %	0.0293 ± 0.015 5 [0.00-0.0450] 0.0334 ; 83.3 %
17aOH-Pregnenolone	0.0175 ± 0.029 6 [0.00-0.0798] 0.00 ; 30.0 %	0.0325 ± 0.031 5 [0.00-0.0639] 0.0417 ; 55.6 %	0.0246 ± 0.038 6 [0.00-0.0826] 0.00 ; 33.3 %
Progesterone	0.0456 ± 0.0584 [0.00-0.165] 0.0204 ; 50.0 %	0.0743 ± 0.0377 [0.00-0.111] 0.0835 ; 88.9 %	0.0947 ± 0.0459 [0.0406-0.175] 0.0892 ; 100 %
17aOH-Progesterone	0.0899 ± 0.0876 [0.00-0.252] 0.0628 ; 80.0 %	0.147 ± 0.0894 [0.0450-0.306] 0.127 ; 100 %	0.135 ± 0.112 [0.00-0.275] 0.119 ; 83.3 %

Table S8 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in amniotic fluid after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Amniotic fluid -conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5b-Androstane-3a, 17a-diol	2.30 ± 1.74 [0.383-5.83] 1.92 ; 100 %	2.143 ± 1.28 [0.852-4.98] 1.78 ; 100 %	3.00 ± 2.06 [0.990-5.65] 2.46 ; 100 %
5b-Androstane-3b, 17a-diol	0.468 ± 0.454 [0.00-1.429] 0.285 ; 90.0 %	0.402 ± 0.317 [0.00-0.902] 0.359 ; 88.9 %	0.582 ± 0.417 [0.251-1.37] 0.479 ; 100 %
5a-Androstane-3a, 17a-diol	0.444 ± 0.308 [0.00-0.924] 0.443 ; 80.0 %	0.340 ± 0.307 [0.00-0.867] 0.319 ; 66.7 %	0.486 ± 0.435 [0.00-0.997] 0.512 ; 66.7 %
5a-Androstane-3b, 17a-diol	0.252 ± 0.368 [0.00-0.323] 0.126 ; 80.0 %	0.146 ± 0.126 [0.00-0.997] 0.169 ; 66.7 %	0.120 ± 0.110 [0.00-0.924] 0.132 ; 66.7 %
5-androstene-3b, 17a-diol	1.64 ± 1.94 [0.391-6.63] 0.812 ; 100 %	1.14 ± 0.454 [0.661-2.19] 1.12 ; 100 %	1.41 ± 0.936 [0.476-3.18] 1.13 ; 100 %
DHEA	1.53 ± 0.960 [0.621-3.27] 1.19 ; 100 %	2.51 ± 1.16 [1.22-3.95] 2.28 ; 100 %	2.64 ± 2.22 [0.780-6.47] 1.83 ; 100 %
5a-Androstane-3b, 17b-diol	0.0780 ± 0.126 [0.00-0.285] 0.00 ; 30.0 %	0.163 ± 0.201 [0.00-0.605] 0.166 ; 55.6 %	0.203 ± 0.171 [0.00-0.369] 0.254 ; 66.7 %
Androstenedione	0.0213 ± 0.0249 [0.00-0.0612] 0.00809 ; 50.0 %	0.00724 ± 0.0217 [0.00-0.0652] 0.00 ; 11.1 %	0.0234 ± 0.0288 [0.00-0.0702] 0.0155 ; 50.0 %
17a-testosterone	0.244 ± 0.265 [0.00-0.820] 0.194 ; 80.0 %	0.206 ± 0.100 [0.00-0.338] 0.198 ; 88.9 %	0.321 ± 0.231 [0.0678-0.6898] 0.2568 ; 100 %
17a-estradiol	58.1 ± 37.9 [21.7-117] 47.5 ; 100 %	55.5 ± 27.6 [26.2-115] 47.7 ; 100 %	87.0 ± 42.4 [23.5-137] 87.8 ; 100 %
Estrone	3.20 ± 4.09 [0.00-13.4] 1.64 ; 90.0 %	4.23 ± 4.99 [1.25-16.8] 2.45 ; 100 %	7.14 ± 5.47 [1.44-15.5] 6.80 ; 100 %

Table S8 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in amniotic fluid after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96 (continuation)

Amniotic fluid -conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
17b-estradiol	0.0868 ± 0.168 [0.00-0.559] 0.0304 ; 80.0 %	0.0672 ± 0.057 8 [0.00-0.188] 0.0517 ; 88.9 %	0.0934 ± 0.067 1 [0.0201-0.179] 0.0704 ; 100 %
Allopregnanolone	6.41 ± 4.02 [2.00-13.0] 4.80 ; 100 %	7.55 ± 5.48 [2.68-19.8] 4.94 ; 100 %	13.3 ± 8.96 [4.75-25.0] 9.54 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	0.216 ± 0.136 [0.0784-0.542] 0.172 ; 100 %	0.195 ± 0.149 [0.00-0.493] 0.141 ; 88.9 %	0.276 ± 0.187 [0.00-0.448] 0.361 ; 83.3 %
Pregnenolone	0.454 ± 0.296 [0.00-0.883] 0.389 ; 90.0 %	0.714 ± 0.184 [0.444-0.998] 0.740 ; 100 %	0.999 ± 0.283 [0.542-1.39] 0.986 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	0.195 ± 0.156 [0.00-0.445] 0.163 ; 80.0 %	0.387 ± 0.135 [0.256-0.625] 0.335 ; 100 %	0.426 ± 0.177 [0.229-0.668] 0.367 ; 100 %
Progesterone	0.0669 ± 0.0486 [0.00-0.158] 0.0588 ; 90.0 %	0.106 ± 0.0264 [0.0663-0.155] 0.109 ; 100 %	0.106 ± 0.0437 [0.0473-0.156] 0.107 ; 100 %
17aOH-Progesterone	0.102 ± 0.0674 [0.0438-0.256] 0.0867 ; 100 %	0.133 ± 0.0711 [0.0534-0.265] 0.108 ; 100 %	0.127 ± 0.0927 [0.0497-0.262] 0.0776 ; 100 %

Table S9 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted aglycone steroids in fetal plasma after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Fetal plasma - aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
DHEA	0.391 ± 0.250 [0.00-0.906] 0.400 ; 88.9 %	0.591 ± 0.205 [0.347-0.848] 0.522 ; 100 %	0.667 ± 0.512 [0.224-1.41] 0.520 ; 100 %
17a-testosterone	0.148 ± 0.0479 [0.0441-0.211] 0.154 ; 100 %	0.145 ± 0.0674 [0.00-0.252] 0.149 ; 88.9 %	0.0769 ± 0.0952 [0.00-0.196] 0.0558 ; 50.0 %
17b-testosterone	0.373 ± 0.868 [0.00-2.67] 0.0405 ; 66.7 %	0.162 ± 0.268 [0.00-0.825] 0.0215 ; 55.6 %	0.151 ± 0.275 [0.00-0.563] 0.0199 ; 50.0 %
17a-estradiol	0.0160 ± 0.009 24 [0.00883-0.0319] 0.0152 ; 100 %	0.0200 ± 0.007 02 [0.00-0.563] 0.0182 ; 100 %	0.0213 ± 0.005 87 [0.00-2.67] 0.0220 ; 100 %
Estrone	0.00885 ± 0.010 6 [0.00-0.0310] 0.00735 ; 55.6 %	0.0214 ± 0.012 5 [0.00880-0.0531] 0.0186 ; 100 %	0.0251 ± 0.005 25 [0.0198-0.0312] 0.0247 ; 100 %
17b-estradiol	0.00334 ± 0.003 45 [0.00-0.00784] 0.00328 ; 55.6 %	0.00704 ± 0.006 22 [0.00-0.0203] 0.00624 ; 77.8 %	0.00790 ± 0.006 48 [0.00216-0.0157] 0.00685 ; 100 %
Allopregnanolone	0.931 ± 0.545 [0.280-1.97] 0.918 ; 100 %	0.970 ± 0.251 7 [0.558-1.513] 0.947 ; 100 %	0.941 ± 0.418 [0.475-1.31] 0.992 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	0.266 ± 0.176 [0.00-0.597] 0.221 ; 88.9 %	0.205 ± 0.095 3 [0.0745-0.333] 0.214 ; 100 %	0.262 ± 0.132 [0.131-0.446] 0.235 ; 100 %
Pregnenolone	0.272 ± 0.207 [0.0905-0.762] 0.230 ; 100 %	0.272 ± 0.110 [0.151-0.519] 0.260 ; 100 %	0.500 ± 0.466 [0.197-1.19] 0.304 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	0.451 ± 0.391 [0.00-1.220] 0.365 ; 77.8 %	0.590 ± 0.354 [0.00-1.10] 0.741 ; 88.9 %	0.980 ± 0.460 [0.649-1.64] 0.818 ; 100 %
Progesterone	0.396 ± 0.373 [0.0983-1.23] 0.301 ; 100 %	0.367 ± 0.249 [0.181-0.982] 0.274 ; 100 %	0.310 ± 0.294 [0.151-0.751] 0.169 ; 100 %
17aOH-Progesterone	0.0338 ± 0.0359 [0.00-0.0953] 0.0386 ; 55.6 %	0.0224 ± 0.0290 [0.00-0.0720] 0.00 ; 44.4 %	0.0278 ± 0.0357 [0.00-0.0749] 0.0181 ; 50.0 %

Table S10 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in fetal plasma after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Fetal plasma -conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5b-Androstane-3a, 17a-diol	2.75 ± 2.27 [0.902-7.89] 1.68 ; 100 %	3.04 ± 3.12 [0.00-10.6] 2.14 ; 88.9 %	2.91 ± 1.84 [1.26-5.13] 2.62 ; 100 %
5b-Androstane-3b, 17a-diol	1.27 ± 0.947 [0.527-2.96] 0.797 ; 100 %	1.95 ± 1.57 [0.241-4.69] 1.23 ; 100 %	1.42 ± 1.04 [0.380-2.51] 1.41 ; 100 %
5a-Androstane-3a, 17a-diol	0.641 ± 0.507 [0.00-1.48] 0.568 ; 77.8 %	0.784 ± 0.575 [0.00-2.05] 0.781 ; 88.9 %	0.587 ± 0.862 [0.00-1.83] 0.261 ; 50.0 %
5a-Androstane-3b, 17a-diol	0.566 ± 0.470 [0.00-1.94] 0.512 ; 77.8 %	0.709 ± 0.655 [0.00-1.83] 0.532 ; 88.9 %	0.710 ± 0.580 [0.00-1.48] 0.546 ; 100 %
5-androstene-3b, 17a-diol	4.47 ± 3.50 [1.41-10.7] 2.60 ; 100 %	16.2 ± 26.2 [1.77-81.6] 4.21 ; 100 %	3.74 ± 3.87 [0.00-9.06] 2.94 ; 75.0 %
DHEA	2.26 ± 1.62 [0.473-5.08] 1.69 ; 100 %	3.42 ± 4.03 [0.00-13.5] 2.73 ; 88.9 %	1.81 ± 0.357 [1.52-2.32] 1.70 ; 100 %
17a-testosterone	0.437 ± 0.324 [0.00-1.04] 0.453 ; 77.8 %	0.413 ± 0.328 [0.00-1.08] 0.461 ; 77.8 %	0.445 ± 0.182 [0.246-0.687] 0.423 ; 100 %
17b-testosterone	0.402 ± 0.927 [0.00-2.84] 0.00 ; 44.4 %	0.113 ± 0.168 [0.00-0.489] 0.0329 ; 55.6 %	0.141 ± 0.244 [0.00-0.504] 0.0295 ; 50.0 %
17a-estradiol	18.1 ± 18.6 [0.00-52.5] 15.1 ; 88.9 %	23.5 ± 16.0 [2.09-52.1] 23.4 ; 100 %	19.6 ± 4.02 [14.5-23.7] 20.1 ; 100 %
Estrone	2.37 ± 2.37 [0.00-6.84] 1.38 ; 77.8 %	6.06 ± 2.59 [2.68-11.1] 5.48 ; 100 %	4.60 ± 1.58 [2.33-5.85] 5.10 ; 100 %
17b-estradiol	0.0240 ± 0.030 7 [0.00-0.0750] 0.0133 ; 55.6 %	0.0465 ± 0.047 1 [0.00-0.131] 0.0452 ; 66.7 %	0.0256 ± 0.032 9 [0.00-0.0689] 0.0168 ; 50.0 %
Allopregnanolone	8.02 ± 4.74 [1.89-15.7] 7.65 ; 100 %	8.69 ± 7.33 [2.43-24.4] 5.81 ; 100 %	9.00 ± 5.95 [4.52-17.2] 7.16 ; 100 %

Table S10 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in fetal plasma after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96 (continuation).

Fetal plasma -conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
17aOH-Allopregnanolone	0.319 ± 0.261 [0.00-0.655] 0.359 ; 66.7 %	0.428 ± 0.361 [0.00-1.26] 0.333 ; 88.9 %	0.475 ± 0.382 [0.192-1.04] 0.336 ; 100 %
Pregnenolone	9.69 ± 9.13 [2.39-26.5] 6.23 ; 100 %	15.7 ± 15.9 [2.73-44.5] 8.06 ; 100 %	16.2 ± 22.3 [3.52-49.5] 5.95 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	4.10 ± 4.51 [0.554-11.7] 1.73 ; 100 %	5.87 ± 7.39 [0.00-21.4] 2.46 ; 77.8 %	4.88 ± 5.12 [1.36-12.4] 2.87 ; 100 %
Progesterone	0.335 ± 0.290 [0.00-1.02] 0.319 ; 88.9 %	0.472 ± 0.311 [0.0760-0.898] 0.471 ; 100 %	0.281 ± 0.394 [0.00-0.859] 0.133 ; 75.0 %
17aOH-Progesterone	0.0219 ± 0.0347 [0.00-0.0802] 0.00 ; 33.3 %	0.0816 ± 0.0756 [0.00-0.246] 0.0707 ; 77.8 %	0.0651 ± 0.0903 [0.00-0.192] 0.0345 ; 50.0 %

Table S11 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted aglycone steroids in maternal plasma after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Maternal plasma – aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5a-dihydrotestosterone	0.0325 ± 0.0322 [0.00-0.0697] 0.0356 ; 57.1 %	0.0205 ± 0.0304 [0.00-0.0678] 0.00 ; 40.0 %	0.00 ± 0.00 [0.00-0.00] 0.00 ; 0.00 %
DHEA	0.0480 ± 0.063 4 [0.00-0.151] 0.00 ; 42.9 %	0.0723 ± 0.066 6 [0.00-0.129] 0.106 ; 60.0 %	0.0541 ± 0.065 6 [0.00-0.133] 0.0417 ; 50.0 %
Androstenedione	0.00690 ± 0.0183 [0.00-0.0483] 0.00 ; 14.3 %	0.00692 ± 0.0155 [0.00-0.0346] 0.00 ; 20.0 %	0.0146 ± 0.0172 [0.00-0.0322] 0.0134 ; 50 %
17a-testosterone	0.0583 ± 0.0582 [0.00-0.124] 0.0610 ; 57.1 %	0.0449 ± 0.0509 [0.00-0.0322] 0.0453 ; 60.0 %	0.0170 ± 0.0339 [0.00-0.0483] 0.00 ; 25.0 %
17a-estradiol	0.00700 ± 0.003 74 [0.00357-0.0123] 0.00611 ; 100 %	0.00968 ± 0.004 18 [0.00441-0.0161] 0.00907 ; 100 %	0.00833 ± 0.002 92 [0.00595-0.0126] 0.00741 ; 100 %
Estrone	0.00477 ± 0.003 99 [0.00-0.00896] 0.00650 ; 71.4 %	0.00395 ± 0.004 11 [0.00-0.00821] 0.00338 ; 60.0 %	0.00710 ± 0.003 52 [0.00351-0.0118] 0.00651 ; 100 %
17b-estradiol	0.00517 ± 0.003 12 [0.00-0.00985] 0.00452 ; 85.7 %	0.00445 ± 0.004 58 [0.00-0.0104] 0.00445 ; 60.0 %	0.00504 ± 0.004 73 [0.00-0.0114] 0.00437 ; 75 %
Allopregnanolone	7.51 ± 4.06 [2.29-15.6] 7.19 ; 100 %	7.18 ± 3.68 [2.58-11.1] 8.19 ; 100 %	5.46 ± 4.71 [1.30-12.1] 4.20 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	0.369 ± 0.141 [0.142-0.544] 0.367 ; 100 %	0.299 ± 0.125 [0.159-0.491] 0.261 ; 100 %	0.283 ± 0.240 [0.147-0.641] 0.172 ; 100 %
Pregnenolone	2.36 ± 0.642 [1.32-3.27] 2.41 ; 100 %	3.03 ± 1.41 [1.54-4.62] 2.84 ; 100 %	2.11 ± 1.18 [0.595-3.38] 2.22 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	0.422 ± 0.152 [0.199-0.599] 0.404 ; 100 %	0.365 ± 0.260 [0.00-0.661] 0.310 ; 80.0 %	0.305 ± 0.144 [0.193-0.513] 0.256 ; 100 %
Progesterone	8.68 ± 4.08 [2.81-14.7] 7.33 ; 100 %	8.56 ± 5.64 [3.91-18.3] 7.07 ; 100 %	5.68 ± 3.72 [1.19-9.88] 5.83 ; 100 %
17aOH-Progesterone	0.147 ± 0.155 [0.00-0.407] 0.19 ; 57.1 %	0.222 ± 0.0923 [0.128-0.326] 0.230 ; 100 %	0.122 ± 0.103 [0.0510-0.274] 0.0811 ; 100 %

Table S12 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in maternal plasma after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Maternal plasma -conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5b-Androstane-3a, 17a-diol	4.31 ± 1.84 [2.27-7.80] 4.35 ; 100 %	3.678 ± 1 248 [1.91-4.88] 3.80 ; 100 %	4.15 ± 1.86 [2.41-5.79] 4.20 ; 100 %
5b-Androstane-3b, 17a-diol	0.121 ± 0.118 [0.00-0.275] 0.159 ; 57.1 %	0.452 ± 0.308 [0.181-0.909] 0.350 ; 100 %	0.211 ± 0.278 [0.00-0.586] 0.129 ; 50.0 %
5a-Androstane-3a, 17a-diol	0.189 ± 0.239 [0.00-0.514] 0.00 ; 42.9 %	0.179 ± 0.261 [0.00-0.575] 0.00 ; 40.0 %	0.295 ± 0.262 2 [0.00-0.529] 0.325 ; 75.0 %
5a-Androstane-3b, 17a-diol	1.77 ± 0.550 [1.22-2.71] 1.62 ; 100 %	1.75 ± 0.587 [0.00-0.529] 1.48 ; 100 %	1.85 ± 1.15 [0.00-0.514] 1.94 ; 100 %
5-androstene-3b, 17a-diol	0.173 ± 0.297 [0.00-0.667] 0.00 ; 28.6 %	0.802 ± 0.516 [0.319-1.65] 0.663 ; 100 %	0.527 ± 0.412 [0.00-1.01] 0.550 ; 75.0 %
DHEA	0.172 ± 0.164 [0.00-0.482] 0.155 ; 71.4 %	0.0663 ± 0.090 9 [0.00-0.170] 0.00 ; 40.0 %	0.254 ± 0.049 1 [0.194-0.315] 0.254 ; 100 %
17a-testosterone	0.362 ± 0.176 [0.00-0.553] 0.396 ; 85.7 %	0.400 ± 0.372 [0.00-0.774] 0.577 ; 60.0 %	0.337 ± 0.135 [0.197-0.496] 0.327 ; 100 %
17a-estradiol	0.663 ± 0.320 [0.333-1.164] 0.639 ; 100 %	1.31 ± 0.647 [0.289-1.98] 1.56 ; 100 %	0.760 ± 0.331 [0.430-1.20] 0.703 ; 100 %
Estrone	0.247 ± 0.234 [0.0477-0.704] 0.155 ; 100 %	0.313 ± 0.248 [0.044-0.602] 0.273 ; 100 %	0.214 ± 0.202 [0.00-0.484] 0.186 ; 75.0 %
17b-estradiol	0.00608 ± 0.009 2 [0.00-0.0242] 0.00 ; 43.0 %	0.00708 ± 0.007 81 [0.00-0.0185] 0.00624 ; 60.0 %	0.00885 ± 0.017 7 [0.00-0.0354] 0.00 ; 25.0 %
Allopregnanolone	19.8 ± 11.2 [5.00-38.9] 19.6 ; 100 %	28.9 ± 31.7 [10.7-85.0] 16.8 ; 100 %	21.3 ± 11.8 [12.4-38.6] 17.2 ; 100 %

Table S12 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/mL) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in maternal plasma after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96 (continuation).

Maternal plasma -conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
17aOH-Allopregnanolone	0.638 ± 0.283 [0.308-1.09] 0.551 ; 100 %	0.823 ± 0.809 [0.374-2.27] 0.490 ; 100 %	0.568 ± 0.278 [0.274-0.864] 0.568 ; 100 %
Pregnenolone	16.2 ± 21.5 [5.31-64.8] 8.44 ; 100 %	13.2 ± 9.32 [5.22-27.7] 9.20 ; 100 %	8.00 ± 2.60 [6.07-11.6] 7.16 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	0.676 ± 0.405 [0.361-1.54] 0.574 ; 100 %	0.694 ± 0.698 [0.00-1.85] 0.594 ; 80.0 %	0.391 ± 0.271 [0.00-0.600] 0.482 ; 75.0 %
Progesterone	7.10 ± 4.38 [0.866-14.9] 7.45 ; 100 %	6.23 ± 4.17 [1.23-12.5] 5.58 ; 100 %	5.81 ± 3.69 [2.18-10.9] 5.09 ; 100 %
17aOH-Progesterone	0.263 ± 0.160 [0.140-0.540] 0.160 ; 100 %	0.225 ± 0.0453 [0.175-0.286] 0.217 ; 100 %	0.108 ± 0.0877 [0.00-0.202] 0.115 ; 75 %

Table S13 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted aglycone steroids in adrenal after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Adrenal - aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
Androsterone	1.05 ± 0.681 [0.00-2.20] 0.866 ; 90.0 %	1.00 ± 0.570 [0.00-1.85] 1.00 ; 87.5 %	1.30 ± 1.31 [0.00-3.78] 1.01 ; 83.3 %
Androstenedione	5.35 ± 2.89 [0.00-8.85] 6.48 ; 90.0 %	7.32 ± 7.13 [0.00-19.7] 8.37 ; 62.5 %	10.3 ± 12.1 [0.00-31.7] 7.12 ; 66.7 %
17a-testosterone	0.353 ± 0.336 [0.00-0.685] 0.594 ; 60.0 %	0.452 ± 0.487 [0.00-1.02] 0.406 ; 50.0 %	0.613 ± 0.568 [0.00-1.49] 0.672 ; 66.7 %
17b-testosterone	0.547 ± 0.758 [0.00-6.31] 0.00 ; 50.0 %	1.30 ± 2.06 [0.00-1.49] 0.600 ; 87.5 %	3.09 ± 3.76 [0.00-0.685] 1.56 ; 100 %
17a-estradiol	0.0607 ± 0.095 [0.00-0.286] 0.00 ; 40.0 %	0.154 ± 0.129 [0.00-0.425] 0.128 ; 87.5 %	0.191 ± 0.248 [0.00-0.569] 0.0759 ; 50.0 %
Allopregnanolone	82.5 ± 36.6 [27.1-147] 78.7 ; 100 %	77.3 ± 13.3 [57.6-94.6] 77.9 ; 100 %	73.5 ± 24.8 [39.8-108] 75.8 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	10.4 ± 5.36 [3.07-19.0] 10.3 ; 100 %	19.6 ± 11.7 [6.88-35.8] 18.2 ; 100 %	12.9 ± 9.27 [3.58-27.0] 11.5 ; 100 %
Pregnenolone	349 ± 225 [12.0-763] 335 ; 100 %	353 ± 258 [85.4-755] 263 ; 100 %	467 ± 251 [150-800] 520 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	19.0 ± 21.3 [0.00-68.1] 10.6 ; 90.0 %	78.5 ± 79.2 [14.1-267] 48.4 ; 100 %	68.5 ± 58.4 [6.65-150] 51.0 ; 100 %
Progesterone	22.1 ± 26.0 [1.95-85.1] 13.9 ; 100 %	33.6 ± 26.6 [13.8-79.7] 22.6 ; 100 %	34.3 ± 17.7 [15.8-60.1] 33.1 ; 100 %
17aOH-Progesterone	0.720 ± 0.989 [0.00-2.45] 0.406 ; 60.0 %	4.46 ± 6.09 [0.00-18.4] 3.49 ; 62.5 %	2.17 ± 2.72 [0.00-6.36] 0.938 ; 66.7 %

Table S14 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in adrenal after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Adrenal - conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5a-dihydrotestosterone	0.439 ± 0.867 [0.00-2.69] 0.00 ; 30.0 %	0.525 ± 0.459 [0.00-1.13] 0.663 ; 62.5 %	0.513 ± 1.05 [0.00-2.63] 0.00 ; 33.3 %
Androsterone	1.20 ± 1.02 [0.00-3.14] 1.15 ; 80.0 %	1.21 ± 0.762 [0.00-2.70] 1.17 ; 87.5 %	1.50 ± 1.22 [0.00-3.23] 1.31 ; 83.3 %
DHEA	0.102 ± 0.323 [0.00-1.02] 0.00 ; 10.0 %	1.24 ± 0.601 [0.00-1.89] 1.41 ; 87.5 %	1.63 ± 2.48 [0.00-6.31] 0.540 ; 50.0 %
Androstenedione	5.01 ± 3.62 [0.00-25.7] 5.96 ; 80.0 %	11.8 ± 7.39 [0.00-6.31] 11.2 ; 87.5 %	14.3 ± 9.11 [0.00-1.02] 12.2 ; 100 %
17a-testosterone	0.654 ± 0.561 [0.00-1.71] 0.681 ; 70.0 %	0.731 ± 0.516 [0.00-1.37] 0.782 ; 75.0 %	1.12 ± 0.858 [0.00-2.37] 0.901 ; 83.3 %
17b-testosterone	0.972 ± 1.47 [0.00-4.96] 0.557 ; 70.0 %	1.62 ± 2.72 [0.00-8.27] 0.778 ; 87.5 %	2.77 ± 4.05 [0.583-11.0] 1.34 ; 100 %
17a-estradiol	9.26 ± 7.60 [3.22-25.3] 6.09 ; 100 %	7.82 ± 2.95 [4.38-12.4] 6.84 ; 100 %	9.22 ± 6.13 [2.99-17.2] 7.89 ; 100 %
Estrone	0.873 ± 0.588 [0.00-1.71] 0.876 ; 90.0 %	0.786 ± 0.478 [0.00-1.52] 0.865 ; 87.5 %	1.47 ± 0.631 [0.552-2.36] 1.42 ; 100 %
17b-estradiol	0.0359 ± 0.040 7 [0.00-0.0981] 0.0220 ; 50.0 %	0.0381 ± 0.052 7 [0.00-0.105] 0.00 ; 37.5 %	0.100 ± 0.039 8 [0.0568-0.149] 0.0980 ; 100 %
Allopregnanolone	69.1 ± 31.0 [27.6-129] 74.0 ; 100 %	68.3 ± 16.9 [39.1-96.6] 71.5 ; 100 %	67.4 ± 21.8 [42.5-98.9] 70.5 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	11.0 ± 11.0 [3.88-38.4] 6.78 ; 100 %	14.8 ± 8.34 [4.45-26.2] 16.4 ; 100 %	11.6 ± 6.90 [3.48-22.1] 12.3 ; 100 %
Pregnenolone	379 ± 162 [95.3-558] 401 ; 100 %	455 ± 271 [149-873] 396 ; 100 %	457 ± 312 [159-925] 409 ; 100 %

Table S14 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in adrenal after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Adrenal - conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
17aOH-Pregnenolone	13.5 ± 15.6 [0.00-55.6] 10.5 ; 90.0 %	40.2 ± 21.1 [3.74-60.9] 47.6 ; 100 %	50.8 ± 71.4 [4.05-176] 10.9 ; 100 %
Progesterone	106 ± 53.8 [27.5-188] 108 ; 100 %	120 ± 112 [36.0-374] 67.7 ; 100 %	150 ± 56.9 [73.9-220] 154 ; 100 %
17aOH-Progesterone	1.39 ± 1.07 [0.00-2.96] 1.61 ; 70.0 %	9.19 ± 5.35 [0.874-17.6] 8.73 ; 100 %	12.8 ± 17.9 [0.751-43.1] 2.40 ; 100 %

Table S15 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted aglycone steroids in testis after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Testis - aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5b-Androstane-3a,17b-diol	1.88 ± 1.43 [0.00-3.43] 2.62 ; 66.7 %	0.586 ± 1.03 [0.00-2.91] 0.00 ; 30.0 %	0.897 ± 1.13 [0.00-2.40] 0.401 ; 50.0 %
5a-dihydrotestosterone	9.86 ± 22.0 [0.00-65.6] 0.00 ; 44.4 %	1.78 ± 2.79 [0.00-9.25] 1.22 ; 60.0 %	7.66 ± 10.8 [0.00-27.1] 2.50 ; 66.7 %
Androsterone	7.31 ± 7.10 [0.00-20.7] 5.70 ; 77.8 %	7.28 ± 7.06 [0.00-23.9] 6.47 ; 80.0 %	6.62 ± 5.49 [0.00-13.3] 8.28 ; 66.7 %
5-androstene-3a, 17b-diol	12.2 ± 18.5 [0.00-16.4] 6.90 ; 55.6 %	6.32 ± 5.99 [0.00-13.3] 7.36 ; 60.0 %	17.9 ± 10.3 [0.00-20.7] 13.0 ; 100 %
5a-Androstanedione	1.99 ± 3.67 [0.00-10.8] 0.00 ; 33.3 %	1.31 ± 1.27 [0.00-4.26] 1.44 ; 70.0 %	4.45 ± 6.77 [0.00-17.8] 2.36 ; 66.7 %
DHEA	86.5 ± 137 [0.00-381] 16.5 ; 88.9 %	55.2 ± 103 [8.62-346] 17.5 ; 100 %	204 ± 233 [11.2-628] 156 ; 100 %
5a-Androstane-3a,17b-diol	7.23 ± 13.5 [0.00-40.1] 0.00 ; 33.3 %	6.37 ± 7.43 [0.00-19.7] 3.06 ; 50.0 %	16.6 ± 12.6 [0.00-37.6] 13.6 ; 83.3 %
5a-Androstane-3b,17b-diol	18.3 ± 41.3 [0.00-126] 1.19 ; 55.6 %	2.24 ± 3.32 [0.00-10.2] 0.780 ; 50.0 %	19.8 ± 22.2 [0.00-56.8] 16.3 ; 66.7 %
Androstenedione	81.2 ± 123 [0.00-307] 29.0 ; 88.9 %	57.9 ± 69.6 [11.1-240] 30.7 ; 100 %	99.1 ± 85.4 [13.6-210] 92.9 ; 100 %
17a-testosterone	1.14 ± 2.26 [0.00-5.26] 0.00 ; 22.2 %	0.889 ± 1.30 [0.00-3.72] 0.00 ; 40.0 %	4.17 ± 4.95 [0.00-13.7] 2.45 ; 83.3 %
17b-testosterone	502 ± 733 [0.00-2047] 154 ; 88.9 %	435 ± 555 [49.1-1903] 296 ; 100 %	1234 ± 1552 [64.7-4186] 778 ; 100 %
17a-estradiol	0.0902 ± 0.050 3 [0.0289-0.165] 0.0724 ; 100 %	0.112 ± 0.071 4 [0.00-0.233] 0.105 ; 90.0 %	0.113 ± 0.101 [0.00-0.286] 0.0829 ; 83.3 %

Table S15 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted aglycone steroids in testis after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96 (continuation).

Testis - aglycone steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
Estrone	0.309 ± 0.179 [0.00-0.543] 0.329 ; 88.9 %	0.395 ± 0.332 [0.00-1.07] 0.324 ; 80.0 %	0.433 ± 0.206 [0.165-0.621] 0.515 ; 100 %
17b-estradiol	0.343 ± 0.185 [0.00-0.708] 0.334 ; 88.9 %	0.453 ± 0.177 [0.273-0.778] 0.381 ; 100 %	0.489 ± 0.083 8 [0.387-0.614] 0.508 ; 100 %
Allopregnanolone	9.38 ± 6.16 [0.00-21.7] 8.58 ; 88.9 %	10.1 ± 2.70 [6.56-14.6] 9.29 ; 100 %	8.91 ± 3.48 [4.42-13.3] 9.63 ; 100 %
17aOH-dihydroprogesterone	6.91 ± 15.8 [0.00-47.6] 0.00 ; 33.3 %	2.66 ± 8.41 [0.00-26.6] 0.00 ; 10.0 %	4.77 ± 6.12 [0.00-14.8] 2.38 ; 50.0 %
Pregnenolone	1.99 ± 1.45 [0.00-3.91] 1.24 ; 88.9 %	2.31 ± 1.81 [0.660-6.35] 1.80 ; 100 %	2.94 ± 1.29 [1.48-4.84] 2.91 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	17.0 ± 39.6 [0.00-119] 0.00 ; 33.3 %	6.81 ± 20.5 [0.00-65.2] 0.00 ; 20.0 %	11.4 ± 17.3 [0.00-44.6] 4.91 ; 50.0 %
Progesterone	0.752 ± 0.718 [0.00-2.20] 0.589 ; 77.8 %	1.09 ± 1.53 [0.00-4.88] 0.551 ; 80.0 %	1.50 ± 0.963 [0.00-2.86] 1.74 ; 83.3 %
17aOH-Progesterone	22.4 ± 36.2 [0.00-96.5] 3.68 ; 88.9 %	18.2 ± 35.1 [0.00-115] 5.98 ; 70.0 %	27.5 ± 24.9 [1.57-59.6] 28.3 ; 100 %

Table S16 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in testis after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96.

Testis - conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
5a-dihydrotestosterone	5.76 ± 9.14 [0.00-21.4] 0.780 ; 100 %	4.63 ± 7.29 [0.00-21.3] 1.73 ; 100 %	13.5 ± 14.6 [0.00-37.4] 9.90 ; 100 %
Androsterone	5.66 ± 3.00 [0.00-10.3] 6.81 ; 100 %	8.59 ± 5.88 [0.00-20.3] 7.36 ; 100 %	7.67 ± 4.08 [3.01-12.9] 7.82 ; 100 %
5-androstene-3a, 17b-diol	5.53 ± 6.70 [0.00-19.9] 4.72 ; 100 %	8.75 ± 6.62 [0.00-19.9] 7.34 ; 100 %	13.7 ± 8.75 [5.18-26.2] 12.0 ; 100 %
5-androstene-3b, 17b-diol	4.23 ± 11.6 [0.00-144] 0.00 ; 100 %	17.1 ± 45.1 [5.18-26.2] 0.00 ; 100 %	100 ± 163 [0.00-19.9] 35.0 ; 100 %
DHEA	82.3 ± 166 [0.00-521] 21.6 ; 100 %	82.5 ± 155 [0.00-506] 23.2 ; 100 %	214 ± 214 [9.87-468] 194 ; 100 %
5a-Androstane-3a,17b-diol	9.22 ± 3.74 [0.00-13.3] 9.73 ; 100 %	12.3 ± 7.08 [0.00-27.8] 12.4 ; 100 %	17.3 ± 10.6 [8.51-36.8] 14.6 ; 100 %
5a-Androstane-3b,17b-diol	5.97 ± 8.85 [0.00-23.3] 1.89 ; 100 %	6.87 ± 9.98 [0.00-27.1] 2.66 ; 90.0 %	19.6 ± 22.1 [0.00-57.3] 15.3 ; 100 %
Androstenedione	41.2 ± 63.0 [0.00-205] 18.2 ; 100 %	53.8 ± 70.0 [0.00-241] 30.5 ; 100 %	96.4 ± 101 [0.00-227] 76.8 ; 100 %
17a-testosterone	1.49 ± 2.18 [0.00-5.16] 0.00 ; 100 %	2.68 ± 1.93 [0.00-6.88] 2.14 ; 100 %	2.98 ± 2.81 [0.00-7.34] 2.19 ; 100 %
17b-testosterone	310 ± 420 [0.00-1270] 87.4 ; 100 %	419 ± 530 [48.6-1763] 194 ; 100 %	798 ± 868 [56.2-2038] 528 ; 100 %
17a-estradiol	4.98 ± 2.24 [1.87-7.99] 5.59 ; 100 %	4.83 ± 2.44 [2.55-9.67] 4.20 ; 90.0 %	5.87 ± 4.37 [2.26-12.1] 3.43 ; 100 %
Estrone	1.07 ± 0.643 [0.391-2.47] 1.02 ; 100 %	0.983 ± 0.460 [0.539-1.84] 0.900 ; 90.0 %	1.10 ± 0.387 [0.613-1.67] 1.13 ; 100 %

Table S16 : Mean ± SD, [Min-Max] and median concentration (ng/g) ; detection rate (%) of targeted conjugated steroids in testis after a BPS treatment (0, 0.5 or 5 mg/kg/d, IM) of pregnant sheep from GD68 to GD96 (continuation).

Testis - conjugated steroids			
Steroids	**Control**	**Low dose (0.05 mg/kg/d)**	**High dose (5 mg/kg/d)**
17b-estradiol	0.419 ± 0.175 [0.0582-0.641] 0.460 ; 100 %	0.600 ± 0.263 [0.335-1.11] 0.446 ; 90.0 %	0.960 ± 0.968 [0.420-2.91] 0.606 ; 100 %
Allopregnanolone	15.9 ± 6.57 [6.00-24.9] 16.2 ; 100 %	14.3 ± 6.80 [0.00-25.3] 15.5 ; 100 %	15.5 ± 7.30 [9.58-27.0] 12.0 ; 100 %
17aOH-Allopregnanolone	0.859 ± 1.17 [0.00-3.36] 0.352 ; 100 %	0.910 ± 1.20 [0.00-3.67] 0.487 ; 100 %	2.17 ± 2.71 [0.00-7.27] 1.65 ; 100 %
17aOH-dihydroprogesterone	4.33 ± 6.88 [0.00-18.7] 1.40 ; 100 %	5.52 ± 10.4 [0.00-30.0] 0.666 ; 100 %	8.22 ± 9.64 [0.00-20.2] 5.10 ; 100 %
Pregnenolone	12.0 ± 10.9 [0.00-38.7] 10.6 ; 100 %	40.8 ± 22.9 [7.55-81.7] 45.3 ; 100 %	15.1 ± 7.70 [6.55-26.0] 14.5 ; 100 %
17aOH-Pregnenolone	6.50 ± 8.86 [0.00-23.9] 3.17 ; 100 %	4.42 ± 7.49 [0.00-22.2] 0.00 ; 100 %	19.8 ± 29.8 [0.00-77.7] 8.41 ; 100 %
Progesterone	0.957 ± 0.573 [0.00-1.97] 0.816 ; 100 %	1.53 ± 0.558 [0.591-2.54] 1.47 ; 100 %	1.32 ± 0.462 [0.712-2.01] 1.20 ; 100 %
17aOH-Progesterone	10.9 ± 14.5 [0.00-46.3] 4.28 ; 100 %	19.9 ± 31.4 [0.00-104] 9.38 ; 100 %	33.8 ± 33.6 [2.66-69.7] 31.2 ; 100 %

IV. Conclusion

L'exposition interne maternelle au BPS et au BPSG des brebis gravides traitées quotidiennement au BPS, à la dose de 0.05 et de 5 mg/kg/j par voie IM entre GD 68 et 96 indique l'absence d'accumulation du BPS dans le compartiment maternel. En outre, l'exposition interne au BPS et au BPSG dans l'unité materno-fœtale, évaluée 24-48h après la fin du traitement était proportionnelle à la dose. Après 28 jours d'exposition au BPS, les concentrations de BPSG étaient toujours supérieures aux concentrations de BPS et étaient deux à cinq fois supérieures dans le plasma fœtal comparativement au plasma maternel et au liquide amniotique. Tous les tissus producteurs ou impliqués dans le métabolisme des stéroïdes (cotylédon, hypothalamus, hippocampe, hypophyse, foie maternel et fœtal, testicule et surrénale) ont été exposés au BPS et au BPSG, avec des concentrations tissulaires de BPSG supérieures à celles du plasma fœtal, à l'exception de l'hypothalamus et de l'hippocampe, qui sont protégés par la barrière hémato-encéphalique. En outre, les concentrations de BPS sont 3 à 50 fois plus faibles que celles en BPSG dans tous les tissus ou liquides biologiques d'intérêt et semblent plus variables que les concentrations en BPSG. Cela signifie que le BPSG pourrait être un meilleur marqueur d'exposition que le BPS, dont les concentrations peuvent être surestimées par de possibles contaminations environnementales, comme cela a déjà été démontré pour le BPA [157].

Cependant, l'exposition au BPS des organes producteurs ou impliqués dans le métabolisme des stéroïdes au milieu de la gestation, qu'elle soit faible ou forte, n'a pas altéré le profil stéroïdien dans l'unité materno-fœto-placentaire.

Notre stratégie a reposé sur une signature stéroïdienne. Une approche stéroïdomique non ciblée aurait permis d'étendre nos investigations sur l'impact du BPS à l'ensemble de la stéroïdogenèse et du métabolisme des stéroïdes dans l'unité materno-fœto-placentaire [194]. En effet, certaines voies de la stéroïdogenèse n'ont pas été explorées dans notre étude, comme la synthèse des glucocorticoïdes et des corticostéroïdes par exemple.

Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que l'effet potentiel du BPS sur la stéroïdogenèse démontrée notamment sur la voie de synthèse de la testostérone, *in vitro* [40,41,195–197], puisse être contrebalancé *in vivo* par la redondance de la régulation des voies de la stéroïdogenèse.

L'extrapolation de ces résultats à d'autres stades de la gestation et à d'autres espèces doit être menée en tenant compte de l'évolution des mécanismes de régulation de la stéroïdogenèse au cours de la gestation [148,198]. Enfin, l'évaluation de l'effet du BPS sur la stéroïdogenèse sur des fœtus mâles pourrait être étendue aux fœtus femelles.

Discussion générale & perspectives

Discussion générale et perspectives

Ces dernières années, la communauté scientifique alerte les pouvoirs politiques sur les substitutions regrettables d'une substance interdite pour ses effets néfastes sur la santé par d'autres substances qui présentent un potentiel toxicologique similaire. C'est le cas du BPS, largement utilisé en remplacement du BPA, qui est retrouvé dans divers produits de consommation courante. L'exposition de la population au BPS est croissante et ubiquitaire [76,92], alors même que son potentiel toxicologique est similaire à celui du BPA.

En effet, les données toxicologiques *in vitro* et quelques études *in vivo* indiquent que le BPS présente, comme le BPA, un pouvoir perturbateur endocrinien [15,18,37], ce qui soulève des interrogations sur le risque pour la santé humaine lié à l'exposition au BPS, notamment pendant la période critique de la grossesse. Or, il existe actuellement très peu de données TK sur le BPS. Dans ce contexte, il est nécessaire de caractériser les mécanismes de l'exposition fœtale au BPS et ses potentielles conséquences sur le développement fœtal, pour déterminer si la substitution du BPA par le BPS peut être une alternative acceptable en termes de risque pour la santé humaine.

Les objectifs des travaux exposés dans ce manuscrit étaient tout d'abord d'évaluer l'exposition fœtale au BPS puis de caractériser des biomarqueurs phénotypiques d'exposition fœtale et/ou d'effet du BPS à partir d'une signature stéroïdienne.

Dans un premier temps, des outils analytiques ont été développés. Ainsi, du BPSG a été produit en quantité suffisante pour l'étude TK et une méthode de dosage simultané et en direct du BPS et du BPSG a été développée et validée selon les recommandations de l'EMA dans le plasma ovin puis adaptée à chacune des matrices biologiques d'intérêt pour la réalisation de l'ensemble du projet.

Les études TK sur le modèle de brebis nécessitaient des quantités importantes de BPSG. Notre méthode de purification, à partir des urines de brebis ayant reçu une forte dose de BPS par voie orale, nous a permis d'obtenir une quantité de BPSG de l'ordre du gramme, à faible coût avec un délai de production de quelques mois. Toutefois, sa pureté (de 68 à 85 %, selon les fractions) était inférieure à celle obtenue en synthèse chimique (< 98 %) pour des standards analytiques et présentait une faible contamination en BPS (4.4 %). Cependant, la synthèse chimique du BPSG n'était pas compatible avec les contraintes de production de notre

étude TK chez la brebis. Par ailleurs, la production de BPSG par des microsomes hépatiques aurait également pu être mise en œuvre facilement et à faible coût, mais elle permet une production de quantités de BPSG plus limitées, de l'ordre du mg et avec une plus faible pureté [100,199,200].

La méthode de dosage simultané du BPS et du BPSG que nous avons mise au point est adaptée aux études TK, comme l'a montré l'ensemble de nos études expérimentales sur le modèle de brebis gravide ou sur le placenta humain perfusé. Son intérêt majeur est qu'elle ne nécessite pas le recours à l'hydrolyse enzymatique du BPSG et permet de suivre simultanément les profils cinétiques du BPS et de son métabolite sur une large gamme de concentrations. En revanche, elle est moins adaptée aux études de biosurveillance, qui nécessitent la détection de très faibles concentrations de BPS et de BPSG. Ainsi, au laboratoire, une méthode de dosage des bisphénols glucuronide A, S et F a été développé parallèlement à notre projet de thèse pour atteindre des LOQ adaptées aux études de biosurveillance, c'est-à-dire des concentrations en BPS total (aglycone + conjugué) de l'ordre de 0.01 à 0.1 ng/mL dans le plasma (Tableau 4) et de quelques dizaines de ng/mL dans les urines (Tableau 3). Un marquage préalable des bisphénols glucuronides a été nécessaire pour augmenter la réponse analytique des molécules et une méthode d'extraction sur phase solide a été développée en amont pour atténuer le bruit de fond. Cette méthode a été développée pour le BPSG car ce métabolite conjugué n'est pas, comme le BPS, sujet aux contaminations qui peuvent survenir lors de la collecte, du stockage ou encore du prétraitement analytique de l'échantillon. De plus, il est le métabolite majoritaire du BPS. Pour ces deux raisons, il devrait être préférentiellement recherché dans les études de biosurveillance chez l'Homme.

Notre méthode de dosage a d'abord été appliquée à une étude TK sur la brebis non gravide, puis à l'étude de la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire sur le modèle de la brebis gravide dont le fœtus a été cathétérisé lors du dernier tiers de gestation (Figure 29). Nous avons ainsi montré que la gestation ne modifie pas les paramètres TK du BPS et du BPSG. Dans le compartiment maternel, le BPS, tout comme le BPA, est largement métabolisé en BPSG qui est complètement éliminé dans les urines. **Cependant, l'élimination du BPS est deux fois plus lente que celle du BPA et celle du BPSG 7 fois plus lente que celle du BPAG.**

Seulement 0.4 % de la dose de BPS administrée à la mère est transféré au fœtus, **soit un taux de transfert placentaire dix fois moins important que celui du BPA.** En tenant compte du rapport de poids entre la mère et le fœtus, celui-ci est donc exposé à une dose de BPS 10 fois inférieure à celle de sa mère alors que pour le BPA, le fœtus est exposé à une dose équivalente à celle de sa mère [110,157].

Le BPS est essentiellement lié à l'albumine, même si une liaison à des protéines spécifiques (protéines de transport des hormones thyroïdiennes ou des hormones sexuelles) ne peut être exclue. Cependant, malgré une concentration en albumine plus importante dans le plasma fœtal en fin de gestation que dans le plasma maternel [133], la fraction de BPS libre est similaire chez la brebis (5.0 %) et chez le fœtus ovin (6.6 %). Ainsi, pour une même exposition interne au BPS total, l'exposition au BPS libre est similaire dans les deux compartiments, maternel et fœtal. Alors que dans le cas du BPA, la fraction libre est environ deux fois plus importante dans le plasma fœtal en fin de gestation (10.1 %) que dans le plasma maternel (6.21 %). Ce qui conduit à une exposition fœtale au BPA libre deux fois plus importante que celle de sa mère. Cette différence pourrait être expliquée par la faible affinité de l'albumine du fœtus pour le BPA, comparativement à celle de l'adulte, comme cela a déjà été montré pour d'autres substances [201].

Quoi qu'il en soit, la différence de concentrations en protéines plasmatiques et de leur affinité entre la mère et le fœtus constitue un déterminant de la fraction libre des bisphénols et de leur distribution entre les circulations maternelle et fœtale. Elles doivent donc être prises en compte pour prédire l'exposition du fœtus humain à la forme active des bisphénols. En outre, des données expérimentales indiquent que la liaison à l'albumine pourrait faciliter les mécanismes de capture cellulaire [202] et donc de diffusion du BPS dans les différents organes cibles.

Au sein du compartiment fœtal, le BPS est métabolisé en BPSG avec une clairance 5 fois inférieure à la clairance maternelle. Cette différence pourrait être liée à une plus faible expression des UGTs chez le fœtus comparativement à l'adulte [124]. Cependant, la clairance de glucuronoconjugaison fœtale est deux fois plus importante que la clairance de transfert placentaire fœto-maternelle du BPS. Le BPS est donc majoritairement métabolisé en BPSG dans le compartiment fœtal alors que le BPA est essentiellement éliminé vers le compartiment

maternel par voie placentaire avec une clairance placentaire deux fois supérieure à la clairance de métabolisation [157].

Lors de l'évaluation du devenir du BPSG dans le compartiment fœtal, nous n'avons pas mis en évidence de passage placentaire fœto-maternel du BPSG. Compte tenu de la LOQ de notre méthode analytique, nous avons estimé que le passage du BPSG du fœtus à la mère, par transfert placentaire du BPSG lui-même ou du BPS, après hydrolyse du BPSG, n'excède pas 0.6 %. **Le BPSG est donc piégé dans le compartiment fœtal.**

Chez la brebis gravide, le BPS et le BPSG sont distribués dans le liquide amniotique et les tissus. Sur ce modèle, le ratio des concentrations de BPSG/BPS dans le liquide amniotique est inférieur à celui du plasma (30 versus 200) et nous avons montré que le liquide amniotique présentait *ex vivo* une activité glucuronidase capable d'hydrolyser le BPSG en BPS. Le liquide amniotique constitue donc, au moins en partie, un site d'hydrolyse du BPSG au niveau périphérique. Les β-glucuronidases étant largement répandues dans les tissus et liquides biologiques [183], le liquide amniotique n'est probablement pas l'unique site de l'hydrolyse du BPSG au niveau périphérique. En effet, l'exposition des brebis gravides pendant 28 jours en milieu de gestation a montré que le ratio des concentrations de BPSG/BPS dans certains tissus est plus faible que dans le plasma (de 3 à 15 dans les tissus versus 50 dans le plasma fœtal), ce qui suggère que l'hydrolyse du BPSG en BPS pourrait avoir lieu dans les tissus périphériques. **Ainsi, nous avons montré que le cycle futile de conjugaison-déconjugaison entraîne une surexposition fœtale au BPS de 87 %. Par ailleurs, ce phénomène d'hydrolyse est nécessaire à l'élimination du BPS du compartiment fœtal, en raison de la capacité limitée du BPSG à passer la barrière placentaire.**

Ce mécanisme d'élimination du BPSG du compartiment fœtal, nécessitant au préalable une hydrolyse enzymatique, est similaire à celui du BPAG avec toutefois une clairance plasmatique du BPSG 11 fois plus faible que celle du BPAG. **Ce phénomène d'hydrolyse du BPSG, associé au faible passage placentaire fœto-maternel du BPS conduit à une exposition prolongée du fœtus au BPS et au BPSG.**

Ainsi, même si les mécanismes qui déterminent l'exposition fœtale au BPS sont différents de ceux qui prédominent pour le BPA, une exposition maternelle répétée aux bisphénols conduit à une exposition fœtale interne au BPS similaire à celle au BPA. **Le faible taux de transfert materno-fœtal du BPS ne suffit donc pas à protéger le fœtus de l'exposition**

au BPS en raison de l'accumulation du BPS et du BPSG dans le compartiment fœtal. Cette accumulation de BPS lors d'exposition répétée tout au long de la gestation pourrait conduire à des effets adverses, compte tenu de son potentiel perturbateur endocrinien (Figure 29).

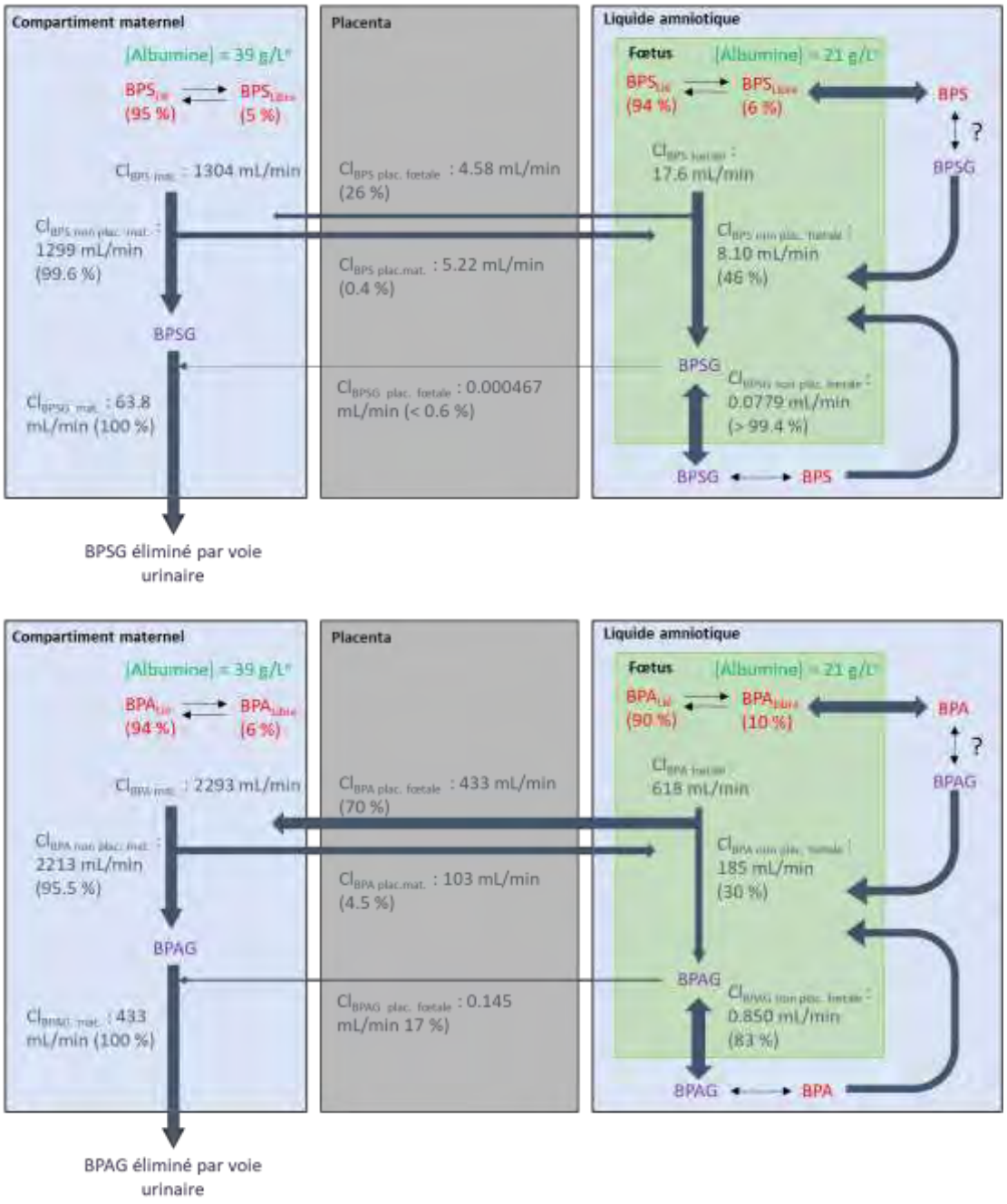


Figure 29 : Comparaison des mécanismes qui déterminent la disposition du BPS (en haut) et du BPA (en bas) dans l'unité materno-fœto-placentaire dans le modèle ovin en fin de gestation.

Les paramètres TK du BPS et du BPSG sont issus de Grandin et coll. [203]. Les paramètres TK du BPA et du BPAG sont issus des études de Corbel et coll. [110] et de Gauderat et coll. [157]. °Concentrations plasmatiques maternelle et fœtale en albumine en fin de gestation [121]. Cl plac. fœtale : clairance placentaire fœtale ; Cl plac.mat. : clairance placentaire maternelle ; Cl non plac. fœtale : clairance non placentaire fœtale ; Cl non plac. mat. : clairance non-placentaire maternelle.

Cette première partie de notre travail de thèse nous a permis de décrire, par une approche non compartimentale, les mécanismes de l'exposition fœtale au BPS et au BPSG. Une limite majeure de cette approche non-compartimentale est que les paramètres TK sont estimés indépendamment les uns des autres, alors que certains mécanismes (hydrolyse, glucuronoconjugaison, transfert, etc. se déroulent simultanément). Par ailleurs, certains mécanismes physiologiques ne peuvent pas être évalués avec cette approche non-compartimentale simplifiée. Par exemple, pour évaluer le passage placentaire materno-fœtal du BPS, nous n'avons pris en compte que l'AUC du BPS chez le fœtus. Or, une partie du BPS maternel transféré au fœtus pourrait l'être sous forme de BPSG, en raison de l'activité de glucuronidation du placenta et de l'effet de premier passage hépatique chez le fœtus, ce qui signifie que nous avons certainement sous-estimé le passage materno-fœtal du BPS. Par ailleurs, la quantité de BPS éliminée du compartiment fœtal, évaluée par la somme de la quantité transférée à la mère et de celle glucuronidée dans le compartiment fœtal n'atteint pas 100 %, ce qui suggère qu'un mécanisme déterminant le devenir du BPS dans le compartiment fœtal n'a pas été identifié. D'autre part, cette approche ne prend pas en compte la distribution des substances dans les compartiments périphériques de l'unité materno-fœtale. **Ainsi**, **le développement d'un modèle compartimental prenant en compte tous les mécanismes qui déterminent la disposition du BPS et du BPSG dans l'unité materno-fœto-placentaire permettrait de mieux décrire l'exposition fœtale au BPS, et pourrait être utilisé pour prédire l'exposition fœtale pour des expositions gestationnelles environnementales.**

Cependant, pour prédire l'exposition fœtale humaine au BPS, il est nécessaire d'évaluer si les mécanismes qui déterminent l'exposition fœtale dans le modèle ovin sont extrapolables à l'homme. En particulier, les mécanismes de transfert placentaire du BPS et du BPSG pourraient être différents chez l'Homme et dans le modèle ovin, en raison des différences interspécifiques de placentation. C'est la raison pour laquelle nous avons évalué le passage bidirectionnel du BPS et du BPSG sur le modèle du cotylédon humain isolé en perfusion.

Les clairances placentaires du BPS et du BPSG ont été calculées à partir des clairances obtenues sur ce modèle de cotylédon humain perfusé puis comparées à celles obtenues sur le modèle ovin et à celles du BPA et du BPAG (Tableau 12).

Sur ce modèle, nous avons montré que contrairement au BPA, le passage du BPS à travers le placenta ne se fait pas par simple diffusion passive, mais qu'il pourrait mettre en jeu une protéine d'efflux qui permettrait de limiter le transfert materno-fetal du BPS, protégeant ainsi le fœtus de l'exposition au BPS. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'implication de la P-gp dans le passage placentaire du BPS. Le caractère moins lipophile du BPS (LogP de 1.83 pour le BPS et de 3.43 pour le BPA) et la forte ionisation du BPS aux pH physiologiques fœtal ou maternel (équilibre entre la forme ionique et non ionique pour le BPS, alors que le BPA est majoritairement sous sa forme non ionique) expliquent probablement le très faible passage placentaire du BPS comparativement à celui du BPA, avec une clairance placentaire materno-fœtale environ 9 fois plus faible que celle du BPA et une clairance fœto-maternelle trois fois inférieure à celle du BPA (Tableau 12).

Alors que les clairances materno-fœtales du BPS chez l'Homme et chez la brebis sont similaires, la clairance fœto-maternelle du BPS est 8 fois plus élevée sur le modèle humain que celle évaluée sur la brebis gravide (Tableau 12). Ces différences de clairances placentaires du BPS entre nos deux modèles d'étude pourraient être liées : (1) au stade de gestation, en effet, l'étude *in vivo* a été réalisée au début du dernier tiers de gestation et l'étude *ex vivo* a été réalisée sur des placentas à terme ; (2) à des différences interspécifiques de perméabilité placentaire [130] et d'expression des protéines de transport [137,204]. Ces résultats pourraient signifier que l'accumulation du BPS au cours de la gestation serait moins importante chez le fœtus humain comparativement au fœtus ovin. Cependant, pour conclure sur cette comparaison interspécifique, il faudrait également comparer la capacité métabolique du fœtus ovin et humain vis-à-vis du BPS, ce qui pourrait être réalisé *in vitro* sur des microsomes hépatiques. **Ainsi, en accord avec les résultats obtenus sur le modèle ovin, le passage du BPS dans le compartiment fœtal est donc plus faible que celui du BPA. Le fœtus humain pourrait donc être mieux protégé de l'exposition au BPS que de celle au BPA.**

À l'instar de ce qui a été montré sur le modèle ovin, le transfert placentaire materno-fœtal du BPSG est quasiment inexistant, **ce qui signifie que le BPSG retrouvé dans le compartiment fœtal dans les études de biosurveillance provient essentiellement de la glucuronoconjugaison fœtale.** Par ailleurs, la clairance fœto-maternelle du BPSG est 2 fois plus faible que celle du BPAG et que celle du BPS, ce qui est en accord avec le fait que le BPSG, tout comme le BPAG est trappé dans le compartiment fœtal.

Tableau 12 : Comparaison des clairances placentaires du BPS, BPSG, BPA et BPAG chez la brebis et chez la femme.

Brebis (*in vivo*)	**BPS**	**BPSG**	**BPA**	**BPAG**
Clairance maternelle totale (mL/min)	1304	63.8	2293	433
Taux de transfert M-F (%)	0.4	NA	4.5	NA
Clairance fœtale totale (mL/min)	17.6	0.077 9	618	0.850
Taux de transfert F-M (%)	26	< 0.6	70	17
Clairance placentaire M-F (mL/min)	5.22	NA	103	NA
Clairance placentaire F-M (mL/min)	4.58	<0.000 468	433	0.145

Cotylédon humain (*ex vivo*)	**BPS**	**BPSG**	**BPA**	**BPAG**
Clairance cotylédonnaire M-F (mL/min)	0.174	0.018 1	1.53	0.210
Clairance cotylédonnaire F-M (mL/min)	0.717	0.487	1.90	1.04
Clairance placentaire M-F (mL/min)	8.72	0.904	76.5	10.5
Clairance placentaire F-M (mL/min)	37.3	25.3	98.8	54.1

Ce tableau reprend les paramètres TK obtenus in vivo chez la brebis et les clairances cotylédonnaires calculées ex vivo sur le cotylédon humain pour déterminer des clairances placentaires chez la brebis et la femme. Les paramètres TK du BPA et du BPAG proviennent des études de Gauderat et coll. [157,205] *et les clairances cotylédonnaires du BPA et du BPAG sont issues de l'étude de Corbel et coll.[184].*

Chez la brebis, les clairances placentaires ont été obtenues par multiplication de la clairance totale par le taux de transfert placentaire correspondant.

Chez la femme, les clairances placentaires materno-fœtales ont été obtenues par multiplication de la clairance cotylédonnaire materno-fœtale par le rapport du débit utérin (600 mL) [206] sur le débit de l'irrigation maternelle d'un cotylédon dans notre expérience (12 mL). Les clairances placentaires fœto-maternelles ont été obtenues par multiplication de la clairance cotylédonnaire fœto-maternelle par le rapport du débit ombilical (312 mL) [206] sur le débit fœtal d'un cotylédon dans notre expérience (6 mL).

Nos deux modèles *in vivo* et *ex vivo* ont permis d'évaluer les mécanismes de l'exposition fœtale au BPS et au BPSG à un stade tardif de la gestation. La fin de la gestation est une période au cours de laquelle la perméabilité et la surface d'échange placentaire sont généralement maximales [130]. Par conséquent les transferts placentaires du BPS et du BPSG évalués sur nos modèles pourraient être considérés comme maximaux. Cependant, l'expression des transporteurs varie au cours de la gestation. Ainsi, l'expression de la P-gp diminue au cours de la gestation, alors que celle de la MRP2 augmente [204]. Une étude mécanistique sur l'implication des protéines de transport qui prennent en charge le BPS pourrait permettre d'évaluer les variations du passage du BPS au cours de la gestation.

Par ailleurs, à la fin de la gestation, le fœtus présente des capacités de glucuronoconjugaison importantes [110,207,208] à la fois dans l'espèce ovine et chez

l'Homme, alors qu'à un stade plus précoce, le fœtus présente des capacités métaboliques limitées, avec essentiellement une sulfoconjugaison [125]. Des études de métabolisme *in vitro* du BPS sur des microsomes hépatiques fœtaux pourraient permettre d'extrapoler nos résultats à des stades de gestation plus précoces.

L'ensemble des déterminants de l'exposition materno-fœto-placentaire au BPS a été étudié à la fois sur le modèle intégratif de la brebis gravide et sur un modèle de cotylédon humain isolé en perfusion. Cependant, pour extrapoler nos données à l'Homme, il est nécessaire d'évaluer les paramètres TK du BPS chez l'Homme, notamment pour les voies d'exposition environnementales. En particulier, l'absorption et la biodisponibilité du BPS par voie orale et transdermale sont des déterminants essentiels de l'exposition maternelle et par voie de conséquence de l'exposition fœtale. C'est pourquoi, dans la continuité de ce projet de recherche, l'absorption et la biodisponibilité du BPS via différentes voies d'administration seront évaluées par une approche multi-espèce incluant l'Homme et la clairance sera évaluée par une approche allométrique. Ces données permettront par la suite de construire un modèle TK permettant de prédire l'exposition fœtale humaine.

La mise en évidence de l'accumulation du BPS dans le compartiment fœtal, au cours d'administrations répétées nous a amenés à évaluer des biomarqueurs d'effet/ou d'exposition du BPS. Compte tenu de l'importance de l'équilibre stéroïdien au cours de la gestation et des effets démontrés du BPS sur la production de testostérone, nous avons choisi d'évaluer l'effet d'une exposition gestationnelle au BPS au milieu de la gestation sur la signature stéroïdienne dans l'unité materno-fœto-placentaire. Tous les tissus stéroïdogéniques étudiés étaient exposés au BPS et au BPSG, avec des concentrations supérieures aux concentrations plasmatiques, à l'exception de l'hippocampe et de l'hypothalamus, qui sont protégés par la barrière hémato-encéphalique.

La faible dose de BPS à laquelle les brebis ont été exposées (50 µg/kg/j) a permis d'atteindre des concentrations plasmatiques maternelles compatibles avec l'exposition interne humaine au BPS [77].

Toutefois, malgré l'exposition tissulaire des principaux tissus stéroïdogéniques, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence d'effet du BPS sur la signature stéroïdienne, quel que soit l'organe considéré. Dans des études similaires, sur l'effet de stéroïdes exogènes ou de perturbateurs endocriniens environnementaux sur la stéroïdogenèse chez la brebis

gravide, les animaux étaient généralement exposés aux xénobiotiques entre JG 30 et 90 [209], c'est-à-dire sur une période plus longue et plus précoce que celle de notre étude. L'inclusion dans notre étude d'un contrôle positif, avec des brebis gravides traitées à une substance, comme la testostérone, dont les effets sur la stéroïdogenèse ont été caractérisés [210,211], nous aurait permis de valider notre modèle d'étude ainsi que la fenêtre de traitement.

D'autre part, malgré le grand nombre de stéroïdes dosés dans cette étude, certaines voies de la stéroïdogenèse n'ont pas été explorées, comme la synthèse des glucocorticoïdes et des minérolocorticoïdes par exemple.

En conclusion, notre approche intégrative et mécanistique a permis de déterminer et de quantifier les mécanismes TK impliqués dans l'exposition fœtale au BPS. Ces données pourront être utilisées pour la construction d'un modèle compartimental qui pourra ensuite être humanisé afin de prédire l'exposition fœtale humaine au BPS pour des expositions maternelles environnementales. Ce travail a également permis de montrer que pour deux analogues structuraux comme le BPS et le BPA, les mécanismes TK qui déterminent l'exposition fœtale sont différents. Malgré cela, lors d'exposition gestationnelle répétée, le potentiel d'exposition fœtale au BPS est similaire à celui du BPA, ce qui pourrait indiquer que le BPS n'est pas une bonne alternative au BPA. Cependant, une exposition gestationnelle au BPS en milieu de gestation n'a pas modifié la stéroïdogenèse dans l'unité materno-fœto-placentaire, ce qui signifie soit que le BPS n'a pas eu d'effet sur ces organes exposés, soit que des mécanismes compensatoires ont été mis en place au cours de la gestation pour maintenir l'homéostasie stéroïdienne.

Références bibliographiques

[1] G. Lj, M.P. Gunderson, Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants, Reproduction. 122 (2001) 857–864. doi:10.1530/rep.0.1220857.

[2] J. Auger, J.M. Kunstmann, F. Czyglik, P. Jouannet, Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years, N. Engl. J. Med. 332 (1995) 281–285. doi:10.1056/NEJM199502023320501.

[3] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years., BMJ. 305 (1992) 609–613.

[4] P. Sengupta, U. Nwagha, S. Dutta, E. Krajewska-Kulak, E. Izuka, Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015, Afr Health Sci. 17 (2017) 418–427. doi:10.4314/ahs.v17i2.16.

[5] L. Remontet, J. Estève, A.-M. Bouvier, P. Grosclaude, G. Launoy, F. Menegoz, C. Exbrayat, B. Tretare, P.-M. Carli, A.-V. Guizard, X. Troussard, P. Bercelli, M. Colonna, J.-M. Halna, G. Hedelin, J. Macé-Lesec'h, J. Peng, A. Buemi, M. Velten, E. Jougla, P. Arveux, L. Le Bodic, E. Michel, M. Sauvage, C. Schvartz, J. Faivre, Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000, Rev Epidemiol Sante Publique. 51 (2003) 3–30.

[6] A. Giwercman, E. Carlsen, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review., Environ Health Perspect. 101 (1993) 65–71.

[7] T. Colborn, C. Clement, Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection, Advances in Modern Environmental Toxicology (USA). (1992). http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9545328 (accessed July 12, 2018).

[8] R.J. Kavlock, G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M.J. Mac, C. Maczka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D.M. Sheehan, T. Sinks, H.A. Tilson, Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop., Environ Health Perspect. 104 (1996) 715–740.

[9] WHO | Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, WHO. (n.d.). http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ (accessed June 23, 2018).

[10] L.N. Vandenberg, T. Colborn, T.B. Hayes, J.J. Heindel, D.R. Jacobs, D.-H. Lee, T. Shioda, A.M. Soto, F.S. vom Saal, W.V. Welshons, R.T. Zoeller, J.P. Myers, Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses, Endocr Rev. 33 (2012) 378–455. doi:10.1210/er.2011-1050.

[11] F. Lagarde, C. Beausoleil, S.M. Belcher, L.P. Belzunces, C. Emond, M. Guerbet, C. Rousselle, Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment, Environ Health. 14 (2015). doi:10.1186/1476-069X-14-13.

[12] Glausiusz J, The plastics puzzle, Nature. 508 (2014) 306–308. doi:10.1038/508306a.

[13] J.R. Rochester, Bisphenol A and human health: A review of the literature, Reproductive Toxicology. 42 (2013) 132–155. doi:10.1016/j.reprotox.2013.08.008.

[14] J. Liu, J. Li, Y. Wu, Y. Zhao, F. Luo, S. Li, L. Yang, E.K. Moez, I. Dinu, J.W. Martin, Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum, Environ. Sci. Technol. 51 (2017) 2456–2463. doi:10.1021/acs.est.6b05718.

[15] J.R. Rochester, A.L. Bolden, Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes, Environ Health Perspect. 123 (2015) 643–650. doi:10.1289/ehp.1408989.

[16] E.C. Dodds, W. Lawson, Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus, Nature. 137 (1936) 996. doi:10.1038/137996a0.

[17] E.C. Dodds, L. Goldberg, W. Lawson, R. Robinson, OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds, Nature. 141 (1938) 247–248. doi:10.1038/141247b0.

[18] A. Usman, M. Ahmad, From BPA to its analogues: Is it a safe journey?, Chemosphere. 158 (2016) 131–142. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.070.

[19] L.-H. Wu, X.-M. Zhang, F. Wang, C.-J. Gao, D. Chen, J.R. Palumbo, Y. Guo, E.Y. Zeng, Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review, Science of The Total Environment. 615 (2018) 87–98. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.194.

[20] T. Žalmanová, K. Hošková, J. Nevoral, Š. Prokešová, K. Zámostná, T. Kott, J. Petr, Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regretable substitution-a review, Czech Journal of Animal Sciences. 61 (2016) 433–449. doi:10.17221/81/2015-CJAS.

[21] Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE, EFSA Journal. 5 (n.d.) 428. doi:10.2903/j.efsa.2007.428.

[22] Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs, EFSA Journal. 13 (2015) 3978. doi:10.2903/j.efsa.2015.3978.

[23] LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A, 2012.

[24] ECHA, Seven new substances added to the Candidate List, entry for bisphenol-A updated, (2017). https://echa.europa.eu/fr/-/seven-new-substances-added-to-the-candidate-list-entry-for-bisphenol-a-updated-to-reflect-its-endocrine-disrupting-properties-for-the-environment (accessed July 6, 2018).

[25] INERIS, Information réglementaire | Service national d'assistance - Substitution des bisphénols, (2017). https://substitution-bp.ineris.fr/fr/information-reglementaire (accessed July 7, 2018).

[26] J.K. Fink, High Performance Polymers, William Andrew, 2014.

[27] INRS, Fiche toxicologique BPS, http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_297, Accessed July 28, 2018., (2013). http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_297 (accessed July 28, 2018).

[28] Y.J. Choi, L.S. Lee, Partitioning Behavior of Bisphenol Alternatives BPS and BPAF Compared to BPA, Environ. Sci. Technol. 51 (2017) 3725–3732. doi:10.1021/acs.est.6b05902.

[29] ANSES, Environmental and occupational health & safety on the assessment of the risks associated with bisphenol a for human health, and on toxicological data and data on the Use of bisphenols S, F, M, B, AP, AF and BADGE, opinion of the French Agency for Food, 2013.https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-1.pdf. Accessed July 19, 2016., (2013). https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-1.pdf (accessed July 19, 2016).

[30] INERIS, Rapport INERIS sur le BPS et le BPF, (2015). https://substitution-bp.ineris.fr/sites/substitution-bp/files/documents/fiche_bp_vf_avril2015.pdf (accessed July 28, 2018).

[31] 4,4'-sulphonyldiphenol - Substance Information - ECHA, (n.d.). https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.001.137 (accessed April 10, 2018).

[32] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans, Anal Bioanal Chem. 397 (2010) 115–125. doi:10.1007/s00216-010-3464-7.

[33] Règlement (UE) no 10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, (n.d.) 89.

[34] J.-M. Molina-Molina, E. Amaya, M. Grimaldi, J.-M. Sáenz, M. Real, M.F. Fernández, P. Balaguer, N. Olea, In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors, Toxicology and Applied Pharmacology. 272 (2013) 127–136. doi:10.1016/j.taap.2013.05.015.

[35] R. Viñas, C.S. Watson, Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions, Environmental Health Perspectives. 121 (2013) 352–358. doi:10.1289/ehp.1205826.

[36] K. Yamasaki, S. Noda, N. Imatanaka, Y. Yakabe, Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity, Toxicology Letters. 146 (2004) 111–120. doi:10.1016/j.toxlet.2003.07.003.

[37] A.K. Rosenmai, M. Dybdahl, M. Pedersen, B.M. Alice van Vugt-Lussenburg, E.B. Wedebye, C. Taxvig, A.M. Vinggaard, Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives?, Toxicological Sciences. 139 (2014) 35–47. doi:10.1093/toxsci/kfu030.

[38] D. Chen, K. Kannan, H. Tan, Z. Zheng, Y.-L. Feng, Y. Wu, M. Widelka, Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 5438–5453. doi:10.1021/acs.est.5b05387.

[39] D.M. Goldinger, A.-L. Demierre, O. Zoller, H. Rupp, H. Reinhard, R. Magnin, T.W. Becker, M. Bourqui-Pittet, Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland, Regulatory Toxicology and Pharmacology. 71 (2015) 453–462. doi:10.1016/j.yrtph.2015.01.002.

[40] M.J.E. Roelofs, M. van den Berg, T.F.H. Bovee, A.H. Piersma, M.B.M. va. Duursen, Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor, Toxicology. 329 (2015) 10–20. doi:10.1016/j.tox.2015.01.003.

[41] S. Eladak, T. Grisin, D. Moison, M.-J. Guerquin, T. N'Tumba-Byn, S. Pozzi-Gaudin, A. Benachi, G. Livera, V. Rouiller-Fabre, R. Habert, A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound, Fertility and Sterility. 103 (2015) 11–21. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.005.

[42] H. Ullah, S. Jahan, Q.U. Ain, G. Shaheen, N. Ahsan, Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study, Chemosphere. 152 (2016) 383–391. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.125.

[43] K. Ji, S. Hong, Y. Kho, K. Choi, Effects of Bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish, Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 8793–8800. doi:10.1021/es400329t.

[44] M. Naderi, M.Y.L. Wong, F. Gholami, Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults, Aquatic Toxicology. 148 (2014) 195–203. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.009.

[45] C.D. Kinch, K. Ibhazehiebo, J.-H. Jeong, H.R. Habibi, D.M. Kurrasch, Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 112 (2015) 1475–1480. doi:10.1073/pnas.1417731112.

[46] Evaluation des risques du BPA pour la santé humaine, (n.d.). https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0-An.pdf (accessed July 9, 2018).

[47] Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs, EFSA Journal. 13 (n.d.) 3978. doi:10.2903/j.efsa.2015.3978.

[48] M.K. Björnsdotter, J. de Boer, A. Ballesteros-Gómez, Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review, Chemosphere. 182 (2017) 691–706. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.070.

[49] K. Pivnenko, D. Laner, T.F. Astrup, Dynamics of bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) in the European paper cycle: Need for concern?, Resources, Conservation and Recycling. 133 (2018) 278–287. doi:10.1016/j.resconrec.2018.01.021.

[50] M. Eckardt, T.J. Simat, Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017, Chemosphere. 186 (2017) 1016–1025. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.08.037.

[51] C. Liao, F. Liu, K. Kannan, Bisphenol S, a New Bisphenol Analogue, in Paper Products and Currency Bills and Its Association with Bisphenol A Residues, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 6515–6522. doi:10.1021/es300876n.

[52] B.A. Rocha, L.F. Azevedo, M. Gallimberti, A.D. Campiglia, F. Barbosa, High Levels of Bisphenol A and Bisphenol S in Brazilian Thermal Paper Receipts and Estimation of Daily Exposure, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 78 (2015) 1181–1188. doi:10.1080/15287394.2015.1083519.

[53] A.M. Hormann, F.S. vom Saal, S.C. Nagel, R.W. Stahlhut, C.L. Moyer, M.R. Ellersieck, W.V. Welshons, P.-L. Toutain, J.A. Taylor, Holding Thermal Receipt Paper and Eating Food after Using Hand Sanitizer Results in High Serum Bioactive and Urine Total Levels of Bisphenol A (BPA), PLOS ONE. 9 (2014) e110509. doi:10.1371/journal.pone.0110509.

[54] K.A. Thayer, K.W. Taylor, S. Garantziotis, S. Schurman, G.E. Kissling, D. Hunt, B. Herbert, R. Church, R. Jankowich, M.I. Churchwell, Bisphenol A, Bisphenol S, and 4-Hydroxyphenyl 4-Isoprooxyphenylsulfone (BPSIP) in Urine and Blood of Cashiers., Environmental Health Perspectives. (2015). doi:10.1289/ehp.1409427.

[55] K. Pivnenko, G.A. Pedersen, E. Eriksson, T.F. Astrup, Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper, Waste Management. 44 (2015) 39–47. doi:10.1016/j.wasman.2015.07.017.

[56] J. Rajasärkkä, J. Koponen, R. Airaksinen, H. Kiviranta, M. Virta, Monitoring bisphenol A and estrogenic chemicals in thermal paper with yeast-based bioreporter assay, Anal Bioanal Chem. 406 (2014) 5695–5702. doi:10.1007/s00216-014-7812-x.

[57] G. Russo, F. Barbato, L. Grumetto, Monitoring of bisphenol A and bisphenol S in thermal paper receipts from the Italian market and estimated transdermal human intake: A pilot

study, Science of The Total Environment. 599–600 (2017) 68–75. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.192.

[58] M.K. Björnsdotter, W. Jonker, J. Legradi, J. Kool, A. Ballesteros-Gómez, Bisphenol A alternatives in thermal paper from the Netherlands, Spain, Sweden and Norway. Screening and potential toxicity, Science of The Total Environment. 601–602 (2017) 210–221. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.171.

[59] C. Liao, K. Kannan, Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 4655–4662. doi:10.1021/jf400445n.

[60] C. Liao, K. Kannan, A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China, Food Additives & Contaminants: Part A. 31 (2014) 319–329. doi:10.1080/19440049.2013.868611.

[61] J. Regueiro, T. Wenzl, Development and validation of a stable-isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of bisphenols in ready-made meals, Journal of Chromatography A. 1414 (2015) 110–121. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.037.

[62] Y. Yang, J. Yu, J. Yin, B. Shao, J. Zhang, Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction for Selective Extraction of Bisphenol Analogues in Beverages and Canned Food, J. Agric. Food Chem. 62 (2014) 11130–11137. doi:10.1021/jf5037933.

[63] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry, Analytica Chimica Acta. 683 (2011) 227–233. doi:10.1016/j.aca.2010.10.034.

[64] J. Regueiro, T. Wenzl, Determination of bisphenols in beverages by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A. 1422 (2015) 230–238. doi:10.1016/j.chroma.2015.10.046.

[65] K. Mandrah, G.N.V. Satyanarayana, S.K. Roy, A dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet followed by injector port silylation coupled with gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of nine bisphenols in bottled carbonated beverages, Journal of Chromatography A. 1528 (2017) 10–17. doi:10.1016/j.chroma.2017.10.071.

[66] G. Russo, F. Barbato, E. Cardone, M. Fattore, S. Albrizio, L. Grumetto, Bisphenol A and Bisphenol S release in milk under household conditions from baby bottles marketed in Italy, J Environ Sci Health B. 53 (2018) 116–120. doi:10.1080/03601234.2017.1388662.

[67] C. Simoneau, S. Valzacchi, V. Morkunas, L.V. den Eede, Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles, Food Additives & Contaminants: Part A. 28 (2011) 1763–1768. doi:10.1080/19440049.2011.604644.

[68] W. Wang, K.O. Abualnaja, A.G. Asimakopoulos, A. Covaci, B. Gevao, B. Johnson-Restrepo, T.A. Kumosani, G. Malarvannan, T.B. Minh, H.-B. Moon, H. Nakata, R.K. Sinha, K. Kannan, A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries, Environment International. 83 (2015) 183–191. doi:10.1016/j.envint.2015.06.015.

[69] C. Liao, F. Liu, Y. Guo, H.-B. Moon, H. Nakata, Q. Wu, K. Kannan, Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 9138–9145. doi:10.1021/es302004w.

[70] J. Xue, Y. Wan, K. Kannan, Occurrence of bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers (BADGEs), and novolac glycidyl ethers (NOGEs) in indoor air from Albany, New York, USA, and its implications for inhalation exposure, Chemosphere. 151 (2016) 1–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.038.

[71] C. Liao, K. Kannan, A Survey of Alkylphenols, Bisphenols, and Triclosan in Personal Care Products from China and the United States, Arch Environ Contam Toxicol. 67 (2014) 50–59. doi:10.1007/s00244-014-0016-8.

[72] J. Xue, W. Liu, K. Kannan, Bisphenols, Benzophenones, and Bisphenol A Diglycidyl Ethers in Textiles and Infant Clothing, Environ. Sci. Technol. 51 (2017) 5279–5286. doi:10.1021/acs.est.7b00701.

[73] Y. Song, P. Xie, Z. Cai, Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration, Rapid Commun Mass Spectrom. 32 (2018) 495–502. doi:10.1002/rcm.8051.

[74] V. Le Fol, S. Aït-Aïssa, N. Cabaton, L. Dolo, M. Grimaldi, P. Balaguer, E. Perdu, L. Debrauwer, F. Brion, D. Zalko, Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-S in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 3860–3868. doi:10.1021/es505302c.

[75] C. Vernet, C. Philippat, A.M. Calafat, X. Ye, S. Lyon-Caen, V. Siroux, E.F. Schisterman, R. Slama, Within-Day, Between-Day, and Between-Week Variability of Urinary Concentrations of Phenol Biomarkers in Pregnant Women, Environ. Health Perspect. 126 (2018) 037005. doi:10.1289/EHP1994.

[76] X. Ye, L.-Y. Wong, J. Kramer, X. Zhou, T. Jia, A.M. Calafat, Urinary concentrations of bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of U.S. adults during 2000–2014, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 11834–11839. doi:10.1021/acs.est.5b02135.

[77] H. Jin, J. Zhu, Z. Chen, Y. Hong, Z. Cai, Occurrence and Partitioning of Bisphenol Analogues in Adults' Blood from China, Environ. Sci. Technol. 52 (2018) 812–820. doi:10.1021/acs.est.7b03958.

[78] Y. Wan, W. Xia, S. Yang, X. Pan, Z. He, K. Kannan, Spatial distribution of bisphenol S in surface water and human serum from Yangtze River watershed, China: Implications for exposure through drinking water, Chemosphere. 199 (2018) 595–602. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.02.040.

[79] L.N. Vandenberg, R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, W.V. Welshons, Human exposure to bisphenol A (BPA), Reprod. Toxicol. 24 (2007) 139–177. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010.

[80] T. Zhang, J. Xue, C. Gao, R. Qiu, Y. Li, X. Li, M. Huang, K. Kannan, Urinary Concentrations of Bisphenols and Their Association with Biomarkers of Oxidative Stress in People Living Near E-Waste Recycling Facilities in China, Environ. Sci. Technol. (2016). doi:10.1021/acs.est.6b00032.

[81] B.A. Rocha, A.R.M. de Oliveira, F. Barbosa, A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Talanta. 183 (2018) 94–101. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.052.

[82] J. Xue, Q. Wu, S. Sakthivel, P.V. Pavithran, J.R. Vasukutty, K. Kannan, Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children, Environmental Research. 137 (2015) 120–128. doi:10.1016/j.envres.2014.12.007.

[83] Y. Chen, J. Fang, L. Ren, R. Fan, J. Zhang, G. Liu, L. Zhou, D. Chen, Y. Yu, S. Lu, Urinary bisphenol analogues and triclosan in children from south China and implications for human exposure, Environmental Pollution. 238 (2018) 299–305. doi:10.1016/j.envpol.2018.03.031.

[84] E.S. Ihde, S. Zamudio, J.M. Loh, Y. Zhu, J. Woytanowski, L. Rosen, M. Liu, B. Buckley, Application of a novel mass spectrometric (MS) method to examine exposure to Bisphenol-A and common substitutes in a maternal fetal cohort, Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 24 (2018) 331–346. doi:10.1080/10807039.2017.1381831.

[85] E.M. Philips, V.W.V. Jaddoe, A.G. Asimakopoulos, K. Kannan, E.A.P. Steegers, S. Santos, L. Trasande, Bisphenol and phthalate concentrations and its determinants among pregnant women in a population-based cohort in the Netherlands, 2004–5, Environ Res. 161 (2018) 562–572. doi:10.1016/j.envres.2017.11.051.

[86] Y. Wan, W. Huo, S. Xu, T. Zheng, B. Zhang, Y. Li, A. Zhou, Y. Zhang, J. Hu, Y. Zhu, Z. Chen, S. Lu, C. Wu, M. Jiang, Y. Jiang, H. Liu, X. Yang, W. Xia, Relationship between maternal exposure to bisphenol S and pregnancy duration, Environmental Pollution. 238 (2018) 717–724. doi:10.1016/j.envpol.2018.03.057.

[87] Y. Deceuninck, E. Bichon, P. Marchand, C.-Y. Boquien, A. Legrand, C. Boscher, J.P. Antignac, B. Le Bizec, Determination of bisphenol A and related substitutes/analogues in human breast milk using gas chromatography-tandem mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry. 407 (2015) 2485–2497. doi:10.1007/s00216-015-8469-9.

[88] Y. Niu, B. Wang, Y. Zhao, J. Zhang, B. Shao, Highly Sensitive and High-Throughput Method for the Analysis of Bisphenol Analogues and Their Halogenated Derivatives in Breast Milk, J. Agric. Food Chem. 65 (2017) 10452–10463. doi:10.1021/acs.jafc.7b04394.

[89] F. Vela-Soria, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, A. Navalón, UHPLC–MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples, Anal Bioanal Chem. 406 (2014) 3773–3785. doi:10.1007/s00216-014-7785-9.

[90] F. Vela-Soria, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, A. Navalón, A multiclass method for the analysis of endocrine disrupting chemicals in human urine samples. Sample treatment by dispersive liquid–liquid microextraction, Talanta. 129 (2014) 209–218. doi:10.1016/j.talanta.2014.05.016.

[91] B.A. Rocha, B.R.B. da Costa, N.C.P. de Albuquerque, A.R.M. de Oliveira, J.M.O. Souza, M. Al-Tameemi, A.D. Campiglia, F. Barbosa Jr., A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Talanta. 154 (2016) 511–519. doi:10.1016/j.talanta.2016.03.098.

[92] C. Liao, F. Liu, H. Alomirah, V.D. Loi, M.A. Mohd, H.-B. Moon, H. Nakata, K. Kannan, Bisphenol S in urine from the united states and seven asian countries: occurrence and human exposures, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 6860–6866. doi:10.1021/es301334j.

[93] X. Zhou, J.P. Kramer, A.M. Calafat, X. Ye, Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine, Journal of Chromatography B. 944 (2014) 152–156. doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.009.

[94] Y. Yang, J. Guan, J. Yin, B. Shao, H. Li, Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China, Chemosphere. 112 (2014) 481–486. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.004.

[95] A.G. Asimakopoulos, J. Xue, B.P. De Carvalho, A. Iyer, K.O. Abualnaja, S.S. Yaghmoor, T.A. Kumosani, K. Kannan, Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia, Environmental Research. (n.d.). doi:10.1016/j.envres.2015.11.029.

[96] A.L. Heffernan, K. Thompson, G. Eaglesham, S. Vijayasarathy, J.F. Mueller, P.D. Sly, M.J. Gomez, Rapid, automated online SPE-LC-QTRAP-MS/MS method for the simultaneous analysis of 14 phthalate metabolites and 5 bisphenol analogues in human urine, Talanta. 151 (2016) 224–233. doi:10.1016/j.talanta.2016.01.037.

[97] A.M. Aker, L. Johns, T.F. McElrath, D.E. Cantonwine, B. Mukherjee, J.D. Meeker, Associations between maternal phenol and paraben urinary biomarkers and maternal hormones during pregnancy: A repeated measures study, Environment International. 113 (2018) 341–349. doi:10.1016/j.envint.2018.01.006.

[98] K.K. Ferguson, J.D. Meeker, D.E. Cantonwine, B. Mukherjee, G.G. Pace, D. Weller, T.F. McElrath, Environmental phenol associations with ultrasound and delivery measures of fetal growth, Environment International. 112 (2018) 243–250. doi:10.1016/j.envint.2017.12.011.

[99] L. Kolatorova Sosvorova, T. Chlupacova, J. Vitku, M. Vlk, J. Heracek, L. Starka, D. Saman, M. Simkova, R. Hampl, Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS, Talanta. 174 (2017) 21–28. doi:10.1016/j.talanta.2017.05.070.

[100] D.G. Skledar, J. Schmidt, A. Fic, I. Klopčič, J. Trontelj, M.S. Dolenc, M. Finel, L.P. Mašič, Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S, Chemosphere. 157 (2016) 152–159. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.027.

[101] D. Gramec Skledar, J. Troberg, J. Lavdas, L. Peterlin Mašic, M. Finel, Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10, Xenobiotica. (2014) 1–9. doi:10.3109/00498254.2014.999140.

[102] C.S. Mazur, J.F. Kenneke, J.K. Hess-Wilson, J.C. Lipscomb, Differences between Human and Rat Intestinal and Hepatic Bisphenol A Glucuronidation and the Influence of Alamethicin on In Vitro Kinetic Measurements, Drug Metab Dispos. 38 (2010) 2232–2238. doi:10.1124/dmd.110.034819.

[103] N. Hanioka, T. Naito, S. Narimatsu, Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation, Chemosphere. 74 (2008) 33–36. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.053.

[104] V. Le Fol, F. Brion, A. Hillenweck, E. Perdu, S. Bruel, S. Aït-Aïssa, J.-P. Cravedi, D. Zalko, Comparison of the In Vivo Biotransformation of Two Emerging Estrogenic Contaminants, BP2 and BPS, in Zebrafish Embryos and Adults, Int J Mol Sci. 18 (2017). doi:10.3390/ijms18040704.

[105] J. Oh, J.W. Choi, Y.-A. Ahn, S. Kim, Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration, Environment International. 112 (2018) 127–133. doi:10.1016/j.envint.2017.11.020.

[106] S.H. Collet, N. Picard-Hagen, M.Z. Lacroix, S. Puel, C. Viguié, A. Bousquet-Melou, P.-L. Toutain, V. Gayrard, Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A, Toxicology and Applied Pharmacology. 284 (2015) 323–329. doi:10.1016/j.taap.2015.02.024.

[107] E. EFSA Panel on Food Contact Materials Flavourings and Processing Aids (CEF), Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs, EFSA Journal. 13 (2015) 3978-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2015.3978.

[108] K.A. Thayer, D.R. Doerge, D. Hunt, S.H. Schurman, N.C. Twaddle, M.I. Churchwell, S. Garantziotis, G.E. Kissling, M.R. Easterling, J.R. Bucher, L.S. Birnbaum, Pharmacokinetics of Bisphenol A in Humans Following a Single Oral Administration, Environment International. 83 (2015) 107–115. doi:10.1016/j.envint.2015.06.008.

[109] G. Csanády, H. Oberste-Frielinghaus, B. Semder, C. Baur, K. Schneider, J. Filser, Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein, Arch Toxicol. 76 (2002) 299–305. doi:10.1007/s00204-002-0339-5.

[110] T. Corbel, V. Gayrard, C. Viguié, S. Puel, M.Z. Lacroix, P.-L. Toutain, N. Picard-Hagen, Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure, Biology of Reproduction. 89 (2013) 11. doi:10.1095/biolreprod.112.106369.

[111] J.G. Teeguarden, J.M. Waechter, H.J. Clewell, T.R. Covington, H.A. Barton, Evaluation of Oral and Intravenous Route Pharmacokinetics, Plasma Protein Binding, and Uterine Tissue Dose Metrics of Bisphenol A: A Physiologically Based Pharmacokinetic Approach, Toxicol Sci. 85 (2005) 823–838. doi:10.1093/toxsci/kfi135.

[112] H. Kurebayashi, R. Harada, R.K. Stewart, H. Numata, Y. Ohno, Disposition of a Low Dose of Bisphenol A in Male and Female Cynomolgus Monkeys, Toxicol Sci. 68 (2002) 32–42. doi:10.1093/toxsci/68.1.32.

[113] Luo Huangshi, Li Chunya, Fang Huaifang, Wang Xian, Comparative study of the interactions between bisphenol analogues and serum albumins by electrospray mass spectrometry and fluorescence spectroscopy, Rapid Communications in Mass Spectrometry. 30 (2016) 162–167. doi:10.1002/rcm.7633.

[114] M. Mathew, S. Sreedhanya, P. Manoj, C.T. Aravindakumar, U.K. Aravind, Exploring the Interaction of Bisphenol-S with Serum Albumins: A Better or Worse Alternative for Bisphenol A?, J. Phys. Chem. B. 118 (2014) 3832–3843. doi:10.1021/jp500404u.

[115] J. Zhang, A. Begum, K. Brännström, C. Grundström, I. Iakovleva, A. Olofsson, A.E. Sauer-Eriksson, P.L. Andersson, Structure-Based Virtual Screening Protocol for in Silico Identification of Potential Thyroid Disrupting Chemicals Targeting Transthyretin, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 11984–11993. doi:10.1021/acs.est.6b02771.

[116] Meschia Giacomo, Barron Donald H., Cotter Julian R., Breathnach Caoimhghin S., The hemoglobin, oxygen, carbon dioxide and hydrogen ion concentrations in the umbilical bloods of sheep and goats as sampled via indwelling plastic catheters, Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences. 50 (1965) 185–195. doi:10.1113/expphysiol.1965.sp001780.

[117] G. Meschia, J.R. Cotter, C.S. Breathnach, D.H. Barron, THE DIFFUSIBILITY OF OXYGEN ACROSS THE SHEEP PLACENTA, Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences. 50 (1965) 466–480. doi:10.1113/expphysiol.1965.sp001812.

[118] Meschia Giacomo, Cotter Julian R., Makowski Edgar L., Barron Donald H., Simultaneous measurement of uterine and umbilical blood flows and oxygen uptakes, Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences. 52 (1967) 1–18. doi:10.1113/expphysiol.1967.sp001877.

[119] J.S. Barry, R.V. Anthony, The pregnant sheep as a model for human pregnancy, Theriogenology. 69 (2008) 55–67. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.021.

[120] G.S. Dawes, Foetal and Neonatal Physiology: A Comparative Study of the Changes at Birth, Year Book Medical Publ., 1969.

[121] J.-M. Jouannic, L. Fermont, G. Brodaty, D. Bonnet, F. Daffos, [An update on the fetal circulation], J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 33 (2004) 291–296.

[122] M. Kaddouri, N. Brasset, M. Alvinerie, C. Eeckhoutte, C. Bonfils, J. Derancourt, P. Galtier, Ontogenic development of liver progesterone metabolism in female sheep. Contribution of cytochrome P4502B and P4503A subfamilies, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 42 (1992) 499–508. doi:10.1016/0960-0760(92)90262-H.

[123] J.A. Ring, H. Ghabrial, M.S. Ching, R.A. Smallwood, D.J. Morgan, Fetal hepatic drug elimination, Pharmacology & Therapeutics. 84 (1999) 429–445. doi:10.1016/S0163-7258(99)00046-7.

[124] R.N. Hines, The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events, Pharmacology & Therapeutics. 118 (2008) 250–267. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.02.005.

[125] G.M. Pacifici, Sulfation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus, Early Human Development. 81 (2005) 573–581. doi:10.1016/j.earlhumdev.2004.10.021.

[126] Y. Miki, T. Nakata, T. Suzuki, A.D. Darnel, T. Moriya, C. Kaneko, K. Hidaka, Y. Shiotsu, H. Kusaka, H. Sasano, Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues, J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 (2002) 5760–5768. doi:10.1210/jc.2002-020670.

[127] E.L. Stanley, R. Hume, M.W.H. Coughtrie, Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification, Molecular and Cellular Endocrinology. 240 (2005) 32–42. doi:10.1016/j.mce.2005.06.003.

[128] M. Cappiello, L. Giuliani, A. Rane, G.M. Pacifici, Dopamine sulphotransferase is better developed than p-nitrophenol sulphotransferase in the human fetus, Dev Pharmacol Ther. 16 (1991) 83–88.

[129] H. Boxenbaum, Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: Extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin, Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. 8 (1980) 165–176. doi:10.1007/BF01065191.

[130] M.R. Syme, J.W. Paxton, J.A. Keelan, Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta, Clinical Pharmacokinetics. 43 (2004) 487–514. doi:10.2165/00003088-200443080-00001.

[131] M. Pasanen, The expression and regulation of drug metabolism in human placenta, Advanced Drug Delivery Reviews. 38 (1999) 81–97. doi:10.1016/S0169-409X(99)00008-3.

[132] D. Sammin, B. Markey, H. Bassett, D. Buxton, The ovine placenta and placentitis—A review, Veterinary Microbiology. 135 (2009) 90–97. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.054.

[133] D. Evain-Brion, P. Berveiller, S. Gil, Le passage transplacentaire des médicaments, Therapie. 69 (2014) 3–11. doi:10.2515/therapie/2014002.

[134] N.P. Illsley, Glucose transporters in the human placenta, Placenta. 21 (2000) 14–22. doi:10.1053/plac.1999.0448.

[135] K. Vähäkangas, P. Myllynen, Drug transporters in the human blood-placental barrier, British Journal of Pharmacology. 158 (2009) 665–678. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00336.x.

[136] K. Vähäkangas, P. Myllynen, Drug transporters in the human blood-placental barrier, Br J Pharmacol. 158 (2009) 665–678. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00336.x.

[137] M. Ceckova-Novotna, P. Pavek, F. Staud, P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function, Reproductive Toxicology. 22 (2006) 400–410. doi:10.1016/j.reprotox.2006.01.007.

[138] D.A. Evseenko, P. Murthi, J.W. Paxton, G. Reid, B.S. Emerald, K. Mohankumar, P.E. Lobie, S.P. Brennecke, B. Kalionis, J. Keelan, The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction, The FASEB Journal. 21 (2007) 3592–3605. doi:10.1096/fj.07-8688com.

[139] V. Ganapathy, P.D. Prasad, Role of transporters in placental transfer of drugs, Toxicology and Applied Pharmacology. 207 (2005) 381–387. doi:10.1016/j.taap.2005.02.023.

[140] R.A. Brace, D.F. Anderson, C.Y. Cheung, Ovine fetal swallowing responses to polyhydramnios, Physiological Reports. 2 (2014) e00279. doi:10.1002/phy2.279.

[141] J. Kamarýt, P. Matýsek, Beta-glucuronidase activity in amniotic fluid., J Clin Chem Clin Biochem. 18(10):611–4. (1980).

[142] E. Zambrano, C. Guzmán, G.L. Rodríguez-González, M. Durand-Carbajal, P.W. Nathanielsz, Fetal programming of sexual development and reproductive function, Molecular and Cellular Endocrinology. 382 (2014) 538–549. doi:10.1016/j.mce.2013.09.008.

[143] M. Hill, A. Pašková, R. Kančeva, M. Velíková, J. Kubátová, L. Kancheva, K. Adamcová, M. Mikešová, Z. Žižka, M. Koucký, H. Šarapatková, V. Kačer, P. Matucha, M. Meloun, A. Pařízek, Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 139 (2014) 201–222. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.03.008.

[144] Y. Morel, F. Roucher, I. Plotton, C. Goursaud, V. Tardy, D. Mallet, Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis, Annales d'Endocrinologie. 77 (2016) 82–89. doi:10.1016/j.ando.2016.04.023.

[145] W.L. Miller, R.J. Auchus, The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders, Endocrine Reviews. 32 (2010) 81–151. doi:10.1210/er.2010-0013.

[146] A.H. Payne, D.B. Hales, Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones, Endocrine Reviews. 25 (2004) 947–970. doi:10.1210/er.2003-0030.

[147] R. Mindnich, G. Möller, J. Adamski, The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases, Mol. Cell. Endocrinol. 218 (2004) 7–20. doi:10.1016/j.mce.2003.12.006.

[148] J.R. Pasqualini, Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 97 (2005) 401–415. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.08.004.

[149] A.A. Weech, U. Stave, Physiology of the Perinatal Period: Functional and Biochemical Development in Mammals, Appleton-Century-Crofts, 1970.

[150] J.A. Carnegie, H.A. Robertson, Conjugated and unconjugated estrogens in fetal and maternal fluids of the pregnant ewe: a possible role for estrone sulfate during early pregnancy, Biol. Reprod. 19 (1978) 202–211.

[151] C.E. Wood, Estrogen in the Fetus, in: Advances in Fetal and Neonatal Physiology, Springer, New York, NY, 2014: pp. 217–228. doi:10.1007/978-1-4939-1031-1_19.

[152] G.J. Pepe, E.D. Albrecht, Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy, Endocr. Rev. 16 (1995) 608–648. doi:10.1210/edrv-16-5-608.
[153] C.E. Flück, A.V. Pandey, Steroidogenesis of the testis – new genes and pathways, Annales d'Endocrinologie. 75 (2014) 40–47. doi:10.1016/j.ando.2014.03.002.
[154] P.J. O'Shaughnessy, P.A. Fowler, Development of the human fetal testis, Annales d'Endocrinologie. 75 (2014) 48–53. doi:10.1016/j.ando.2014.03.009.
[155] T.S. Han, B.R. Walker, W. Arlt, R.J. Ross, Treatment and health outcomes in adults with congenital adrenal hyperplasia, Nat Rev Endocrinol. 10 (2014) 115–124. doi:10.1038/nrendo.2013.239.
[156] F.W. Bazer, T.E. Spencer, W.W. Thatcher, Growth and development of the ovine conceptus1, Journal of Animal Science. 90 (2012) 159–170. doi:10.2527/jas.2011-4180.
[157] G. Gauderat, N. Picard-Hagen, P.-L. Toutain, T. Corbel, C. Viguié, S. Puel, M.Z. Lacroix, P. Mindeguia, A. Bousquet-Melou, V. Gayrard, Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A, Environment International. 86 (2016) 52–59. doi:10.1016/j.envint.2015.10.006.
[158] V. Becerra, J. Odermatt, Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS, Analyst. 137 (2012) 2250–2259. doi:10.1039/C2AN15961A.
[159] V. Becerra, J. Odermatt, Interferences in the direct quantification of bisphenol S in paper by means of thermochemolysis, Journal of Chromatography A. 1275 (2013) 70–77. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.034.
[160] A. Jurek, E. Leitner, Analytical determination of bisphenol A (BPA) and bisphenol analogues in paper products by GC-MS/MS, Food Additives & Contaminants: Part A. 34 (2017) 1225–1238. doi:10.1080/19440049.2017.1319076.
[161] A. Asati, G.N.V. Satyanarayana, S. Panchal, R.S. Thakur, N.G. Ansari, D.K. Patel, Ionic liquid based vortex assisted liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography mass spectrometry for the determination of bisphenols in thermal papers with the aid of response surface methodology, Journal of Chromatography A. 1509 (2017) 35–42. doi:10.1016/j.chroma.2017.06.040.
[162] S. Chen, Q. Chang, K. Yin, Q. He, Y. Deng, B. Chen, C. Liu, Y. Wang, L. Wang, Rapid Analysis of Bisphenol A and Its Analogues in Food Packaging Products by Paper Spray Ionization Mass Spectrometry, J. Agric. Food Chem. 65 (2017) 4859–4865. doi:10.1021/acs.jafc.7b02061.
[163] S. Pan, Q. He, X. Chen, L. Wang, Q. Qiu, M. Jin, [Rapid determination of four phenolic environmental estrogen residues in cooking oil by ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry coupled with solid-phase extraction], Se Pu. 35 (2017) 980–986. doi:10.3724/SP.J.1123.2017.06003.
[164] Y. Yang, L. Lu, J. Zhang, Y. Yang, Y. Wu, B. Shao, Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A. 1328 (2014) 26–34. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.074.
[165] X. Sun, J. Wang, Y. Li, J. Jin, B. Zhang, S.M. Shah, X. Wang, J. Chen, Highly selective dummy molecularly imprinted polymer as a solid-phase extraction sorbent for five bisphenols in tap and river water, Journal of Chromatography A. 1343 (2014) 33–41. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.063.
[166] M. Česen, K. Lenarčič, V. Mislej, M. Levstek, A. Kovačič, B. Cimrmančič, N. Uranjek, T. Kosjek, D. Heath, M.S. Dolenc, E. Heath, The occurrence and source identification of

bisphenol compounds in wastewaters, Science of The Total Environment. 616–617 (2018) 744–752. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.252.

[167] H. Jin, L. Zhu, Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China, Water Research. 103 (2016) 343–351. doi:10.1016/j.watres.2016.07.059.

[168] C. Liao, F. Liu, H.-B. Moon, N. Yamashita, S. Yun, K. Kannan, Bisphenol Analogues in Sediments from Industrialized Areas in the United States, Japan, and Korea: Spatial and Temporal Distributions, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 11558–11565. doi:10.1021/es303191g.

[169] Q. Wang, L. Zhu, M. Chen, X. Ma, X. Wang, J. Xia, Simultaneously determination of bisphenol A and its alternatives in sediment by ultrasound-assisted and solid phase extractions followed by derivatization using GC-MS, Chemosphere. 169 (2017) 709–715. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.11.095.

[170] K.K. Nejumal, D. Dineep, M. Mohan, K.P. Krishnan, U.K. Aravind, C.T. Aravindakumar, Presence of bisphenol S and surfactants in the sediments of Kongsfjorden: a negative impact of human activities in Arctic?, Environ Monit Assess. 190 (2018) 22. doi:10.1007/s10661-017-6383-7.

[171] L. Lu, Y. Yang, J. Zhang, B. Shao, Determination of seven bisphenol analogues in reed and Callitrichaceae by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B. 953–954 (2014) 80–85. doi:10.1016/j.jchromb.2014.02.003.

[172] S. Song, M. Song, L. Zeng, T. Wang, R. Liu, T. Ruan, G. Jiang, Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China, Environmental Pollution. 186 (2014) 14–19. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.023.

[173] X. Yu, J. Xue, H. Yao, Q. Wu, A.K. Venkatesan, R.U. Halden, K. Kannan, Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U.S. EPA targeted national sewage sludge survey, Journal of Hazardous Materials. 299 (2015) 733–739. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.07.012.

[174] Y. Yao, Y. Shao, M. Zhan, X. Zou, W. Qu, Y. Zhou, Rapid and sensitive determination of nine bisphenol analogues, three amphenicol antibiotics, and six phthalate metabolites in human urine samples using UHPLC-MS/MS, Anal Bioanal Chem. (2018). doi:10.1007/s00216-018-1062-2.

[175] European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation - EMA, (2011). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed November 7, 2016).

[176] M.Z. Lacroix, S. Puel, S.H. Collet, T. Corbel, N. Picard-Hagen, P. Toutain, C. Viguié, V. Gayrard, Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations, Talanta. 85 (2011) 2053–2059. doi:10.1016/j.talanta.2011.07.040.

[177] H. Zhao, L. Xiang, J. Li, Z. Yang, J. Fang, C. Zhao, S. Xu, Z. Cai, Investigation on fragmentation pathways of bisphenols by using electrospray ionization Orbitrap mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 30 (2016) 1901–1913. doi:10.1002/rcm.7666.

[178] X. Ye, A.M. Bishop, J.A. Reidy, L.L. Needham, A.M. Calafat, Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine, J Expos Sci Environ Epidemiol. 17 (2007) 567–572. doi:10.1038/sj.jes.

[179] F. Grandin, N. Picard-Hagen, V. Gayrard, S. Puel, C. Viguié, P.-L. Toutain, L. Debrauwer, M.Z. Lacroix, Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: applicability to toxicokinetic investigations, Journal of Chromatography A. 1526 (2017) 39–46. doi:10.1016/j.chroma.2017.10.020.

[180] H. Nau, B. Krauer, Serum protein binding of valproic acid in fetus-mother pairs throughout pregnancy: correlation with oxytocin administration and albumin and free fatty acid concentrations, J Clin Pharmacol. 26 (1986) 215–221. doi:10.1002/j.1552-4604.1986.tb02937.x.

[181] G.L. Hammond, Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction, Biol. Reprod. 85 (2011) 431–441. doi:10.1095/biolreprod.111.092593.

[182] V. Gayrard, N. Picard-Hagen, C. Viguié, P.-L. Toutain, Competitive binding to plasma thyroid hormone transport proteins and thyroid disruption by phenylbutazone used as a probe, General and Comparative Endocrinology. 174 (2011) 225–231. doi:10.1016/j.ygcen.2011.09.001.

[183] B. Sperker, J.T. Backman, H.K. Kroemer, The role of β-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans, Clinical Pharmacokinetics. 33 (1997) 18–31.

[184] T. Corbel, V. Gayrard, S. Puel, M.Z. Lacroix, A. Berrebi, S. Gil, C. Viguié, P.-L. Toutain, N. Picard-Hagen, Bidirectional placental transfer of bisphenol A and its main metabolite, bisphenol A-glucuronide, in the isolated perfused human placenta, Reproductive Toxicology. 47 (2014) 51–58. doi:10.1016/j.reprotox.2014.06.001.

[185] C.S. Mazur, S.A. Marchitti, M. Dimova, J.F. Kenneke, A. Lumen, J. Fisher, Human and Rat ABC Transporter Efflux of Bisphenol A and Bisphenol A Glucuronide: Interspecies Comparison and Implications for Pharmacokinetic Assessment, Toxicological Sciences. 128 (2012) 317–325. doi:10.1093/toxsci/kfs167.

[186] T.J. Mørck, G. Sorda, N. Bechi, B.S. Rasmussen, J.B. Nielsen, F. Ietta, E. Rytting, L. Mathiesen, L. Paulesu, L.E. Knudsen, Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A, Reproductive Toxicology. 30 (2010) 131–137. doi:10.1016/j.reprotox.2010.02.007.

[187] M. Mölsä, T. Heikkinen, J. Hakkola, K. Hakala, O. Wallerman, M. Wadelius, C. Wadelius, K. Laine, Functional role of P-glycoprotein in the human blood-placental barrier, Clinical Pharmacology & Therapeutics. 78 (2005) 123–131. doi:10.1016/j.clpt.2005.04.014.

[188] S. Sudhakaran, C.R. Rayner, J. Li, D.C.M. Kong, N.M. Gude, R.L. Nation, Inhibition of placental P-glycoprotein: impact on indinavir transfer to the foetus, Br J Clin Pharmacol. 65 (2008) 667–673. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.03067.x.

[189] M. Rahi, T. Heikkinen, S. Härtter, J. Hakkola, K. Hakala, O. Wallerman, M. Wadelius, C. Wadelius, K. Laine, Placental transfer of quetiapine in relation to P-glycoprotein activity, J Psychopharmacol. 21 (2007) 751–756. doi:10.1177/0269881106074065.

[190] K. May, V. Minarikova, K. Linnemann, M. Zygmunt, H.K. Kroemer, C. Fusch, W. Siegmund, Role of the Multidrug Transporter Proteins ABCB1 and ABCC2 in the Diaplacental Transport of Talinolol in the Term Human Placenta, Drug Metab Dispos. 36 (2008) 740. doi:10.1124/dmd.107.019448.

[191] Z. Binkhathlan, D.A. Hamdy, D.R. Brocks, A. Lavasanifar, Development of a polymeric micellar formulation for valspodar and assessment of its pharmacokinetics in rat, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 75 (2010) 90–95. doi:10.1016/j.ejpb.2010.03.010.

[192] W.R. Friedenberg, M. Rue, E.A. Blood, W.S. Dalton, C. Shustik, R.A. Larson, P. Sonneveld, P.R. Greipp, Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95), Cancer. 106 (n.d.) 830–838. doi:10.1002/cncr.21666.

[193] P.L. Toutain, A. Bousquet-Mélou, Bioavailability and its assessment, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 27 (2004) 455–466. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x.

[194] F. Jeanneret, D. Tonoli, M.F. Rossier, M. Saugy, J. Boccard, S. Rudaz, Evaluation of steroidomics by liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry as a powerful analytical strategy for measuring human steroid perturbations, Journal of Chromatography A. 1430 (2016) 97–112. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.008.

[195] C.E. Hill, S.A. Sapouckey, A. Suvorov, L.N. Vandenberg, Developmental exposures to bisphenol S, a BPA replacement, alter estrogen-responsiveness of the female reproductive tract: a pilot study, Cogent Medicine. 4 (2017). doi:10.1080/2331205X.2017.1317690.

[196] Y. Feng, Z. Jiao, J. Shi, M. Li, Q. Guo, B. Shao, Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells, Chemosphere. 147 (2016) 9–19. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.12.081.

[197] P. Strajhar, D. Tonoli, F. Jeanneret, R.M. Imhof, V. Malagnino, M. Patt, D.V. Kratschmar, J. Boccard, S. Rudaz, A. Odermatt, Steroid profiling in H295R cells to identify chemicals potentially disrupting the production of adrenal steroids, Toxicology. 381 (2017) 51–63. doi:10.1016/j.tox.2017.02.010.

[198] T. Klonisch, P.A. Fowler, S. Hombach-Klonisch, Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development, Developmental Biology. 270 (2004) 1–18. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.018.

[199] T. Corbel, E. Perdu, V. Gayrard, S. Puel, M.Z. Lacroix, C. Viguié, P.-L. Toutain, D. Zalko, N. Picard-Hagen, Conjugation and Deconjugation Reactions within the Fetoplacental Compartment in a Sheep Model: A Key Factor Determining Bisphenol A Fetal Exposure, Drug Metabolism and Disposition. 43 (2015) 467–476. doi:10.1124/dmd.114.061291.

[200] W. Völkel, T. Colnot, G.A. Csanády, J.G. Filser, W. Dekant, Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 1281–1287. doi:10.1021/tx025548t.

[201] A. Rane, P.K. Lunde, B. Jalling, S.J. Yaffe, F. Sjöqvist, Plasma protein binding of diphenylhydantoin in normal and hyperbilirubinemic infants, J. Pediatr. 78 (1971) 877–882. doi:10.1016/S0022-3476(71)80369-4.

[202] P. Poulin, S. Haddad, Albumin and Uptake of Drugs in Cells: Additional Validation Exercises of a Recently Published Equation that Quantifies the Albumin-Facilitated Uptake Mechanism(s) in Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling Research, JPharmSci. 104 (2015) 4448–4458. doi:10.1002/jps.24676.

[203] F.C. Grandin, M.Z. Lacroix, V. Gayrard, G. Gauderat, H. Mila, P.-L. TOUTAIN, N. Picard-Hagen, Bisphenol S instead of Bisphenol A: toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. Accepted in Environment International., (2018).

[204] A.A. Joshi, S.S. Vaidya, M.V. St-Pierre, A.M. Mikheev, K.E. Desino, A.N. Nyandege, K.L. Audus, J.D. Unadkat, P.M. Gerk, Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance, Pharmaceutical Research. 33 (2016) 2847–2878. doi:10.1007/s11095-016-2028-8.

[205] G. Gauderat, N. Picard-Hagen, P.-L. Toutain, R. Servien, C. Viguié, S. Puel, M.Z. Lacroix, T. Corbel, A. Bousquet-Melou, V. Gayrard, Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A and bisphenol A glucuronide from an ovine semi-physiological toxicokinetic model, Scientific Reports. 7 (2017) 15330. doi:10.1038/s41598-017-15646-5.

[206] E. Ferrazzi, M. Bellotti, H. Galan, G. Pennati, M. Bozzo, S. Rigano, F.C. Battaglia, Doppler Investigation in Intrauterine Growth Restriction—From Qualitative Indices to Flow Measurements, Annals of the New York Academy of Sciences. 943 (n.d.) 316–325. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03812.x.

[207] L.H. Wang, D. Zakim, A.M. Rudolph, L.Z. Benet, Developmental alterations in hepatic UDP-glucuronosyltransferase: A comparison of the kinetic properties of enzymes from adult sheep and fetal lambs, Biochemical Pharmacology. 35 (1986) 3065–3070. doi:10.1016/0006-2952(86)90387-4.

[208] B.H. Dvorchik, G. Woodward, D.S. Sitar, W.A. Tweed, Hydroxylation and Glucuronidation of Various Xenobiotics by Hepatic Microsomes from the Fetal Lamb, Pregnant Ewe and Human Fetus, DPD. 9 (1986) 282–289. doi:10.1159/000457103.

[209] V. Padmanabhan, H.N. Sarma, M. Savabieasfahani, T.L. Steckler, A. Veiga-Lopez, Developmental reprogramming of reproductive and metabolic dysfunction in sheep: native steroids vs. environmental steroid receptor modulators, International Journal of Andrology. 33 (2010) 394–404. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01024.x.

[210] V. Padmanabhan, A. Veiga-Lopez, Developmental Origin of Reproductive and Metabolic Dysfunctions: Androgenic Versus Estrogenic Reprogramming, Seminars in Reproductive Medicine. 29 (2011) 173–186. doi:10.1055/s-0031-1275519.

[211] V. Padmanabhan, A. Veiga-Lopez, Developmental programming of reproductive and metabolic health(,), Journal of Animal Science. 92 (2014) 3199–3210. doi:10.2527/jas.2014-7637.

Annexe 1 : Comment on « Pharmacokinetic of bisphenol S in humans after a single oral administration »

Environment International 116 (2018) 29–

Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint

Correspondence

Comment on 'Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after a single oral administration'

(Oh et al., 2017) report a pharmacokinetic (PK) study of Bisphenol S (BPS) in humans after a single oral administration. The authors confused absorption (actually total) and bioavailability, that they erroneously assumed to also be total without any argument to support this assumption. Actually, the authors do not take into account a more than likely first-pass effect of the substance before entering the systemic circulation. This assumption is surprising since the oral bioavailability of Bisphenol A (BPA), the well-known bisphenol analog of BPS, is very low (about 1%) (Thayer et al., 2015), due precisely to its extensive hepatic first-pass effect. This major flaw may explain the physiological irrelevance of the model parameters and their deemed incompatibility with the main results of the study.

Moreover, taking into account the model depicted in Fig. 2, it can be estimated that the fraction eliminated in urine as unconjugated BPS is K10/(K10 + Km) and the fraction eliminatesl as conjugated BPS is Km/(Km + K10). As K10 and Km were evaluated at 0.10 and 0.12 per h respectively (Table 3), the proposed model predicts that half the dose should be eliminated in urine as unconjugated BPS and the other half as conjugated BPS. However this prediction is totally contradicted by the experimental results which show that most of the dose was eliminated as conjugated BPS, not unconjugated BPS. So, the structure of the compartmental PK model is absolutely false and the results obtained misleading. This would lead to major erroneous conclusions about BPS human exposure.

We also have concerns about the analytical method used to evaluate unconjugated and conjugated BPS-d4 concentrations in human serum and urine samples. This method does not comply with the bioanalytical method validation guidelines from the European Medicines Agency (EMA) (European Medicines Agency, 2011) and the Food and Drug Administration (FDA, 2013).

Hence, the calibration curve (0.04–200 ng/mL) is not appropriate since the lowest calibration standard cannot be lower than the Lower limit of quantification (0.2 ng/mL) and this range does not allow adequate description of the time-BPS plasma concentration data that varied between 0.085 to only 4.75 ng/mL. Furthermore, the double log linear regression model used to describe the wide range of calibration standards (difference of 5 logs) minimizes the errors on each calibration standard. It may increase the size of the confidence interval of the prediction and decrease the precision of measurements, especially for the low values that are reported in the study.

The last critical point concerns the fact that the BPS concentrations between the LOD and LOQ are taken into account in the data analysis even though they should be censored.

In conclusion, considering the uncertainties about the measurements of BPS and the inadequacy of the PK model to describe internal exposure to BPS, the results of the present study are doubtful and could lead to erroneous conclusions in risk assessments of BPS.

The authors declare they have no competing financial interests.

References

European Medicines Agency, 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. FDA, 2013. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Updated 2013.

Oh, J., Choi, J.W., Ahn, Y.-A., Kim, S., 2017. Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration. Environ. Int. 112, 127–133. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.028.

Thayer, K.A., Doerge, D.R., Hunt, D., Schurman, S.H., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Garantziotis, S., Kissling, G.E., Easterling, M.R., Bucher, J.R., Birnbaum, L.S., 2015. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. Environ. Int. 83, 107–115. http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.006.

Flore C. Grandin[a], Véronique Gayrard[a,*], Marlène Z. Lacroix[a], Nicole Picard-Hagen[a], Hanna Mila[a], Pierre-Louis Toutain[b,c]

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

[b] *INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France*

[c] *The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom*

E-mail address: v.gayrard@envt.fr

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

https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.042

Received 10 January 2018; Received in revised form 23 March 2018; Accepted 27 March 2018

0160-4120/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Title : Development of an experimental approach to evaluate the human fetal internal exposure to Bisphenol S.

Summary : Bisphenol S (BPS) is widely used as a substitute for Bisphenol A (BPA) and human exposure to BPS is now ubiquitous. However, BPS, like BPA, displays an endocrine disrupting potential, raising the issue of the risk of fetal exposure to BPS for human health. In this context, the objective of this thesis is to evaluate the fetal exposure to BPS and to characterize phenotypic biomarkers of fetal exposure and / or effect of BPS from a steroidal signature. A toxicokinetic study carried out on the model of the ovine fetus has shown that materno-fetal transfer of BPS is weak. However, BPS and its major metabolite, BPS glucuronide, are slowly eliminated from the fetal compartment due to the limited feto-maternal placental transfer of BPS and the low rate of reactivation of BPSG to BPS. This results in fetal exposure to BPS similar to BPA at repeated maternal exposure. The study of placental transfer of BPS and BPSG on the model of human perfused placenta reinforced the results observed in sheep, with low materno-fetal and feto-maternal transfers of BPS, respectively 10 and 3 times lower than those of BPA.

Daily maternal exposure to BPS during pregnancy in ewes did not impact the androgen biosynthetic pathways in the materno-feto-placental unit for male fetuses. Although the potential for fetal exposure of BPS is similar to that of BPA, we have not found any effects associated with this exposure.

Keywords : Biphenol S, fetal exposure, endocrine disruptor, toxicokinetic, Bisphenol A substitute, placental transfer, steroidogenesis.

Auteur : Flore Grandin

Titre : Développement d'une approche intégrative pour évaluer l'exposition interne fœtale au Bisphénol S.

Directeur de thèse : Madame le Professeur Nicole Hagen-Picard

Co-directeur de thèse : Madame le Docteur Marlène Lacroix

Lieux et date de la soutenance : École Nationale Vétérinaire de Toulouse, le 11 octobre 2018

RÉSUME : Le bisphénol S (BPS) est largement utilisé comme substitut du Bisphénol A (BPA) et l'exposition humaine au BPS est désormais ubiquitaire. Or, le BPS, à l'instar du BPA, présente un potentiel perturbateur endocrinien, ce qui soulève la question du risque liée à une exposition fœtale au BPS pour la santé humaine. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'évaluer l'exposition fœtale au BPS et de caractériser des biomarqueurs phénotypiques d'exposition fœtale et/ou d'effet du BPS à partir d'une signature stéroïdomique. Une étude toxicocinétique réalisée sur le modèle du fœtus ovin a montré que le transfert materno-fœtal du BPS est faible. Cependant, le BPS et son principal métabolite, le BPS glucuronide, sont lentement éliminés du compartiment fœtal en raison d'un passage placentaire fœto-maternel du BPS limité et de la faible vitesse de réactivation du BPSG en BPS. Il en résulte une exposition fœtale au BPS similaire à celle au BPA, lors d'exposition maternelle répétée. L'étude du transfert placentaire du BPS et du BPSG sur le modèle de placenta humain perfusé a conforté les résultats observés chez le mouton, avec des faibles transferts materno-fœtal et fœto-maternel du BPS, respectivement 10 et 3 fois inférieurs à ceux du BPA.

L'exposition maternelle quotidienne au BPS au cours de la gestation chez la brebis n'a pas eu d'impact sur les voies de biosynthèse des androgènes dans l'unité materno-fœto-placentaire pour les fœtus mâles. Bien que le potentiel d'exposition fœtale du BPS est similaire à celui du BPA, nous n'avons pas mis en évidence d'effets associés à cette exposition.

Mots-clefs : Bisphénol S, exposition fœtale, perturbateur endocrinien, toxicocinétique, passage placentaire, substitut du Bisphénol A, stéroïdogenèse.

Intitulé et adresse du laboratoire : UMR 1331 TOXALIM, Research Center in Food Toxicology, INRA/INPT/UPS. École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des capelles – BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 3.