



HAL
open science

Impacts d'une exposition prénatale au bisphénol A sur la fonction thyroïdienne et le métabolome du système nerveux central foetal

Davy Guignard

► **To cite this version:**

Davy Guignard. Impacts d'une exposition prénatale au bisphénol A sur la fonction thyroïdienne et le métabolome du système nerveux central foetal. Toxicologie et chaîne alimentaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30284 . tel-01888722

HAL Id: tel-01888722

<https://theses.hal.science/tel-01888722>

Submitted on 5 Oct 2018

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Davy GUIGNARD

le jeudi 3 novembre 2016

Titre :

Impacts d'une exposition prénatale au bisphénol A sur la fonction thyroïdienne
et le métabolome du système nerveux central foetal

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Unité de recherche :

UMR 1331 Toxalim

Directeur/trice(s) de Thèse :

Madame le Docteur Catherine VIGUIE

Monsieur le Docteur Nicolas CABATON

Jury :

Monsieur le Professeur Paul FOWLER : rapporteur

Monsieur le Professeur Nicolas CHEVALIER : rapporteur

Monsieur le Professeur Philippe VALET : président du jury

Madame le Professeur Ana SOTO : examinateur

Madame le Docteur Catherine VIGUIE : co-directeur de thèse

Monsieur le Docteur Nicolas CABATON : co-directeur de thèse

A M. Paul Fowler et M. Nicolas Chevalier qui ont accepté de consacrer de leur temps à la lecture et l'appréciation de ce manuscrit. A Mme Ana Soto et M. Philippe Valet qui ont accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineur.

A Catherine Viguié et Nicolas Cabaton pour m'avoir aiguillé tout au long de ce projet soumis à de nombreux rebondissements. Votre expertise scientifique m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances et techniques. Je vous remercie également pour m'avoir permis de développer des traits essentiels du métier de chercheur, à savoir la rigueur scientifique, l'esprit critique et la pugnacité. Un grand merci à vous deux !

A Daniel Zalko, Jean-Philippe Antignac et Anne Duittoz qui ont accepté de suivre ce projet en faisant partie de mon comité de thèse. Je les remercie pour leurs remarques et conseils constructifs pour améliorer ce travail.

A Véronique Gayrard et Nicole Hagen-Picard pour avoir contribué à la réflexion et à la réalisation des protocoles expérimentaux. Je vous remercie pour l'aide que vous avez pu m'apporter même sous les températures glaciales que l'hiver toulousain nous avait réservées !

A M. Alain Bousquet-Mélou et M. Pierre-Louis Toutain pour m'avoir initié à la pharmacocinétique et m'avoir fait profiter de leur expertise scientifique. Je les remercie également pour leurs inépuisables anecdotes qui ont su agrémenter les pauses café du midi.

A Marlène Lacroix et Sylvie Puel pour avoir dosé, redosé et re-redosé nos très nombreux échantillons. Je n'imagine pas le nombre de fois où vous auriez préféré que je travaille sur un modèle rongeur ! Avec le mouton, quand il n'y en a plus, il y en a encore !

A Laurent Debrauwer et au trio de choc, Cécile Canlet, Marie Tremblay-Franco et Roselyne Gautier, sans qui aucun résultat de métabolomique ne serait sorti. Sans vous, cette approche serait toujours pour moi un mystère. Je vous remercie pour votre éternelle bonne humeur et le temps que vous m'avez consacré.

A Fabien Jourdan pour m'avoir déniché un réseau métabolomique ovin et m'avoir fait une place quelques semaines parmi cette espèce en pleine expansion qu'on appelle « geeks ».

A Marc Audebert, qui en plus de ses connaissances scientifiques, a su me faire profiter de sa voie suave lorsqu'il poussait la chansonnette !

Aux statisticiens Didier Concordet, Rémy Servien et Patrick Tardivel qui ont su m'éclairer dans nos analyses statistiques parfois un peu tordues !

A Cédric Lacassagne, Noémie Deschamps et Jean-Pierre Gau qui m'ont grandement aidé dans le bon déroulement des études animales. Cédric et Noémie, un grand merci pour les tontes et les pesées de brebis parfois rocambolesques ! Jean-Pierre, j'espère que vous ne m'en voudrez pas pour cette triste aventure du 24 décembre 2014 au matin...

Aux membres du bureau des thésards de l'ENVT avec qui nous avons pu confronter nos expériences « d'apprentis bergers », que dis-je, de jeunes chercheurs ! Glenn, ça y est, les 3 ans sont déjà terminés. Fini les bottes, la cote et la fourche, place à ton skate et à ta basse qui t'attendent depuis trop longtemps ! Diane et Flore, notre cohabitation n'aura finalement pas été longue mais je suis sûr que je peux compter sur vous pour de nouvelles parties nocturnes de mölkky !

Aux « jeunes » de MeX, Axiom et E8 qui m'ont tout de suite intégré à leurs délires des plus saugrenus (que la décence m'interdit de décrire ici) et à leurs apéros V&B hauts en couleurs. Laure, je tiens particulièrement à te remercier pour m'avoir accueilli chaleureusement dans ton bureau et m'avoir fait profiter de ta bonne humeur débordante ! Un grand merci aux « geeks » qui ont toujours su répondre à mes problèmes de biologiste ! Bonne continuation à vous tous...

A l'ensemble des membres des équipes E2, E3 et E7 qui ont apporté au quotidien une aide indispensable au bon déroulement de cette thèse.

A mes amis nantais qui ont toujours été compréhensifs face à des coups de téléphone tardifs, des anniversaires manqués, des réveillons annulés, des vacances studieuses... et à qui la distance géographique n'a jamais fait peur (coup de chapeau à Maxime qui a bravé sa phobie de l'avion pour rejoindre la ville rose !).

A ma famille qui m'a toujours encouragé durant ces 3 années dans ce parcours surprenant de « pharmacien-berger ». Je retiendrai votre indulgence face à mes passages express en contrées vendéennes et aux difficultés d'organisation que je vous ai infligées (Papa, on ne retiendra pas la date à laquelle on a fêté ta retraite, mais simplement qu'on l'a fêtée !).

A Anne qui a, plus que quiconque, toujours été présente au cours de cette thèse et m'a soutenu sans relâche même dans les moments difficiles, et ce malgré l'investissement que cela engendrait. Je crois qu'il est maintenant temps pour nous de passer à une autre vie...

Valorisation scientifique

Une partie des travaux de cette thèse a fait l'objet d'une publication et de communications orales ou affichées.

1) Publication

Davy Guignard, Glenn Gauderat, Véronique Gayrard, Marlène Z. Lacroix, Nicole Picard-Hagen, Sylvie Puel, Pierre-Louis Toutain, Catherine Viguié. Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. *Food and Chemical Toxicology*. **2016**;93:82-8

2) Communications orales

Davy Guignard, Pierre-Louis Toutain, Sylvie Puel, Véronique Gayrard, Nicole Picard-Hagen, Marlène Z. Lacroix and Catherine Viguié. Bisphenol A: comparison of the pharmacokinetics profiles obtained after 3 routes of administration. 13th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. 19-22 July 2015, Nantes, France.

Davy Guignard, Glenn Gauderat, Véronique Gayrard, Marlène Z. Lacroix, Nicole Picard-Hagen, Sylvie Puel, Pierre-Louis Toutain, Catherine Viguié. Quelle « bouche » d'entrée pour le bisphénol A ? Journée du Pôle Aliment : Sécurité Sanitaire et Santé. 3 Juin 2016, Toulouse, France.

3) Communications affichées

D. Guignard, C. Canlet, M. Tremblay-Franco, F. Jourdan, R. Gautier, V. Gayrard, N. Picard-Hagen, D. Zalko, N. Cabaton, C. Viguié. Une faible dose de bisphénol A module le métabolome de différentes structures cérébrales chez le fœtus ovin. Journées d'animation scientifique du département Santé Animale de l'Institut National de la Recherche Agronomique. 9-12 Mai 2016, Poitiers, France.

D. Guignard, C. Canlet, M. Tremblay-Franco, F. Jourdan, R. Gautier, V. Gayrard, N. Picard-Hagen, D. Zalko, C. Viguié, N. Cabaton. A low dose of bisphenol A impacts the metabolome in brain regions of ovine fetuses. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors. 19-24 June 2016, Sunday River Newry, ME, USA

Sommaire

INTRODUCTION	13
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. Les perturbateurs endocriniens	16
A. Définitions	16
B. Des effets à faibles doses	17
C. Relation dose-réponse non-monotone	18
D. Fenêtres critiques de sensibilité - Exposition périnatale.....	20
II. Les perturbateurs thyroïdiens	24
A. Mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens	24
1. Perturbation de la régulation centrale de l'axe thyroïdien.....	25
2. Perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes.....	25
3. Interaction avec les protéines sériques de liaison des hormones thyroïdiennes	26
4. Perturbation des voies de désiodation	27
5. Perturbation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes	29
6. Perturbation du transfert intracellulaire des hormones thyroïdiennes.....	29
7. Modulation de la liaison des hormones thyroïdiennes à leurs récepteurs.....	30
B. Modèles d'étude des perturbateurs thyroïdiens	32
1. Modèles in vitro.....	32
2. Modèles amphibiens et zebrafish	32
3. Modèles mammifères.....	33
III. Régulation du développement du système nerveux central par le système thyroïdien	40
A. Origines des hormones thyroïdiennes chez le fœtus.....	40
B. Conséquences d'une perturbation thyroïdienne sur le développement du SNC	43
1. Critères régissant la nature et l'intensité des altérations du SNC.....	43

2.	Altérations de l'ontogenèse du SNC.....	45
C.	Modèles mammifères d'étude de la relation SNC - thyroïde.....	51
IV.	Le bisphénol A	53
A.	Présentation et principales utilisations.....	53
B.	Principaux effets du bisphénol A.....	54
C.	Données d'exposition interne humaine.....	57
1.	Données urinaires.....	57
2.	Données sanguines chez l'adulte	59
3.	Données sur le sang de cordon et le liquide amniotique.....	60
D.	Données pharmacocinétiques et controverse	62
E.	BPA et système nerveux central.....	65
F.	Bisphénol A et perturbation thyroïdienne	67
V.	Apport de l'approche métabolomique.....	72
A.	Généralités	72
1.	Définitions	72
2.	Avantages et inconvénients de la métabolomique.....	73
B.	Outils technologiques et statistiques	76
1.	Outils analytiques.....	77
2.	Outils statistiques.....	81
C.	Application de la métabolomique à l'étude des perturbateurs endocriniens.....	83
1.	Un outil complémentaire aux approches classiquement utilisées.....	83
2.	Application à l'étude des perturbateurs thyroïdiens	84
3.	Application à l'étude des effets au bisphénol A.....	85
VI.	Objectifs et stratégie de la thèse.....	88

CHAPITRE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	91
I. Voies d'administration et exposition interne au BPA	92
A. Introduction et objectifs.....	92
B. Article 1	94
C. Comparaison de l'exposition interne au BPA attachée aux voies alimentaire et SC	102
D. Conclusion	103
II. Exploration des effets du BPA sur la fonction thyroïdienne	104
A. Introduction et objectifs.....	104
B. Article 2	105
C. Conclusion	135
III. Exploration des effets d'une exposition prénatale au BPA sur le développement du SNC	136
A. Introduction et objectifs.....	136
B. Article 3	137
C. Conclusion	164
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	165
Références.....	179

Liste des figures

Figure 1 : exemples de courbes dose-réponse non-monotones.....	19
Figure 2 : poids moyen (\pm SEM) de la prostate (en mg) chez des souris mâles adultes exposées durant la période prénatale à l'œstradiol ou au diéthylstilbestrol.....	19
Figure 3 : schéma expliquant le risque de sous-estimation de l'effet si le composé décrit une courbe dose-réponse en U	20
Figure 4 : effet du développement périnatal sur la fraction de BPA non-conjugué (seule fraction biologiquement active) présente chez le rat aux stades fœtus, nouveau-né et adulte	22
Figure 5 : description des éléments clés du système thyroïdien et des mécanismes d'action potentiels de perturbateurs thyroïdiens	24
Figure 6 : production des hormones thyroïdiennes par les follicules thyroïdiens.....	26
Figure 7 : structure chimique de la thyroxine et de xénobiotiques se liant à la transthyréline	27
Figure 8 : relations entre les principales hormones thyroïdiennes activées ou inactivées par les différentes désiodases	28
Figure 9 : schéma de la cascade de transduction activée par les hormones thyroïdiennes.....	31
Figure 10 : décours temporel des concentrations sériques de T4, T3 et rT3 au cours de la période de maturation chez le fœtus ovin et chez le fœtus humain	35
Figure 11 : décours temporel des concentrations sanguines de T4 totale et libre, TBG, thyrotropine et d'hCG au cours de la grossesse chez la femme ⁵⁰	38
Figure 12 : décours temporel des concentrations (moyenne \pm SEM) sériques de T4 (ronds noirs) et T3 (ronds blancs) totales chez la brebis au cours de la gestation ¹⁰²	39
Figure 13 : origines materno-fœtales de la thyroxine (T4) retrouvée dans le sang fœtal au cours de la période périnatale.....	40
Figure 14 : comparaison des concentrations de T4 totale et libre dans le sang maternel, le sang fœtal, le liquide amniotique et le liquide cœlomique au cours des 18 premières semaines d'aménorrhées chez l'espèce humaine	42

Figure 15 : effets de différents degrés d'insuffisance en hormones thyroïdiennes sur le développement du SNC observés chez l'homme et l'animal	44
Figure 16 : schéma de la relation existant entre la fonction thyroïdienne (maternelle et fœtale) et la mise en place des principales étapes du développement du SNC	45
Figure 17 : effets d'une hypothyroïdie congénitale sur le développement du cortex cérébelleux chez une souris à 12 jours post-natal	48
Figure 18 : diminution de la concentration sérique de T4 et altération de la différenciation des précurseurs des cellules gliales en oligodendrocytes exprimant le facteur MAPG (myelin-associated glycoprotein) ou en astrocytes exprimant le facteur GFAP (glial fibrillary acidic protein) dans le corps calleux de rats issus de mères traitées avec du propylthiouracile, un agent antithyroïdien	49
Figure 19 : développement de la fonction thyroïdienne et du système nerveux central de la conception au 50ème jour post-natal chez l'espèce ovine	52
Figure 20 : relation entre le développement du SNC (C) et le système thyroïdien (A) chez l'espèce humaine.....	52
Figure 21 : structure chimique du bisphénol A	53
Figure 22 : homéostasie glucidique sanguine (A) après un test de tolérance à l'insuline intra-péritonéale et (B) un test de tolérance au glucose intra-péritonéale chez des souris âgées de 6 mois et exposées in utero au BPA 10 (F1 BPA10) ou 100 (F1 BPA100) $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (S.C.) ou au contrôle (F1-C)	55
Figure 23 : métabolisation chez l'homme du bisphénol A (1) en bisphénol A glucuronide (2)	57
Figure 24 : concentrations urinaires en BPA total rapportées dans la littérature pour des études publiées	58
Figure 25 : schéma représentant les différentes composantes intervenant dans la biodisponibilité d'un composé administré par voie orale.....	63
Figure 26 : décours temporel des concentrations moyennes (\pm SEM) de T4 totale dans le sang jugulaire de brebis gestantes traitées par du BPA ($5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$; S.C.) ou par le véhicule du 28 ^{ème} au 145 ^{ème} jour de gestation.....	68

Figure 27 : concentrations moyennes (\pm SEM) de la T4 totale, de la T4 libre et de la T3 totale dans le sang de cordon, le sang jugulaire foetal (1h et 2 mois après la naissance) et maternel après traitement des brebis gestantes par du BPA.....	69
Figure 28 : schéma des différents niveaux d'étude des approches « omiques »	74
Figure 29 : déroulement chronologique des principales étapes d'une étude de métabolomique	77
Figure 30 : spectre typique de résonance magnétique nucléaire du proton.....	78
Figure 31 : spectres typiques obtenus par analyse en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse.....	80
Figure 32 : « score-plot » à deux dimensions issu de l'analyse PLS-DA des données générées par la spectroscopie $^1\text{H-RMN}$ de cerveaux de souris issues de mères exposées au BPA ($0 - 0,025 - 0,25$ ou $25 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) durant la période périnatale	86
Figure 33 : proposition d'un schéma physiopathologique des effets d'une exposition prénatale au BPA sur la fonction thyroïdienne et le développement du SNC.....	168
Figure 34 : mécanismes d'absorption attachés aux administrations par voie alimentaire, sous-cutanée et gavage du BPA.....	169
Figure 35 : mécanismes d'action possibles des effets du BPA sur le développement du SNC	171
Figure 36 : effets probables du BPA sur l'activité des désiodases placentaires et cérébrales.....	172
Figure 37 : structure chimique du bisphénol A et de certains analogues du BPA	177

Liste des tableaux

Tableau 1 : comparaison de la chronologie des principales phases de l'ontogenèse de la fonction thyroïdienne chez les espèces humaine, ovine et rat	36
Tableau 2 : comparaison des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales, des fractions libres et des temps de demi-vie des hormones thyroïdiennes chez l'homme, le mouton, le rat et la souris	37
Tableau 3 : principales propriétés physico-chimiques du bisphénol A.....	53
Tableau 4 : Concentrations sanguines en BPA non-conjugué dans différentes études d'épidémiologie menées chez des femmes enceintes.....	59
Tableau 5 : concentrations en BPA (non-conjugué ou total) mesurées dans le sang de cordon ombilical chez l'espèce humaine.....	61
Tableau 6 : effets d'une exposition pré- ou périnatale du BPA sur le développement du SNC et/ou sur la fonction thyroïdienne, parallèlement ou non à l'exploration de l'exposition interne au BPA	71

Abréviations

- ACP : analyse en composantes principales
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ANOVA : analyse de la variance
- ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- ARN : acide ribonucléique
- AUC : aire sous la courbe (area under the curve)
- BDNF : brain-derived neurotrophic factor
- BPA : bisphénol A
- BPA-G : bisphénol A glucuronide
- BPA-S : bisphénol A sulfate
- CRF : corticotropin-releasing factor
- DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène
- DEHP : di(2-éthylhexyl)phtalate
- DES : diéthylstilbestrol
- DJA : dose journalière admissible
- DJT : dose journalière tolérable
- EC : électrophorèse capillaire
- EFSA : european food safety authority
- EPA : environmental protection agency
- FD : fluorescent detector
- FDA : food and drug administration
- fT3 : T3 libre (free T3)

- fT4 : T4 libre (free T4)
- GABA : acide γ -aminobutyrique
- GAD : glutamic acid decarboxylase
- GC : gaz chromatography
- GD : gestational day
- GFAP : glial fibrillary acidic protein
- GFP : green fluorescent protein
- HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
- HCB : hexachlorobenzène
- HPLC : high performance liquid chromatography
- LAT : L-type amino acid transporter
- LOAEL : lowest observed adverse effect level
- LOD : limit of detection
- LOQ : limit of quantification
- MAG : myelin associated glycoprotein
- MBP : myelin basic protein
- MCT : monocarboxylate transporter
- MEHP : monoethylhexyl phthalate
- MS : mass spectrometry
- N-CoR : nuclear receptor corepressor
- Ngf : nerve growth factor
- NIS : sodium-iodide symport
- NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

- NOAEL : no-observed adverse effect level
- NTCP : Na/Taurocholate Cotransporting Polypeptide
- OATP : organic anion transporting polypeptide
- OMC : octyl-méthoxycinnamate
- PBDE : polybromodiphényléther
- PCB : polychlorobiphényle
- PE : perturbateur endocrinien
- PLS-DA : partial least squares discriminant analysis
- PND : post-natal day
- PPAR γ : peroxysome proliferator activated receptor
- PSA-NCAM : polysialylated-neural cell adhesion molecule
- PTU : propylthiouracile
- REEF : reproductive effects of environmental chemicals in females
- RIA : radioimmunoassay
- RMN : résonance magnétique nucléaire
- rT3 : reverse T3
- RXR : retinoid X receptor
- SC : sous-cutanée
- SMRT : silencing mediator for retinoid and thyroid receptors
- SNC : système nerveux central
- SULT : sulfotransférase
- T2 : 3,3'-diiodothyronine
- T3 : triiodothyronine

- T4 : thyroxine
- TBBPA : tétrabromobisphénol A
- TBG : thyroxine-binding globulin
- TCDD : tétrachlorodibenzo-p-dioxine
- TOF : time of flight
- TPO : thyroperoxydase
- TR : thyroid hormone receptor
- TRE : thyroid hormone response element
- TSH : thyroid stimulating hormone
- TT3 : T3 totale
- TT4 : T4 totale
- TTR : transthyrétine
- UDPGT : UDP-glucuronosyltransférase
- VO : voie orale

INTRODUCTION

Les perturbateurs endocriniens focalisent l'attention d'un grand nombre de scientifiques de par le monde, mais également des pouvoirs publics et des médias en raison des enjeux sanitaires, économiques et politiques qu'ils suscitent. L'exposition durant la vie fœtale et néo-natale est au cœur des préoccupations de santé publique puisque cette période représente une fenêtre de sensibilité accrue y compris pour les perturbateurs endocriniens. Selon certaines études épidémiologiques, l'exposition à des perturbateurs endocriniens, en particulier durant la période périnatale, serait associée à la survenue de troubles cognitifs et comportementaux dont le coût sociétal s'élèverait à plus de 150 milliards d'euros par an dans l'union européenne ¹.

Les perturbateurs thyroïdiens sont particulièrement incriminés compte-tenu du fort lien existant entre dysthyroïdie congénitale et survenue de troubles neurocognitifs. L'exposition de la femme enceinte à des perturbateurs thyroïdiens apparaît dès lors comme une source potentielle d'altérations du développement du système nerveux central (SNC). Toutefois, malgré le très fort impact sociétal qu'elles sont susceptibles d'engendrer, ces altérations sont encore peu caractérisées notamment en raison des difficultés qu'impose l'exploration d'un système aussi complexe que le SNC.

Dans ce contexte, notre projet de recherche s'est particulièrement intéressé à un perturbateur endocrinien au cœur de nombreuses controverses, le bisphénol A (BPA). En effet, outre ses propriétés œstrogénomimétiques, ce polluant alimentaire, retrouvé de façon ubiquitaire au sein de la population humaine, modifie l'homéostasie thyroïdienne. Des données montrent par ailleurs que le BPA induit également des altérations sur le cerveau d'animaux exposés.

Le projet de thèse avait pour objectifs (1) de déterminer les conséquences d'une exposition gestationnelle au BPA sur le développement du SNC conjointement aux effets sur la fonction thyroïdienne et (2) de documenter l'exposition interne attachée à différentes voies d'administration du BPA. Ce dernier point est en effet un élément indispensable à l'évaluation de la pertinence de nos procédures expérimentales en termes d'équivalence d'exposition humaine. Les travaux ont été réalisés au sein des équipes « Gestation et Perturbation Endocrinienne » et « Métabolisme des Xénobiotiques » de l'UMR 1331 Toxalim, centre de recherche en toxicologie alimentaire, INRA/ENVT, sous la direction de Catherine Viguié et Nicolas Cabaton.

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les perturbateurs endocriniens

A. Définitions

La notion de "perturbateurs endocrinien" (PE) a été définie pour la première en 1996 lors d'un colloque organisé à Weybridge (Angleterre) par l'EPA (Environmental Protection Agency, USA) comme "toute substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale" ². Aujourd'hui, la définition qui prévaut est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé proposée en 2002 qui entend comme PE "une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou de (sous-)populations". Toutefois, comme en témoigne les nombreuses propositions établies depuis une vingtaine d'années, il n'existe pas à l'heure actuelle de véritable consensus autour de la définition d'un PE.

Les divergences reposent notamment sur la caractérisation d'un effet biologique comme délétère ou non ³⁻⁵. En effet, bien que le terme d'effet délétère ait été défini par l'OMS (2009), les critères s'appliquant spécifiquement aux PE n'ont pas été clairement établis. Ainsi, la toxicité des effets observés dans les études (ex: altérations des concentrations circulantes d'hormones, modification de la distance anogénitale, altération du dimorphisme sexuel du comportement...) est souvent jugée différemment entre des scientifiques de champs disciplinaires différents (toxicologue, biologiste spécialiste du développement, endocrinologue...) ^{6,7}. Tandis que pour certains auteurs, beaucoup d'effets sont réversibles et reflètent davantage un phénomène d'adaptation qu'un effet délétère ⁸, pour d'autres, il est fortement probable qu'un organisme, en particulier lors de périodes d'exposition critiques telles que la vie embryonnaire, ne soit pas suffisamment développé pour maintenir son homéostasie et s'adapter à un déficit ou un excès hormonal ⁹.

Une autre difficulté pour les scientifiques provient de la diversité des structures chimiques et des domaines d'utilisation des PE. En 2010, la FDA (Food and Drug Administration, USA) recensait une liste de plus de 1000 produits chimiques susceptibles de présenter des propriétés perturbatrices endocriniennes et utilisés comme insecticides, herbicides, plastifiants, détergents, retardateurs de flamme, résines, excipients dans les produits de soins personnels ⁶...

Les PE présentent des propriétés particulières auxquelles les tests classiques de toxicologie ne sont pas nécessairement adaptés. Certaines sont partagées avec d'autres classes de composés chimiques (effets à faible dose, effets non-monotones, effets "cocktail"), d'autres sont propres aux PE (effets

transgénérationnels, association à des fenêtres d'exposition critiques). Ces propriétés représentent actuellement de véritables challenges pour les toxicologues.

Cette partie présente plus en détails les notions d'effets à faibles doses, d'effets non-monotones et de fenêtres d'exposition critiques.

B. Des effets à faibles doses

L'hypothèse des effets à faibles doses a été proposée au début des années 90 suite à l'observation d'altérations de la reproduction et du développement chez des animaux exposés à de faibles concentrations de PE, comparables à celles auxquelles l'homme est exposé. Aujourd'hui, la littérature scientifique regorge d'exemples d'effets biologiques mis en évidence à de faibles doses.

On peut notamment citer les effets à faible dose du bisphénol A (BPA) sur la glande mammaire. Le BPA est un contaminant alimentaire présentant des propriétés œstrogénomimétiques. La NOAEL du BPA a été établie à $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ¹⁰. Pourtant, plusieurs études animales ont mis en évidence des altérations de la glande mammaire à des doses inférieures de BPA. Ainsi, chez le singe, l'exposition prénatale au BPA à une dose de $400 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (VO), conduisant à des concentrations sanguines de BPA comparables à celles observées chez l'homme, entraîne un développement accéléré de la glande mammaire à la naissance¹¹. Chez la souris, l'exposition prénatale (8-18^{ème} jours de gestation) au BPA à une dose de $0,25 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ par voie sous-cutanée induit des altérations tissulaires de la glande mammaire au 18^{ème} jour de gestation¹². Une augmentation de l'aire ductale et des modifications de la localisation du collagène ont été observées. Dans une autre étude, le transcriptome de l'épithélium ductal et du stroma périductal a été modifié chez des souris exposées *in utero* à $250 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de BPA. Certaines altérations du transcriptome étaient comparables à celles retrouvées chez des souris exposées à l'éthinylestradiol ($10 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$)¹³.

Malgré ces observations, les effets à faible dose du BPA et des PE en général sont encore controversés chez l'homme. La définition même d'un effet à faible dose est source de critiques. Celle-ci a été proposée en 2001 par les membres du "National Toxicology Program" et prévaut toujours aujourd'hui. On entend par effet à faible dose toute modification biologique se produisant (1) pour des doses d'exposition comparables à celles décrites chez l'homme (exposition externe) ou (2) pour une dose inférieure aux doses classiquement utilisées dans les tests de toxicologie¹⁴. Une dose inférieure à la LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) ou la NOAEL (No-Observed Adverse Effect Level), est ainsi considérée comme faible. Certains auteurs jugent également qu'une dose est faible lorsqu'elle

produit chez l'animal des concentrations du même ordre que celles mesurées dans la population humaine (exposition interne) ¹⁵.

La multiplicité des critères permettant de définir une faible dose génère certaines difficultés. D'une part, elle conduit à considérer différents « seuils » de faible dose pour un même composé ¹⁶. D'autre part, selon certains auteurs, des doses sont annoncées comme « faibles » sur la base de la comparaison avec la NOAEL alors qu'elles sont en réalité très supérieures aux niveaux d'exposition humaine ^{8,17}. Une définition plus adéquate d'une faible dose serait donc nécessaire pour faciliter les discussions.

Par ailleurs, il est à noter le manque criant de directives et de standardisation autour de l'évaluation des effets d'un composé à faible dose. La batterie de tests toxicologiques reconnus réglementairement ne semble pas nécessairement adaptée à l'évaluation des PE et souffre d'un manque de sensibilité pour mettre en évidence des effets à faible dose. Seuls quelques tests tels que le test utéro-trophique chez les rongeurs (essai de dépistage des propriétés œstrogéniques d'un composé) sont aujourd'hui admis réglementairement. Des tests à la fois sensibles et robustes doivent donc être développés pour pallier au manque de reproductibilité des études à faible dose décrit par certains auteurs ^{8,17,18}. Ces effets sont généralement subtils et nécessitent de parfaitement maîtriser certains facteurs. Ainsi, l'absence de contamination dans le milieu de culture ou dans la nourriture doit être vérifiée ¹⁹. De même, le choix du modèle utilisé doit être réfléchi : certaines souches de rat et de souris présentent par exemple une insensibilité naturelle aux effets œstrogéniques ^{12,16}.

C. Relation dose-réponse non-monotone

Bien que très liés, les concepts d'effet à faible dose et de relation non-monotone ne sont pas identiques. Un xénobiotique peut en effet induire des effets à faible dose sans présenter de courbe dose-réponse non-monotone.

Une relation dose-réponse est dite non-monotone lorsque la pente de la courbe dose-réponse change de signe sur un domaine de concentrations testées ²⁰. On parle généralement de courbe en U et en U-inversé mais des cas plus complexes ont déjà été décrits (Figure 1). Ce type de relation a été mis en évidence pour une vingtaine d'hormones endogènes ainsi que pour un grand nombre de PE ¹⁶. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'observation de relations non-monotones avec les PE : la cytotoxicité à fortes doses ; la désensibilisation des récepteurs ; la spécificité cellulaire et tissulaire des récepteurs et des cofacteurs ; la sélectivité des récepteurs ; les boucles de rétrocontrôle ²¹.

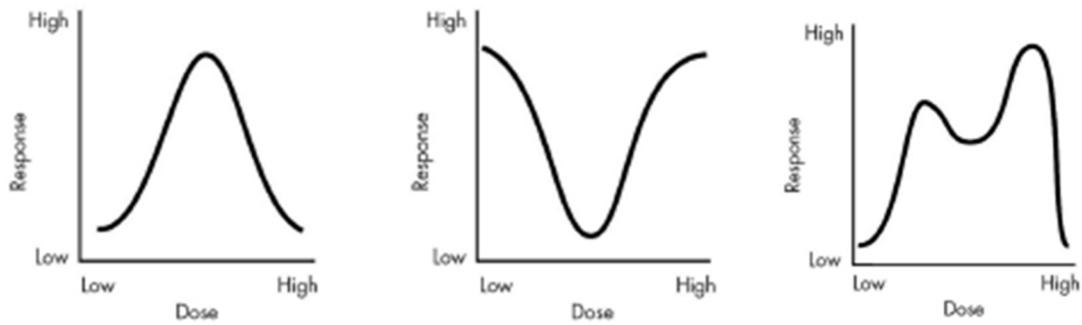


Figure 1 : exemples de courbes dose-réponse non-monotones ¹⁶

Pour exemple, l'œstradiol et le diéthylstilbestrol (DES), un œstrogénomimétique puissant, présentent un effet non-monotone sur le développement prostatique ²². Chez des souris mâles adultes exposées durant la période prénatale à différentes concentrations d'œstradiol, le poids de la prostate augmente avec des faibles doses d'exposition et diminue avec des fortes doses. Un profil similaire a été observé suite à l'exposition au DES (Figure 2). Sur le plan mécanistique, cette courbe en U inversé pourrait provenir de la capacité de l'œstradiol (et probablement du DES) à se lier, à fortes doses, à d'autres récepteurs (ex : les récepteurs androgéniques) qu'aux récepteurs œstrogéniques, entraînant alors globalement un effet antagoniste sur le poids de la prostate.

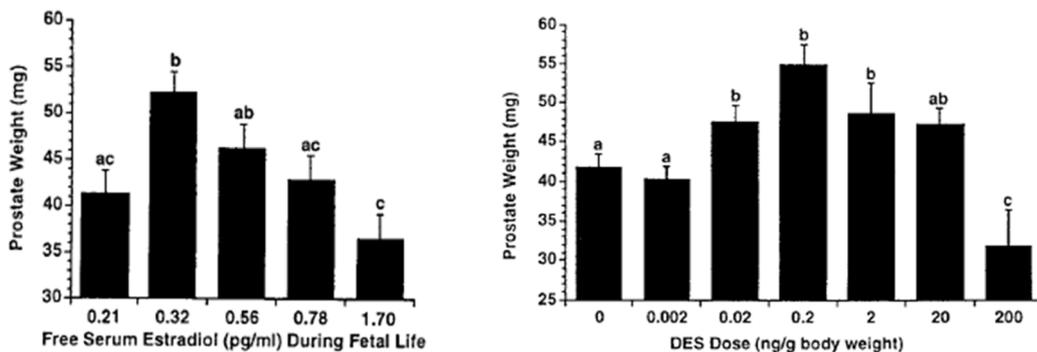


Figure 2 : poids moyen (\pm SEM) de la prostate (en mg) chez des souris mâles adultes exposées durant la période prénatale à l'œstradiol (graphe de gauche) ou au diéthylstilbestrol (DES ; graphe de droite) ²²

Ce type de relation est problématique par rapport aux tests classiquement utilisés en toxicologie pour définir les valeurs toxicologiques de référence. En effet, il remet en cause le principe fondamental

d'extrapolation de la dose. Les tests classiques reposent sur l'identification d'une dose sans effet (NOAEL ou LOAEL) permettant de définir la dose journalière tolérable ou admissible (DJT ou DJA) *via* l'application de facteurs de sécurité. Cependant, si le composé présente une dose-réponse en U, des effets biologiques peuvent apparaître pour des doses inférieures à la DJT (Figure 3). Pour mieux caractériser la relation dose-réponse, il est donc proposé de tester plus de doses et en particulier de tester la dose à laquelle l'homme est exposé ^{6,19,21,23}. Cette proposition soulève toutefois des difficultés pour les nouveaux composés dont l'exposition humaine est encore inconnue avant leur autorisation.

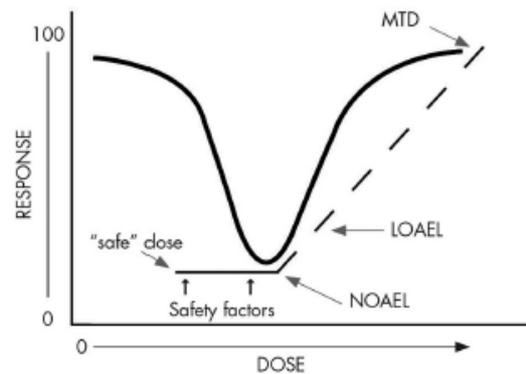


Figure 3 : schéma expliquant le risque de sous-estimation de l'effet si le composé décrit une courbe dose-réponse en U.

Dans les tests traditionnels de toxicologie, des doses élevées sont testées pour identifier la dose maximale tolérée (MTD), la LOAEL et la NOAEL. Des facteurs de sécurité sont appliqués pour définir la dose de référence (dose pour laquelle l'exposition est présumée sans risque). Cette dose de référence est rarement testée directement. Pourtant, dans le cas d'une relation non-monotone, des effets délétères peuvent être observés à cette dose ¹⁶

D. Fenêtres critiques de sensibilité - Exposition périnatale

Une des difficultés propre à l'étude des PE réside dans l'association fréquente de ces xénobiotiques avec des fenêtres critiques de sensibilité. En effet, leurs effets ne se manifestent pas de façon similaire, quantitativement et qualitativement, au cours de la vie. L'absence d'effet à un stade donné ne garantit donc pas de l'innocuité de ce composé à une autre période de développement.

La période périnatale est aujourd'hui au cœur des préoccupations de santé. La barrière placentaire n'est malheureusement pas complètement imperméable et de nombreux composés chimiques peuvent la franchir ²⁴⁻²⁶. Ceci est notamment vrai chez l'homme du fait de sa placentation conduisant à une très forte intimité entre les circulations maternelle et fœtale. Ce passage transplacentaire est étudié avec attention puisque la période périnatale représente une période d'extrême sensibilité aux PE. En effet, alors que chez l'adulte, les effets sont généralement réversibles (effets « activationnels »), une exposition périnatale (*i.e.* durant l'embryogenèse, l'organogenèse et le développement post-

natal) peut conduire à des altérations persistantes. Ces effets sont dits « organisationnels ». Ils peuvent être visibles directement et se maintenir toute la vie, mais peuvent aussi être indétectables à la naissance et n'apparaître qu'ultérieurement ²⁷.

Le fœtus est particulièrement sensible à une perturbation endocrinienne car un grand nombre d'étapes clés du développement est directement régulé par les hormones circulantes. Ces dernières contrôlent notamment la prolifération, la différenciation, la croissance cellulaire ou l'apoptose ^{19,28}. Le bon déroulement de ces événements nécessite que les concentrations hormonales soient finement contrôlées. Une modification même minime de ces concentrations est donc susceptible d'altérer le développement normal, d'autant que les systèmes endocriniens fœtaux ne sont pas suffisamment matures pour compenser ces modulations ⁹.

La sensibilité accrue du fœtus et du nouveau-né aux PE est aussi due à ses capacités de biotransformation limitées. L'exposition du fœtus aux xénobiotiques peut ainsi être prolongée par rapport à l'adulte ^{19,29}. Pour exemple, sur le modèle de fœtus ovin, l'activité des enzymes hépatiques responsables de la conjugaison du bisphénol A (sa principale voie de métabolisation) est relativement faible en début de gestation par rapport aux activités mesurées chez la brebis adulte, de façon très similaire à ce qui est décrit chez l'homme ³⁰. Chez les rongeurs cette situation est encore plus accentuée car le nouveau-né est quasiment dénué de capacité de glucuroconjugaison du BPA (Figure 4) ^{31,32}.

Pour certains composés, l'exposition fœtale peut également être facilitée par une diminution de la clairance maternelle en raison des modifications pharmacocinétiques liées à la grossesse ¹⁹. L'activité de cytochromes P450 hépatiques est modulée au cours de la grossesse : l'activité des CYP2D6 et CYP3A4 est augmentée tandis que celle du CYP2D6 est diminuée ³³.

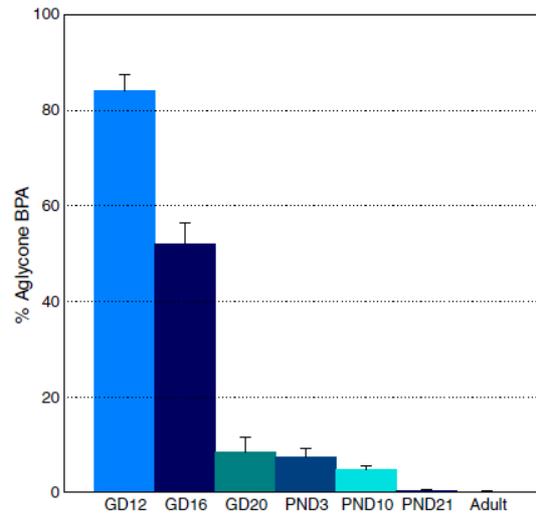


Figure 4 : effet du développement périnatal sur la fraction de BPA non-conjugué (seule fraction biologiquement active) présente chez le rat aux stades fœtus, nouveau-né et adulte. Les valeurs représentent la fraction moyenne (\pm SD) de BPA non-conjugué par rapport au BPA total (BPA-non-conjugué et principaux métabolites du BPA formés sous l'action des enzymes hépatiques de phase II) aux 12^{ème}, 16^{ème} et 20^{ème} jours de gestation, aux 3^{ème} et 10^{ème} jours post-natal et au stade adulte, suite à l'administration orale de BPA non-conjugué ³¹

Le diéthylstilbestrol (DES) constitue un des plus tristes exemples de PE présentant des effets à long terme suite à une exposition prénatale. Ce composé est un puissant œstrogénomimétique fréquemment utilisé aujourd'hui comme témoin positif en toxicologie. Au milieu du 20^{ème} siècle, le DES a été prescrit à de nombreuses femmes enceintes faisant des fausses couches répétées. Ce médicament a été interdit en 1977 en France suite à la mise en évidence d'un grand nombre de troubles de l'appareil reproducteur chez les filles des mères traitées. Ainsi, l'exposition *in utero* au DES a été associée à une forte augmentation de l'incidence d'adénocarcinomes du vagin ou de l'utérus chez des femmes jeunes ainsi qu'à des troubles de la fertilité. Les effets étaient moins importants chez les garçons bien que dans certains cas, une augmentation de l'incidence de cryptorchidie et d'oligospermie aient été rapportés ³⁴⁻³⁶. Chez les femmes traitées par le DES, le traitement n'induisait pas d'adénocarcinome vaginal et augmentait seulement légèrement le risque de développer un cancer du sein ³⁶, soulignant une nouvelle fois l'association des PE à des fenêtres spécifiques de sensibilité.

L'exposition périnatale à des composés chimiques et particulièrement à des PE est d'autre part suspectée d'être l'une des causes de l'augmentation de l'incidence des troubles comportementaux tels que l'hyperactivité et l'autisme ³⁷. En Californie, une étude épidémiologique a été menée sur une cohorte comparant 465 enfants souffrant de troubles autistiques à 6975 enfants sains ³⁸. Les résultats suggéraient que le risque de survenue des troubles était d'autant plus élevé que le lieu d'habitation

de la mère durant la grossesse était proche de zones d'application de pesticides. Dans une autre étude, la confrontation des résultats de 21 publications semble conforter le lien entre exposition périnatale à des PE et apparition de troubles comportementaux²⁸. Ainsi, l'exposition à des pesticides organochlorés et au BPA serait positivement associée à la survenue de troubles autistiques. Les syndromes d'hyperactivité seraient augmentés chez les enfants exposés *in utero* aux PCB (polychlorobiphényles) ou à certains pesticides (dialkylphosphate, chlorpyrifos).

II. Les perturbateurs thyroïdiens

La majorité des travaux menés sur les PE se sont focalisés sur la fonction de reproduction. Néanmoins, la fonction thyroïdienne constitue également la cible de certains xénobiotiques (contaminants environnementaux, médicaments...) auxquels l'homme est exposé. Ceci a notamment été montré pour les contaminants organo-halogénés tels que les polychlorobiphényles (PCB) ou les polybromodiphényléthers (PBDE) mais d'autres familles de composés présentent des propriétés similaires^{15,39-41}. Cette partie présente les différents mécanismes d'action décrits pour les perturbateurs thyroïdiens ainsi que différents modèles d'études de cette classe de composés.

A. Mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens

Les perturbateurs thyroïdiens peuvent modifier l'homéostasie thyroïdienne en agissant à différents niveaux de la régulation thyroïdienne (Figure 5).

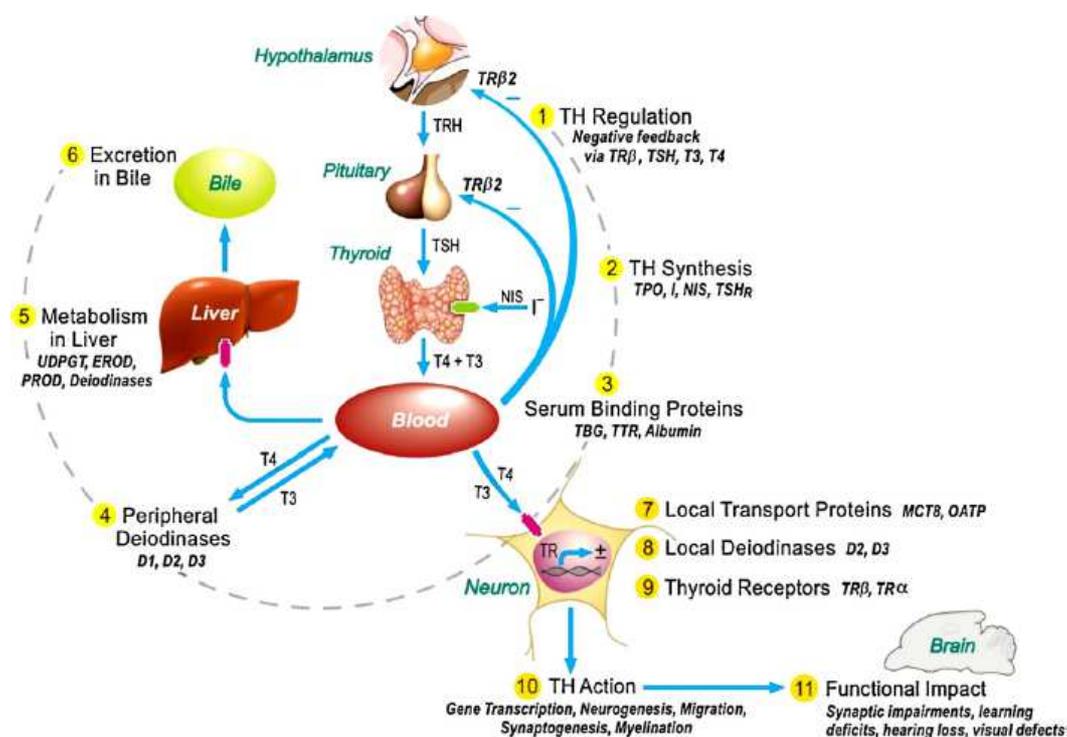


Figure 5 : description des éléments clés du système thyroïdien et des mécanismes d'action potentiels de perturbateurs thyroïdiens⁴⁰

1. Perturbation de la régulation centrale de l'axe thyroïdien

Au vu de la littérature, peu de xénobiotiques semblent perturber directement la régulation centrale de l'axe thyroïdien, c'est-à-dire agir au niveau de l'étage hypothalamo-hypophysaire⁴². Ces propriétés sont majoritairement retrouvées pour des agents pharmacologiques tels que les analogues de la somatostatine ou encore les réxinoïdes de synthèse (rétinoïdes sélectifs des RXR, Retinoid X Receptor). Ces derniers semblent moduler l'activité des cellules thyrotropes de l'adénohypophyse puisqu'ils diminuent *in vitro* le niveau d'expression des ARNm TSH β sans modifier l'expression des ARNm TRH⁴³. Des modulations de la régulation thyroïdienne centrale ont toutefois également été observées avec certains polluants environnementaux. Ainsi, à fortes doses, le tétrabromobisphénol A (TBBPA ; 2,1 g/kg ; SC) et la tributylène (un anti-salissure de la famille des tributylétains ; 40 mg/kg ; VO) diminuent l'activité du promoteur du gène *Trh* au sein de l'hypothalamus de rats issus de mères exposées durant la lactation⁴⁴. Il est néanmoins difficile de préciser si la diminution observée résulte d'une action directe des xénobiotiques sur l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien ou d'un mécanisme indirect de rétrocontrôle par les hormones thyroïdiennes.

2. Perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes

Certains composés inhibent la synthèse des principales hormones thyroïdiennes, la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3), en bloquant le transporteur NIS (Na/I Symport) chargé de l'absorption des ions iodure par les cellules folliculaires thyroïdiennes (Figure 7). C'est notamment par ce mécanisme qu'agissent le perchlorate (1 μ M) et les thiocyanates (10 μ M)⁴⁵, des molécules fréquemment utilisées dans les modèles animaux d'hypothyroïdie. Certains phtalates tels que le diisodécylphtalate et le butylbenzylphtalate altèrent aussi l'activité des NIS *in vitro* à une concentration de 1 mM⁴⁶.

D'autres composés agissent en bloquant la thyroperoxydase (TPO). Cette enzyme catalyse la première étape de la synthèse des hormones thyroïdiennes en permettant l'organification de l'iode et l'iodation des résidus tyrosine de la thyroglobuline aboutissant à la formation de monoiodotyrosine et de diiodotyrosine (Figure 6). Le propylthiouracile et le méthimazole, deux puissants antithyroïdiens utilisés chez l'homme pour traiter l'hyperthyroïdie et couramment chez les animaux comme référence dans les tests de toxicologie, bloquent l'activité de la TPO à des doses de l'ordre du μ M⁴². L'inhibition de la TPO a également été décrite pour certains fongicides comme le mancozeb⁴⁷ et l'éthyléthiourée⁴⁸, des herbicides comme l'amtrol, des protecteurs UV utilisés en cosmétologie tels que la benzophénone⁴⁹ ou encore pour des composés naturels tels que les composés isothiocyanates naturellement présents dans beaucoup de crucifères cultivées, en particulier le chou⁴⁷.

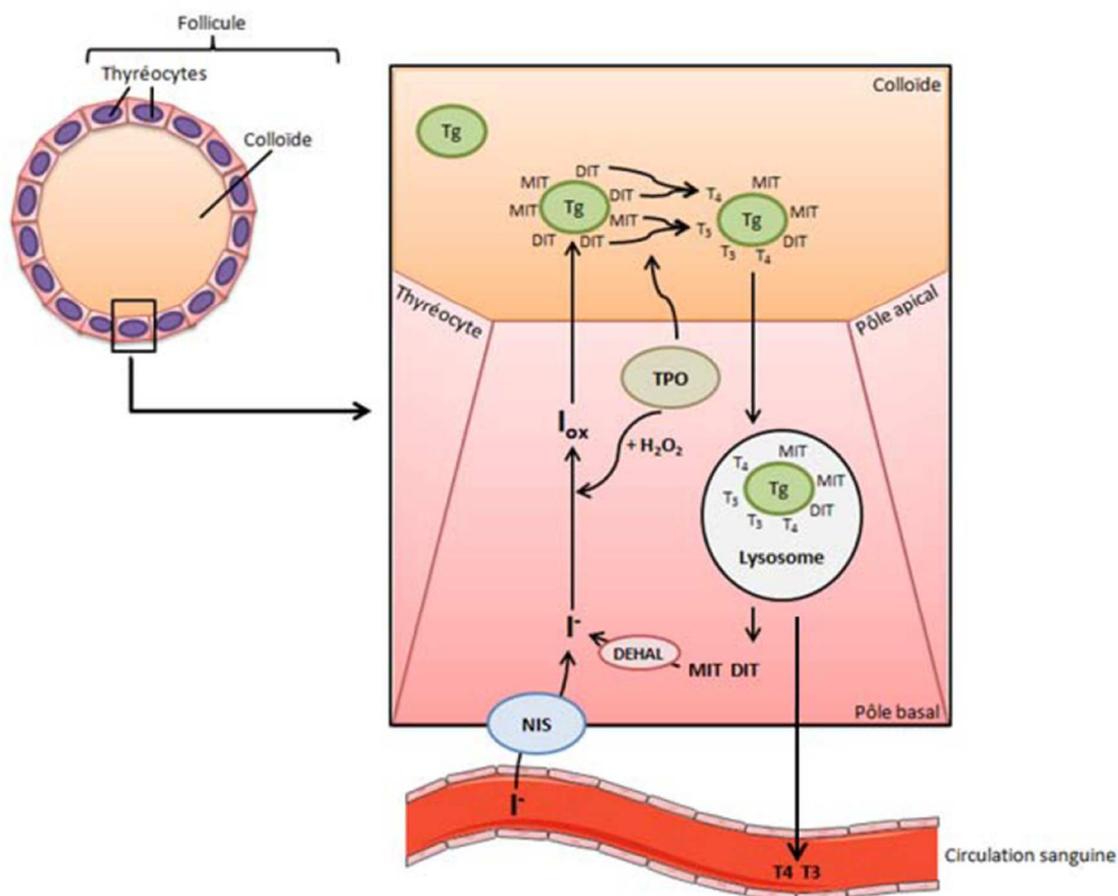


Figure 6 : production des hormones thyroïdiennes par les follicules thyroïdiens. NIS : sodium-iodide symporter ; I : iode ; TPO : thyroperoxydase ; Tg : thyroglobuline ; DEHAL : iodotyrosine déhalogénase ; MIT : monoiodotyrosine ; DIT : diiodotyrosine ; T4 : thyroxine ; T3 : triiodothyronine ⁵⁰

3. Interaction avec les protéines sériques de liaison des hormones thyroïdiennes

Le transport des hormones thyroïdiennes (essentiellement la T4) dans le compartiment sanguin est principalement assuré par trois protéines sériques : la thyroxine binding globuline (TBG), la transthyrétine (TTR) et l'albumine. Néanmoins, des différences inter-espèces existent sur les plans qualitatif et quantitatif. Ainsi, chez l'homme, la TBG est la principale protéine alors que chez les rongeurs, c'est la TTR qui est majoritaire. La majorité des études toxicologiques étant réalisées sur des modèles rongeurs, les interactions de contaminants environnementaux avec les protéines sériques ont essentiellement été décrites pour la TTR ; très peu de données de liaison à la TBG sont disponibles.

Les xénobiotiques affins pour ces protéines sériques sont susceptibles d'entrer en compétition avec la T4, de la déplacer de ses sites de liaison et d'entraîner alors une modification du ratio des concentrations de T4 libre / liée. Les polychlorobiphényles (PCB), plus particulièrement leurs dérivés

par la désiodase 3 qui supprime un atome d'iode sur le cycle interne de la T4. La T3 et la rT3 sont ensuite métabolisées en T2 (diiodothyronine) biologiquement inactive. Les désiodases sont retrouvées dans les organes d'élimination (foie, rein) et de la régulation centrale de l'axe thyroïdien (hypophyse, thyroïde) mais également dans les tissus cibles des hormones thyroïdiennes (SNC, muscles squelettiques, tissus adipeux...) pour réguler les concentrations locales en T3⁵⁵. Les désiodases sont aussi retrouvées dans le placenta, en particulier la désiodase de type 3, où elles contrôlent l'entrée des hormones thyroïdiennes dans le compartiment foetal en activant ou désactivant la T4 par conversion respective en T3 ou en rT3.

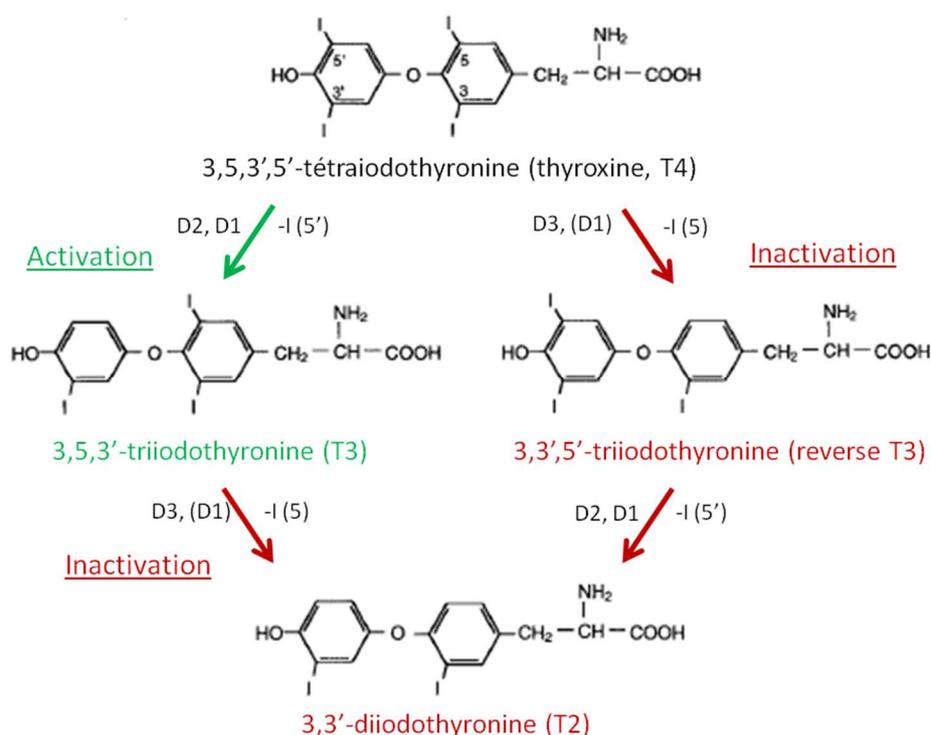


Figure 8 : relations entre les principales hormones thyroïdiennes activées ou inactivées par les différentes désiodases⁵⁶

Certains xénobiotiques ont la capacité d'inactiver les désiodases et entraînent alors une modification des concentrations d'hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine et au niveau des organes cibles. Il est à noter que ces effets peuvent être spécifiques d'un type de désiodase et d'un tissu. L'OMC (octyl-méthoxycinnamate) et la benzophénone 2, deux composés utilisés pour leurs propriétés de filtres UV, réduisent, respectivement chez le rat et *in vitro*, l'activité de la désiodase hépatique de type 1 et perturbent par conséquent la synthèse extrathyroïdiale de T3^{49,57}. Il est à noter que cette diminution a été observée à des doses élevées, respectivement à partir de 333 et 1000 µg/kg d'OMC et de benzophénone 2. L'exposition de rates gestantes à l'hexachlorobiphényle (1,8 mg/kg), un composé de la famille des PCB, augmente l'activité de la désiodase 2 dans l'homogénat de cerveau des

rates et de leurs progénitures ⁵⁸. Le méthoxychlore (5 mg/kg), un insecticide, et le TCDD (tétrachlorodibenzo-p-dioxine ; 5 µg/kg) modifient eux aussi l'activité des désiodases hépatiques *in vivo* ^{59,60}.

5. Perturbation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes

Outre les voies de désiodation, les hormones thyroïdiennes peuvent être métabolisées par les enzymes de phase II du métabolisme hépatique. La T4 peut notamment être prise en charge par des UDPGT (uridine diphosphate glucuronosyltransférases) ou des SULT (sulfotransférases) facilitant ainsi son élimination par voie biliaire. Par conséquent, l'induction des enzymes de glucuronidation et de sulfatation de la T4 augmente la clairance hépatique de cette hormone et diminue ses concentrations circulantes.

Ce mécanisme a été décrit chez des rats traités au fipronil à des doses de l'ordre du µM. Cet insecticide, utilisé notamment en médecine vétérinaire, augmente le catabolisme des hormones thyroïdiennes en induisant l'expression des isoformes UDPGT1a1 et SULT1b1 ⁶¹. De même, le pentachlorophénol, le triclosan ⁶², les PCB hydroxylés ⁶³ et les métabolites des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés ⁴² modulent l'activité des SULT et sont susceptibles de modifier la clairance des hormones thyroïdiennes. L'altération de la clairance des hormones thyroïdiennes *via* une induction des UDPGT a quant à elle été décrite chez des rates exposées à des dioxines (TCDD 200 ng.kg⁻¹.j⁻¹ ; VO) ainsi que chez leurs nouveau-nés ⁶⁴.

6. Perturbation du transfert intracellulaire des hormones thyroïdiennes

Avant d'atteindre les récepteurs nucléaires, les hormones thyroïdiennes doivent franchir les membranes des cellules cibles. Ce transfert est assuré par des transporteurs protéiques des familles suivantes : les Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATP dont l'isoforme OATP1C1 qui transporte spécifiquement les hormones thyroïdiennes), les Multidrug Resistance-associated Proteins (MRP), les Monocarboxylate Transporters (MCT et plus particulièrement l'isoforme MCT8), les L-type Amino acid Transporters (LAT) et la Na/Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) ⁶⁵. Chez l'homme, la mutation du gène codant pour le transporteur MCT8 est d'ailleurs caractérisée par des sévères troubles du développement et des concentrations sanguines en hormones thyroïdiennes anormales

(syndrome Allan-Herndon-Dudley) ⁶⁶. Chez les souris déficientes pour les gènes codant pour les protéines MCT8 et/ou OATP1, les concentrations en hormones thyroïdiennes dans le cerveau sont altérées ^{67,68}.

Les systèmes de transport intracellulaire des hormones thyroïdiennes peuvent être la cible de perturbateurs thyroïdiens. Ainsi, l'exposition de souris à une forte dose de BDE 47 (100 mg.kg⁻¹.j⁻¹), un composé de la famille des PBDE, induit une diminution des concentrations sériques de TT4 associée à une diminution de l'expression des ARNm MCT8 ⁶⁹. Par ailleurs, différents phtalates (di-n-butylphtalate ; n-butylbenzylphtalate) peuvent bloquer *in vitro* la capture intracellulaire de T3 avec une concentration inhibitrice 50% (CI50) de l'ordre du µM ⁷⁰.

7. Modulation de la liaison des hormones thyroïdiennes à leurs récepteurs

Au sein des cellules cibles, les hormones thyroïdiennes (en particulier la T3) se lient à leurs récepteurs nucléaires (Figure 9). Le récepteur forme alors un hétérodimère avec d'autres récepteurs nucléaires tels que RXR (Retinoid X Receptor). Le complexe se fixe ensuite aux domaines TRE (Thyroid hormone Response Element) de l'ADN qui constituent les régions promotrices des gènes cibles des hormones thyroïdiennes. Des facteurs co-activateurs peuvent se lier au complexe et augmenter le taux de transcription de ces gènes. Les co-activateurs les plus connus sont ceux de la famille p160 (SRC-1, GRIP-1 ; pCIP) qui possèdent une activité histone acétyltransférase. Il existe à l'inverse des facteurs co-répresseurs tels que N-CoR (Nuclear Receptor Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptors). En l'absence de ligand, les facteurs co-répresseurs se fixent au TRE et diminuent activement la transcription basale des gènes cibles des hormones thyroïdiennes ⁵⁰.

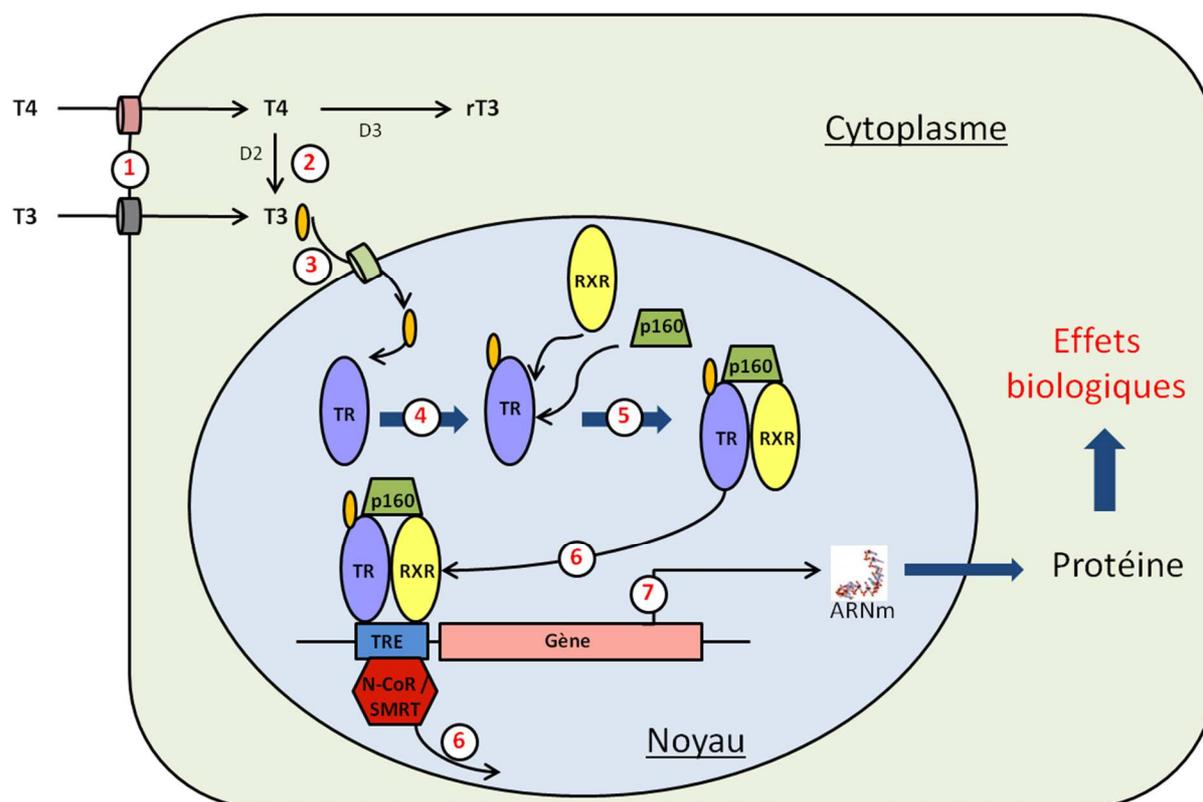


Figure 9 : schéma de la cascade de transduction activée par les hormones thyroïdiennes.

- (1) Transport intracellulaire de T4 ou T3 via les différents transporteurs spécifiques des hormones thyroïdiennes
- (2) Activation en T3 ou inactivation en rT3 de la T4 par les désiodases spécifiques
- (3) Transfert intranucléaire de la T3 via les transporteurs spécifiques
- (4) Liaison de la T3 au récepteur des hormones thyroïdiennes (TR)
- (5) Hétérodimérisation par liaison du récepteur aux hormones thyroïdiennes avec le récepteur aux rétinoïdes (RXR) et fixation d'un co-activateur de la famille p-160
- (6) Fixation du complexe au domaine TRE de l'ADN et décrochage du co-répresseur (N-CoR /SMRT)
- (7) Transcription du gène cible des hormones thyroïdiennes et traduction de l'ARNm aboutissant à un effet biologique.

Les différentes étapes de la cascade de transduction peuvent être modulées par des perturbateurs thyroïdiens. De nombreuses études montrent que les métabolites hydroxylés des PCB bloquent la cascade de transduction induite par la T3⁵¹. Ils inhibent ainsi sur des cultures de cellules d'hypophyse de rat la liaison de la T3 aux récepteurs thyroïdiens à des doses de 1-100 μM ⁷¹. Sur le plan mécanistique, ils empêcheraient le recrutement du co-activateur p160/SRC-1 et supprimeraient ainsi la formation du complexe TR/SRC-1 nécessaire à la transcription des gènes régulés par les hormones

thyroïdiennes⁵⁶. Ces composés entraîneraient également la dissociation de l'hétérodimère TR/RXR au niveau des TRE⁷².

Les PBDE interagissent également avec les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes⁴². Ainsi, sur des cellules CHO (chinese hamster ovary) transfectées, le métabolite hydroxylé 4-OH-BDE-90 (10 µM) a un effet antagoniste sur l'expression de la luciférase contrôlée par les promoteurs des gènes TRα1 et TRβ1⁷³. Le mécanisme impliqué dans la perturbation thyroïdienne des PBDE pourrait passer par la diminution des concentrations circulantes de vitamine A, l'acide rétinoïque co-régulant l'expression des gènes induits par les hormones thyroïdiennes⁹.

Le blocage de l'expression des gènes cibles de la T3 a aussi été décrit pour le TBBPA et certains phtalates tels que le DEHP (di-2-éthylhexyl-phtalate)^{51,71,74}.

B. Modèles d'étude des perturbateurs thyroïdiens

1. Modèles *in vitro*

De nombreux modèles *in vitro* permettent de tester les propriétés perturbatrices thyroïdiennes d'un composé⁷⁵. On peut par exemple citer le test GH3 (ou T-screen) basé sur l'utilisation d'une lignée de cellules tumorales hypophysaires de rat dont la prolifération est contrôlée par l'activation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes. Ainsi, un composé antagoniste des récepteurs diminue la prolifération induite par la T3⁷⁶⁻⁷⁸. D'autres tests *in vitro* évaluent la liaison de composés avec les différentes protéines sériques de transport des hormones thyroïdiennes⁷⁹.

Ces modèles présentent l'avantage de pouvoir tester rapidement un grand nombre de composés avec une large gamme de doses (criblage à haut débit) pour un coût relativement faible. Ils apportent également des éléments de compréhension quant au mécanisme d'action sous-jacent à la perturbation. Néanmoins, l'extrapolation à l'homme des résultats apportés par ce type de modèle reste délicate. En effet, ces modèles très simplifiés ne tiennent pas compte de la complexité de la régulation de la fonction thyroïdienne et de sa capacité à compenser les modulations observées via l'implication de voies parallèles⁷⁵.

2. Modèles amphibiens et zebrafish

A un niveau d'organisation plus intégré, des espèces animales non-mammifères telles que les xénopes et les zebrafish sont très utilisées pour l'étude de la perturbation thyroïdienne^{80,81}. La métamorphose

entre les différents stades de développement de ces animaux est sous le contrôle des hormones thyroïdiennes. Ainsi, l'exposition de stades larvaires de xénopes à des perturbateurs endocriniens est susceptible d'entraîner un ralentissement de la métamorphose pouvant se traduire par un retard de la disparition de la queue ⁸². Des tests sont ainsi réalisés sur des larves de xénopes ou des zebrafish génétiquement modifiés et exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) lors de l'activation du promoteur des gènes sous le contrôle de la T3 dans le système nerveux central ^{74,83}.

Ces modèles permettent cette fois d'effectuer un criblage de xénobiotiques sur des organismes dotés d'un système thyroïdien « complet ». Leur petite taille et leur croissance rapide sont des avantages pour leur utilisation en recherche. Contrairement aux stades de développement plus précoces, le têtard se nourrit dans le milieu extérieur. Son exposition se rapproche ainsi de l'exposition humaine par voie orale. D'autre part, l'étude des effets de composés chimiques sur la métamorphose des amphibiens est très informative sur le plan mécanistique puisque la métamorphose est un processus physiologique strictement dépendant des hormones thyroïdiennes alors que pour beaucoup de processus, les hormones thyroïdiennes sont davantage permissives que déterminantes

En raison de son rôle primordial dans l'homéostasie du métabolisme, le système thyroïdien a été relativement conservé au cours de l'évolution animale. La régulation de la fonction thyroïdienne chez les amphibiens est ainsi proche de celle retrouvée chez l'homme. Néanmoins, il est à noter que chez les têtards, la libération de TSH n'est pas contrôlée par la TRH mais par le CRF (corticotropin-releasing factor) ⁸⁴. Les amphibiens et les poissons se distinguent également de l'homme par le fait que la T4 est majoritairement transportée par l'albumine et la T3 par la transthyrétine ⁸⁵. La séquence d'acides aminés de cette dernière ne présente d'ailleurs que seulement 62% de similarité avec la séquence humaine ⁸⁵. D'autre part, chez les amphibiens, une fois l'ovocyte fécondé, les œufs sont libérés dans le milieu extérieur. Le transfert materno-fœtal d'hormones thyroïdiennes est alors inexistant au cours du développement de l'œuf, ce dernier ne se développant qu'à partir de ses propres réserves. Une autre limite des modèles amphibien et zebrafish réside dans la difficulté d'explorer sur ce type d'organisme les conséquences physiologiques d'une modulation de l'équilibre thyroïdien sur les tissus cibles (le SNC par exemple).

3. Modèles mammifères

Les différences inter-espèces dans la régulation fine de la fonction thyroïdienne se retrouvent au sein même de l'embranchement des mammifères. Ces différences peuvent être d'ordre qualitatif et quantitatif et doivent être prises en considération dans l'extrapolation des résultats à l'homme. La

majorité des études mammifères visant à explorer les effets de composés perturbateurs thyroïdiens sont menées sur le modèle rongeur. Ce dernier présente toutefois des limites physiologiques par rapport à l'homme, ce qui conduit très souvent à la réfutation des effets sur la fonction thyroïdienne mis en émoi chez les rongeurs, notamment dans le cadre d'évaluation toxicologique réglementaire⁸⁶. A l'inverse, compte-tenu des nombreuses similarités physiologiques qu'il partage avec l'espèce humaine du point de vue de l'ontogenèse et de la régulation de la fonction thyroïdienne, le modèle ovin apparaît comme un modèle plus pertinent pour l'étude de la fonction thyroïdienne et des conséquences de sa perturbation.

a) *Chez le fœtus*

L'ontogenèse de la fonction thyroïdienne peut être séparée en 4 phases plus ou moins continues⁸⁷:

- l'embryogenèse de la glande thyroïdienne et de l'hypophyse
- la maturation de l'hypothalamus
- le développement du contrôle neuroendocrinien.
- la maturation du métabolisme tissulaire.

Le tableau 1 compare la mise en place de ces 4 phases chez les espèces ovine, humaine et rat. On remarque que, relativement à la durée de la gestation, l'ontogenèse de la fonction thyroïdienne est semblable entre les espèces ovine et humaine (Figure 11). Ainsi, à la naissance, le nouveau-né ovin présente un système thyroïdien mature comparable à celui observé chez le nouveau-né humain. Ces espèces sont dites « précoces » par opposition aux espèces dites « tardives » telles que le rat⁸⁸. En effet, les rongeurs sont caractérisés par le développement post-natal d'un grand nombre d'évènements clés de la régulation thyroïdienne. Ainsi, le développement de l'hypophyse et le rétrocontrôle se poursuivent après la naissance. La synthèse de T4 et T3 débute au 20^{ème} jour de gestation mais les concentrations sériques continuent d'augmenter au cours des 3 premières semaines post-partum. De plus, bien que la TRH soit présente dans l'hypothalamus, elle ne semble pas influencer l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien jusqu'à la fin de la 2^{ème} semaine post-natale. La fonction thyroïdienne du nouveau-né humain ou ovin est ainsi comparable à celle d'un raton de 15-20 jours.

Chez les fœtus humain et ovin, au cours de la 2^{ème} moitié de gestation, la concentration sérique de T4 augmente de façon importante au fur et à mesure de la fonctionnalisation des follicules thyroïdiens (Figure 10). Parallèlement à l'augmentation de la concentration sérique de T4, la concentration sérique de rT3 augmente. Chez le fœtus ovin, la rT3 reste élevée jusqu'à la naissance avant de diminuer brusquement alors que chez le fœtus humain, la réduction s'opère dès la 30^{ème} semaine de grossesse. L'essentiel de la production de rT3 provient de la conversion de T4 en rT3 sous l'action de la désiodase 3 dont l'activité dans les tissus fœtaux et le placenta reste très forte jusqu'à la naissance chez le fœtus

ovin. Durant la maturation, les concentrations sériques de T3 sont très faibles chez les deux espèces en raison d'une activité minimale de la désiodase 1 (catalyse la conversion de T4 en T3). Quelques jours avant la naissance, les concentrations sériques de T3 augmentent fortement chez les deux espèces sous l'influence d'un pic de TSH.

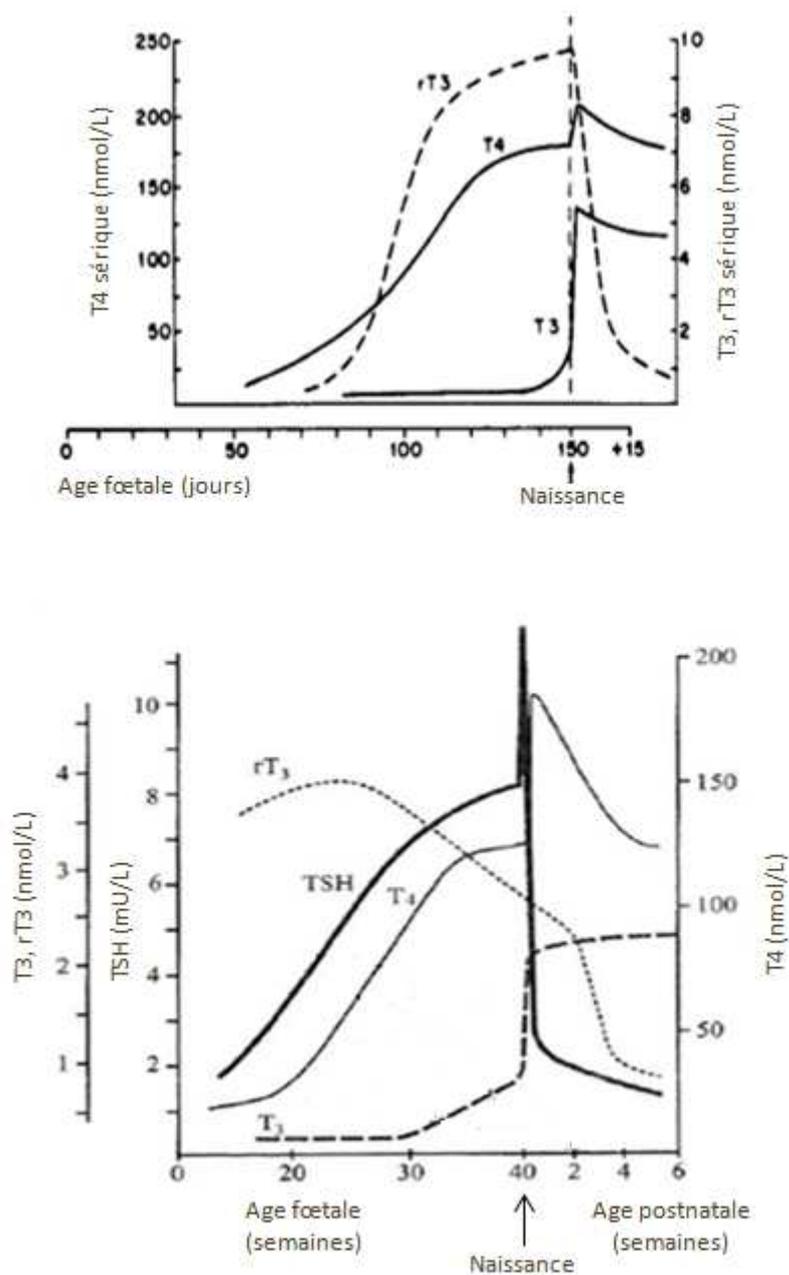


Figure 10 : décours temporel des concentrations sériques de T4, T3 et rT3 au cours de la période de maturation chez le fœtus ovin (en haut)⁸⁹ et chez le fœtus humain (en bas)⁹⁰

Tableau 1 : comparaison de la chronologie des principales phases de l’ontogenèse de la fonction thyroïdienne chez les espèces humaine, ovine et rat ⁸⁷

Espèce	Phases du développement			
	Embryogenèse	Maturation de l’hypothalamus	Développement du contrôle neuroendocrinien	Maturation du métabolisme périphérique
	a) Développement de la thyroïde jusqu’aux follicules matures b) Développement de l’hypophyse incluant la synthèse hormonale	a) Maturation histologique b) Augmentation de la concentration sanguine de TRH c) Maturation du plexus portal primaire	a) Augmentation des concentrations de TSH sériques et hypophysaires b) Maturation du rétrocontrôle négatif c) Maturation de la réponse à la TRH	a) Augmentation de la concentration sérique de T3 c) Diminution des concentrations sériques de rT3 d) Equilibration des taux de production T3 / rT3
Mouton (145 jours de gestation)	0 – 12 ^{ème} semaines de gestation	10 ^{ème} – 30 ^{ème} semaines de gestation	16 ^{ème} semaine de gestation – 1 ^{er} mois post-partum	30 ^{ème} semaine de gestation – 1 ^{er} mois post-partum
Homme (40 semaines de gestation)	0 – 60 ^{ème} jours de gestation	60 ^{ème} – 150 ^{ème} jours de gestation	70 ^{ème} jour de gestation – 1 ^{ère} semaine post-partum	120 ^{ème} jour de gestation – 1 ^{er} mois post-partum
Rat (22 jours de gestation)	0 – 20 ^{ème} jours de gestation	16 ^{ème} jour de gestation – 3 ^{ème} semaines post-partum	4 ^{ème} – 18 ^{ème} jours post-partum	Naissance à 26 ^{ème} jour post-partum

b) *Chez l'adulte*

Le mouton et le rat présentent des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes relativement proches de celles retrouvées chez l'homme (Tableau 2). La souris possède quant à elle une concentration plasmatique en T4 totale presque 2 fois plus faible que l'homme. Alors que les fractions de T3 et T4 libres sont semblables chez l'homme et le mouton, celles-ci sont plus élevées chez les rongeurs. Ceci peut être attribué aux différences inter-espèces de protéines sériques de transport des hormones thyroïdiennes. Chez l'homme et le mouton, la majorité de la T4 est liée à la Thyroxine Binding Globuline (TBG) qui présente de surcroît des constantes de dissociation très proches entre les deux espèces (0,105 et 0,112 nmol/L respectivement chez l'homme et le mouton)⁹¹. Chez les rongeurs, la TBG étant absente à l'âge adulte, le transport des hormones thyroïdiennes est majoritairement assuré par la transthyréline (TTR)^{92,93}. Cette protéine est également retrouvée chez l'homme et le mouton. En revanche, elle ne prend en charge qu'une faible fraction de la T4 liée.

Tableau 2 : comparaison des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales, des fractions libres et des temps de demi-vie des hormones thyroïdiennes chez l'homme, le mouton, le rat et la souris^{65,91}

	Homme	Mouton	Rat	Souris
Concentration plasmatique de T3 totale (pg/mL)	1,2	0.8 – 1.6	0,7	0,7
Concentration plasmatique de T4 totale (ng/mL)	78	52-56	54	24
Fraction de T3 libre (%)	0.3	0.3	0,54	0,35
Fraction de T4 libre (%)	0.02	0.02	0,04	0,06
Temps de demi-vie de la T4 (jours)	5 - 9	1,5	0,5 - 1	0,5 – 0,75

La liaison d'une hormone étant généralement associée à une plus faible clairance métabolique, certains auteurs suggèrent que ces systèmes de transport joueraient un rôle déterminant dans la

protection des hormones thyroïdiennes vis-à-vis de leur catabolisme périphérique. Ceci expliquerait l'élimination plus importante et le temps de demi-vie plus court des hormones thyroïdiennes chez les espèces n'exprimant pas la TBG, la plus efficace de ces protéines (Tableau 2)⁹⁴. Ainsi, un rat dépourvu de thyroïde fonctionnelle nécessite, relativement au poids corporel, un apport de T4 dix fois plus important qu'un homme adulte pour restaurer les concentrations physiologiques⁸⁶. Cette divergence d'espèces sur le système de transport pourrait expliquer, au moins partiellement, la plus grande sensibilité du rat que le mouton à des perturbateurs thyroïdiens⁹⁵ mais cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée à ce jour.

c) *Chez la mère*

Chez la femme (Figure 11), sous l'influence des œstrogènes dont la concentration sanguine augmente au cours de la grossesse, la concentration sérique de TBG augmente au cours des premières semaines de grossesse avant d'atteindre un plateau⁹⁶⁻⁹⁸. Ceci a pour conséquence une augmentation de la capacité de transport sériques des hormones thyroïdiennes et donc une augmentation des concentrations sériques de T4 et T3 totales lors des premières semaines de grossesse^{99,100}. Le pic de concentration sérique de β -hCG (human chorionic gonadotrophin) stimule en début de grossesse la glande thyroïdienne et entraîne alors une brève augmentation de la concentration sanguine de T4 libre en parallèle d'une baisse de la TSH^{99,101}. Dans la 2^{nde} moitié de grossesse, les concentrations sériques en T4 et T3 libres diminuent légèrement (10-15%)⁹⁹.

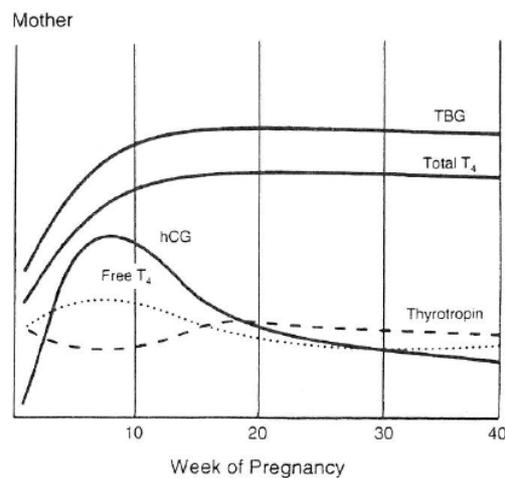


Figure 11 : déroulement temporel des concentrations sanguines de T4 totale et libre, TBG, thyrotropine et d'hCG au cours de la grossesse chez la femme⁵⁰

Chez la brebis gestante, le déroulement temporel des concentrations sériques en hormones thyroïdiennes diffère de celui décrit chez la femme. Bien que les données soient rares avant 40 jours de gestation, il semble que la T4 totale et la T4 libre augmentent du 30^{ème} au 45^{ème} jour de gestation⁶¹. Elles diminuent

ensuite régulièrement entre le 50^{ème} et le 145^{ème} jour de gestation (Figure 12)^{102,103}. La T3 totale diminue également entre les jours 50 et 130 de gestation avant de remonter lors des derniers jours avant la parturition.

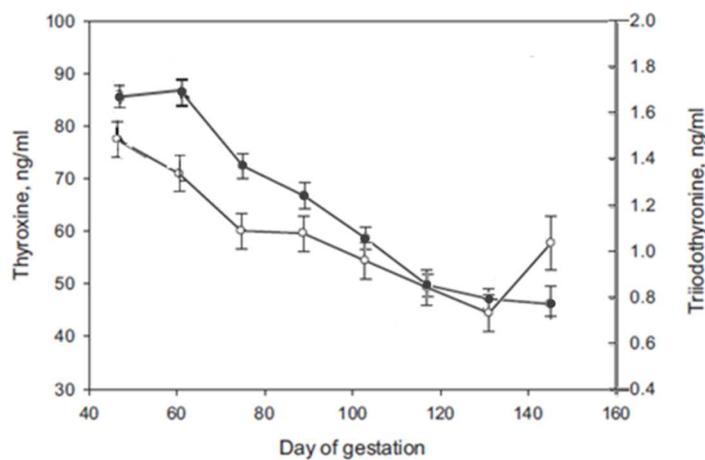


Figure 12 : décours temporel des concentrations (moyenne \pm SEM) sériques de T4 (ronds noirs) et T3 (ronds blancs) totales chez la brebis au cours de la gestation¹⁰²

III. Régulation du développement du système nerveux central par le système thyroïdien

Les préoccupations associées aux perturbateurs thyroïdiens sont essentiellement centrées sur l'exposition prénatale en raison de la forte sensibilité du fœtus à des modifications de l'équilibre thyroïdien. En effet, le développement du système nerveux central (SNC) est sous la stricte dépendance des hormones thyroïdiennes. Cette relation est d'ailleurs dramatiquement illustrée chez l'homme par le syndrome de crétinisme, une maladie causée par une déficience sévère en hormones thyroïdiennes au cours de la grossesse et se caractérisant par des troubles cognitifs et moteurs importants ainsi que par des malformations structurales.

Cette partie se focalise dans un premier temps sur les particularités de la physiologie thyroïdienne durant la gestation puis dans un second temps sur les conséquences d'une perturbation thyroïdienne sur le développement du SNC.

A. Origines des hormones thyroïdiennes chez le fœtus

Les hormones thyroïdiennes détectées chez le fœtus au cours de la grossesse proviennent à la fois des systèmes thyroïdiens maternel et fœtal (Figure 13).

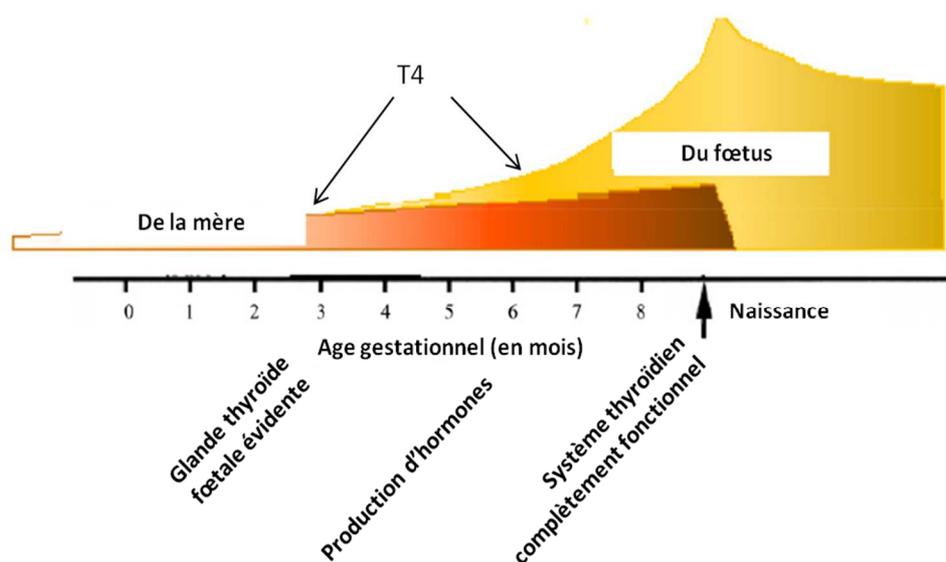


Figure 13 : origines materno-fœtales de la thyroxine (T4) retrouvée dans le sang fœtal au cours de la période périnatale ⁴⁰

Dans l'espèce humaine, le système thyroïdien fœtal n'est pas fonctionnel jusqu'à la fin du premier trimestre de grossesse^{40,87,104}. Le fœtus est dès lors totalement dépendant de l'apport maternel en hormones thyroïdiennes pour répondre à ses besoins les plus précoces. Pendant de nombreuses années, les biologistes ont pensé, en raison de la faible sensibilité des techniques de dosage des hormones thyroïdiennes, que le placenta constituait une barrière imperméable aux hormones thyroïdiennes et que le transfert materno-fœtal était nul. Ceci était de surcroît renforcé par la forte activité placentaire de la désiodase de type 3, catalysant la conversion de T4 en rT3 biologiquement inactive et protégeant ainsi le fœtus d'un excès d'hormones thyroïdiennes^{39,105}. Néanmoins, l'amélioration des techniques analytiques a permis de révéler qu'en réalité, la concentration fœtale en T4 est directement liée à la concentration maternelle en T4 puisqu'une fraction des hormones thyroïdiennes maternelles échappe au placenta et rejoint le compartiment fœtal¹⁰⁵. Cette fraction reste très faible : entre 13 et 17 semaines d'aménorrhée, les concentrations de T4 totale (TT4) dans le sang fœtal sont plus de 100 fois inférieures aux concentrations maternelles de TT4 et ce ratio est encore plus important pour la T3 totale¹⁰⁶. Cependant, compte-tenu des faibles concentrations en protéines sériques de transport des hormones thyroïdiennes chez le fœtus durant les premières semaines de grossesse, les concentrations sériques en hormones libres et donc biodisponibles pour les tissus cibles sont relativement élevées (Figure 14)¹⁰⁵. Ainsi, entre 13 et 17 semaines d'aménorrhées, la concentration sanguine en T4 libre (fT4) chez le fœtus représente au moins un tiers de la concentration en fT4 retrouvée chez la mère, soit une concentration biologiquement active chez l'adulte¹⁰⁶.

Sous l'action des désiodases, en particulier de la désiodase de type 2 dont l'activité a été démontrée dès le 1^{er} trimestre de grossesse, la T4 est convertie au sein des tissus cibles en T3 qui possède une forte affinité pour les récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes¹⁰⁷. Ces derniers sont d'ailleurs présents dès 10 semaines d'aménorrhée dans le cerveau fœtal. Leur concentration est multipliée par un facteur 10 entre la 10^{ème} et la 16^{ème} semaine de grossesse, période correspondant à la multiplication neuroblastique¹⁰⁸. Le taux d'occupation des récepteurs par la T3 durant cette période est de 25-30%¹⁰⁵.

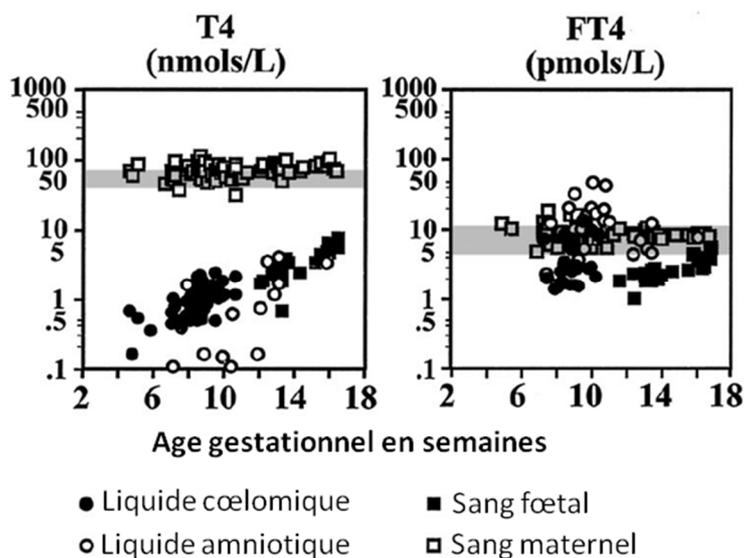


Figure 14 : comparaison des concentrations de T4 totale (à gauche) et libre (à droite) dans le sang maternel, le sang fœtal, le liquide amniotique et le liquide cœlomique au cours des 18 premières semaines d'aménorrhées. La zone grisée représente l'intervalle de confiance à 95% des concentrations retrouvées chez l'adulte euthyroïdien ¹⁰⁶

A partir du 2^{ème} trimestre de grossesse, l'axe thyroïdien fœtal se met en place progressivement chez l'espèce humaine. Bien que visible dès 16-17 jours de grossesse, la glande thyroïdienne fœtale ne prend sa position anatomique définitive qu'à partir de 45-50 jours. L'organisation folliculaire se met en place entre 47 et 80 jours. Aux alentours du 74^{ème} jour, la glande est capable de fixer l'iode et de synthétiser les hormones ^{87,109}. Le degré de maturation de la glande augmente au cours de la 2^{ème} moitié de grossesse et se traduit par une augmentation de la production d'hormones. Le système thyroïdien maternel continue toutefois à « alimenter » le fœtus de façon constante jusqu'à la fin de la grossesse pour subvenir aux besoins métaboliques fœtaux.

L'ensemble de ces éléments souligne l'importance de la contribution du système thyroïdien maternel dans la régulation des niveaux d'hormones thyroïdiennes retrouvées chez le fœtus, notamment durant la première moitié de grossesse. Le suivi de l'homéostasie thyroïdienne maternelle est donc primordial pour limiter les risques d'hypothyroïdie gestationnelle susceptibles d'altérer le développement du SNC fœtal. La TSH maternelle est généralement utilisée comme biomarqueur d'une hypothyroïdie. Toutefois, ce biomarqueur reste peu précis et très distal par rapport à une perturbation. En effet, la concentration sérique en T4 totale chez la mère peut être diminuée sans qu'il n'y ait de répercussions sur les concentrations sériques de T3 et de TSH ^{40,104,109}. Ce contexte biologique, appelé hypothyroxinémie, serait 150 à 200 fois plus fréquent qu'une véritable hypothyroïdie congénitale ¹¹⁰. Or, les concentrations en fT4 retrouvées chez le fœtus dépendent directement des concentrations

maternelles de T4. Par conséquent, sans que la TSH maternelle ne soit impactée, une hypothyroxinémie maternelle peut être associée, notamment durant la première moitié de grossesse, à une faible concentration fœtale de fT4 et donc à des niveaux de T3 dans le SNC possiblement insuffisants pour palier à l'intégralité de ses besoins physiologiques ¹⁰⁵.

B. Conséquences d'une perturbation thyroïdienne sur le développement du SNC

1. Critères régissant la nature et l'intensité des altérations du SNC

a) Degré d'insuffisance thyroïdienne

Les conséquences d'une hypothyroïdie maternelle et/ou fœtale sur le développement du SNC sont évidemment corrélées au degré d'insuffisance en hormones thyroïdiennes (Figure 15). Ainsi, les altérations profondes du développement physique et mental de l'enfant ne sont retrouvées que pour des hypothyroïdies sévères détectées de façon précoce aujourd'hui. Si les conséquences sur le développement du SNC d'une hypothyroïdie clinique sont désormais bien caractérisées (développement psychomoteur retardé, troubles cognitifs sévères, déficits de l'attention, des performances visuelles et motrices...), des interrogations persistent sur les effets d'une hypothyroïdie plus modérée voire d'une hypothyroxinémie, c'est-à-dire pour des modifications subtiles de l'équilibre thyroïdien susceptibles d'être induites par une exposition à des perturbateurs thyroïdiens. Certaines études suggèrent toutefois que ces contextes pourraient être associés à la survenue d'anomalies du neurodéveloppement, d'augmentation du temps de réactivité ou encore à la perte de points de quotient intellectuel ^{104,109,111-113}.

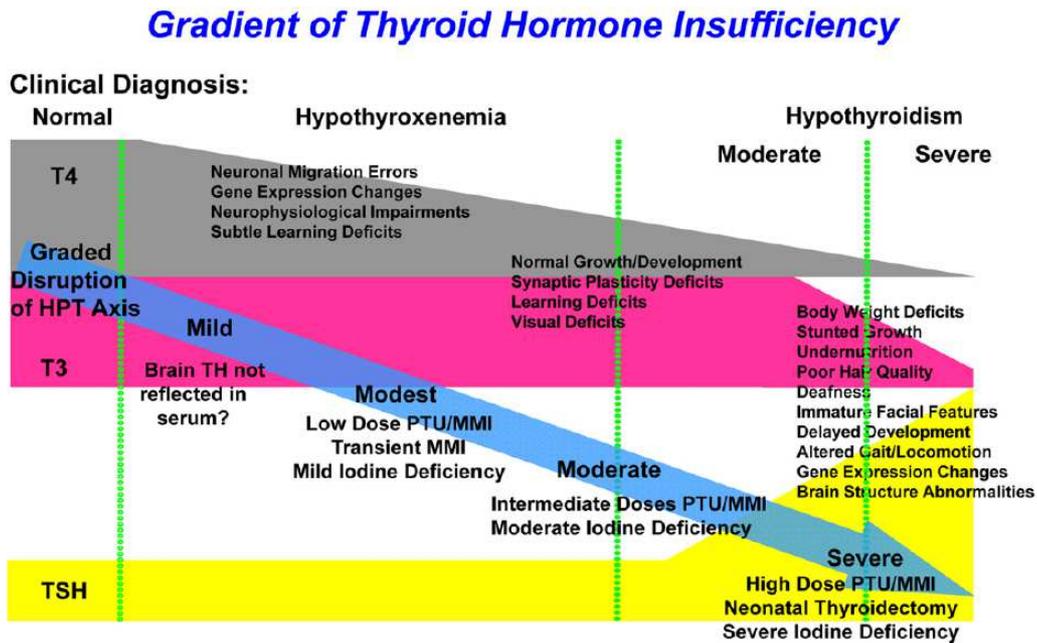


Figure 15 : effets de différents degrés d'insuffisance en hormones thyroïdiennes sur le développement du SNC observés chez l'homme et l'animal ⁴⁰

b) Période d'insuffisance thyroïdienne

Outre le degré d'insuffisance en hormones thyroïdiennes, la fenêtre de temps et la durée durant lesquelles la perturbation thyroïdienne survient régissent également le type d'anomalies observées ^{40,114}. En effet, l'activité dans les tissus cibles des désiodases 2 et 3, qui régulent localement les concentrations en T3 et rT3, varie spatialement (entre les différentes structures du SNC) et temporellement ^{105,115}. Ainsi, en fin de 1^{er} trimestre, l'activité dans le cortex de la désiodase 2 est importante et celle de la désiodase 3 est très faible, favorisant alors la production *in situ* de T3 et donc l'activation des gènes cibles des hormones thyroïdiennes. Au contraire, dans le cervelet, la concentration de T3 est très faible à cette période et augmente seulement à mi-grossesse ¹⁰⁷. La Figure 16 présente, chez l'espèce humaine, les événements et les structures cérébrales se mettant en place au cours de la gestation sous le contrôle des hormones thyroïdiennes. Elle définit par continuité les anomalies assimilables à une perturbation thyroïdienne à un temps donné. Ainsi, une diminution des concentrations en hormones thyroïdiennes chez le fœtus au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse aura un impact important sur le cervelet alors que le cortex sera moins impacté. On note que le début de la prolifération et de la migration neuronale intervient au cours du 1^{er} trimestre et est donc intégralement sous le contrôle des hormones thyroïdiennes apportées par le système maternel.

La forte spécificité spatiale et temporelle de l'activité des désiodases explique que même une brève déficience en hormones thyroïdiennes peut avoir des conséquences importantes sur le développement du SNC ^{105,116}.

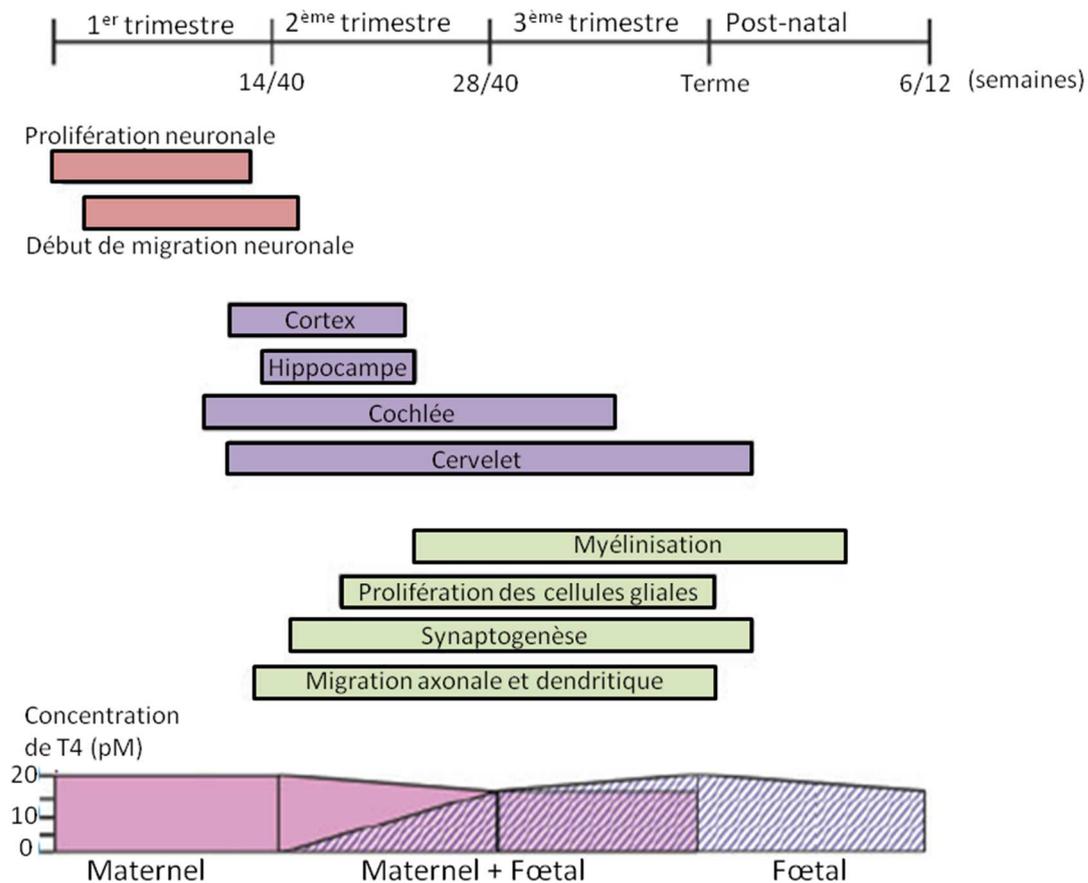


Figure 16 : schéma de la relation existant entre la fonction thyroïdienne (maternelle et fœtale) et la mise en place des principales étapes du développement du SNC ¹¹⁷

2. Altérations de l'ontogenèse du SNC

La fonction thyroïdienne présente un rôle critique dans un grand nombre d'étapes clés du développement cérébral : la prolifération cellulaire, la migration neuronale, la synaptogenèse, la différenciation cellulaire et la myélinisation. Une modification des concentrations en hormones thyroïdiennes maternelles et/ou fœtales peut donc altérer chacune de ces étapes et conduire à des dommages possiblement irréversibles.

a) Prolifération cellulaire

Les mécanismes de prolifération cellulaire sont sous la dépendance des hormones thyroïdiennes qui agissent majoritairement via les récepteurs TR α 1¹¹⁶. Une hypothyroïdie périnatale se traduit chez le raton et le souriceau par une réduction du nombre de cellules progénitrices de la couche granulaire externe du cervelet¹¹⁸ et un ralentissement de leur prolifération¹¹⁹. Des observations similaires ont été décrites dans l'hippocampe. Ainsi, le nombre de cellules granulaires hippocampales est diminué chez des ratons issus de mères hypothyroïdiennes¹²⁰. Sur un modèle de souris hypothyroïdienne (par modification génétique), le gyrus denté présente des altérations de la neurogenèse restaurées par l'apport de T3 exogène¹²¹. Par ailleurs, chez l'embryon de souris, la T4 contrôle l'expansion du néocortex à partir de la zone subventriculaire¹²².

b) Migration cellulaire

Chez des souris présentant une mutation du gène codant pour le récepteur TR α (sans modification des concentrations sériques de T3), la migration radiale des précurseurs de cellules granulaires du cervelet est perturbée¹²³. Sur un modèle de rat *rdw* muté sur le gène codant pour la thyroglobuline, l'hypothyroïdie gestationnelle induite entraîne similairement un retard de la migration des cellules granulaires du cervelet se reflétant par un épaississement de la couche granulaire externe chez les ratons âgés de 15 jours¹²⁴. Ces modifications ont été observées pour une hypothyroïdie majeure puisque la T3 et la T4 étaient respectivement diminuées de plus de 60 et 80%.

La migration neuronale est également sous le contrôle des hormones thyroïdiennes dans le cortex. Ainsi, les migrations radiale et tangentielle sont respectivement perturbées dans le cortex somatosensitif et dans l'éminence ganglionnaire médiane corticale de nouveau-nés rongeurs issus de mères traitées avec des agents antithyroïdiens (T4 sérique diminuée d'environ 30%)^{125,126}. Par ailleurs, des altérations de migration neuronale révélées par la localisation anormale de cellules de cortex somatosensitif et d'hippocampe ont été mises en évidence chez des ratons issus de mères présentant une hypothyroxinémie sévère (T4 diminuée de plus de 90%) causée par un régime appauvri en iode et/ou un traitement par un agent antithyroïdien¹¹⁰. Une hypothyroïdie gestationnelle caractérisée par une diminution de 45% de la T4 sérique induit aussi dans le corps calleux de ratons une malformation bilatérale correspondant à un défaut de migration neuronale¹²⁷.

c) Synaptogenèse

Le rôle des hormones thyroïdiennes dans la synaptogenèse est particulièrement visible sur les cellules de Purkinje du cervelet. Ces neurones GABAergiques sont impliqués dans la coordination motrice. Ils émettent, à partir de leurs corps cellulaires regroupés dans la couche de Purkinje, un très grand nombre de dendrites formant une véritable arborisation dendritique dans la couche moléculaire du cervelet. La mise en place de cette arborisation est perturbée par un contexte d'hypothyroïdie^{128,129} (Figure 5). Ainsi, sur un modèle de rat *rdw* hypothyroïdien (T3 et T4 diminuées respectivement de 60 et 80%), les nouveau-nés présentent, à 15 jours post-natal, des anomalies de la morphogenèse du cortex cérébelleux se traduisant notamment par une arborisation dendritique retardée et un amincissement de la couche moléculaire¹²⁴. Ces modifications histologiques sont associées à une hypoactivité et à des défauts de coordination motrice. Un retard de l'arborisation dendritique et une perturbation de la migration des cellules granulaires externes du cervelet ont également été décrits sur un modèle de souris présentant un récepteur aux hormones thyroïdiennes muté et ne pouvant pas fixer la T3¹³⁰. La perturbation de l'arborisation est aussi particulièrement bien visible sur des modèles de cellules de Purkinje issues de rats et mises en culture avec ou sans T4^{131,132}, ce qui démontre le rôle essentiel des hormones thyroïdiennes sur le bon développement du cervelet (Figure 17).

Les hormones thyroïdiennes contrôlent également la synaptogenèse au niveau des noyaux caudés puisque l'exposition de rates à un agent antithyroïdien durant la gestation et la lactation entraîne une diminution du nombre de dendrites au sein des noyaux caudés des nouveau-nés¹³³.

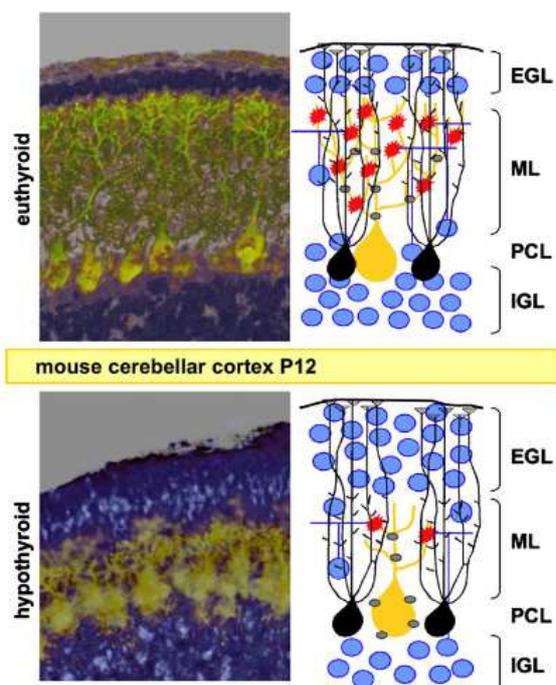


Figure 17 : effets d'une hypothyroïdie congénitale sur le développement du cortex cérébelleux chez une souris à 12 jours post-natal. EGL = couche granulaire externe ; ML = couche moléculaire ; PCL = couche des cellules de Purkinje ; IGL = couche cellulaire interne ¹³⁴

d) Différenciation et maturation

Le traitement de rates gestantes avec un agent antithyroïdien induit un retard et un prolongement de la différenciation cellulaire dans les couches granulaires moléculaire et interne du cervelet des rats ¹¹⁹. Sur un modèle rat présentant une hypothyroïdie sévère induite par un traitement pharmacologique, la prolifération et la différenciation des précurseurs des inter-neurones GABAergiques sont ralenties dans le cervelet des nouveau-nés entraînant une accumulation de ces précurseurs neuronaux et une diminution du nombre d'inter-neurones GABAergiques ¹³⁵. Les hormones thyroïdiennes agissent également sur la différenciation des précurseurs de cellules gliales en oligodendrocytes ou en astrocytes. Ainsi, la différenciation de la glie de Bergmann, constituée de cellules astrocytaires de la couche granulaire interne du cervelet, est retardée chez des souris mutées pour les récepteurs aux hormones thyroïdiennes ¹²³. Par ailleurs, chez des rates gestantes, le traitement au propylthiouracile induit chez les rats une diminution dose-dépendante des concentrations sériques de T4 totale, associée à une diminution de l'expression du facteur MAG (Myelin-Associated Protein, marqueur des oligodendrocytes) et à une augmentation de l'expression GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, marqueur des astrocytes) dans le corps calleux et la commissure antérieure (Figure 18) ¹³⁶.

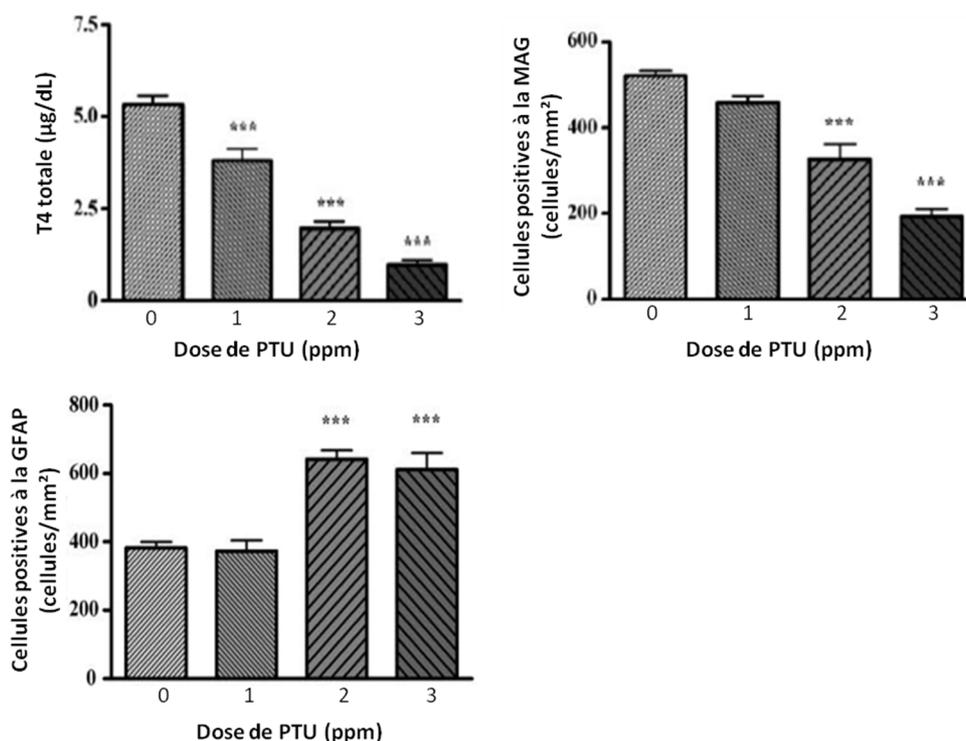


Figure 18 : diminution de la concentration sérique de T4 et altération de la différenciation des précurseurs des cellules gliales en oligodendrocytes exprimant le facteur MAPG (myelin-associated glycoprotein) ou en astrocytes exprimant le facteur GFAP (glial fibrillary acidic protein) dans le corps calleux de rats issus de mères traitées avec du propylthiouracile (PTU), un agent antithyroïdien ¹³⁶

e) Myélinisation

Compte-tenu de l'implication des hormones thyroïdiennes dans la différenciation des cellules gliales et du rôle essentiel des oligodendrocytes dans la production de myéline ¹³⁷, il n'est pas surprenant qu'une hypothyroïdie soit associée à une myélinisation retardée et plus faible ¹³⁸. Ainsi, suite à une hypothyroïdie périnatale, le nombre d'axones myélinisés dans le corps calleux et la commissure antérieure est anormalement faible chez le rat adulte ¹¹⁶. Sur un modèle de souris présentant un récepteur aux hormones thyroïdiennes muté et ne pouvant pas fixer la T3, une diminution de l'expression ARNm de la MBP (Myelin Basic Protein) a été notée ¹³⁰. Par ailleurs, le défaut de maturation axonale observé chez des animaux hypothyroïdiens empêche un grand nombre d'axones d'avoir un diamètre suffisant pour être myélinisés ¹¹⁶.

f) Altérations biochimiques

Les modifications histologiques sont associées à des altérations des concentrations en neurotrophines, des facteurs impliqués dans la croissance et la survie neuronale. Ainsi, l'exposition périnatale de rats

au propylthiouracile (agent antithyroïdien) réduit de façon dose-dépendante l'expression d'ARNm du facteur Ngf (Nerve Growth Factor)¹³⁹. L'exposition de rats adultes à cet agent induit une hypothyroïdie sévère (fT4 diminuée de 71% et TT3 de 44%) et augmente l'expression ARNm du facteur BDNF (Brain-Derived Neurotrophin Factor) dans l'hippocampe¹⁴⁰.

Par ailleurs, les hormones thyroïdiennes modulent le système GABAergique comme en témoigne la suppression de l'inhibition GABAergique chez des rats adultes présentant une hypothyroïdie périnatale sévère (T4 diminuée de 70% ou plus et T3 réduite de 30 à 70%)¹⁴¹. Les études semblent plutôt converger vers une diminution des concentrations de GABA dans le SNC d'animaux hypothyroïdiens¹⁴². Celle-ci pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression de la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase), l'enzyme responsable de la synthèse de GABA à partir du glutamate, comme montré dans l'hippocampe de rats exposés durant la période périnatale au méthimazole (0,0025% dans l'eau), un inhibiteur de la synthèse d'hormones thyroïdiennes¹⁴³. Toutefois, toutes les études ne convergent pas puisque certaines mettent en évidence au contraire une augmentation de la concentration de GABA dans le SNC d'animaux hypothyroïdiens^{142,144,145}.

Les concentrations de dopamine et de sérotonine sont également modulées par un contexte d'hypothyroïdie. La dopamine est augmentée dans la substance noire et diminuée dans le striatum d'un modèle de rat génétiquement modifié pour présenter une hypothyroïdie gestationnelle (T3 et T4 respectivement diminuées de 60 et 80%)¹²⁴. Ces résultats suggèrent une altération du transport nigro-striatal de la dopamine. L'administration de propylthiouracile à des rats de 3 semaines entraîne une hypothyroïdie marquée (T3 et T4 diminuées de 70-90% ; TSH augmentée de 240-400%) et une diminution de la dopamine et de la sérotonine dans le cortex, le complexe thalamus-hypothalamus, le pons et le cervelet des animaux¹⁴⁶.

Le système cholinergique représente également une cible des hormones thyroïdiennes. L'acétylcholine est synthétisée à partir de choline et d'acétate par l'acétylcholine-transférase et est dégradée par l'acétylcholinestérase. L'activité de l'acétylcholinestérase est diminuée dans le striatum, le cortex cérébral, le cortex préfrontal, l'hippocampe et le cervelet de rongeurs nouveau-nés issus de mères traitées par différents agents antithyroïdiens¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. L'activité de l'acétylcholine transférase est également diminuée dans un contexte d'hypothyroïdie. Suite à l'exposition périnatale de rats au propylthiouracile (15-25 mg/L) ou à l'Aroclor 1254® (mélange de PCB ; environ 1 mg.kg⁻¹.j⁻¹), les rats développent une hypothyroïdie associée à une diminution de l'activité de l'acétylcholine transférase respectivement dans le cortex et l'hippocampe¹⁵⁰ ou dans le prosencéphale basale et l'hippocampe¹⁵¹. L'activité de l'acétylcholine transférase est restaurée après l'arrêt du traitement au propylthiouracile¹⁵⁰.

Malheureusement, la très grande majorité des effets sur le développement du SNC d'un déficit en hormones thyroïdiennes a été mise en évidence pour des hypothyroïdies sévères. Les données décrivant les effets d'une hypothyroïdie plus modérée sont beaucoup plus rares. C'est là une lacune pour l'évaluation des perturbateurs thyroïdiens qu'il s'agit de combler de façon urgente.

C. Modèles mammifères d'étude de la relation SNC - thyroïde

Les différences inter-espèces décrites pour l'ontogenèse du système thyroïdien sont également présentes pour le développement du SNC.

Chez le mouton, la chronologie des principales étapes de la neurogenèse est relativement proche de celle observée chez l'homme. En effet, chez ces deux espèces dites « précoces », le développement du SNC est essentiellement *in utero*. Ainsi, la synaptogenèse et la myélinisation sont déjà bien avancées à la naissance (Figures 19 et 20). Cette similitude favorise l'extrapolation à l'espèce humaine des effets observés sur le SNC du fœtus ovin.

L'extrapolation du rat à l'homme est quant à elle plus délicate. En effet, chez le rat, le développement du SNC est plus tardif et se déroule majoritairement après la naissance (Figure 20). Selon Legrand (1984)¹¹⁶, « le nouveau-né raton peut être comparé à un fœtus humain au deuxième trimestre de grossesse, et un nouveau-né humain à un rat âgé de 6-10 jours ». Chez le rat, l'influence maternelle sur les mécanismes de neurogenèse tardifs est donc plus limitée que pour les espèces précoces. De nombreux processus du développement du SNC ne sont régulés que par la fonction thyroïdienne du nouveau-né. En outre, cela pose un problème du point de vue de l'exposition aux perturbateurs endocriniens du fœtus à ces stades tardifs critiques puisque, chez les rongeurs, elle sera affranchie de la barrière placentaire.

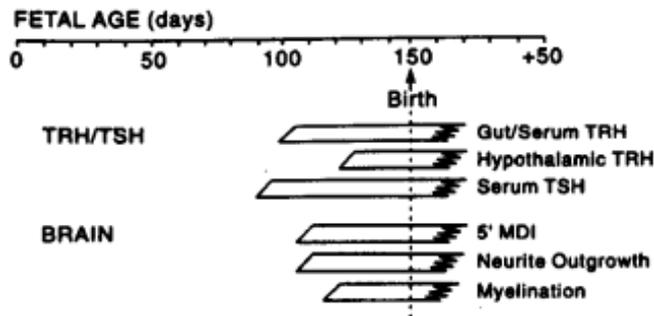


Figure 19 : développement de la fonction thyroïdienne et du système nerveux central de la conception au 50ème jour post-natal chez l'espèce ovine ⁸⁹

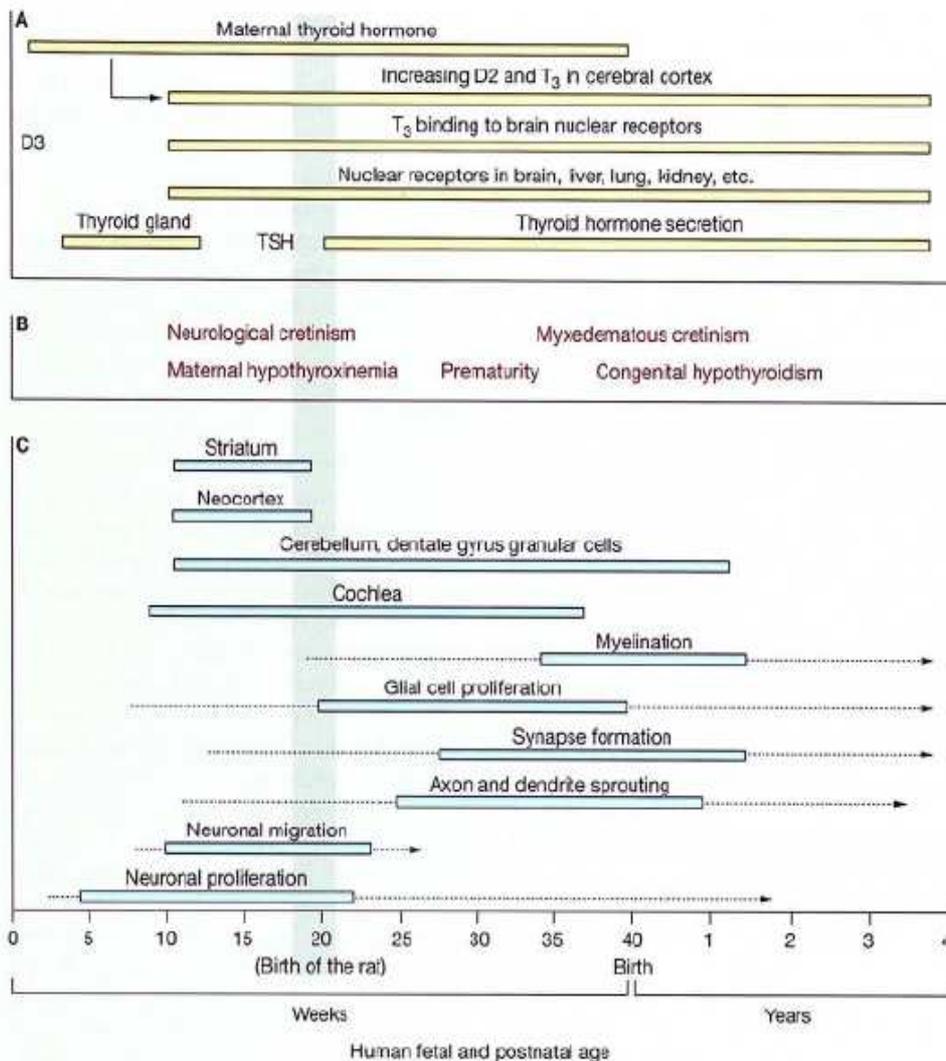


Figure 20 : relation entre le développement du SNC (C) et le système thyroïdien (A) chez l'espèce humaine. Les conditions pouvant amener à un déficit en hormones thyroïdiennes ont été précisées en B. Pour une comparaison avec le développement chez le rat, l'équivalence de la naissance chez le rat est marqué par une zone verte autour de 20 semaines d'aménorrhée ¹⁵²

IV. Le bisphénol A

A. Présentation et principales utilisations

Le bisphénol A (BPA), 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane, répertorié sous le numéro CAS 80-05-7 est un composé organique issu de la réaction entre deux molécules de phénols et une molécule d'acétone (Figure 21).

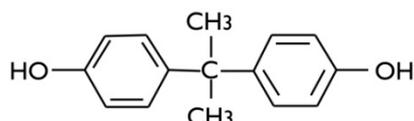


Figure 21 : structure chimique du bisphénol A

Les propriétés physico-chimiques du BPA sont résumées dans le Tableau 3. En raison de ses 2 groupements phénols, le BPA est un acide faible. Ses 2 noyaux phényles lui confèrent un caractère lipophile comme le souligne son coefficient de partage relativement élevé.

Tableau 3 : principales propriétés physico-chimiques du bisphénol A

Formule chimique brute	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Masse moléculaire	228,3 g/mol
Densité	1,2
Coefficient de partage n-octanol/eau (logP)	3,32
Solubilité	300 mg/L dans l'eau >100 mg/L dans l'éthanol 95%
pKa	9,6
Point de fusion	153 °C

Synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe Alexandre Dianine, le BPA a ensuite intéressé quelques temps les industriels pharmaceutiques pour ses propriétés œstrogénomimétiques avant d'être abandonné au profit du diéthylstilbestrol. Depuis les années 1960, le BPA est utilisé

massivement par l'industrie du plastique (> 3 millions de tonnes par an) comme monomère pour la fabrication de polymères tels que les polycarbonates et les résines époxydes. Les polycarbonates sont notamment utilisés dans la fabrication de conditionnements alimentaires, de bonbonnes d'eau ou encore pour certains ustensiles de vaisselle. Les résines époxydes sont quant à elles utilisées comme film de protection dans les conserves en métal notamment en raison des propriétés bactériostatiques et thermorésistantes du BPA. Malheureusement, dans certaines conditions extrêmes de chauffage et/ou de pH, des monomères de BPA peuvent être libérés du polymère et migrer directement dans les denrées alimentaires^{153,154}. Ainsi, des contaminations allant de 1 à 420 µg/kg d'aliment ont été décrites^{155,156}. Outre son utilisation dans le domaine alimentaire, le BPA entre également dans la composition de papiers thermiques (ex : tickets de caisse), peintures, laques, dispositifs médicaux, composites dentaires... Le transfert de BPA a d'ailleurs été décrit chez l'homme suite à un contact avec des implants dentaires contenant des résines époxydes^{157,158} ou encore suite à l'utilisation de dispositifs médicaux en polycarbonate (cathéters, sondes...).

B. Principaux effets du bisphénol A

Le BPA a été très étudié pour ses propriétés perturbatrices endocriniennes. En raison de son activité œstrogénomimétique^{159,160}, les scientifiques se sont particulièrement attachés à l'exploration des effets du BPA sur le développement et la fonction de reproduction.

Chez l'animal, il est avéré que l'exposition périnatale au BPA induit des troubles du système reproducteur femelle. Ainsi, le traitement au BPA ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; SC) de souris du 1^{er} jour de gestation au 7^{ème} jour post-natal entraîne une hyperplasie endométriale et augmente la survenue de kystes ovariens chez les nouveau-nés¹⁶¹. Chez la rate, l'exposition périnatale au BPA à une dose de $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ via l'eau de boisson induit des modifications du cycle ovarien¹⁶². Le traitement par voie orale de jeunes souris à une dose de BPA de $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ est associé à une baisse des capacités de fertilité de l'ovocyte¹⁶³. Ceci est en accord avec la diminution des capacités de reproduction de souris femelles exposées durant la période périnatale ($25 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; SC)¹⁶⁴.

Il est avéré chez l'animal que la glande mammaire présente une sensibilité importante au BPA. Ainsi, l'exposition prénatale au BPA induit des altérations du développement de la glande mammaire chez le singe ($400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; VO)¹¹ et chez la souris ($0,25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; SC)¹². L'exposition périnatale au BPA est également suspectée d'induire sur la glande mammaire le développement de lésions de type néoplasique au regard des résultats obtenus chez le rat à une dose de $2,5 - 1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (SC)^{165,166}.

Elle est également suspectée d'augmenter chez l'animal la susceptibilité des glandes mammaires à développer ultérieurement des tumeurs mammaires lors de co-expositions avec un agent cancérigène.

Outre ses effets sur la fonction de reproduction, il est suggéré chez le rongeur que l'exposition périnatale au BPA (10- 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) altère le métabolisme énergétique et favorise la survenue chez l'adulte de syndromes métaboliques tels que l'obésité^{167,168}, la résistance à l'insuline voire le diabète (Figure 22)¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

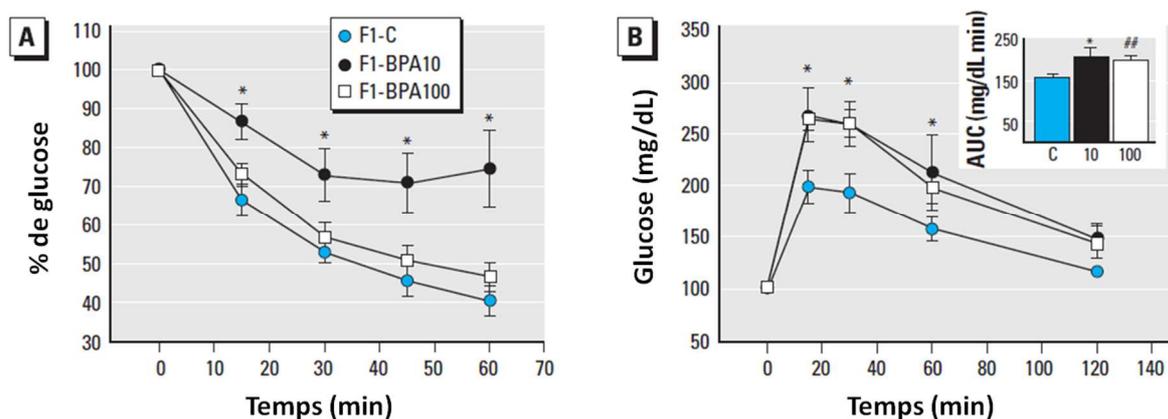


Figure 22 : homéostasie glucidique sanguine (A) après un test de tolérance à l'insuline intra-péritonéale et (B) un test de tolérance au glucose intra-péritonéale chez des souris âgées de 6 mois et exposées *in utero* au BPA 10 (F1 BPA10) ou 100 (F1 BPA100) $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (S.C.) ou au contrôle (F1-C)¹⁷⁰

Le système nerveux central et la fonction thyroïdienne constituent également des cibles du BPA. Les conséquences d'une exposition au BPA sur ces deux systèmes sont développées plus loin dans les parties E et F.

Alors que chez l'animal de nombreux effets du BPA sont désormais avérés, ces effets restent controversés chez l'homme. En effet, de nombreuses incertitudes existent quant à la transposabilité à l'homme des différents effets mis en évidence chez les rongeurs dans la majorité des cas. Des corrélations entre l'exposition au BPA et l'apparition d'effets néfastes ont été observées chez l'homme au travers d'études épidémiologiques¹⁷²⁻¹⁷⁴. Toutefois, compte-tenu des nombreux facteurs de confusion possibles, les véritables liens de causes à effets restent difficiles à établir. Des incertitudes relèvent également de la composante "exposition". En effet, alors que les voies parentérales sont souvent utilisées pour exposer les animaux, peu de données permettent de comparer la biodisponibilité de ces voies par rapport à la voie alimentaire principalement décrite chez l'homme.

Dans ce contexte, l'évaluation du risque par les agences de santé publique est délicate et les résultats de ces expertises sont quelque peu controversés eu égard aux incertitudes quant à la plausibilité de ces effets chez l'homme.

En 2015, l'EFSA (European Food Safety Authority) a réalisé une évaluation du risque sanitaire du BPA. Elle a notamment fait état d'effets probables du BPA sur le rein et la glande mammaire¹⁷⁵ et a proposé de diminuer la dose journalière tolérable (DJT) de 50 à 4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$.

Parallèlement à l'établissement de ces valeurs toxicologiques de référence, les experts de l'EFSA ont mené un travail d'évaluation de l'exposition de la population humaine au BPA. Bien que des voies d'exposition annexes (cutanée, respiratoire) aient été identifiées, la contamination par voie orale, plus particulièrement par voie alimentaire, reste majoritaire (80% de l'exposition humaine externe). En croisant les données de contamination des denrées en BPA avec les fréquences de consommation humaine, l'exposition externe au BPA a été estimée à 0,388 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ pour une femme enceinte. Les adolescents constitueraient la tranche d'âge la plus exposée au BPA (1,449 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) dans les scénarii les plus extrêmes¹⁷⁶.

La comparaison de la DJT temporaire avec ces données d'exposition a conduit l'EFSA à déclarer comme négligeable le risque pour la santé humaine de l'exposition au BPA.

On peut imaginer que les données de l'EFSA surestiment l'exposition humaine retrouvée dorénavant en France. En effet, ces estimations ont été réalisées à partir de données de contamination des denrées antérieures à janvier 2015, date à partir de laquelle l'utilisation du BPA dans les conditionnements alimentaires a été interdite en France. Malheureusement, aucune étude d'épidémiologie-surveillance n'a été menée en France depuis cette interdiction, empêchant d'évaluer l'impact de cette mesure sur l'exposition interne de la population française.

En France, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) s'est montrée plus réservée que l'EFSA quant au risque représenté par l'exposition de la population humaine au BPA¹⁵⁵. Le groupe de travail dédié à l'étude des perturbateurs endocriniens a ainsi considéré que « certaines situations d'exposition de la femme enceinte au BPA présentent un risque pour la glande mammaire de l'enfant à naître ». Le niveau de confiance attaché à ces résultats a été jugé comme « modéré ».

C. Données d'exposition interne humaine

De nombreuses publications décrivent les niveaux d'exposition au BPA retrouvés au sein de cohortes. Outre par la population observée (homme/femme, patients sains/hospitalisés) et la matrice biologique analysée, ces études se différencient par la nature même de l'analyte mesuré. En effet, au sein de l'organisme, le BPA peut subir principalement des biotransformations de phase II et être métabolisé en BPA-glucuronide (BPA-G) sous l'action de la glucuronotransférase ou en BPA-sulfate (BPA-S) sous l'action de la sulfotransférase (Figure 23). Ainsi, certaines techniques analytiques mesurent séparément le bisphénol A non-conjugué et ses métabolites conjugués tandis que d'autres méthodes mesurent conjointement l'ensemble des composés (BPA total : BPA non-conjugué et BPA conjugué) généralement suite à une étape de déconjugaison enzymatique. Cette information est à prendre en compte dans l'interprétation des données d'exposition puisque les métabolites du BPA, en particulier le BPA-G (principal métabolite formé chez l'homme), sont considérés comme biologiquement inactifs pour l'organisme ¹⁶⁰. Ils constituent néanmoins une information importante car ils sont le reflet d'une exposition de l'organisme à la molécule parent.

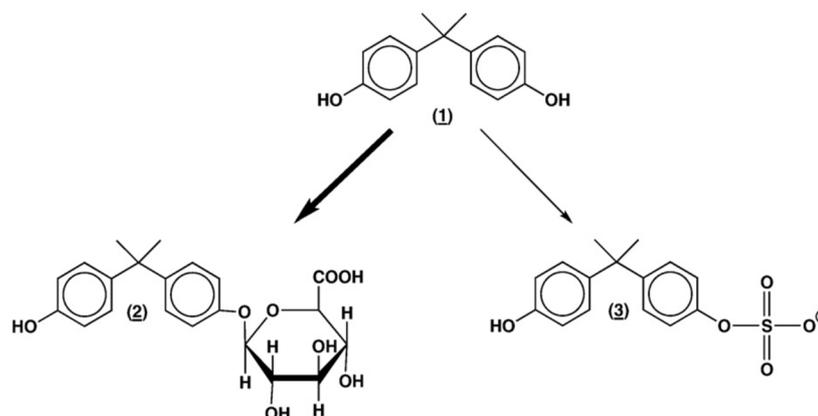


Figure 23 : métabolisation chez l'homme du bisphénol A (1) en bisphénol A glucuronide (2) et en bisphénol A sulfate (3) ¹⁷⁷

1. Données urinaires

Les données urinaires obtenues dans les études d'épidémiologie humaine correspondent le plus souvent aux concentrations de BPA total puisque seule une très faible fraction de la dose d'exposition au BPA est retrouvée sous forme de BPA non-conjugué dans les urines, la majorité étant sous forme de BPA-G.

La détection de BPA total dans les urines de 93% des participants de la cohorte américaine NHANES témoigne du caractère ubiquitaire de l'exposition humaine au BPA ¹⁷⁸. Ceci est en accord avec la

détection de BPA total dans les urines de respectivement 75 - 82 et 96% des participants de cohortes d'hommes coréens ¹⁷⁴, de femmes enceintes ¹⁷² et d'étudiants américains consommant des boissons contenues dans des conditionnements en polycarbonate ¹⁷⁹. La Figure 24 décrit les concentrations urinaires moyennes de BPA total ainsi que les concentrations maximales mesurées dans différentes études d'épidémiologie humaine américaines, européennes et asiatiques menées entre 2001 et 2012. La concentration moyenne de BPA total est généralement comprise entre 1 et 5 ng/mL ¹⁵⁵. De très fortes concentrations (parfois supérieures à 100 ng/mL) sont reportées dans certaines études, toutefois de façon assez anecdotique ^{180,181}.

En théorie, la mesure des concentrations urinaires permet de calculer l'exposition externe des individus au BPA en raison d'une élimination du BPA quasi exclusivement urinaire chez l'homme. Néanmoins, la cinétique d'élimination du BPA étant particulièrement rapide, les concentrations urinaires mesurées au cours de la journée varient considérablement au sein d'un même individu. Par conséquent, l'estimation de l'exposition humaine au BPA à partir d'un seul prélèvement journalier d'urine peut être très imprécise. L'estimation peut être améliorée lorsqu'elle est basée sur la concentration en BPA mesurée sur des urines collectées pendant 24 heures.

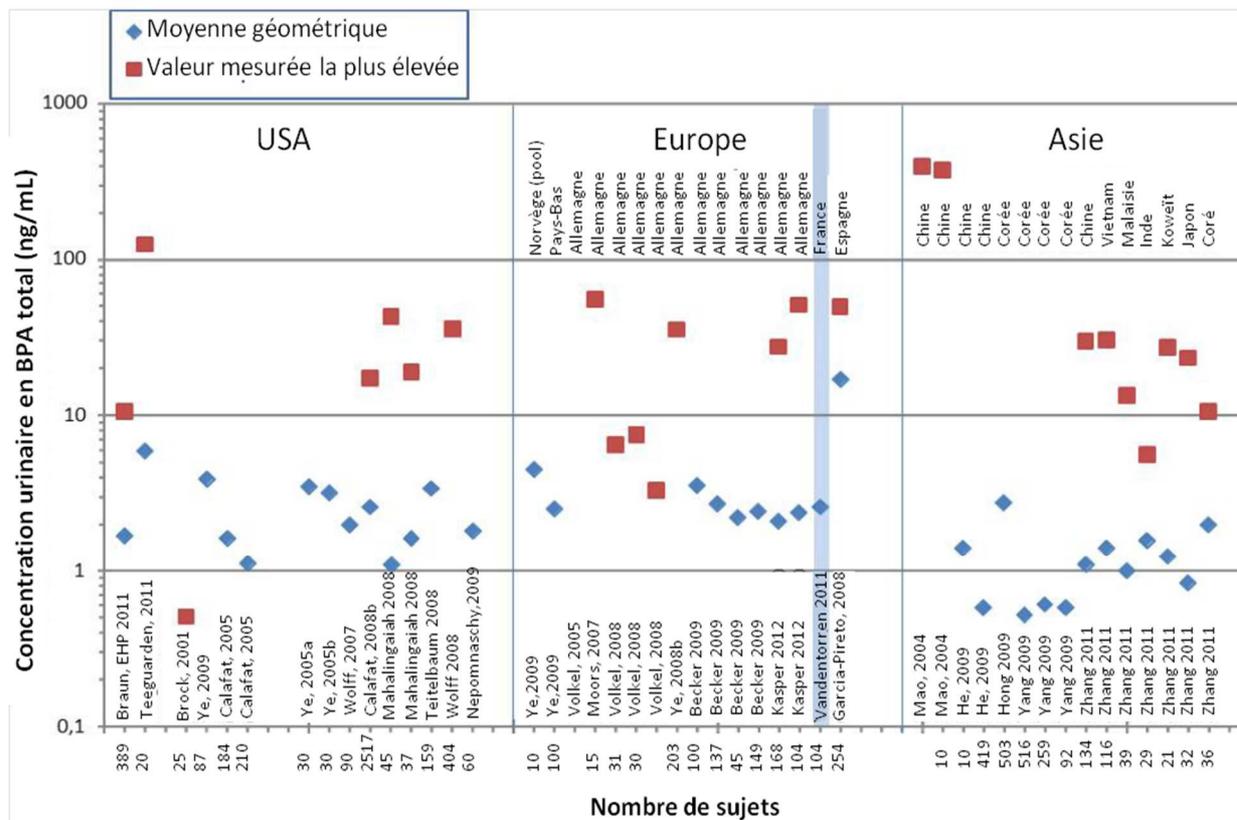


Figure 24 : concentrations urinaires en BPA total rapportées dans la littérature pour des études publiées entre 2001 et 2012 ¹⁵⁵

2. Données sanguines chez l'adulte

Si les données urinaires permettent d'estimer l'exposition globale, la mesure des concentrations sanguines en BPA apporte un élément essentiel dans l'analyse du risque. En effet, d'après un principe fondamental en pharmacodynamie / pharmacocinétique, ce sont les concentrations circulantes d'un composé qui déterminent les effets observés.

De nombreuses études d'épidémiologie se sont focalisées sur l'évaluation de l'exposition interne au cours de la grossesse. Les récentes études menées sur des cohortes de femmes enceintes décrivent des concentrations sanguines maternelles en BPA non-conjugué allant de plusieurs centaines de pg/mL (voire des valeurs indétectables)¹⁸² à $4,8 \pm 1,6$ ng/mL (moyenne \pm SD)¹⁸³ (Tableau 4). Il est à noter que des concentrations sanguines très élevées ont été mesurées. Néanmoins, ces fortes concentrations sont à prendre avec précaution puisqu'il pourrait s'agir de contaminations dues au relargage de BPA depuis les dispositifs médicaux¹⁸⁴.

Tableau 4 : Concentrations sanguines en BPA non-conjugué dans différentes études d'épidémiologie menées chez des femmes enceintes

Référence	Cohorte	Méthode	n	% détection	LOD (ng/mL)	Intervalle (ng/mL)	Moyenne \pm SD ng/mL)
182	Etats-Unis	LC/MS/MS	48	25	0.045- 0.35	0.25 – 0.51	
183	Etats-Unis	HPLC-MS	80		0,02	ND – 96,43	4,8 +/- 1,6
185	Italie	GC-MS	50		0.01	0.22 – 0.50	0.36 +/- 0.08
186	Canada	GC-MS	61	97	0.01	ND – 4,46	1,36 +/- 1,18
187	Inde	GC-MS	40	70	0,52	ND– 22,49	4,62

3. Données sur le sang de cordon et le liquide amniotique

En raison de la sensibilité accrue du fœtus aux perturbateurs endocriniens, le transfert placentaire du BPA a particulièrement été étudié.

In vitro, le BPA est capable de transférer rapidement et de façon bidirectionnelle à travers la monocouche de cellules BeWo (lignée cellulaire de choriocarcinome placentaire humaine) ¹⁸⁸. Similairement, il a été montré dans des études *ex vivo*, sur des placentas humains à terme collectés au moment de l'accouchement, que le BPA diffuse passivement à travers le placenta dans les sens materno-fœtal et fœto-maternel ^{188,189}.

Dans des études d'épidémiologie-surveillance, le BPA non-conjugué et le BPA total ont été dosés dans le liquide amniotique de femmes aux 2^{ème} et 3^{ème} trimestres de grossesse. Avec une limite de détection analytique de 0,1 ng/mL, le BPA total a été détecté dans 16 des 20 échantillons du 2^{ème} trimestre (médiane de 0,47 ng/mL ; [ND ; 0,75 ng/mL]) et le BPA non-conjugué dans 9 des 20 échantillons (médiane de 0,38 ng/mL ; [0,31 – 0,43] ng/mL) ¹⁹⁰. Sur les 20 prélèvements du 3^{ème} trimestre, le BPA total a été détecté sur 2 échantillons et le BPA non-conjugué sur 1 échantillon (0,42 ng/mL). Sur une cohorte de 40 femmes indiennes, le BPA non-conjugué a été détecté (LOD 0,52 ng/mL) respectivement dans 70 et 65% des prélèvements de sang maternel et de liquide amniotique avec une moyenne géométrique de 4,6 et 4,8 ng/mL ¹⁸⁷.

Les concentrations de BPA (total ou non-conjugué) ont également été mesurées dans le sang de cordon (Tableau 5). Ces différentes études confirment que le BPA est capable de franchir la barrière placentaire. Une corrélation positive a été mise en évidence entre les concentrations de BPA total mesurées dans le sang de cordon et le sang maternel ¹⁹¹. Malheureusement, la relation entre les concentrations de BPA non-conjugué dans le sang de cordon et le sang maternel n'a été que très peu étudié. On peut toutefois noter que les concentrations en BPA non-conjugué mesurées dans le sang de cordon sont du même ordre que les concentrations sériques décrites dans la population générale.

Tableau 5 : concentrations en BPA (non-conjugué ou total) mesurées dans le sang de cordon ombilical

Référence	Cohorte	Méthode	n	Sexe du fœtus	BPA total ou non-conjugué	LOD (ng/mL)	Intervalle (ng/mL)	Moyenne \pm SD ng/mL)
192	Allemagne	GC-MS	37	m	Non-conjugué	0.01	0,2 – 9,2	2,9 \pm 2,5
193	Japon	HPLC-FD	9	m et f	Non-conjugué	0.04	0,45 – 0,76	0,62 \pm 0,13
191	Corée du Sud	HPLC-FD	300	m et f	Total	0.625		0,65 \pm 1,06
194	Taïwan	HPLC-UV	97	m et f	Non-conjugué	0,13		1,1 \pm 2,2
173	France	RIA	106	m	Non-conjugué	0.08	0,14 – 4,76	1,12 \pm 0,86
195	Canada	GC-MS	12	m et f	Total	0,026	ND-2,57	1,82
196	Etats-Unis	HPLC-MS	84	m et f	Non-conjugué		ND-52,26	0,16
197	Chine	GC-MS	262	m et f			1,81 – 5,54	2,77
198	France	RIA	128	m	Non-conjugué	0,08		1,14 \pm 1,47
183	Etats-Unis	HPLC-MS	80	m et f	Non-conjugué	0,2	ND-41,83	3,1 \pm 0,7

D. Données pharmacocinétiques et controverse

En parallèle des études d'épidémiologie-surveillance humaine, des études pharmacocinétiques ont été menées sur animal ou directement chez l'homme. Celles-ci avaient pour objectif d'estimer les paramètres pharmacocinétiques du BPA afin de pouvoir déterminer les concentrations sanguines circulantes, dans les conditions d'exposition environnementales, à l'aide de la formule suivante :

$$C_{ss} = \frac{Dose \times F}{Cl}$$

où « C_{ss} » représente la concentration à l'équilibre du BPA, « Dose » la dose de BPA administrée par unité de temps, « F » la biodisponibilité du composé par la voie d'administration étudiée, et « Cl » la clairance du composé. Le paramètre Dose correspond à l'exposition journalière externe estimée par les études d'exposition décrites précédemment.

La clairance plasmatique est un paramètre pharmacocinétique qui décrit la capacité d'un système biologique à éliminer un composé. Pour estimer la clairance plasmatique d'un composé, il est nécessaire de l'administrer par voie intraveineuse et de calculer le ratio :

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

où l'AUC (Area Under the Curve) correspond à l'aire sous la courbe déduite du décours temporel des concentrations sanguines de ce composé. Pour des raisons éthiques, l'administration intraveineuse de BPA chez l'homme n'était pas envisageable et la clairance du BPA n'a donc pas pu être directement déterminée chez l'homme. Cependant, la clairance du BPA chez l'homme a pu être estimée par une approche allométrique^{199,200}. Cette dernière consiste à établir, à l'aide d'une équation mathématique, une relation quantitative entre un paramètre pharmacocinétique (ici la clairance) et un paramètre biologique (généralement le poids corporel) mesurée chez différentes espèces. Ainsi, à l'aide des clairances déterminées chez la souris, le rat, le chien, le cochon, le mouton et le cheval, la clairance du BPA chez l'homme a pu être estimée à 1,79 L/min¹⁹⁹.

L'alimentation contribuant très majoritairement à l'exposition externe humaine au BPA^{155,175}, l'estimation de la biodisponibilité du BPA par voie orale apparaît comme un élément clé dans la prédiction des concentrations sanguines de BPA. La biodisponibilité d'un composé par voie orale dépend de plusieurs composantes dont en particulier :

-**l'absorption intestinale** qui reflète le passage du composé du tractus digestif à la veine porte au travers de l'épithélium intestinal. Cette étape est limitée par la capacité du composé à traverser la

barrière intestinale (fonction de la balance hydrophile / lipophile du composé) et par le métabolisme pouvant exister au sein même des entérocytes (notamment sous l'action de cytochromes P450).

-l'**effet de premier passage hépatique** qui correspond à la métabolisation par le foie d'une fraction plus ou moins importante de la dose absorbée avant même qu'elle n'atteigne la circulation générale (Figure 25).

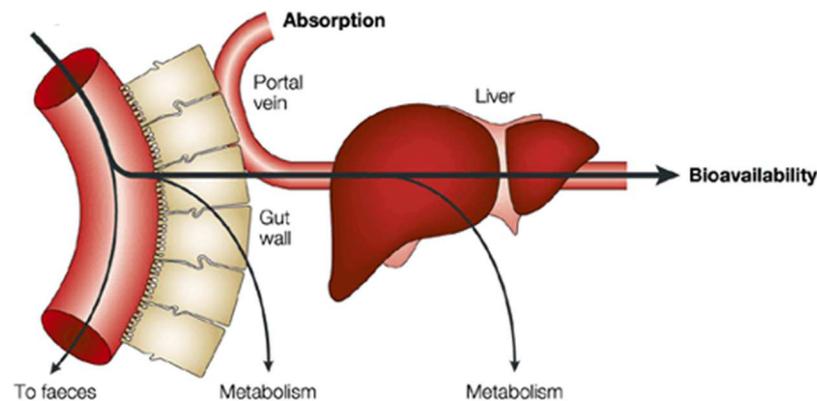


Figure 25 : schéma représentant les différentes composantes intervenant dans la biodisponibilité d'un composé administré par voie orale ²⁰¹

De façon cohérente avec les propriétés physico-chimiques du BPA ($\log P = 3,32$), les études pharmacocinétiques menées chez l'homme et l'animal ont montré que le bisphénol A est très bien absorbé au niveau du tractus digestif. En effet, suite à une administration orale de 5 mg ou 25 μg de d16-bisphénol A, 118 et 90% de la dose ont été retrouvées dans les urines ^{202,203}. De même, chez le rat, la fraction absorbée a été estimée à 77 – 98 et 67 % suite à un gavage gastrique de BPA aux doses respectives de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ²⁰⁴, 10 mg/kg ²⁰⁵ et 100 mg/kg ²⁰⁶. Chez le mouton, 100 % de la dose de BPA administrée (100 mg/kg , gavage orogastrique) a été retrouvée dans les urines ²⁰⁶.

En revanche, suite à une administration orale de bisphénol A et en dépit d'une absorption quasi-totale, seule une très faible fraction de la dose administrée est retrouvée sous forme de molécule parent dans la circulation sanguine, suggérant un très fort effet de premier passage hépatique. En effet, l'exposition interne représente presque exclusivement les métabolites conjugués du BPA et particulièrement le BPA-glucuronide. Ainsi, chez le rat, alors que l'aire sous la courbe de BPA non-conjugué représente 11% de l'aire sous la courbe de BPA total suite à une administration intraveineuse, elle ne représente que 0,4 % suite à une administration par voie orale ²⁰⁴. De même, ce ratio est de 0,1 et 7,7% chez le chien exposé au BPA respectivement par voies orale et intraveineuse²⁰⁷. Cet important effet de

premier passage hépatique est en accord avec les très fortes clairances intrinsèques calculées *in vitro* sur des modèles de cultures d'hépatocytes humains²⁰⁸ ou à partir de fractions microsomales de foie humain³⁰.

Au total, la biodisponibilité du BPA par voie orale est limitée et est estimée à seulement 2-3%^{204,209}.

Ainsi, d'après les estimations des différents paramètres pharmacocinétiques du BPA, à savoir la clairance (1,79 L/min) et la biodisponibilité (3%), ainsi que la dose journalière d'exposition au BPA (0,1 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$), la concentration sanguine en BPA attendue à l'équilibre est de l'ordre du pg/mL. Il existe donc un facteur 1000 entre les concentrations décrites dans les études d'épidémiologie-surveillance humaine et les estimations établies à partir des paramètres pharmacocinétiques du BPA. Face à cette discordance, une controverse s'est installée sur la véritable exposition interne de l'homme au BPA et différentes hypothèses ont été ébauchées pour expliquer cette différence.

Premièrement, l'utilisation du BPA étant massive et diverse, le risque de contamination des échantillons dans les études d'épidémiologie-surveillance a été soulevé^{177,210,211}. En effet, si l'utilisation dans les études de pharmacocinétique d'isotopes du BPA permet de s'affranchir de tout risque de contamination, ce dernier est beaucoup plus difficile à contrôler dans les études d'épidémiologie-surveillance. Certains auteurs affirment que les niveaux de BPA décrits dans la littérature résulteraient de contaminations. Cette hypothèse est toutefois remise en question puisque des concentrations sanguines de l'ordre de 0,1 – 1 ng/mL de BPA ont été décrites²¹² malgré l'établissement depuis plusieurs années de pratiques expérimentales strictes visant à contrôler le risque de contamination tout au long du processus de prélèvement (utilisation de dispositifs de prélèvements dépourvus de BPA), de préparation des échantillons (contrôle de la non-contamination de la matrice de dosage) et de dosage analytique.

Une deuxième hypothèse est basée sur une sous-estimation de la véritable exposition humaine au BPA. En effet, il est admis que l'alimentation constitue la principale source d'exposition au BPA. Néanmoins, il a été mis en évidence que l'homme peut également être exposé par voie aérienne via des poussières en suspension dans l'air ou encore par voie cutanée lors du contact avec des tickets de caisse ou des cosmétiques^{213–216}. Le passage transcutané du BPA a d'ailleurs été montré sur des explants de peaux^{217,218}. Ces voies d'exposition sont désormais prises en considération par les agences dans l'évaluation du risque via l'utilisation de « doses équivalentes orales » mais restent négligeables¹⁷⁵.

Une dernière hypothèse réside dans la contestation de l'estimation de la biodisponibilité par voie orale. En effet, alors que la contamination humaine au BPA se fait essentiellement par voie alimentaire,

dans la très grande majorité des études pharmacocinétiques, l'exposition a été effectuée par gavage gastrique^{204,219} ou via l'ingestion d'une capsule de gélatine²⁰² court-circuitant ainsi la première partie du tractus digestif. Compte tenu de la très grande capacité du bisphénol A à franchir les muqueuses, l'hypothèse d'une absorption sublinguale a été proposée et testée via le dépôt de gouttes d'une solution de BPA sous la langue de chiens. Le suivi du décours temporel des concentrations plasmatiques de BPA a alors mis en évidence une importante absorption sublinguale du BPA associée à une biodisponibilité très élevée (70-90%). Bien que contesté par certains auteurs²²⁰, ce mécanisme d'absorption pourrait expliquer en partie les concentrations sanguines élevées décrites chez l'homme dans la littérature²⁰⁷.

E. BPA et système nerveux central

L'exposition périnatale au BPA est associée, *in vitro* et *in vivo*, à de nombreuses altérations du développement du SNC.

Des troubles de la synaptogenèse ont été rapportés au sein de l'hippocampe de fœtus primates issus de mères exposées au BPA durant les 2 derniers mois de gestation via un implant sous-cutané permettant de délivrer une dose de 50 ou 400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ ^{221,222}. Une inhibition de la synaptogenèse a également été observée chez des souris exposées au BPA (40 et 400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; VO) durant la période périnatale²²³. Cette inhibition était associée à une diminution de l'expression de la synapsine chez des souris (40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$)²²⁴ et de la synaptophysine chez des rats (500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$)²²⁵ exposés oralement au BPA durant la période périnatale. De plus, l'exposition de rates gestantes au BPA (40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; VO) du 6^{ème} jour de gestation au 21^{ème} jour post-partum a entraîné des troubles de la myélinisation des oligodendrocytes dans l'hippocampe de leur progéniture à 21 et 90 jours post-natal²²⁶.

En parallèle de ces altérations histologiques, les concentrations de neuromédiateurs dans l'hippocampe ont été modulées par le BPA. Ainsi, le traitement de souris durant la période de gestation et de lactation à une faible dose de BPA (250 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; SC) a induit, dans l'hippocampe des ratons, une diminution du métabolisme de la sérotonine²²⁷ et une augmentation de la concentration de dopamine associée à une réduction du ratio DOPAC / dopamine²²⁸. Ceci était en accord avec l'altération du nombre de neurones dopaminergiques retrouvée chez des fœtus primates exposés au BPA 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ durant la période prénatale²²¹.

La voie de l'acétylcholine représente également une cible du BPA comme en témoigne la diminution de l'immunoréactivité de l'acétylcholine transférase dans l'hippocampe de souris mâles exposées

durant la période périnatale au BPA (dès 30 ng/g de nourriture) ²²⁹. Les modifications histologiques et biochimiques observées convergent vers l'hypothèse d'une altération par le BPA de la plasticité neuronale au sein de l'hippocampe. Cette hypothèse est renforcée par la diminution de l'expression de gènes codant pour les récepteurs au glutamate et au NMDA décrite chez les rats mâles issus de mères traitées oralement au BPA (respectivement à 50 et 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) ²²⁵. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de modifications comportementales apparaissant chez des animaux exposés, à savoir des troubles de la mémorisation ^{225,229,230} et une augmentation de l'anxiété ^{228,230}.

Similairement aux troubles décrits dans l'hippocampe, l'exposition prénatale au BPA a entraîné des altérations de la synaptogenèse dans le cortex préfrontal de nouveau-nés primates ²²¹. Au vu des résultats d'une étude complémentaire également menée sur le modèle primate, le mécanisme impliqué résiderait, au moins en partie, sur l'inhibition par le BPA de la synaptogenèse induite dans le cortex par l'œstradiol ²³¹.

Par ailleurs, l'exposition prénatale de souris au BPA (20 et 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; VO) a été associée à une mise en place anormale des différentes couches cellulaires corticales ²³². Une accélération de la différenciation et de la migration neuronale a été observée dans le cortex de souris exposées pendant la gestation (20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; SC) ²³³. En parallèle, l'expression des ARNm codant pour les récepteurs $\text{THR}\alpha$ et $\text{THR}\beta$ et pour L1CAM, un facteur impliqué dans la régulation cellulaire et la croissance neuronale et régulé par les hormones thyroïdiennes, a été modulée. Suite à une exposition à des doses de BPA de 20 et 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (VO), les souris ont également présenté des modifications de la projection des neurones dopaminergiques ainsi qu'un comportement apparenté à de l'hyperactivité ²³².

Au sein de l'hypothalamus, l'exposition périnatale au BPA se traduit par des altérations de différents médiateurs et voies neuronales. Ainsi, une modification de l'expression génique du récepteur β à l'œstrogène a été observée dans l'hypothalamus de rats exposés *in utero* au BPA (2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; VO) ²³⁴. L'exposition de larves de zebrafish au BPA (de 1,5 à 200 ng/mL) a également induit une augmentation de la synaptogenèse ^{235,236} associée à une augmentation de l'expression de neurones GnRH3 ²³⁷. *In vitro*, l'expression des marqueurs neuronaux MAP2 et synapsine I a été augmentée sur des cultures de cellules hypothalamiques exposées au BPA (2 – 20 ng/mL) ^{238,239}. Enfin, les concentrations hypothalamiques de neuromédiateurs (GABA, glutamate, norépinéphrine) ont été modifiées chez les souris femelles issues de mères traitées au BPA (500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; VO) entre le 1^{er} jour de gestation et la 3^{ème} semaine post-partum ²⁴⁰.

Au sein des amygdales, l'exposition au BPA (2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; SC) de rats durant la période périnatale s'est manifesté chez les rats âgés de 28 jours, par une modification de la transmission synaptique

caractérisée par une diminution de l'effet inhibiteur GABAergique et un renforcement des neurones dopaminergiques ²⁴¹. Cette dernière observation était en accord avec l'augmentation du ratio des concentrations DOPAC / dopamine dans les amygdales ²²⁸ et des concentrations de dopamine et de sérotonine au sein des noyaux caudés ²⁴², sur des souris de 3 ou 14-15 semaines exposées par voie sous cutanée au BPA (doses respectives de 0,25 et 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) durant la période périnatale.

Le développement du cervelet est aussi modulé par l'exposition au BPA. Ainsi, des modifications histologiques telles qu'un épaissement de la couche granulaire externe du cortex cérébelleux ont été observées chez des souriceaux exposés à de très fortes doses de BPA (14 et 39 mg/kg respectivement pendant la gestation et la lactation, via l'eau de boisson) ²⁴³. Ces altérations ont été associées à une augmentation de l'expression de Pax6, un facteur de transcription régulant la migration neuronale au sein du cortex cérébelleux. Par ailleurs, suite à une administration pendant 4 jours dans le LCR de nouveau-nés rats, le BPA (500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) a augmenté la croissance dendritique des neurones de Purkinje selon un mécanisme estrogéno-dépendant ²⁴⁴. Le BPA a altéré la phosphorylation E2-dépendante du facteur ERK1/2 (facteur régulant la croissance et la mort neuronale) au niveau de cortex cérébelleux de rats exposés ²⁴⁵. *In vitro*, un traitement au BPA (de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{mL}$) a aussi perturbé la croissance dendritique des cellules de Purkinje induite par la thyroxine sur des modèles de cellules de cervelet murin en culture ¹³².

F. Bisphénol A et perturbation thyroïdienne

Malheureusement, les effets du BPA sur le développement du SNC n'ont que rarement été étudiés en relation avec une potentielle perturbation thyroïdienne. Pourtant, au cours des dernières années, de nombreuses données mettent en évidence qu'outre ses effets sur la fonction de reproduction, le BPA perturbe également le système thyroïdien.

Des données épidémiologiques obtenues sur une cohorte d'hommes (consultant pour des problèmes de fertilité de couple) ont fait apparaître une corrélation positive entre la concentration urinaire en BPA et la concentration sanguine en TSH ²⁴⁶. Par ailleurs, les données issues de la cohorte NHANES (n=1346 adultes sains) suggèrent une relation inverse entre la concentration urinaire en BPA et la concentration sanguine en T4 totale ²⁴⁷. Dans une autre étude, une relation inverse entre les concentrations sériques en BPA et en T4 libre a été mise en évidence chez des adultes masculins ²⁴⁸. Sur une cohorte regroupant des femmes enceintes et leurs enfants (étude CHAMACOS), la concentration urinaire maternelle en BPA était négativement corrélée à la concentration sanguine maternelle de T4 totale lorsque les prélèvements d'urine maternelle et de sang de cordon étaient

rapprochés dans le temps ²⁴⁹. La concentration urinaire moyenne en BPA mesurée chez la mère était également corrélée à une diminution de la TSH chez les enfants de sexe masculin. Au sein de la cohorte HOME, l'augmentation par un facteur 10 de la concentration urinaire maternelle en BPA a été associée à une concentration 36 % plus faible de la TSH dans le sang de cordon des nouveau-nés de sexe féminin ²⁵⁰. L'ensemble de ces données épidémiologiques suggèrent un effet inhibiteur du BPA sur la fonction thyroïdienne mais des facteurs de confusion restent possibles.

Les travaux étudiant l'effet du BPA sur la fonction thyroïdienne chez les mammifères sont encore rares. Dans une étude menée chez le rat, l'augmentation physiologique des concentrations sériques de T4 totale observée 15 jours après la naissance était amplifiée chez les ratons issus de mères traitées au BPA par voie orale du 6^{ème} jour de gestation au sevrage à une dose de 1 mg.kg⁻¹.j⁻¹, soit une dose 5 fois plus faible que la dose sans effet (NOAEL = 5 mg.kg⁻¹.j⁻¹) ²⁵¹. Cet impact sur les concentrations circulantes de T4 était associé à des modifications, dans le gyrus denté de l'hippocampe, de l'expression de la neurogranine, un biomarqueur de la différenciation neuronale régulé par les hormones thyroïdiennes. Dans une autre étude, chez des rates gestantes, l'exposition au BPA 0,1 mg/L via l'eau de boisson (soit approximativement 10 µg.kg⁻¹.j⁻¹) entraînait une diminution transitoire de la concentration maternelle de T4 libre aux jours 0 et 7 post-partum ²⁵². Chez les rats mâles issus des mères traitées, une augmentation de la concentration de T4 libre à J7 et une diminution à J21 ont été observées. Par ailleurs, l'administration à des brebis gestantes de BPA (5 mg.kg⁻¹.j⁻¹ ; S.C.), du 28^{ème} jour à la fin de la gestation, a été associée à une hypothyroxinémie maternelle avec une diminution de 30% de la concentration de T4 totale en moyenne (Figure 26). Les nouveau-nés issus des mères traitées présentaient une diminution des concentrations sériques en T4 libre et en T3 totale dans le sang de cordon et/ou le sang jugulaire (Figure 27) ⁶¹.

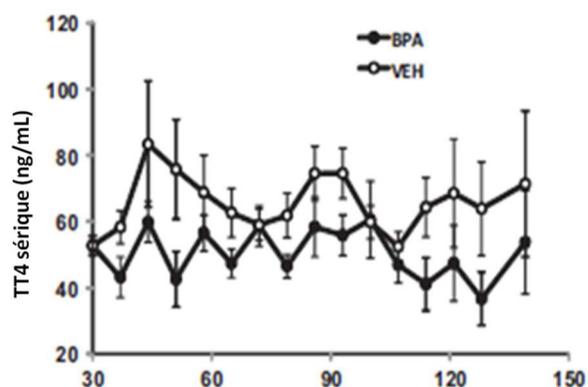


Figure 26 : déroulement temporel des concentrations moyennes (\pm SEM) de T4 totale dans le sang jugulaire de brebis gestantes traitées par du BPA (5 mg.kg⁻¹.j⁻¹ ; S.C.) ou par le véhicule du 28^{ème} au 145^{ème} jour de gestation ⁶¹

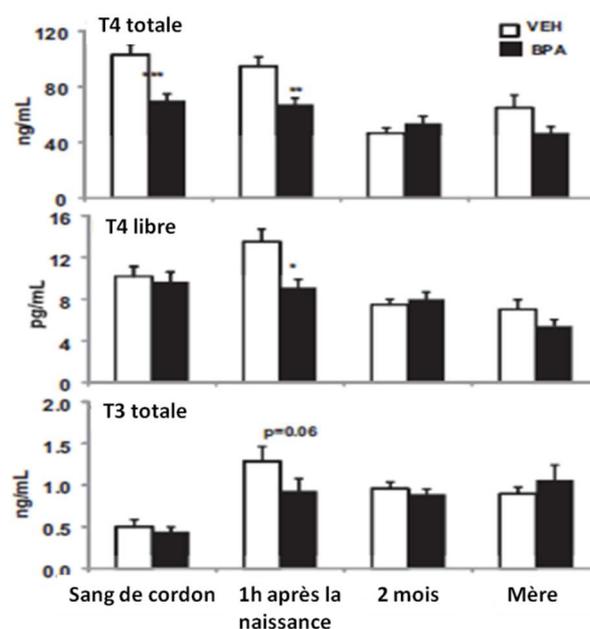


Figure 27 : concentrations moyennes (\pm SEM) de la T4 totale, de la T4 libre et de la T3 totale dans le sang de cordon, le sang jugulaire fœtal (1h et 2 mois après la naissance) et maternel après traitement des brebis gestantes par du BPA ($5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$; S.C.) ou le solvant (VEH) du 28^{ème} au 145^{ème} jour de gestation ⁶¹

Parallèlement, des études à visée plus mécanistique ont été réalisées sur des modèles de larves de xénopes ou de zebrafish. L'exposition au BPA ($30 \mu\text{M}$) de stades larvaires de xénopes entraînait un ralentissement de la métamorphose de ces organismes ²⁵³. Le BPA inhibait les modifications métamorphiques de l'intestin et bloquait la résorption de la queue induite par la T3 ^{81,254}. De plus, sur des modèles transgéniques de larves de xénopes ou de zebrafish exprimant la GFP sous le contrôle du TRE (Thyroid hormone Response Element), le promoteur des gènes cibles des hormones thyroïdiennes, l'exposition au BPA diminuait la fluorescence induite par la T3 suggérant un effet antagoniste du BPA sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes ^{74,83}. Le BPA inhibait également l'effet inducteur de la T3 sur l'expression des gènes $\text{TR}\alpha$, $\text{TR}\beta$ et RXR (un facteur formant un dimère avec le récepteur thyroïdien et contrôlant son activité) ²⁵³⁻²⁵⁵. Sur des embryons de zebrafish, le traitement au BPA 10^{-8} M augmentait, en l'absence de T3 dans le milieu, la transcription des gènes *tg* et *pax8* respectivement impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes et dans le développement des cellules folliculaires thyroïdiennes ²⁵⁶.

Différents modèles cellulaires semblent confirmer les effets antagonistes du BPA sur l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes ²⁵⁷⁻²⁶⁰. L'inhibition par le BPA des effets

induits par la T3 passerait par le recrutement des corépresseurs nucléaires des récepteurs aux hormones thyroïdiennes N-Cor (Nuclear Receptor Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors)^{258,261}. A forte dose ($K_i = 112,3 \mu\text{M}$), le BPA agirait comme un compétiteur non-compétitif des transporteurs NIS (Sodium Iodine Symporter) responsables du transport de l'iode à l'intérieur des follicules thyroïdiens²⁵⁷.

Le tableau 6 présente les résultats de différentes études décrivant les effets d'une exposition pré- ou périnatale sur le développement du SNC et/ou de ses effets sur la fonction thyroïdienne, en parallèle ou non de l'exploration de l'exposition interne au BPA. Malheureusement, ces 3 composantes ne sont jamais étudiées conjointement, et c'est là une lacune pour l'évaluation du risque que représente l'exposition humaine au BPA.

Tableau 6 : effets d'une exposition pré- ou périnatale du BPA sur le développement du SNC et/ou sur la fonction thyroïdienne, parallèlement ou non à l'exploration de l'exposition interne au BPA

Référence	Modèle	Dose de BPA – Voie	Effets sur système thyroïdien	Effets sur SNC	Exposition interne
251	Rat ; exposition périnatale	1 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ ; VO	Amplification de l'augmentation des concentrations sériques de TT4 chez les fœtus à J15 post-natal	Augmentation de l'expression de la neurogranine (régulée par les HT) dans l'hippocampe	-
233	Souris ; exposition prénatale	20 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ ; SC	Modulation de l'expression des ARNm codant pour THRα et THRβ	-Accélération de la différenciation et de la migration neuronale dans le néocortex -Modulation de l'expression des ARNm codant pour Ngn2 et L1CAM (régulés par les HT)	-
252	Rat ; exposition périnatale	≈ 10 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ ; eau de boisson	Diminution de fT4 maternelle à J0 et J7 post-partum ; modulation de fT4 à J7 et J21 post-natal chez les ratons mâles	Augmentation de l'expression ARNm de SRC-1 dans l'hippocampe des ratons mâles	-
221	Macaque ; exposition <i>in utero</i>	≈ 400 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ ; implant SC	-	Diminution du nombre de synapses dans la région CA1 de l'hippocampe des fœtus	Concentration sérique moyenne de BPA chez les mères : 0,91 ± 0,13 ng/mL
243	Souris ; exposition périnatale	14 (gestation) et 39 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (lactation) ; eau de boisson	Augmentation de l'expression du facteur Pax6 (impliqué dans le développement neuronal et régulé par les HT) dans les cellules granulaires du cervelet	Epaississement de la couche granulaire externe du cortex cérébelleux	-
61	Ovin ; exposition <i>in utero</i>	5 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ ; SC	Diminution des concentrations sériques maternelles et fœtales en hormones thyroïdiennes	-	Fluctuations entre 240 ± 15 ng/mL (C _{max}) et 38 ± 4 ng/mL (C _{min})
232	Souris ; exposition prénatale	20 – 200 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ ; VO	-	Altération de la distribution neuronale et hypoplasie des couches cellulaires dans le néocortex des souriceaux	-

V. Apport de l'approche métabolomique

Alors que la toxicologie des faibles doses interpelle de plus en plus les scientifiques, les approches biochimiques et histologiques classiquement utilisées en toxicologie souffrent parfois d'un manque de sensibilité pour mettre en évidence ce type d'effet. Par ailleurs, face aux très nombreuses voies régulées par les systèmes endocriniens et possiblement altérées par les PE, ces méthodes peinent parfois à intégrer l'ensemble des données et à obtenir une vision globale. Dans ce contexte, l'utilisation de la métabolomique, une approche sensible et non-ciblée, apparaît comme une approche prometteuse pour explorer les voies modulées par une exposition à un PE.

A. Généralités

1. Définitions

Le principe de la métabolomique repose sur la détection de modifications qualitatives et quantitatives des métabolites endogènes produits par un organisme dans un contexte pathologique ou d'exposition à un xénobiotique^{262,263}. En ce sens, il faut remonter au Moyen-âge pour retrouver les premiers pas de la métabolomique puisque déjà à cette époque, les hommes ont cherché à relier les caractères organoleptiques de l'urine, directement liés en réalité aux métabolites présents, à un contexte médical²⁶². Toutefois, les véritables débuts de la métabolomique telle qu'on la définit aujourd'hui remontent aux années 70. Cette approche s'est considérablement étendue depuis les années 2000 avec le développement de puissants outils analytiques²⁶⁴.

Même s'ils sont désormais couramment interchangeables, les termes « métabolomique » et « métabonomique » ne sont pas véritablement synonymes. La métabolomique cherche à développer des méthodes analytiques capables d'identifier et de quantifier un grand nombre de métabolites présents dans un échantillon biologique^{262,265}. On parle d'approche globale (ou non-ciblée ou sans hypothèse *a priori*) puisque le spectre de métabolites recherchés n'est pas défini au préalable. Celui-ci couvre en réalité toutes les molécules endogènes polaires et de petite taille (généralement inférieure à 1000 Da)²⁶⁶. L'ensemble des métabolites détectés dans un fluide biologique constitue le métabolome. La métabonomique se définit quant à elle comme la mesure globale et dynamique de la réponse métabolique de systèmes vivants à un stimulus biologique ou encore à une manipulation génétique^{262,265}. Elle participe, en complément des études biochimiques classiquement utilisées, à la compréhension de l'impact d'un facteur externe ou pathologique via la comparaison des métabolomes de systèmes biologiques exposés à différents stimuli²⁶⁷.

Dans un premier temps, la métabolomique a été particulièrement utilisée pour étudier la biologie des végétaux. Elle connaît aujourd'hui un essor dans le domaine médical où elle est notamment mise à profit pour le développement de nouveaux médicaments (acquisition de données pharmacotoxicologiques), la compréhension des mécanismes physiopathologiques ou l'identification de biomarqueurs associés à des maladies humaines ^{265,268}. En thérapeutique, un des objectifs à long terme de la métabolomique est de pouvoir prédire les effets d'un principe actif sur un individu et de personnaliser en conséquence les traitements médicaux. En effet, il a démontré chez l'animal que le métabolome urinaire d'un individu exposé à une molécule peut être utilisé pour prédire chez ce même individu le métabolisme d'une molécule structuralement voisine et sa susceptibilité à présenter des effets indésirables ^{262,268}. Toutefois, malgré l'investissement important des organismes de recherche privés et publics, ce type de prédiction n'est à l'heure actuelle pas réalisable directement chez l'homme.

En raison de leur facilité de prélèvement, le sang et l'urine constituent les principales matrices biologiques étudiées ²⁶⁹. Plusieurs échantillons peuvent être collectés sur un même patient et à des temps rapprochés permettant alors d'obtenir une vision dynamique des modifications métaboliques en réponse à une maladie ou à une molécule ²⁷⁰. Les outils technologiques disponibles permettent désormais de prendre en considération les différents niveaux d'organisation des systèmes biologiques. Les empreintes métaboliques peuvent ainsi être obtenues aux niveaux d'un organe (foie, cerveau...), d'un fluide biologique (sang, liquide amniotique, liquide céphalo-rachidien...) ou encore de tissus cellulaires ou de populations de cellules (systèmes cellulaires *in vitro*) ^{263,265}.

2. Avantages et inconvénients de la métabolomique

La métabolomique est souvent comparée aux autres approches « omiques » couramment utilisées en biologie, à savoir la transcriptomique et la protéomique. Toutes ces approches étudient l'impact d'un stimulus biologique ou d'une modification génétique sur un système biologique mais à des niveaux de régulation différents (Figure 28). La métabolomique présente de nombreux avantages par rapport aux autres approches "omiques".

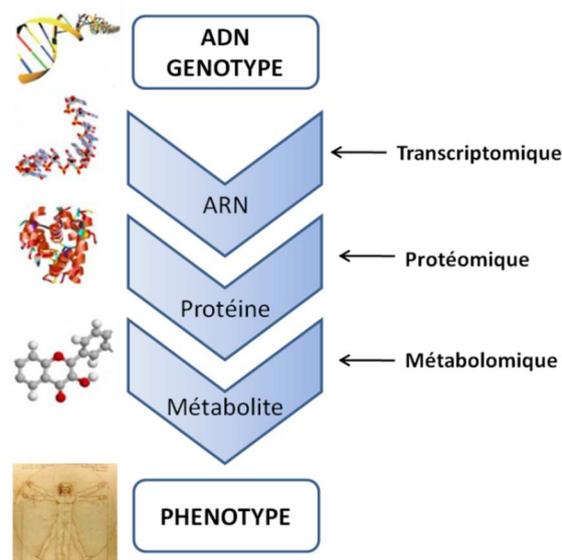


Figure 28 : schéma des différents niveaux d'étude des approches « omiques »

D'une part, la relation entre l'expression génique et le phénotype d'un système biologique n'est pas toujours simple à établir. Il est ainsi souvent difficile de prédire les conséquences biologiques d'une altération génique ou à moindre mesure d'une modification protéique²⁷⁰⁻²⁷². En revanche, de par la position terminale des métabolites dans les processus de régulation, le métabolome constitue, contrairement au transcriptome et au protéome, la signature directe d'un phénotype et le reflet de l'activité biochimique d'un système biologique à un instant donné^{263,273}. Les biomarqueurs métaboliques sont ainsi plus facilement corrélables aux effets biologiques observés²⁷⁰.

D'autre part, les xénobiotiques exercent souvent leurs effets toxiques en interagissant directement avec le matériel génétique ou en induisant ou bloquant la synthèse d'enzymes. Dans ces cas, les approches de transcriptomique et protéomique apportent des informations pertinentes pour la compréhension du mécanisme d'action d'une molécule. En revanche, dans d'autres situations, les xénobiotiques agissent directement à des niveaux de régulation inférieurs (ex : blocage de l'activité d'une protéine...) et induisent alors des effets toxiques indépendamment d'une altération de l'expression génique ou protéique^{270,271}. Des modifications du protéome et du transcriptome résultant d'une réponse adaptative de l'organisme peuvent toutefois être observées. C'est notamment le cas de l'éthanol qui modifie l'expression de certains gènes ou protéines sans que cela ne soit corrélé aux effets directs de l'ébriété. En revanche, toutes les perturbations physiopathologiques induites par une molécule aboutissent à des altérations du métabolome²⁷². Elles se traduisent notamment par la modification des concentrations ou de flux de métabolites.

Par ailleurs, les métabolites sont très bien conservés entre les espèces. A l'inverse, les gènes et les protéines ne partagent souvent qu'un certain degré d'homologie compliquant alors l'extrapolation des résultats ²⁷⁰. La métabolomique bénéficie en outre d'une plus grande reproductibilité biologique et d'un coût par analyte et par échantillon supposé plus faible.

La métabolomique apporte donc des informations complémentaires aux études de transcriptomique et protéomique. La compilation des résultats de ces différentes approches apparaît intéressante pour évaluer le plus globalement possible la réponse d'un système biologique à une perturbation. Les méthodes globales et en particulier la métabolomique présentent certains avantages par rapport aux approches biochimiques conventionnelles.

Premièrement, elles génèrent, à partir d'un même prélèvement, un grand nombre de données. Ceci permet donc de réduire au total le nombre d'animaux nécessaires par rapport aux approches basées sur l'établissement d'une hypothèse *a priori* et n'autorisant la mesure que de seulement quelques paramètres par animal. Les méthodes « omiques » sont ainsi en accord avec le premier principe de la règle des 3R, « réduire, remplacer, raffiner », illustrant les récentes recommandations relatives à l'utilisation et la protection des animaux de laboratoire. De plus, par rapport aux tests classiques de toxicologie, la très forte sensibilité de la métabolomique permet de détecter des modifications de l'homéostasie bien avant l'établissement d'altérations susceptibles de nuire au respect de l'éthique animale ²⁷⁴.

Par ailleurs, l'utilisation d'outils analytiques puissants, permet de mettre en évidence des modifications subtiles du phénotype qui ne pourraient pas être détectées avec les tests physiologiques et biochimiques couramment utilisés en laboratoire. Outre leur sensibilité, ces outils bénéficient d'une grande stabilité et reproductibilité analytique ²⁷⁰ comme en témoigne la similarité des résultats obtenus à partir d'un même échantillon par différentes plateformes et méthodes analytiques ²⁶⁴.

Néanmoins, certaines critiques sont fréquemment avancées à l'égard de la métabolomique. D'une part, bien qu'elle soit financièrement plus abordable que d'autres approches « omiques », la quête d'une caractérisation la plus fine possible des métabolites présents dans un échantillon nécessite le recours à des outils analytiques de haute précision impactant nécessairement le coût des études. Par ailleurs, le revers de cette haute sensibilité analytique est qu'une part non-négligeable de métabolites détectés reste à ce jour fréquemment non-identifiable ²⁷². En effet, alors que le nombre de métabolites contenus dans un seul organisme peut s'élever jusqu'à plusieurs dizaines de milliers, les bases de données (Human Metabolome Database, COLMAR...) ne recensent actuellement que quelques centaines de standards métaboliques ^{263,275}. Il est toutefois à noter que cette part est amenée à diminuer avec le temps en raison de l'enrichissement permanent des bases de données.

Cette puissance analytique et discriminative nécessite également de parfaitement maîtriser les facteurs physiologiques (espèce et souche animale, sexe...) et expérimentaux (choix du véhicule, de la nourriture, période d'acclimatation suffisante notamment pour les expériences en cages à métabolisme...) ^{262,265}. De même, une grande attention doit être portée aux phases de préparation des échantillons (broyage, lyse cellulaire, extraction) et d'analyse au risque d'introduire des biais dans la discrimination des groupes expérimentaux ²⁷².

Par ailleurs, les méthodes globales produisent des jeux de données complexes face auxquels le biologiste peut se retrouver démuni. Elles requièrent donc le rapprochement de biostatisticiens pour assurer le maintien d'une rigueur statistique et éviter le risque de surajustement ^{268,270}. De même, l'identification des voies métaboliques modulées nécessite le plus souvent le recours à des outils bioinformatiques spécialisés ^{276,277}.

En outre, les études ayant très longtemps reposé sur le principe « un test par biomarqueur », un certain scepticisme est à noter chez certains biologistes vis-à-vis des méthodes globales ²⁷⁰. L'absence de lignes de conduite établies par les agences de santé publique pour standardiser l'analyse des données issues des méthodes globales entretient sans doute ce conservatisme. Pourtant, face à la complexité des mécanismes sous-jacents à certaines maladies, ces approches apparaissent comme des outils clés pour l'identification d'une combinaison de biomarqueurs. De par leur sensibilité, elles constituent également des outils puissants pour répondre à une des problématiques actuelles en toxicologie, la caractérisation des effets à faible dose.

B. Outils technologiques et statistiques

La Figure 29 présente le déroulement chronologique des principales étapes d'une étude de métabolomique : prélèvement des échantillons, préparation des échantillons, acquisition des données, pré-traitement des spectres, analyse statistique des données, identification des métabolites et interprétation biologique. Bien que toutes ces étapes soient primordiales pour assurer la qualité scientifique des résultats, cette partie décrit plus particulièrement les principales méthodes analytiques utilisées pour acquérir les données spectrales et les outils statistiques permettant d'analyser les données.

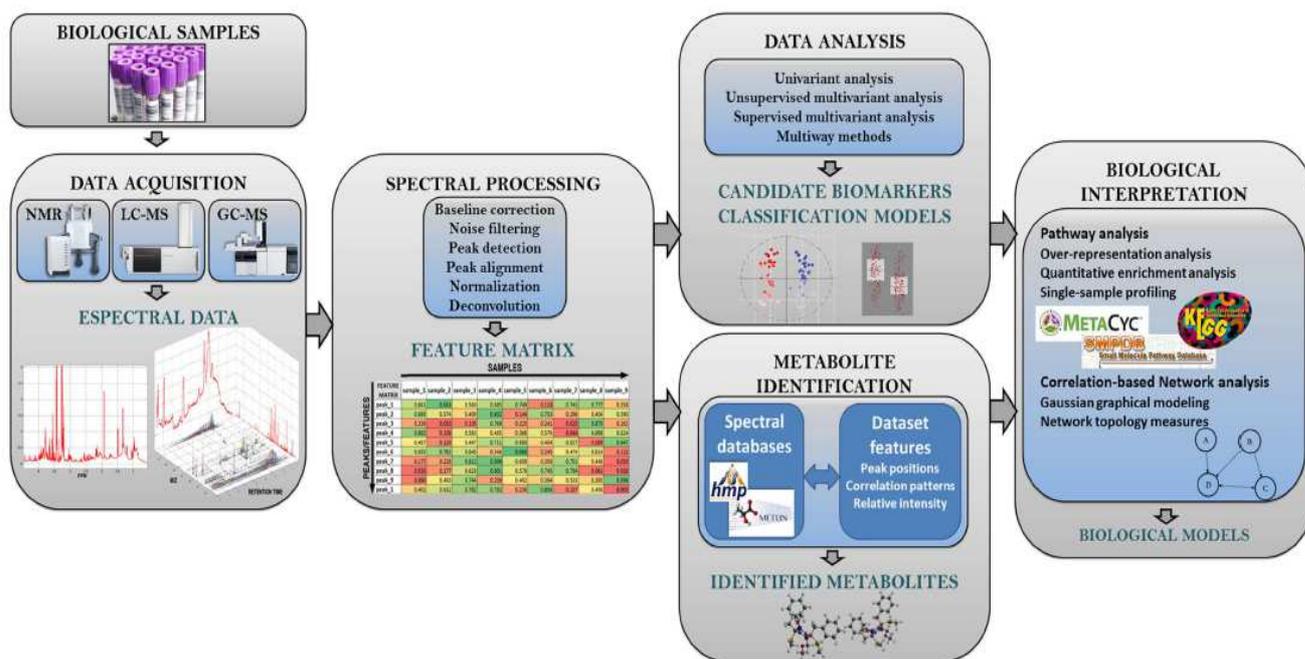


Figure 29 : déroulement chronologique des principales étapes d'une étude de métabolomique ²⁶⁸

1. Outils analytiques

Afin de ne pas entraver la possibilité de détecter une différence liée au traitement, les outils analytiques utilisés doivent permettre de générer des profils métaboliques avec une variabilité analytique inférieure à la variabilité naturellement présente dans la population d'intérêt (variabilité inter-individuelle) ²⁶⁵. Par ailleurs, en métabolomique non ciblée, ils doivent en théorie permettre de détecter et quantifier un très grand nombre de métabolites sans avoir à sélectionner au préalable les analytes recherchés. Néanmoins, en raison de la diversité physicochimique des métabolites, aucun système n'est capable en pratique de caractériser tous les métabolites présents dans un système biologique ²⁶³. Ainsi, le choix de l'instrument est très important car il définit le champ des métabolites possiblement détectables ²⁶⁴. Deux techniques sont principalement utilisées en métabolomique : la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse.

a) La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est basée sur l'absorption puis le relâchement d'énergie par des noyaux atomiques en réponse à une impulsion radiofréquence en présence d'un champ magnétique directeur. Ces atomes entrent en résonance avec une fréquence dépendante du champ magnétique et de leur environnement nucléaire. Cette propriété n'est accessible qu'aux noyaux atomiques possédant un spin nucléaire non nul (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) ^{278,279}. La RMN renseigne sur la structure chimique des composés puisque les pics

(ou multiplets) et la fréquence de résonance (ou le déplacement chimique) sont fonction de l'environnement chimique (Figure 30) ^{266,280}. Elle permet de distinguer des isomères et d'obtenir des informations sur la conformation d'un composé. La ¹H-RMN apporte également des informations quantitatives puisque l'aire sous le pic est directement proportionnelle à la concentration du composé dans le mélange. Il est donc possible d'effectuer une quantification relative (par exemple par rapport à un autre signal ou par rapport à l'intensité totale du spectre) ou même absolue via l'ajout d'un standard interne dans l'échantillon ^{265,268,270}.

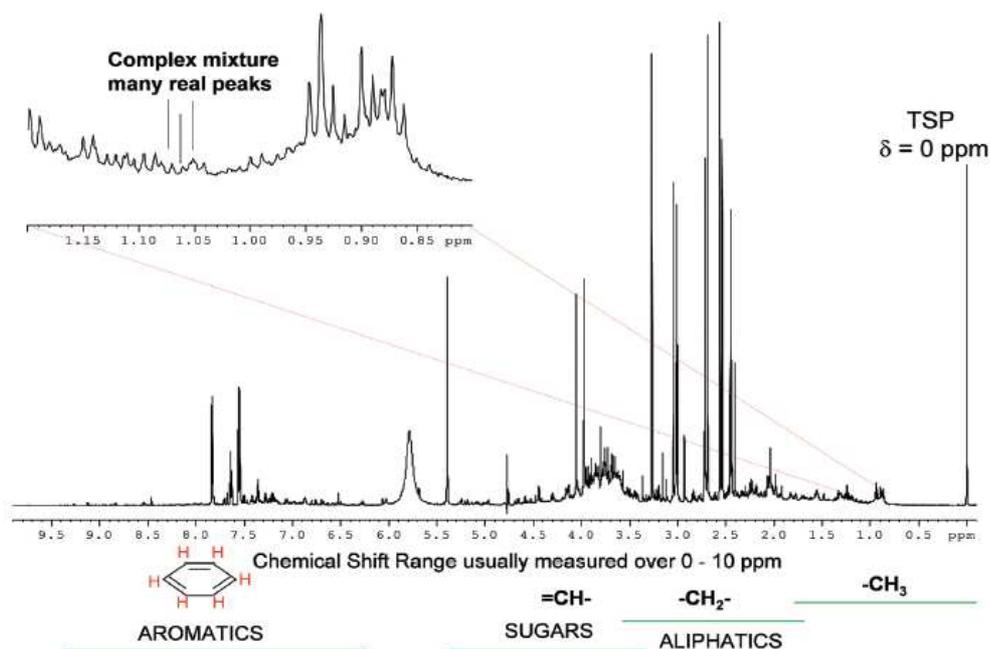


Figure 30 : spectre typique de résonance magnétique nucléaire du proton. Chaque signal représente un proton dans un environnement chimique différent. Les protons appartenant à certaines fonctions chimiques présentent des déplacements chimiques caractéristiques. Le TSP (1,1,2,2-d4-triméthylsilylpropionate) représente un standard interne permettant d'obtenir un déplacement chimique de référence ²⁶⁶

En raison du grand nombre d'atomes d'hydrogène constituant les molécules biologiques et compte-tenu que le proton est le noyau le plus sensible pour les molécules organiques, les études de métabolomique reposent généralement sur la spectroscopie RMN du proton (¹H-RMN). Toutefois, pour faciliter l'identification de certains composés, celle-ci peut être combinée à de la RMN ¹³C, ³¹P ou ¹⁵N lors d'analyses RMN en 2 dimensions ^{265,268,280}. La RMN haute résolution est bien adaptée à la détection de modifications métaboliques puisqu'un grand nombre de métabolites peut être quantifié simultanément. Par ailleurs, cette méthode est robuste et reproductible ²⁷⁰ et l'analyse est relativement rapide (de l'ordre de 30 min) et automatisable ²⁶⁶. De plus, cette méthode est adaptable à de nombreuses matrices. Un de ses plus grands avantages est d'être non destructive, ce qui offre la

possibilité de réutiliser les échantillons pour d'autres analyses (à condition que ces dernières soient compatibles avec l'eau deutérée utilisée pour reprendre les échantillons en RMN). Cette propriété est particulièrement appréciée pour l'étude de tissus précieux tels que les biopsies, d'autant que la technique de MAS (magic angle spinning) permet désormais d'acquérir un signal RMN haute résolution directement à partir de tissus de petite taille (pas de pré-traitement) ^{269,270,281}.

En revanche, la RMN n'est pas réputée pour sa sensibilité analytique ^{262,279}. En effet, bien que celle-ci varie en fonction de la classe biochimique des molécules, la sensibilité est estimée en moyenne à 10^{-6} M ²⁶⁶. Par conséquent, la RMN ne permet pas d'obtenir des informations sur des métabolites faiblement exprimés tels que certains neuromédiateurs dans le cerveau. De plus, elle nécessite une quantité importante de tissus ²⁶⁵.

b) La spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet l'identification de composés grâce au rapport masse / charge (m/z) de molécules chargées (ions) ²⁶⁸. Elle est généralement couplée à une technique séparative telle que la chromatographie liquide (couplage LC-MS) ou gazeuse (couplage GC-MS) ^{269,272}. Ces dernières sont basées sur l'interaction des métabolites avec les matériaux adsorbants contenus dans la colonne et permettent de séparer les composés selon un premier facteur, le temps de rétention. On obtient alors un spectre à 3 dimensions correspondant au temps de rétention, au rapport m/z et à l'intensité du signal ²⁷⁰. La Figure 31 présente un spectre typique obtenu par LC-MS.

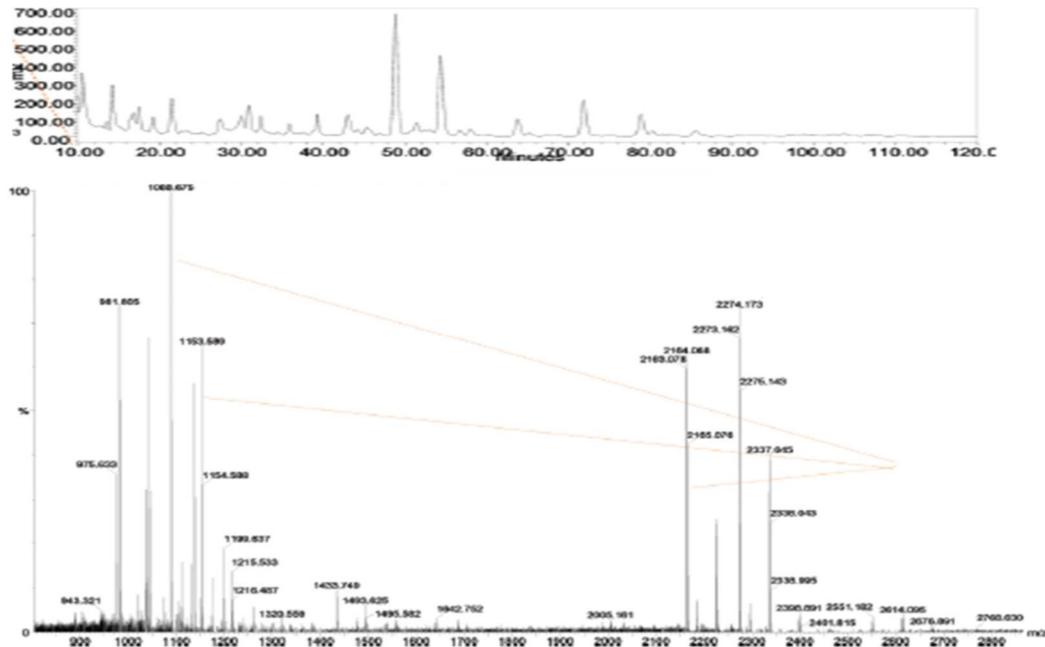


Figure 31 : spectres typiques obtenus par analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Le graphe supérieur montre le spectre obtenu par chromatographie liquide. Les fractions sont séparées en fonction du temps de rétention. Le graphe inférieur est un spectre MS spécifique d'une fraction HPLC et fournit des informations sur la masse des composés ²⁶⁶

La spectrométrie de masse bénéficie d'une meilleure sensibilité que la RMN ($10^{-12}M$) ²⁶⁶. La spectrométrie de masse haute résolution permet d'obtenir la masse exacte d'un composé et donc d'avoir des informations sur sa formule chimique brute. Le couplage MS/MS permet de fragmenter l'ion parent en ions fils et facilite l'identification du composé (à condition que les fragments soient répertoriés dans les bases de données) ²⁶³.

Bien que très sensible, la spectrométrie de masse présente de nombreux inconvénients. D'une part, cette technique est moins performante que la RMN pour la quantification des métabolites puisque le signal n'est pas nécessairement linéaire avec la concentration. La quantification d'un analyte présent dans un mélange peut être biaisée par une ionisation variable et par des effets suppresseurs d'ions ^{265,270}. D'autre part, des effets matrices importants peuvent apparaître, notamment en chromatographie liquide.

Si la RMN est bien adaptée à la caractérisation globale des métabolites, la MS est davantage destinée à la caractérisation de classes spécifiques de métabolites (métabolomique ciblée) ^{266,270}. Dans ces conditions, l'association des deux techniques séparément présente l'avantage de pallier aux déficits de chaque méthode ²⁶⁴. Il existe également des techniques « hyphènes » HPLC-RMN-MS associant

directement les deux méthodes en parallèle ²⁷⁰. Pour analyser des grandes bases de données, il est aussi envisageable de sélectionner des sous-groupes d'intérêt à partir d'une première analyse en RMN et de compléter dans un second temps les informations obtenues par une approche ciblée en spectrométrie de masse ^{263,264}.

2. Outils statistiques

Les approches « omiques » génèrent des jeux de données très complexes. Le nombre de variables observationnelles est souvent très supérieur au nombre d'observations ou d'individus. Les données peuvent être analysées par deux grands types de méthodes statistiques.

a) Méthodes d'analyses univariées

Ces méthodes reposent sur les tests statistiques classiquement utilisés, à savoir le test-t ou l'analyse de variance (ANOVA) lorsque les données sont gaussiennes et les tests non-paramétriques (tests de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis) lorsque la normalité n'est pas vérifiée ²⁶⁸. Elles présentent l'avantage d'être simples à utiliser et à interpréter. Cependant, ces méthodes présentent des biais importants pour l'analyse de données « omiques ».

D'une part, elles ne prennent pas en compte que les variables observationnelles sont dépendantes entre elles. En effet, les variables correspondant à un même métabolite sont directement corrélées entre elles, de même que les métabolites appartenant à une même voie métabolique. D'autre part, étant donné le grand nombre de variables analysées simultanément, il existe une probabilité élevée d'obtenir des faux positifs rien que par le hasard. Ce risque est de surcroît augmenté par l'absence de prise en considération par ces méthodes de facteurs confondants (sexe, indice de masse corporel...) ²⁶⁸. Différentes techniques permettent de corriger en partie ces biais (correction de Bonferroni ; facteur FDR ou false-discovery rate) mais celles-ci restent imparfaites.

En raison des nombreux risques de surinterprétation qu'elles apportent, les méthodes d'analyse univariées sont relativement peu utilisées en métabolomique et la majorité des études sont analysées par des méthodes multivariées.

b) Méthodes d'analyses multivariées

L'ACP (Analyse en Composantes Principales) et la PLS (Principal Least Squares) sont les méthodes multivariées principalement utilisées. Elles ont pour objectif global de discriminer différents groupes d'individus à partir de jeux de données très complexes, et ce malgré une variabilité intra-groupe parfois importante ²⁷². A l'inverse des méthodes univariées, elles prennent en considération toutes les

observations simultanément et peuvent ainsi identifier les relations entre les différentes variables observationnelles ²⁶⁸.

L'ACP cherche à exprimer le maximum de variance contenue dans un jeu de données en utilisant un nombre réduit de facteurs ou composantes principales ^{262,265,270}. Ces dernières sont construites par combinaison linéaire des variables observationnelles de départ associées à des coefficients de pondération appropriés. Chaque composante est orthogonale et donc non-corrélée aux précédentes et cherche à expliquer la variabilité restante. Habituellement, 2 ou 3 composantes sont suffisantes pour expliquer la majorité de la variabilité spectrale, les composantes principales les moins importantes décrivant principalement le bruit de fond du signal ²⁷⁰. A l'issue de l'ACP, 2 types de graphes sont créés. Les « loading plot » permettent de visualiser la contribution individuelle de chaque variable observationnelle de départ dans chaque nouvelle composante principale. Les « scoring plot » représentent la projection de chaque échantillon sur les composantes principales et permettent donc d'identifier des groupes d'échantillons ²⁶⁸. Ils permettent également de repérer d'éventuelles données aberrantes et de mettre en lumière des biais « cachés » (ex : une discrimination des échantillons selon les opérateurs ayant réalisé l'extraction des échantillons). L'ACP ne révèle des structures de groupes que si la variabilité intra-groupe est suffisamment faible devant la variabilité inter-groupe ²⁷². En pratique, on réalise donc généralement une ACP en première instance pour dégager les tendances puis on affine la discrimination des groupes par une PLS.

Contrairement à l'ACP qui est une méthode non-supervisée (ou sans *a priori*), la PLS-DA est une méthode supervisée. On ajoute donc à la matrice X regroupant les données collectées (généralement l'aire des pics) une matrice Y récapitulant des informations directement corrélées aux individus ²⁷². En métabolomique, la colonne Y est souvent binaire (-1 ou +1) puisqu'elle précise l'exposition ou non au traitement : on parle alors de PLS-DA (PLS Discriminant Analysis). Si en ACP les composantes principales cherchent à maximiser la variance expliquée, en PLS, elles cherchent à maximiser la covariance entre la variable d'intérêt (ex : groupe de traitement) et la variable métabolomique mesurée ²⁶⁸. La PLS cherche donc à construire un modèle mathématique qui prédit correctement le groupe de traitement d'un échantillon à partir des données métabolomiques ²⁷¹.

Malheureusement, la variabilité due au traitement est souvent trop faible devant le « bruit » analytique et expérimental pour effectuer directement une PLS. Il est alors nécessaire de réaliser au préalable une filtration OSC (Orthogonal Signal Correction) des données permettant de séparer la variabilité en X corrélée à Y (c'est-à-dire corrélée au traitement) de celle qui ne l'est pas ^{272,282}. La PLS-DA est ensuite uniquement menée sur la part de la matrice X corrélée à Y. Néanmoins, la filtration OSC n'apporte pas d'avantages prédictifs à la PLS-DA puisque si aucune variabilité en X non-

corrélée à Y n'existe, la PLS-DA sans filtration OSC donne un modèle identique à la PLS-DA après filtration^{268,272}.

Les modèles PLS doivent cependant être réalisés avec prudence pour éviter le risque de sur-ajustement, en particulier lorsque le nombre d'individus par groupe est faible. Des tests de permutation et de validation croisée doivent donc être réalisés pour vérifier respectivement la performance et la prédiction du modèle^{268,283}.

C. Application de la métabolomique à l'étude des perturbateurs endocriniens

1. Un outil complémentaire aux approches classiquement utilisées

Bien que la métabolomique soit encore rarement mise à profit dans le domaine des PE, les quelques études disponibles soulignent l'utilité de cette approche, en complément des techniques classiquement utilisées, dans l'identification de voies métaboliques perturbées et la caractérisation des mécanismes d'action de certains composés.

Pour exemple, les effets du PBDE-209 ont été étudiés à travers l'analyse du métabolome urinaire de rats adultes exposés pendant une semaine à ce composé à une dose de $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ²⁸⁴. Le traitement au PBDE-209 était associé à une augmentation de la concentration de pyruvate suggérant une altération du métabolisme glucidique. De plus, la concentration de l'acétylcholine ainsi que celle des 2 métabolites indispensables à sa synthèse, l'acétyl-coenzyme A et la choline, étaient diminuées. De façon intéressante, les modulations observées sur le métabolome étaient en accord avec les effets neurotoxiques des PBDE mis en évidence via d'autres approches. En effet, l'altération du métabolisme glucidique induit des troubles neurologiques. D'autre part, une carence gestationnelle en choline impacte chez la souris la neurogenèse et l'acétylcholine joue un rôle clé dans l'apprentissage et la mémoire.

La métabolomique a également été mise à profit pour révéler, en complément d'études biochimiques et histopathologiques, les mécanismes sous-jacents au potentiel hépatotoxique du TCDD et de l'Aroclor 1254®, un mélange de PCB²⁸⁵. Des rats adultes ont été traités oralement pendant 6 jours avec du TCDD ($10 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), des PCB ($10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), la combinaison des 2 composés ou le véhicule. Le métabolome urinaire des rats a été analysé par ¹H-RMN et une ACP a permis de séparer les 4 groupes de traitement. Alors que l'examen histopathologique du foie et les données biochimiques du sang

témoignaient d'une souffrance hépatique chez les rats traités au PCB et/ou au TCDD, le caractère hépatotoxique des composés était également suggéré par l'approche métabolomique. En effet, l'analyse des voies métaboliques a mis en évidence des troubles du cycle des acides tricarboxyliques, une diminution de la phosphorylation oxydative, une augmentation de la glycolyse et des troubles du métabolisme des acides gras. Cette étude reflétait donc une très bonne conformité entre les changements du métabolome urinaire et les modifications biochimiques du sang ou les altérations histopathologiques du foie.

Les deux précédentes études ont été menées avec des doses élevées mais un des gros atouts de la métabolomique repose sur sa capacité à détecter des modulations même à des doses pertinentes par rapport à l'exposition humaine.

Ainsi, dans une étude menée sur une cohorte de 965 personnes âgées de 70 ans, le métabolome sérique a été mis en relation avec les concentrations sériques de p,p'-DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène) et HCB (hexachlorobenzène), deux pesticides organochlorés ²⁸⁶. Différents métabolites d'acides gras, des flavonoïdes, des glycérophospholipides et des sphingolipides ont été corrélés avec l'exposition au DDE. Ces métabolites jouent un rôle clé dans le métabolisme lipidique et ont été reliés à des maladies cardiovasculaires et au diabète de type 2. Les métabolites corrélés avec l'exposition à l'HCB appartenaient à la famille des acides gras insaturés, des glycérophosphorylcholines et des glycérophosphoéthanolamines. Ceux-ci suggèrent que l'exposition à l'HCB est associée à une dérégulation générale du métabolisme lipidique. Les données métabolomiques confortent donc les précédentes études menées chez l'homme soulignant la relation entre l'exposition au DDE ou à l'HCB et la survenue de maladies métaboliques (diabète de type 2, obésité).

2. Application à l'étude des perturbateurs thyroïdiens

Une étude métabolomique a permis d'explorer les conséquences sur le cervelet de souris adultes d'une exposition pendant 64 jours à du perchlorate (un inhibiteur de la thyroperoxydase, une enzyme clé dans la synthèse des hormones thyroïdiennes) ou au véhicule ¹⁴⁴. Le cervelet a été choisi car il constitue une cible préférentielle des hormones thyroïdiennes. Les données métabolomiques ont été générées par analyse des tissus en GC-MS et ont été traitées par une méthode statistique univariée. Dix-neuf métabolites discriminant les groupes de traitement ont été identifiés. Dix-sept étaient diminués dans le groupe "perchlorate", reflétant la diminution globale du métabolisme du cervelet dans un contexte d'hypothyroïdie. Le traitement au perchlorate entraînait une altération du

métabolisme énergétique oxydatif, une modulation de la voie glutamate / glutamine, une diminution des capacités osmolytiques et anti-oxydantes du cervelet et un impact sur la synthèse protéique et lipidique.

Dans une autre étude, Wu *et al.* ²⁸⁷ ont exploré le métabolome urinaire de 3 modèles de rats adultes présentant une hypothyroïdie induite par un traitement au méthimazole ou au propylthiouracile ou par thyroïdectomie. Les urines ont été analysées par LC-MS. L'analyse en PLS-DA a révélé que 9 métabolites discriminants étaient partagés entre les 3 modèles. Similairement à l'étude précédente, une altération du métabolisme énergétique et plus particulièrement du cycle des acides tricarboxyliques a été mise en évidence. L'hypothyroïdie impactait également le métabolisme des acides aminés, des sphingolipides, des purines et du tryptophane.

Une approche métabolomique a aussi été mise à profit pour discriminer des perturbateurs thyroïdiens ayant des modes d'action directs (inhibition de la synthèse des hormones thyroïdiennes par blocage de la thyroperoxydase) ou indirects (augmentation de la clairance hépatique des hormones thyroïdiennes par induction enzymatique) ²⁸⁸. Pour cela, le sérum de rats adultes traités pendant 4 semaines avec différents agents hypothyroïdiens a été analysé par LC-MS et GC-MS. Le glutamate, le tryptophane, la tyrosine, l'arginine et différents triglycérides permettaient de discriminer les perturbateurs ayant un mode d'action direct ou indirect. L'analyse des voies métaboliques a révélé que les perturbateurs thyroïdiens directs modulaient les enzymes du cycle de l'urée, augmentaient la gamma-oxydation des acides gras et diminuaient les concentrations de glutamate et d'oxoproline. Ceux possédant un mécanisme d'action indirect altéraient le métabolisme hépatique et le métabolisme lipidique.

3. Application à l'étude des effets au bisphénol A

Au sein du laboratoire, une approche métabolomique a été réalisée sur le sérum, le cerveau, le foie et le corps complet de souris exposées par voie sous-cutanée au BPA (0,025 – 0,25 ou 25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) durant la période périnatale ²⁸⁹. La Figure 32 présente le « score-plot » issu de la PLS-DA effectuée sur les données spectrales ^1H -RMN pré-traitées des cerveaux collectés au 21^{ème} jour post-partum. On note que les quatre groupes de traitement sont bien discriminés.

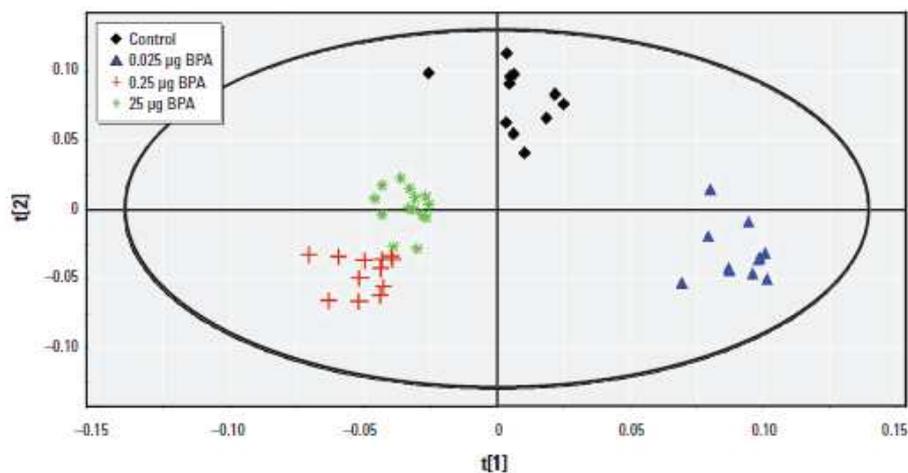


Figure 32 : « score-plot » à deux dimensions issu de l'analyse PLS-DA des données générées par la spectroscopie $^1\text{H-RMN}$ de cerveaux de souris issues de mères exposées au BPA (0 – 0,025 – 0,25 ou 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) durant la période périnatale ²⁸⁹

L'analyse des voies a mis en évidence une altération globale du métabolisme énergétique des animaux. La voie des acides aminés essentiels tels que la valine, la leucine et l'isoleucine était également modulée. La concentration de choline était modifiée laissant supposer une altération de la structure membranaire. L'exposition au BPA induisait aussi la modulation des concentrations de neuromédiateurs excitateurs (glutamate et aspartate) et inhibiteurs (GABA et glycine) du SNC. En raison de leurs rôles essentiels dans la régulation du développement neuronal et dans la potentialisation à long terme, des troubles de la fonction cognitive, de la mémoire et de l'apprentissage ont pu être envisagés. De façon intéressante, les concentrations de GABA et de glutamate dans le cerveau étaient augmentées lors d'une exposition à 0,025 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et diminuées à 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Ces résultats suggéraient ainsi une relation dose-réponse non-monotone et la modulation de voies métaboliques différentes en fonction de la dose de BPA ²⁹⁰.

Dans une 2^{nde} étude, les métabolomes sériques et hépatiques de rats exposés au BPA (0,25 – 2,5 – 25 – 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) durant la période périnatale ont été analysés par spectroscopie $^1\text{H-RMN}$ à J21 – 50 – 90 – 140 et 200 ²⁹¹. Les groupes exposés au BPA étaient encore discriminables du groupe contrôle 200 jours après la naissance, soulignant la persistance à long terme de certaines modulations métaboliques.

Par ailleurs, les conséquences d'une exposition au BPA chez le rat adulte ont également été étudiées via l'exploration du métabolome urinaire ^{292,293}. Les analyses ont été réalisées par électrophorèse capillaire couplée à de la spectroscopie de masse (EC-TOF-MS/MS). Une modulation de la voie métabolique glutamate / glutamine ainsi qu'une altération des concentrations de neuromédiateurs

(GABA, noradrénaline, glutamate) et des métabolites associés à la synthèse de neuromédiateurs (tyrosine, histamine) ont été retrouvées chez des rats adultes traités pendant 45 jours au BPA (1 – 10 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)²⁹². Certains résultats suggéraient une nouvelle fois une réponse non-monotone.

Une augmentation de la synthèse des produits méthylés et une élévation du catabolisme des nucléotides puriques ont été mises en évidence chez des rats adultes traités pendant 8 semaines au BPA (0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ et 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$)²⁹³.

VI. Objectifs et stratégie de la thèse

Bien qu'étudié depuis de nombreuses années, le bisphénol A est toujours au centre de nombreux débats scientifiques et politiques. L'évaluation du risque qu'il représente pour la santé humaine reste délicate puisque les deux principales composantes de l'évaluation, à savoir l'estimation de l'exposition et la caractérisation des dangers, font toujours l'objet de controverses. Des points restent donc à éclaircir.

D'une part, alors que la majorité des travaux menés sur le BPA ont été focalisés sur ses effets sur la fonction de reproduction, de nombreuses études menées *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le BPA présente également des propriétés de perturbation thyroïdienne. L'exposition gestationnelle au BPA serait notamment associée à des troubles de la régulation thyroïdienne chez la mère et/ou le nouveau-né. Néanmoins, la plupart des études animales ont été menées chez le rat, qui, bien qu'appartenant à la classe des mammifères, présente des divergences importantes avec l'homme en termes de régulation thyroïdienne et de physiologie de gestation. L'extrapolation à l'homme de ces données présente donc des limites importantes.

D'autre part, l'exposition périnatale au BPA est associée à la survenue de nombreuses altérations sur le SNC du nouveau-né. Ainsi, elle est notamment suspectée de moduler des étapes clés de la neurogenèse dans différentes structures cérébrales. De façon surprenante, bien que le lien entre perturbation thyroïdienne gestationnelle et anomalies du développement du SNC soit avéré depuis de nombreuses années, rares sont les études ayant exploré les conséquences d'une exposition périnatale au BPA sur le développement du SNC en relation avec une perturbation thyroïdienne.

Par ailleurs, il est admis en pharmacotoxicologie que les effets d'un composé ne sont pas directement guidés par la dose externe mais par ses concentrations sanguines. Or, on peut noter que l'exposition interne au BPA n'est que rarement explorée en parallèle de ses effets et que dans la majorité des études toxicologiques sur le BPA, le volet « exposition » est limité à la description de la dose et de la voie d'administration. Dans ces conditions, une grande incertitude existe autour des données toxicologiques du BPA obtenues via le recours à des voies d'administration autres que la voie alimentaire, principale voie d'exposition décrite chez l'homme. Ainsi, les nombreuses données obtenues suite à une exposition des animaux par voie sous-cutanée ne sont pas nécessairement prises en considération par les agences.

Chez l'homme, le volet « exposition » est également source de polémiques autour de la caractérisation des véritables niveaux d'exposition interne au BPA en raison des nombreuses divergences entre les estimations pharmacocinétiques et les concentrations décrites dans les études d'épidémi-

surveillance. La mise en évidence chez le chien d'une absorption sublinguale du BPA pourrait expliquer en partie ces divergences, mais la pertinence de ce mécanisme reste à démontrer dans un contexte d'exposition alimentaire.

Dans ce contexte, le projet de thèse avait pour objectifs :

- de documenter l'exposition interne attachée à différentes voies d'administration du BPA
- de déterminer les conséquences d'une exposition gestationnelle au BPA sur le développement du SNC conjointement aux effets sur la fonction thyroïdienne.

Pour y répondre, nous avons dans un premier temps cherché à déterminer l'équivalence en termes d'exposition interne entre la voie sous-cutanée et la voie alimentaire afin de relier les doses de BPA administrées par voie sous-cutanée dans nos protocoles expérimentaux à une dose par voie orale (principale voie décrite chez l'homme). Nous avons également comparé l'exposition interne obtenue suite à une administration de BPA par voie alimentaire ou par gavage, une autre voie communément utilisée en toxicologie. Cette comparaison nous a permis en outre de tester la pertinence de l'absorption sublinguale du BPA dans un contexte d'exposition par voie alimentaire. Les outils pharmacocinétiques nous ont alors permis de décrire et prédire qualitativement et quantitativement les profils d'exposition interne au BPA obtenus pour chaque voie et de comprendre les mécanismes pharmacocinétiques impliqués. Ces résultats sont présentés dans la partie I du chapitre 2.

La partie II décrit les travaux qui ont été menés pour explorer des effets d'une exposition gestationnelle au BPA sur la fonction thyroïdienne. Pour cela, nous avons cherché à déterminer, sur le modèle de brebis gestante, la plus faible dose de BPA induisant une modification de l'homéostasie thyroïdienne maternelle et fœtale. L'impact du BPA sur la fonction thyroïdienne a été évalué en caractérisant respectivement les statuts thyroïdiens maternel et fœtal au cours et en fin de gestation.

Dans partie III, nous avons cherché à mettre en relation les effets d'une exposition prénatale au BPA sur la fonction thyroïdienne et sur le développement du SNC. Compte tenu de la diversité des cibles potentielles et de la complexité du cerveau, une approche globale et sans a priori était primordiale pour explorer les voies métaboliques modulées par une exposition au BPA. Nous avons donc cherché à identifier, en parallèle de l'évaluation du statut thyroïdien maternel et fœtal, des biomarqueurs d'effet de l'exposition au BPA sur des structures cérébrales fœtales spécifiques via une approche métabolomique par ^1H -RMN. La sensibilité de cette approche nous permettait de détecter des effets subtils induits par une faible dose de BPA. Cette partie reposait donc sur une approche intégrée associant la physiologie et la modélisation de la réponse au BPA par une approche métabolomique.

Les différents travaux menés au cours de cette thèse ont été réalisés sur le modèle ovin. En effet, le mouton constitue un modèle pertinent par rapport à l'homme pour le développement de l'axe thyroïdien et du SNC. Les dimensions de l'encéphale de mouton nous permettaient par ailleurs d'isoler des structures cérébrales précises, en quantité suffisante pour les analyses ^1H -RMN. De plus, l'utilisation du modèle ovin autorisait le prélèvement répété de sang sur le même animal, ce qui constituait un point clé pour la caractérisation de l'exposition interne au BPA et le suivi dynamique de la fonction thyroïdienne maternelle au cours de la gestation.

Les approches expérimentales menées au cours de cette thèse et les résultats associés sont présentés sous forme d'articles.

.

CHAPITRE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Voies d'administration et exposition interne au BPA

A. Introduction et objectifs

De grandes incertitudes existent autour de l'extrapolation à l'homme des effets du BPA observés chez l'animal. La divergence des résultats obtenus associée à la pluralité des voies d'administration utilisées participe à ces incertitudes. A l'instar de nombreuses études toxicologiques du BPA, nous avons choisi d'exposer les animaux au BPA par voie sous-cutanée afin de maîtriser au mieux la dose de BPA administrée. Néanmoins, malgré les avantages qu'elles possèdent, les voies parentérales font l'objet de nombreuses critiques pour les études de toxicité du BPA. D'une part, ces voies ne constituent pas la voie "naturelle" d'exposition de l'homme au BPA puisque l'alimentation représente la principale source de contamination. D'autre part, en raison de leur échappement à l'effet de premier passage hépatique, les voies parentérales suscitent un grand nombre d'interrogations quant à la biodisponibilité et aux niveaux d'exposition interne auxquels elles conduisent. D'ailleurs, encore récemment, les membres du centre d'évaluation des risques pour la reproduction humaine du NTP étaient réfractaires à prendre en compte les données obtenues suite à une exposition par voie sous-cutanée ²⁹⁴. Dans ces conditions, il convenait de comparer les profils pharmacocinétiques obtenus après exposition au BPA par voie sous-cutanée ou alimentaire afin de relier les doses de BPA administrées par voie sous-cutanée à des doses équivalentes par voie orale.

Par ailleurs, bien que l'étude des propriétés pharmacocinétiques du BPA ait fait l'objet d'un grand nombre de travaux, l'exposition interne de l'homme au BPA fait toujours l'objet d'une controverse. En effet, les paramètres pharmacocinétiques calculés chez l'homme et les animaux de laboratoire ne permettent pas d'expliquer les concentrations décrites dans les études d'épidémiologie humaine. Il a été montré sur un modèle canin que le BPA pouvait être absorbé par voie sublinguale ²⁰⁷. Cette dernière échappe au fort effet de premier passage hépatique observé suite à un gavage orogastrique et conduit chez le chien à une biodisponibilité absolue très élevée (70-90 %). Elle pourrait ainsi expliquer l'observation ponctuelle de concentrations sanguines en BPA élevées. Toutefois, si l'absorption sublinguale du BPA était possible dans les conditions expérimentales utilisées (dépôt direct d'une solution de BPA dans la bouche des chiens) ²⁰⁷, il restait à vérifier si ce mécanisme existe dans un schéma d'exposition similaire à celui de l'homme.

Dans ce contexte, notre étude avait pour objectifs de 1) tester la pertinence de l'absorption sublinguale dans un contexte d'exposition humaine par contamination alimentaire et 2) de déterminer l'équivalence en termes d'exposition interne entre la voie alimentaire et des voies communément utilisées en toxicologie (gavage gastrique et voie sous-cutanée).

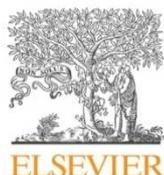
Pour répondre au 1^{er} objectif, nous avons cherché à comparer, sur le modèle ovin, les profils pharmacocinétiques de BPA obtenus suite à une exposition par voie alimentaire ou par gavage nasogastrique. Le gavage permettait de court-circuiter les segments antérieurs du tube digestif et de s'affranchir, contrairement à la voie alimentaire, d'une éventuelle absorption sublinguale. La comparaison de ces deux voies a donné lieu à une publication dans la revue *Food and Chemical Toxicology* présentée dans ce sous-chapitre.

Faisant partie intégrante de l'étude dose-réponse développée dans le 2^{ème} sous-chapitre, la comparaison des profils pharmacocinétiques du BPA obtenus suite à une administration par voie alimentaire ou sous-cutanée est présentée succinctement à la suite de l'article 1 et dans sa totalité dans l'article 2.

B. Article 1

"Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet"

Davy Guignard, Glenn Gauderat, Véronique Gayrard, Marlène Z. Lacroix, Nicole Picard-Hagen, Sylvie Puel, Pierre-Louis Toutain, Catherine Viguié



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

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

Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet



Davy Guignard, Glenn Gauderat, Véronique Gayrard, Marlène Z. Lacroix, Nicole Picard-Hagen, Sylvie Puel, Pierre-Louis Toutain, Catherine Viguie*

Toxalim, Université de Toulouse, INRA, INP-ENVT, INP-El-Purpan, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2016

Received in revised form

21 March 2016

Accepted 8 April 2016

Available online 14 April 2016

Keywords:

Bisphenol A

Food toxicology

Pharmacokinetic

Buccal absorption

ABSTRACT

The gavage route is often used for the toxicological evaluation of food contaminants. This route does not take into account absorption of the toxicants through the buccal mucosa, as evidenced in dogs for bisphenol A (BPA). Our goal was to determine the functional significance of buccal BPA absorption during dietary exposure. Four ewes received BPA by nasogastric gavage (100 mg/kg) and through food pellets (10 mg/kg), 13 days apart. The time course of serum concentrations of BPA and its main metabolite BPA-G was submitted to non-compartmental analysis. The dietary route led to 3-fold higher bioavailability as compared to gavage. The ratio of BPA-G to BPA concentrations varied greatly over time after the food administration, but not after gavage, suggesting a delayed metabolism of BPA after dietary exposure. The maximum entrance rate of BPA in the systemic circulation, determined by deconvolution analysis, was much higher after dietary administration than after gavage and a biphasic pattern of BPA entry was observed in 3 of the 4 ewes. Our results evidenced a dual mechanism of BPA absorption (buccal and digestive) after dietary exposure and highlight the necessity to take buccal absorption into account when evaluating food contaminants.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The choice of exposure route for the toxicological evaluation of xenobiotics is often a source of debate. Although a real-life exposure scheme would be most relevant, a more convenient route is often preferred for animal models. Thus, in many *in vivo* toxicological studies of food contaminants, animals are not exposed through the diet but through gastric gavage, and this is usually assumed appropriate to assess food contamination. Choice of the gavage route of administration is often motivated by its convenience for controlling the actual individual and timing of the dose.

However, substituting stomach gavage for dietary administration might be inappropriate since the possible sites of absorption might not be the same. Indeed, the gavage route does not take into account possible direct absorption of the substance by the buccal

epithelium. Such a mechanism has been well described and is extensively employed by the pharmaceutical industry to design specialties with rapid and highly efficient absorption of the active compound. This is particularly true for small lipophilic molecules able to diffuse passively through the membranes. Buccal absorption is particularly efficient for such molecules, due to the highly-developed vascularization of the mouth. In addition, it allows the drug to escape the hepatic first-pass mechanism. This mechanism results from direct access of the total amount of drug absorbed in the anterior segments of the digestive tract (mainly small intestine) to the liver, via the hepatic portal system receiving the venous mesenteric circulation. It can lead to extensive metabolism of the drug during its first passage through the liver and thus to a very low systemic bioavailability. In contrast, venous drainage of the mouth brings the absorbed molecules directly to the systemic circulation through the jugular veins.

This might be a critical issue when addressing the toxicological evaluation of food contaminants. Humans chew solid food for quite a long time. It is therefore very likely that whatever contaminants that might be present in the food will remain in contact with the buccal epithelium for a relatively long time, possibly resulting in very efficient absorption before any digestive absorption can occur.

Abbreviations: AUC, Area under the curve; BPA, Bisphenol A; BPA-G, Bisphenol A glucuronide; LOQ, Limit of quantification.

* Corresponding author. TOXALIM UMR 1331, INRA INP UPS Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 23 chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse cedex3, France.

E-mail address: catherine.viguie@toulouse.inra.fr (C. Viguie).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.004>

0278-6915/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

As this route escapes the hepatic first-pass effect, it might lead to a high bioavailability of the contaminant.

Recent data obtained in dogs showed that such mechanisms can occur for a major food contaminant, bisphenol A (BPA) (Gayrard et al., 2013), a compound considered as an endocrine disruptor (Alonso-Magdalena et al., 2006; vom Saal et al., 2007) and used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins, including the resins used to coat food and beverage cans. Human exposure to BPA is assumed to occur mainly through the food (Vandenberg et al., 2007). The reported concentrations of BPA in food range from 1 to as high as 420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ANSES, 2013). Human internal exposure to BPA is considered ubiquitous. Indeed, total BPA was detected in the urine of 93% of participants in the U.S. large-size cohort NHANES (Calafat et al., 2008). Some studies have reported median unconjugated BPA concentrations of 1–2 ng/mL or 4–8 nM in adult human blood samples (Ikezuki et al., 2002; Kaddar et al., 2009; Padmanabhan et al., 2008).

Human internal BPA exposure is still a source of controversy. The relatively low estimated daily BPA intake jointly to the evidence of an extensive hepatic first-pass effect after BPA intestinal absorption are not consistent with the highest BPA plasma concentrations reported in biomonitoring studies. Indeed, based on the estimated BPA clearance (Collet et al., 2015) and oral bioavailability in humans, the commonly described plasma concentrations (in the range of ng/ml) would require a daily intake of several tens of $\mu\text{g}/\text{kg}$ whereas the estimated intake in the worst case scenarios is 0.2–2.2 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (EFSA, 2015).

To explain this discrepancy between the pharmacokinetic data and results from biomonitoring surveys, it was hypothesized that BPA could be absorbed in a site other than the gastro-intestinal tract after ingestion. Accordingly, it was shown in a dog model presenting the same histological structure of the mouth epithelium as humans (Sa et al., 2016), that BPA can be very efficiently absorbed directly through the buccal mucosa (Gayrard et al., 2013). This absorption mechanism bypasses the hepatic first-pass effect and thus results in a much higher bioavailability than with digestive absorption. It is therefore tempting to hypothesize that the high plasma concentrations reported in humans might be due to absorption by the buccal mucosa during chewing. Nevertheless, the conditions used to document the possibility of absorption by the buccal mucosa in the dog experiment were not totally relevant to human exposure since BPA was administered as a pure solution directly on the sublingual mucosa and not through food.

The aim of our study was to assess the contribution of BPA absorption through the buccal mucosa to the overall internal exposure in a scenario relevant to human exposure to BPA i.e. food contamination. We thus sought to determine BPA PK parameters following dietary and gastric gavage in the same animals and used deconvolution analysis to characterize the time development of buccal absorption component of BPA internal exposure following diet administration.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bisphenol A and corn oil were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin, Fallavier, France). BPA solution (100 mg/mL) was obtained by dissolving BPA in a mixture of corn oil/HPLC-grade absolute ethanol (86/14 V/V). The solution was then kept in sealed amber glass bottles at ambient temperature.

2.2. Animals

All animal procedures were carried out in accordance with the

accepted standards of humane animal care under agreement 311155515 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture and validated by the ethical committee from the French Ministry of Higher Education and Research (project number: 00890.01). The study was conducted on adult Lacaune ewes ($n = 4$) in the sheep research facility of the National Veterinary School of Toulouse, France. The ewes were 3–5 years old and weighed 50–73 kg. They were kept inside under natural photoperiod and temperature conditions in collective pens. The ewes were housed individually during the sampling periods. They were fed hay *ad libitum* and vegetable pellets and had free access to water. For the dietary treatment period, the ewes were fasted overnight to facilitate intake of the BPA-supplemented pellets. Free access to hay and water was maintained after the administrations.

Sheep were chosen for this study because this species thoroughly masticates its food, thus ensuring a long enough contact of the contaminated food with the buccal mucosa as in humans. In addition, sheep are one of the rare species for which BPA pharmacokinetic parameters have been thoroughly documented (Corbel et al., 2013; Gauderat et al., 2016). Moreover, the main known pathways of BPA metabolism involve phase II metabolic pathways such as glucuronidation. It is noteworthy that the BPA glucuronidation activities of hepatic microsomal fractions in sheep and humans are very similar (Corbel et al., 2015), which strengthens the relevance of our animal model.

2.3. Treatments and samplings

The experimental design is described in Fig. 1. The experiment was performed over 2 periods at least 13 days apart. The first period was devoted to the gavage route of administration (100 mg/kg of body weight) using a nasogastric tube. During the second period, the same ewes received BPA in their feed (10 mg/kg of body weight). For this, the BPA solution was poured on to 75 g of vegetable pellets. The ewes ingested the pellets within 2–9 min. The different doses for the two routes were based on previous studies and chosen to produce BPA concentrations above our assay limit of quantification, for at least 8–10 h following the administration. The use of different doses for the two routes was possible because there is evidence in several species (mouse, rat, monkey, sheep) that BPA pharmacokinetic parameters are linear functions of the dose (Collet et al., 2010; Taylor et al., 2011; Tominaga et al., 2006). These studies suggest that the processes determining internal exposure to BPA, i.e. digestive absorption, distribution and systemic metabolism of BPA, are not modified by the dose up to 100 mg/kg of body weight.

Serial jugular blood samples were collected before all administrations and at 0.08–0.25–0.5–1–2–4–6–8–10 and 24 h after gastric administration or 0.03–0.08–0.16–0.25–0.5–1–2–4–6–8–10 and 24 h after dietary administration. For the dietary administration, time 0 was the time when the ewes had finished ingesting the pellets. Blood samples were collected into

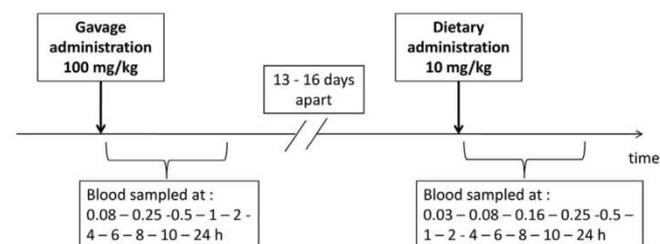


Fig. 1. Schedule of the experimental design. Same ewes ($n = 4$) received BPA by nasogastric gavage (100 mg/kg) and through food pellets (10 mg/kg), 13 days apart.

polypropylene tubes and centrifuged for 20 min at $3000 \times g$ at 4°C . The serum was stored in polypropylene tubes (Eppendorf) at -20°C until assayed.

2.4. BPA and BPA-G assay

BPA and its main metabolite, BPA-glucuronide (BPA-G), were simultaneously quantified in serum samples using an Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled with a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (both from Waters, Milford, MA, USA), according to a previously described method (Lacroix et al., 2011). The mean intra- and inter-day coefficients of variation for three concentration levels of BPA and BPA-G were $<15\%$, and the LOQs were validated at 1 ng/mL and 5 ng/mL, for BPA and BPA-G, respectively.

2.5. Pharmacokinetic analyses

All pharmacokinetic analyses were performed with the software Phoenix®, version 6.4 (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA). It can be argued that the very high concentrations recorded just after the end of ingestion might be artefactual. Indeed, it cannot be excluded that these high concentrations might reflect the direct absorption of BPA from the mouth since the samples were taken from the jugular vein that directly drains the mouth venous circulation. Previous data from our laboratory obtained in dogs, clearly indicated that such a mechanism holds true at first but is rapidly weaned off after 8 min (Gayraud et al., 2013). To avoid any possible confusion, it was decided for the estimation of BPA AUC_{last} to exclude all data obtained during the first 10 min after the end of pellet ingestion.

Serum concentration–time profiles of BPA and BPA-G were first analyzed using a non-compartmental analysis. The areas under the curves of serum BPA and BPA-G concentrations (AUC_{last}) were calculated using the linear trapezoidal rule (linear up, log down) from the dosing time to the sampling time of the last quantifiable (i.e. $>\text{LOQ}$) serum concentration. The ratio $\text{AUC}_{0-\text{last}} \text{BPA-G} / \text{AUC}_{0-\text{last}} \text{BPA}$ was calculated as an index reflecting the extent of metabolism of the parent BPA. Similarly, the ratios of the molar serum BPA-G/BPA concentrations were calculated for each sampling time between 0.25 and 4 h post-administration. The relative bioavailability of BPA was calculated from the following equation:

$$\text{Relative bioavailability} = \frac{\text{AUC}_{\text{last}} \text{gavage}}{\text{AUC}_{\text{last}} \text{diet}} \times \frac{\text{Dose diet}}{\text{Dose gavage}}$$

Moreover, the mean BPA clearance ($1.75 \pm 0.13 \text{ L h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) characterized in our laboratory after BPA intravenous administration (5 mg/kg) in 8 ewes of the same breed and age, was also used to estimate the absolute bioavailability for each route by applying the following equation:

$$\text{Absolute bioavailability} = \frac{\text{AUC}_{\text{last}} \times \text{Clearance BPA}}{\text{Dose}}$$

where “ AUC_{last} ” is the area under the curve of BPA concentrations vs time and “Dose” is the BPA dose administered by each route of administration.

2.6. Deconvolution analyses

The time courses of serum BPA concentrations for both routes of administration were submitted to a deconvolution analysis using the mean intravenous pharmacokinetic parameters obtained in our laboratory from 8 different ewes of the same breed and age. The aim was to discriminate the respective contributions to the

measured concentrations of elimination (characterized by the intravenous pharmacokinetic parameters) and the rates of entrance into the systemic circulation (determination of input rates).

2.7. Statistical analysis

The effect of the route of administration on the ratios of the molar serum BPA-G/BPA concentrations over time after administration was analyzed by a two-way ANOVA with route of administration, sampling time, and their interaction, as fixed-effect factors and animal as a random-effect factor. The statistical analysis was done using a general linear model on SYSTAT 12 software (Systat Software Inc., San Jose, CA).

3. Results

3.1. Comparison of the serum BPA concentration–time profiles

Fig. 2 shows the individual serum BPA concentration–time profiles following gavage (100 mg/kg) or dietary exposure (10 mg/kg) during the 24 h (Fig. 2a) and the first 2 h post-administration (Fig. 2b). The concentrations were not normalized by the dose. For the gavage route, the concentration–time profiles varied considerably between ewes. The maximum concentrations were attained rapidly and within the same time frame for both types of administration. Four to ten hours after gavage, the BPA concentrations increased again to above the limit of quantification.

Individual $\text{AUC}_{0-\text{last}}$ of BPA normalized by the dose are presented in Fig. 2c. Note that for calculation of the AUCs, the serum BPA concentrations obtained during the first 10 min after the end of pellet ingestion were not taken into account to avoid any confusion due to direct drainage of the mouth by the jugular vein. Interestingly, the estimated relative bioavailability for the gavage route, as compared to dietary route, was $31 \pm 5\%$ (mean \pm s.e.m.). The estimated absolute bioavailability of BPA was 0.8 ± 0.2 and $2.7 \pm 0.3\%$ (mean \pm s.e.m.) for gavage and dietary routes, respectively.

Furthermore, when the BPA concentrations measured during the first 10 min after administration were taken into account, the mean (\pm s.e.m.) maximum concentrations normalized by the dose were 1.4 ± 0.6 and $22.2 \pm 2.9 \text{ ng/mL}$ for the gavage and dietary routes, respectively.

3.2. Comparison of BPA metabolism

The ratios of the BPA-G to BPA serum molar concentrations (mean \pm s.e.m.) at 0.25–0.5–1–2 and 4 h post-administration are shown in Fig. 3. The effect of the route on the ratios was significant ($p < 0.001$) with no interaction between the time and the route. The ratios obtained by gavage were much higher than by dietary route for the earliest sampling times, reflecting the extensive metabolism of BPA into BPA-G due to the hepatic first-pass effect. Interestingly, while those ratios remained more or less constant over the 4 h for the gavage route, they tended to increase over time for the dietary route to reach levels within the same range as with gavage.

Overall, the mean ratio of the $\text{AUC}_{0-\text{last}} \text{BPA-G} / \text{AUC}_{0-\text{last}} \text{BPA}$ molar concentrations vs time (mean \pm s.e.m.) obtained after gavage was very high (628 ± 127) reflecting the considerable metabolism of the parent molecule. The AUC ratio of BPA-G to BPA obtained by dietary route was 3.2 fold lower (196 ± 19) than by gavage, thus indicating a more delayed metabolism with the dietary route.

3.3. Deconvolution analysis

Fig. 4 depicts the estimated input rates for BPA during the first 2 h after the gavage and dietary administrations. The entrance

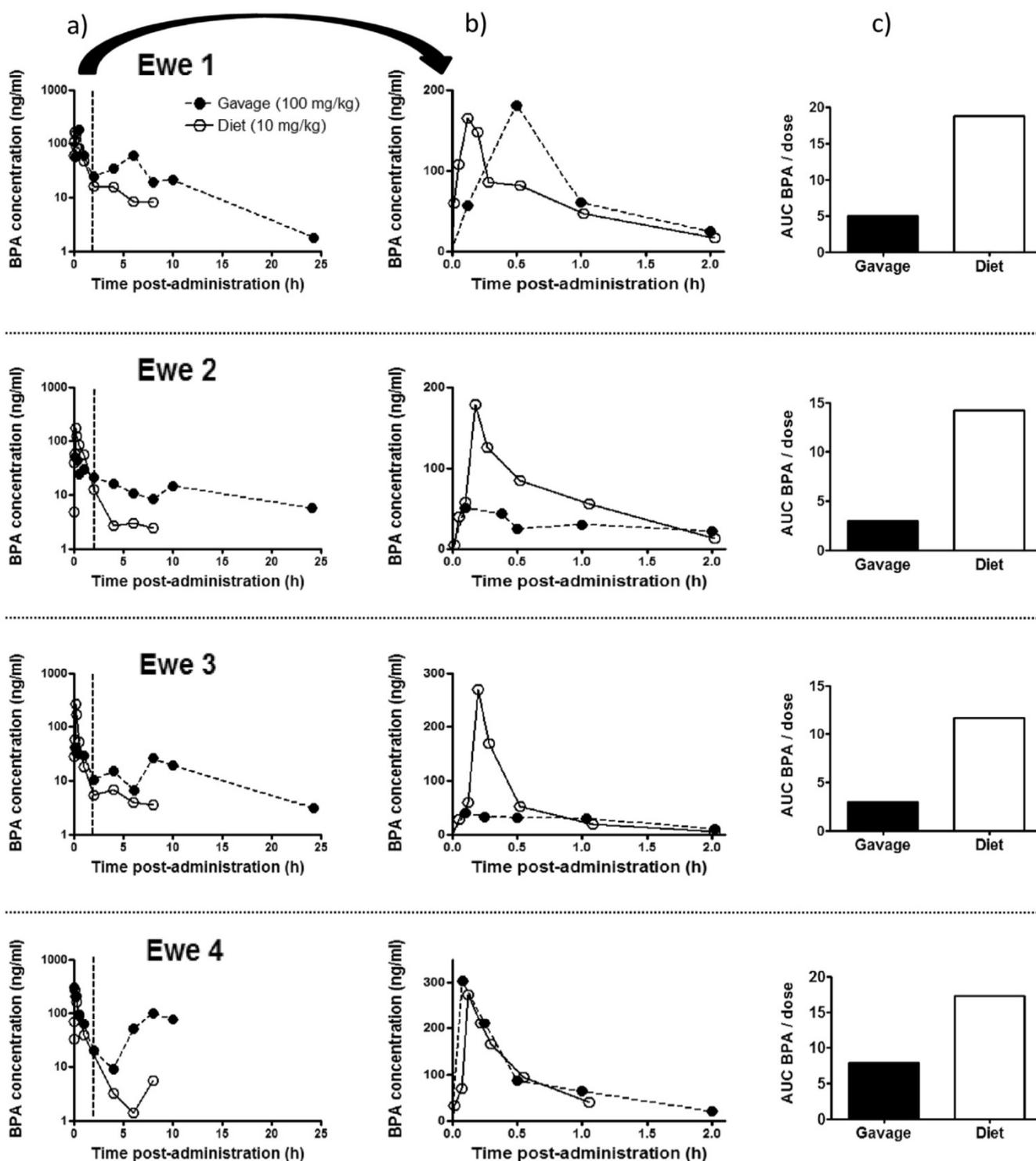


Fig. 2. a–b) individual serum BPA concentration–time profiles obtained on the same ewes ($n = 4$) after gavage (100 mg/kg) and dietary (10 mg/kg) administrations within the 24 h sampling period (a; logarithm scale) and during the first 2 h post-administration (b; linear scale). Blood samples were collected at 0.08–0.25 – 0.5–1 – 2–4 – 6–8 – 10 and 24 h after gastric administration or 0.03–0.08 – 0.16–0.25 – 0.5–1 – 2–4 – 6 – 8–10 and 24 h after dietary administration. The concentrations were not normalized by the dose. c) individual AUC_{0–last} of BPA normalized by the dose after gavage and dietary administrations. The concentrations obtained during the first 10 min after the end of food intake were not taken into account in the AUC estimation.

profiles for the two routes were very different. After dietary exposure, the initial absorption process was brief: the process finished around 0.2 h after the end of pellet ingestion and the

maximum input rate was very quickly obtained for all ewes (at about 0.08 h). In ewes 1, 2 and 4, a second more prolonged entrance process could be evidenced between 0.3 and 2 h after

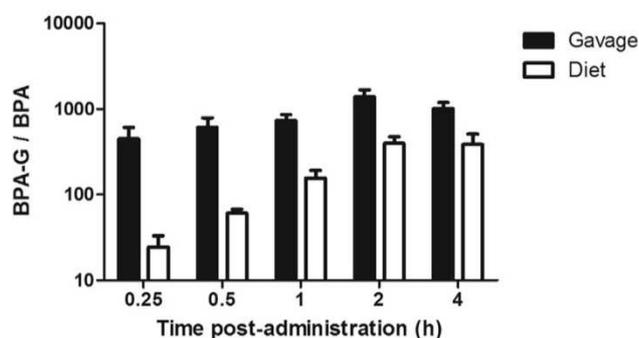


Fig. 3. Mean (\pm s.e.m.) ratios of the BPA-G to BPA serum molar concentrations obtained within the first 4 h after gavage (100 mg/kg) and dietary (10 mg/kg) administrations in the same ewes ($n = 4$).

administration.

With the gavage route, 2 (ewes 1 and 2) or 3 (ewes 3 and 4) entrance phases were computed during the 24 h post-administration. The amplitudes of these entrance phases were much lower than those computed for the dietary route. Maximum input rates during the first phase (quantitatively the largest) were obtained 0.24 h (ewes 1 and 2), 0.72 h (ewe 3) and 0.97 h (ewe 4) after gavage.

4. Discussion

The current study aimed at determining the relevance of sublingual absorption in a real-life exposure scheme relevant to human food contamination. To the best of our knowledge, this is the first study to compare BPA PK parameters after dietary and gavage administrations in the same animals and to use pharmacokinetics deconvolution analysis to discriminate the contribution and pattern of buccal absorption due to food contamination. Our study clearly demonstrates major kinetic differences in BPA disposition following either nasogastric gavage or dietary administration in the ewe. Consistently with our hypothesis of a lower pre-systemic metabolic rate of BPA biotransformation into BPA-G, we showed that the absolute bioavailability of BPA was about 3-fold higher after administration by dietary route than by gavage. Our results are consistent with those obtained by Sieli et al. who reported a higher maximum BPA concentration and a higher relative bioavailability in mice treated with BPA-d6 via their diet as compared to mice treated by gavage (Sieli et al., 2011). All these observations are consistent with the existence of a dual mechanism of BPA absorption following dietary exposure. Part of the ingested BPA can be directly absorbed by passive diffusion through the buccal mucosa due to the molecule's physicochemical properties. This BPA directly attains the systemic circulation and avoids the hepatic first-pass effect. This direct oral absorption during food chewing might therefore be associated with higher bioavailability and higher blood concentrations than routes of administration limited to intestinal absorption, such as gastric gavage. Thus, the dietary route was associated with a higher maximum BPA concentration in the jugular blood draining the mouth, which confirmed a direct passage of BPA through the buccal epithelium.

This hypothesis is supported by results obtained in human pharmacokinetic studies (Table 1). Indeed, the AUC ratios of unconjugated BPA to total BPA (mainly BPA glucuronide) in sheep receiving the dose in pellets and in humans ingesting the dose in cookies, were very similar (Thayer et al., 2015). When humans ingested the dose in tomato soup (Teeguarden et al., 2015), the ratio was 50% lower. This could be attributed to a shorter period of

contact of the soup with the buccal mucosa (which limited mouth absorption) in comparison to the cookie or pellets. In addition, in rhesus monkeys fed with small pieces of BPA-supplemented fruits, the highest ratios were observed in animals that retained small pieces of food in their cheeks, leading to longer contact of the food with the buccal epithelium and thus maximizing BPA absorption by this route (Vom Saal et al., 2014). Interestingly, serum/plasma BPA maximum concentrations normalized by the dose were similar in all *in vivo* studies in which the dose was delivered through solid food, including our current study and the study with BPA-supplemented cookies in humans. The maximum concentration obtained in the study of human exposure through soup was lower. This discrepancy could be explained at least in part by the short contact time of liquid food with the buccal mucosa by contrast with solid food.

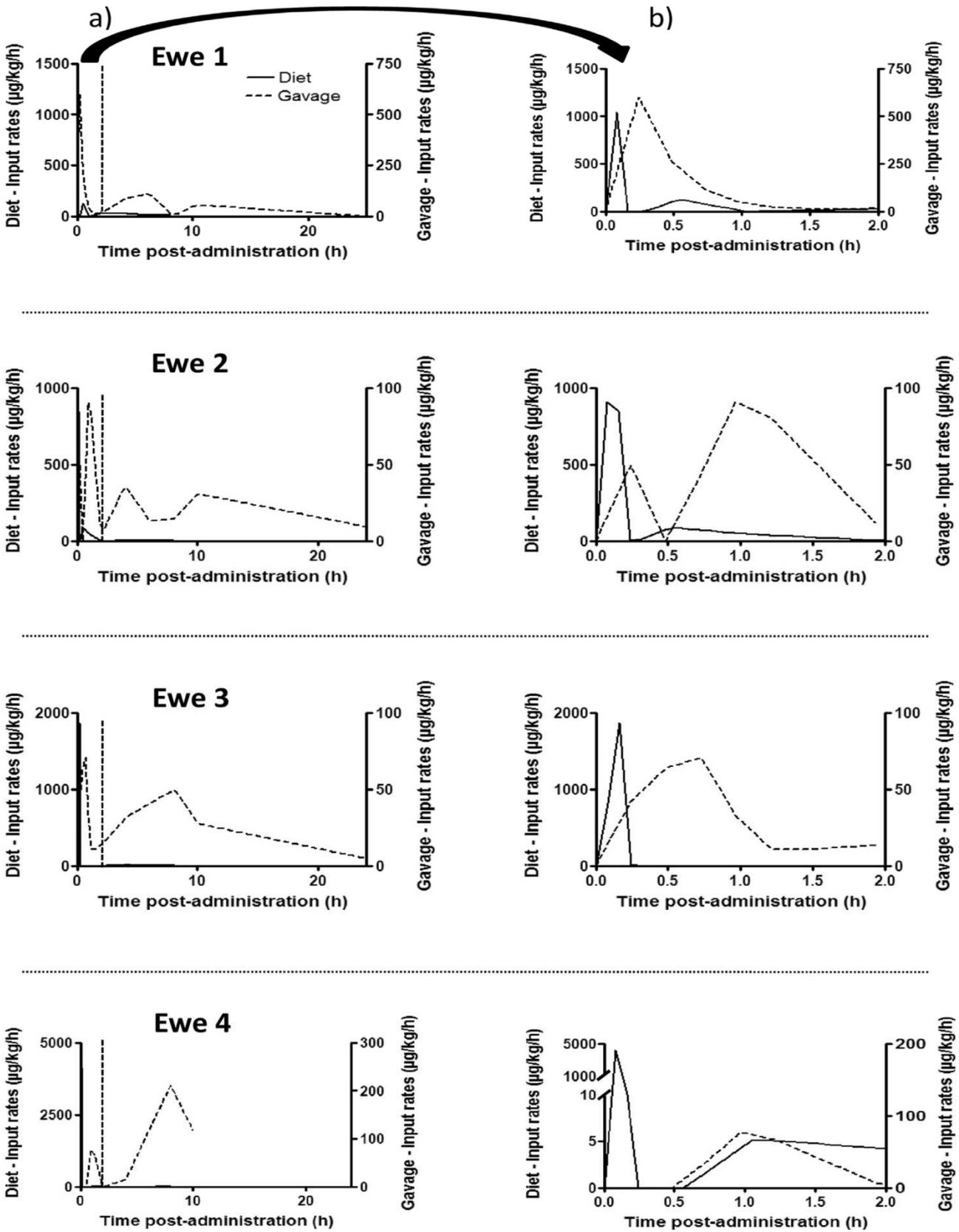
The results of the deconvolution analysis of the time course of serum BPA concentrations are highly suggestive of a dual mechanism of absorption when BPA is ingested through food. The initial very rapid entrance process could be attributed to buccal absorption whereas the second peak could be attributed to absorption in the gastro-intestinal tract, resulting in almost complete inactivation of BPA by the hepatic first-pass effect. Such a hypothesis is strengthened by the time-dependency of the ratios of serum BPAG/BPA concentrations following dietary administration with the highest ratios observed during the latest sampling times.

Interpretation of the results is somewhat complicated by the peculiarities of the digestive physiology in our polygastric animal model. It is indeed possible that the buccal mucosa might also be subsequently exposed long after the arrival of BPA in the stomach compartments, through the process of rumination. Accordingly, for 3 of the 4 ewes, the deconvolution approach predicted prolonged peaks of absorption at around 4–8 and 10 h post-gavage. This might correspond to oral absorption from the ruminal boluses that ewes can chew for quite a long time. However, because the dose would be considerably diluted in the prestomach, it is very likely that our experimental conditions were not suitable to evidence such mechanisms. The predicted second peaks might instead be due to digestive absorption in a more distal digestive compartment.

Bioavailability by dietary route was not as high as determined in the dog after direct application of a BPA solution on the sublingual mucosa (Gayrard et al., 2013). Even if the actual oral absorption in dogs is probably slightly higher than in sheep, because of the much lower degree of keratinization of the epithelium (Sa et al., 2016), it cannot fully explain the extent of the difference between the two studies. In the study by Gayrard et al., the BPA-solution was deposited under the tongue, the thinnest and most vascularized part of the mouth, thus facilitating sublingual absorption. The dog study was purely designed to provide a proof of concept that BPA can be directly absorbed by the mouth mucosa thus bypassing the hepatic first-pass effect. The functional significance of such a mechanism in the context of a "real life" scenario of BPA ingestion through food still needed to be established. Our current results in the ewe show not only that this mechanism occurs during food chewing but also enabled us to apply a deconvolution approach to quantify and characterize the entire process of BPA entrance into the systemic circulation following exposure to BPA through food. We evidenced major qualitative and quantitative differences between gastric gavage and dietary administrations.

5. Conclusion

By comparing the pharmacokinetic profiles and parameters obtained after dietary vs gavage exposure in the ewe, we were able to demonstrate major differences in the time courses of serum BPA concentrations between the two routes. After dietary exposure, a



Individual input rates plots resulting from deconvolution analysis of the intravenous pharmacokinetic parameters (obtained from 8 adult ewes) from the time course of BPA concentrations obtained after gavage (100 mg/kg) and dietary (10 mg/kg) administration to the same ewes (n = 4) between 0 and 24 h (a) and 0–2 h (b) after stration. The input rates were normalized by the dose.

Table 1Comparison of mean (\pm s.e.m.) pharmacokinetic parameters obtained in different species after oral administration of BPA through diet.

Species	Human		Rhesus monkey	Ovine
	Cookie	Tomato soup	Fruits	Pellets
C _{max} (ng/mL)/dose (μ g/kg)	0.015	0.003	0.014	0.022
Equimolar AUC free BPA/AUC total BPA (%)	0.56 \pm 0.04	0.23	1.60	0.52 \pm 0.05
Reference	Thayer et al., 2015	Teeguarden et al., 2015	Vom Saal et al., 2014	current study

dual mechanism of BPA absorption was evidenced. An initial highly efficient mouth mucosal absorption, with no hepatic first-pass effect, was followed by absorption from the gastro-intestinal tract, associated with a high rate of metabolization due to the hepatic first-pass effect. This dual mechanism of absorption was responsible for higher serum unconjugated BPA concentrations than predicted from gavage studies. Such a mechanism could partially explain the observed discrepancies between biomonitoring results and pharmacokinetic studies in humans.

More generally, the current study with BPA makes it clear that the gavage route is not always suitable for studying the pharmacokinetics of food pollutants. Despite being harder to control, dietary exposure should therefore be preferred to gavage to investigate the oral disposition of food pollutants.

Acknowledgements

We thank the INRA experimental unit of Domaine de Lafage for providing the animals and Cédric Lacassagne, Noémie Deschamps and Jean-Pierre Gau from the sheep experimental unit for their involvement in animal care.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.004>.

References

- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A., 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ. Health Perspect.* 114, 106–112. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.8451>.
- ANSES, 2013. Evaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine - Tome 1.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 116, 39–44. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.10753>.
- Collet, S.H., Picard-Hagen, N., Lacroix, M.Z., Puel, S., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.-L., Gayrard, V., 2015. Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.024>.
- 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. <http://dx.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. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.112.106369>.
- Corbel, T., Perdu, E., Gayrard, V., Puel, S., Lacroix, M.Z., Viguié, C., Toutain, P.-L., Zalko, D., Picard-Hagen, N., 2015. Conjugation and deconjugation reactions within the fetoplacental compartment in a sheep model: a key factor determining bisphenol A fetal exposure. *Drug Metab. Dispos.* 43, 467–476. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.114.061291>.
- EFSA, 2015. Scientific Opinion on the Risks to Public Health Related to the Presence of Bisphenol A (BPA) in Food Stuffs: Part I – Exposure Assessment.
- Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P.-L., Corbel, T., Viguié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Mindeguia, P., Bousquet-Melou, A., Gayrard, V., 2016. Bisphenol A

- glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environ. Int.* 86, 52–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.006>.
- Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Collet, S.H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2013. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ. Health Perspect.* 121, 951–956. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1206339>.
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., Taketani, Y., 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 2839–2841. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/17.11.2839>.
- Kaddar, N., Bendridi, N., Harthé, C., de Ravel, M.R., Bienvenu, A.-L., Cuilleron, C.-Y., Mappus, E., Pugeat, M., Déchaud, H., 2009. Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Anal. Chim. Acta* 645, 1–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.036>.
- Lacroix, M.Z., Puel, S., Collet, S.H., Corbel, T., Picard-Hagen, N., Toutain, P.L., Viguié, C., Gayrard, V., 2011. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85, 2053–2059. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.040>.
- Padmanabhan, V., Siefert, K., Ransom, S., Johnson, T., Pinkerton, J., Anderson, L., Tao, L., Kannan, K., 2008. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* 28, 258–263. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jp.7211913>.
- Sa, G., Xiong, X., Wu, T., Yang, J., He, S., Zhao, Y., 2016. Histological features of oral epithelium in seven animal species: as a reference for selecting animal models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 81, 10–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.019>.
- Sieli, P.T., Jašarevic, E., Warzak, D.A., Mao, J., Ellersieck, M.R., Liao, C., Kannan, K., Collet, S.H., Toutain, P.-L., Vom Saal, F.S., Rosenfeld, C.S., 2011. Comparison of serum bisphenol A concentrations in mice exposed to bisphenol A through the diet versus oral bolus exposure. *Environ. Health Perspect.* 119, 1260–1265. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385>.
- Taylor, J.A., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P.A., Toutain, P.-L., Laffont, C.M., VandeVoort, C.A., 2011. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ. Health Perspect.* 119, 422–430. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002514>.
- Teeguarden, J.G., Twaddle, N., Churchwell, M.I., Yang, X., Fisher, J.W., Seryak, L.M., Doerge, D.R., 2015. 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.009>.
- Thayer, K.A., Taylor, K.W., Garantzotis, S., Schurman, S., Kissling, G.E., Hunt, D., Herbert, B., Church, R., Jankovich, R., Churchwell, M.I., Scheri, R.C., Birnbaum, L.S., Bucher, J.R., 2015. Bisphenol A, bisphenol S, and 4-Hydroxyphenyl 4-Isopropoxyphenylsulfone (BPSIP) in urine and blood of cashiers. *Environ. Health Perspect.* <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1409427>.
- Tominaga, T., Negishi, T., Hirooka, H., Miyachi, A., Inoue, A., Hayasaka, I., Yoshikawa, Y., 2006. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC–MS/MS method. *Toxicology* 226, 208–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2006.07.004>.
- Vandenbergh, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139–177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>.
- vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Belcher, S.M., Birnbaum, L.S., Crain, D.A., Eriksen, M., Farabolini, F., Guillelte, L.J., Hauser, R., Heindel, J.J., Ho, S.-M., Hunt, P.A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Keri, R.A., Knudsen, K.E., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Marcus, M., McLachlan, J.A., Myers, R.P., Nadal, A., Newbold, R.R., Olea, N., Prins, G.S., Richter, C.A., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Talsness, C.E., Vandenbergh, J.G., Vandenberg, L.N., Walsler-Kuntz, D.R., Watson, C.S., Welshons, W.V., Wetherill, Y., Zoeller, R.T., 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod. Toxicol. Elmsford N.* 24, 131–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.005>.
- Vom Saal, F.S., VandeVoort, C.A., Taylor, J.A., Welshons, W.V., Toutain, P.-L., Hunt, P.A., 2014. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: relevance for human exposures. *Reprod. Toxicol. Elmsford N.* 45, 105–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.01.007>.

C. Comparaison de l'exposition interne au BPA attachée aux voies alimentaire et sous-cutanée

Une deuxième approche pharmacocinétique a été réalisée afin d'évaluer la pertinence de notre mode d'exposition habituelle par voie sous-cutanée, mis en place afin de mieux contrôler la dose et de s'affranchir des particularités du système digestif propre aux ruminants, par rapport à un contexte d'exposition proche de la voie de contamination préférentielle de l'homme. Les résultats sont détaillés plus en profondeur dans l'article 2.

Brièvement, quatre brebis adultes ont été traitées avec du BPA par voie alimentaire (10 mg/kg) et par voie sous-cutanée (5 mg/kg), à 13 jours d'intervalle au minimum. Des prélèvements de sang sériés ont été réalisés pendant 24 h après les administrations. Les concentrations sériques de BPA et de BPA-G ont été mesurées par UPLC-MS. Une analyse pharmacocinétique non-compartmentale a ensuite été réalisée pour comparer les profils pharmacocinétiques des 2 voies.

Le décours temporel des concentrations de BPA variait de façon importante entre les deux voies (Figure 33A). Avec la voie alimentaire, la concentration maximale (C_{max}) était atteinte très rapidement (0,12 h pour 2 brebis et 0,20 h pour 2 autres). La concentration maximale moyenne, normalisée par la dose, était seulement $4,6 \pm 1,5$ fois plus élevée avec la voie sous-cutanée qu'avec la voie alimentaire (Figure 33C). Avec cette dernière, les concentrations de BPA diminuaient rapidement et étaient inférieures à la limite de quantification analytique 8 h après l'administration. Avec la voie sous-cutanée, la concentration maximale était obtenue plus tardivement (2 h pour 3 brebis et 1 h pour une brebis) et les concentrations de BPA diminuaient plus lentement.

Le décours temporel du BPA-G était quant à lui très similaire entre les 2 voies d'administration (Figure 33B). Les concentrations maximales de BPA-G obtenues par les 2 voies étaient identiques après normalisation par la dose (environ 2,4 nmol/mL ; Figure 33D).

Le profil temporel des concentrations sériques de BPA obtenu avec la voie sous-cutanée était caractérisé par une aire sous la courbe (AUC) normalisée par la dose supérieure à celle obtenue avec la voie alimentaire (Figure 34A). Cette dernière conduisait à une biodisponibilité relative de $3,3 \pm 0,3$ % par rapport à la voie sous-cutanée.

A l'inverse, pour le BPA-G, l'AUC normalisée par la dose était très similaire entre les 2 voies (Figure 34B). Le ratio des AUC de BPA-G / BPA était ainsi 25 fois plus élevé avec la voie alimentaire qu'avec la voie sous-cutanée (Figure 34C). Ceci suggérait que la biotransformation du BPA en BPA-G était beaucoup plus importante lorsque l'administration était par voie alimentaire, probablement en raison

de la fraction de BPA absorbée au niveau intestinal et subissant un très fort effet de premier passage hépatique.

D. Conclusion

Cette étude d'équivalence apporte de nouvelles données pharmacocinétiques du BPA susceptibles de favoriser la comparaison d'études animales ayant recours à des voies d'exposition différentes et l'extrapolation des données de l'animal à l'homme. Elle constitue également un élément clé pour relier les doses de BPA administrées par voie sous-cutanée à des doses équivalentes par voie alimentaire.

La confrontation des profils de BPA obtenus par voie alimentaire et par gavage a permis de consolider l'hypothèse de l'absorption sublinguale du BPA dans un contexte de contamination humaine par voie alimentaire. L'analyse pharmacocinétique non-compartimentale des profils de BPA et de BPA-G ainsi que la déconvolution du décours temporel des concentrations sériques de BPA ont permis de mettre en évidence un double mécanisme d'absorption du BPA suite à une exposition par voie alimentaire. Ainsi, outre la fraction absorbée dans le tractus gastro-intestinal, une fraction est directement absorbée au niveau de la muqueuse buccale. Ce double mécanisme d'absorption est à l'origine d'une biodisponibilité et d'une concentration maximale respectivement 3 et 16 fois plus élevées par voie alimentaire que par gavage. Il pourrait donc contribuer à expliquer l'observation ponctuelle, dans les études d'épidémiologie humaine, de concentrations sanguines en BPA élevées.

La comparaison des voies alimentaire et sous-cutanée a, quant à elle, permis de déterminer l'équivalence, en termes d'exposition interne, de notre voie expérimentale d'exposition, la voie sous-cutanée, à la principale voie d'exposition décrite chez l'homme, la voie alimentaire. La voie sous-cutanée se distingue par une exposition prolongée au BPA alors que l'exposition par voie alimentaire conduit à une augmentation rapide et brève des concentrations sériques de BPA. La biodisponibilité du BPA par voie sous-cutanée est 30 fois supérieure à celle obtenue par voie alimentaire. En revanche, les deux voies conduisent à des concentrations maximales en BPA et à une exposition au BPA-G comparables.

Par ailleurs, l'ajustement par un modèle PK de la cinétique du BPA par voie sous-cutanée nous a permis de simuler, dans les études ultérieures, les concentrations sériques maternelles en BPA et BPA-G obtenues après des administrations répétées de BPA et de pallier aux limites de sensibilité de notre méthode analytique.

II. Exploration des effets du BPA sur la fonction thyroïdienne

A. Introduction et objectifs

Bien étudié pour ses effets sur la fonction de reproduction en raison de ses propriétés œstrogénomimétiques, le BPA présente également des propriétés perturbatrices thyroïdiennes. Compte-tenu de la très grande sensibilité du fœtus à des modifications de l'homéostasie thyroïdienne, l'exposition de la femme enceinte au BPA constitue un risque potentiel pour le développement fœtal.

Quelques études épidémiologiques focalisées sur la grossesse suggèrent des corrélations entre le niveau d'exposition maternelle au BPA et les concentrations en hormones thyroïdiennes circulantes chez la mère ou les enfants. Ces données sont en accord avec les rares études animales explorant l'effet sur la fonction thyroïdienne d'une exposition gestationnelle au BPA. Celles-ci mettent en évidence que l'exposition de rates durant la gestation et la lactation altère le statut thyroïdien des mères et/ou des descendants. Toutefois, la pertinence de ces résultats chez l'homme est limitée par les nombreuses différences inter-espèces existant entre les rongeurs et l'espèce humaine. De plus, aucune donnée d'exposition interne n'est disponible dans ces études compliquant alors la mise en relation avec les niveaux d'exposition humaine.

Dans ce contexte, les effets d'une exposition gestationnelle (du 28^{ème} jour à la fin de la gestation) au BPA sur la fonction thyroïdienne maternelle et fœtale ont été étudiés sur le modèle ovin. Le traitement au BPA a été associé à une hypothyroxinémie marquée (plus de 30 % de diminution de TT4) chez les mères et les descendants. Néanmoins, la dose de BPA testée était de 5 mg.kg⁻¹.j⁻¹, soit une concentration très supérieure aux doses auxquelles l'homme est exposé. Il convenait donc de vérifier si les effets perturbateurs thyroïdiens du BPA se manifestaient toujours à des doses plus faibles.

L'objectif de cette étude était donc de déterminer, sur le modèle de brebis gestantes, la plus faible dose de BPA associée à une perturbation thyroïdienne et de préciser les caractéristiques de cette perturbation.

Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'article (Article 2) et feront l'objet d'une publication prochainement soumise dans une revue de toxicologie.

B. Article 2

"Evidence for bisphenol A-induced disruption of the maternal thyroid homeostasis at very low level of exposure in the pregnant ewe"

D. Guignard, V. Gayrard, M.Z. Lacroix, N. Picard-Hagen, S. Puel, C. Viguié

Evidence for bisphenol A-induced disruption of maternal thyroid homeostasis in the pregnant ewe at low level representative of human exposure

Davy Guignard, Véronique Gayrard, Marlène Lacroix, Sylvie Puel, Nicole Picard-Hagen, Catherine Viguié

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: Catherine Viguié

TOXALIM UMR 1331, INRA UPS

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

23 chemin des Capelles, BP 87614

31076 Toulouse cedex3, France

Phone: +33 561 19 39 13

Email: catherine.viguie@inra.fr

Abbreviations:

AUC, area under the curve; BPA, bisphenol A; BPA-GLUC, bisphenol A glucuronide; BPA-SULF, bisphenol A sulfate; GD, gestational day; LOQ, limit of quantification; LOD, limit of detection; PK, pharmacokinetic; PND, post-natal day; S.C., subcutaneous; TH, thyroid hormones

Abstract

Many uncertainties remain regarding the potential of bisphenol A (BPA) as a thyroid disruptor *in vivo* in mammals and the relevance of experimental data to humans. The relevance of the exposure schemes used in experimental *in vivo* studies, particularly the use of parenteral routes, is also a major source of uncertainty when analysing the risk of BPA exposure for human health. In this context, the goals of our study conducted in an ovine model relevant to human gestation and thyroid physiologies were to: 1) determine the equivalence of subcutaneous and dietary exposures, 2) determine the lowest BPA dose associated with thyroid disruption in the pregnant ewe and 3) gain some mechanistic insights by specifying the characteristics of thyroid disruption. Subcutaneous administration did not induce much higher maximum serum concentrations of BPA than the dietary route but was associated with more prolonged exposure. Interestingly, BPA-GLUC internal exposure via the two routes was almost identical. In pregnant ewes, the decrease in thyroid hormones (TH) concentration overtime was more accentuated in ewes treated with BPA, particularly with the medium dose (50 µg/(kg.d); SC) for which the maximum BPA concentrations were predicted to be within the 1-10 ng/mL range i.e. very similar to the highest blood concentrations reported in humans. The balance between TT4 and rT3 varied differently between the control and treatment groups throughout the treatment period particularly in the medium dose group. The origin of this modification could not be determined from our results but it would be interesting to test whether BPA exposure can affect the endocrine function of the placenta as a thyroid modulator, in particular its deiodinase 3 activity.

Highlights

- Maximum BPA serum concentration is similar between subcutaneous and dietary routes
- Bisphenol A alters the maternal thyroid status in pregnant ewe
- Thyroid disruption is observed at BPA serum concentration relevant to human exposure
- BPA might disrupt the deiodinase activity in pregnant ewe

Keywords: bisphenol A; toxicokinetic; exposure; thyroid disruption; pregnancy; ovine model

Introduction

Bisphenol A (BPA), a major molecule used in the plastics industry, is now recognized to be an endocrine disruptor that exerts deleterious effects on human health (Chapin et al., 2008; vom Saal et al., 2007). Most investigations have focused on reproductive functions based on the estrogenomimetic properties of this compound. However, accumulated evidence suggests that BPA might have negative effects on other endocrine systems (Richter et al., 2007; Rubin, 2011) including thyroid function (Zoeller, 2010).

Although sometimes controversial, the results of numerous epidemiological studies in humans indicate that BPA exposure might be associated with diverse degrees of thyroid disruption in adults, children and new born. Epidemiological data obtained in a cohort of men from infertile couples (Meeker et al., 2010) and in a larger cohort of healthy individuals (NHANES cohort; Meeker and Ferguson, 2011) suggest that BPA exposure might be associated with some degrees of thyroid disruption characterized by an inverse relationship between urinary BPA concentrations and total thyroxine (TT4) concentrations. In another cohort of adults, urinary BPA concentration was, respectively, positively and negatively correlated with free T3 and TSH serum concentrations (Wang et al., 2013). In a large cohort of Thai adults, BPA serum concentrations were shown to be negatively correlated with free T4 (fT4) concentrations in men but not in women (Sriprapradang et al., 2013). In a cohort of 9 to 11 year old Chinese children, the BPA urinary concentration in morning spot sampling was negatively correlated with thyroid gland volume (Wang et al., 2015) and this correlation did not seem to depend upon the iodine supply and/or iodine status of the children.

As far as gestational exposure is concerned, data are very scarce in human. However, there is some evidence that infant thyroid function might be altered in relation to maternal exposure to BPA. In a cohort of pregnant women and their infants (CHAMACOS study), urinary BPA in the mother was shown to be negatively correlated with maternal TT4 blood concentration when the urine BPA and TT4 blood samples were collected close together in time (Chevrier et al., 2013). As a result, the average maternal urine BPA was related to increased odds of low TT4 in the mother. An inverse relationship between maternal urinary BPA and neonatal blood TSH was evidenced in newborn boys. In the HOME study, 26-week maternal urinary BPA concentrations were inversely correlated with serum TSH concentrations in newborn girls but not in boys (Romano et al., 2015).

Very few experimental studies have been done on the effect of BPA on thyroid function in mammals. In one study, the physiological increase in circulating TT4 that generally occurs around post-natal day 15 (PND15) was amplified in rats born to and fed by mothers treated with an oral BPA dose of 1 mg/(kg.d) from gestational day (GD) 6 until weaning (Zoeller et al., 2005). In another study in pregnant

rats (Xu et al., 2007), BPA oral treatment of 0.1 mg/L in drinking water (approximately 10 µg/(kg.d)) led to a transitory decrease in fT4 concentration in mothers during the early postpartum period (PND0 to PND7), while their male offspring showed an increase in fT4 at PND7 followed by a decrease at PND21. The relevance to humans of thyroid regulation in rodents is nevertheless controversial due to the different timing of thyroid function ontogenesis and the lack of expression of thyroxine binding globulin (TBG), the high affinity specific binding protein in adult rats (Fisher et al., 1976). This serum protein is considered a key player in the maintenance of thyroid homeostasis (Hard, 1998; Wu and Farrelly, 2006). In one of our studies in pregnant ewes, more relevant to humans than the rodent model from the thyroid regulation standpoint, BPA exposure was associated with hypothyroxinemia (about 30% decrease in TT4) in both the mothers and newborn lambs after subcutaneous exposure of the ewes to 5 mg/(kg.d) throughout gestation (Viguié et al., 2013).

Evidence that BPA can be a potential thyroid disruptor has also arisen from studies in mammalian cells and in amphibian or fish larvae models. The results of these studies converge to suggest that BPA can exert an antagonistic effect on TH-dependent mechanisms (Fini et al., 2007; Goto et al., 2006; Heimeier et al., 2009; Iwamuro et al., 2003; Kaneko et al., 2008; Sun et al., 2009; Terrien et al., 2011; Yang and Chan, 2015) and that several pathways involved in TH economy can be affected by BPA. For example, at concentrations above the µM range, BPA can inhibit thyroid uptake in FRTL-5 cells (Wu et al., 2016). Hepatic regulation of thyroid hormone homeostasis can also be affected by BPA as shown in a zebrafish liver cell line in which BPA (45-180 µM) decreased the expression of several genes involved in thyroid homeostasis i.e., deiodinases I and III, sulfotransferases 1,2 and 3, UGT2A1 and thyroid receptor β (Yang and Chan, 2015). In addition, the antagonistic effect of BPA could be mediated, at least in cell models, by the increased recruitment of co-repressors of TH nuclear receptors from the N-CoR family (Moriyama et al., 2002; Sheng et al., 2012).

Overall, it is apparent that uncertainties remain regarding the potential of BPA as a thyroid disruptor in mammals and the relevance of experimental data to humans. Another major source of uncertainty on BPA risk analysis for human health based on experimental data obtained in animals is related to the level of internal exposure, particularly with regard to the route of administration. Indeed, in many good quality experimental studies, animals were exposed via parenteral or gastric gavage routes to ensure better control of the dose administered although none of these routes is totally representative of the acknowledged main route of human exposure i.e. via food contamination (Guignard et al., 2016; Taylor et al., 2011; Vom Saal et al., 2014). Thus, the relevance of the route of administration is a critical issue that every scientist needs to bear in mind when performing toxicological evaluations of small lipophilic molecules which, alike BPA, are subjected to a high hepatic first pass effect.

In this context, the goals of our study conducted in an ovine model relevant to human gestation and thyroid physiologies were to 1) compare the internal exposure to BPA and BPA-GLUC after subcutaneous and dietary exposures, 2) determine the lowest dose of BPA associated with thyroid disruption in pregnant animals and, 3) qualify the characteristics of the thyroid disruption.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Bisphenol A 99% purity (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was dissolved in corn oil / absolute ethanol (6/1: V/V). For experiment 1, a single BPA solution (100 mg/mL) was prepared and used for both routes of administration. The volume administered to the animals was adjusted to the bodyweight recorded the day before the administrations. For the dietary route, BPA solution was spilled onto the pellet ration (on average 6 mL of solution on 75g of pellets). The subcutaneous (S.C.) injection of BPA was performed on the distal part of the neck (on average 3 mL/ewe). For experiment 2, a vehicle and three different BPA solutions (0.01 – 1 and 100 mg/mL) were prepared so that the injected volume adjusted to individual bodyweight was the same in all groups. The solutions were renewed monthly and were stored at ambient temperature in sealed amber glass bottles for the entire duration of their use. The vehicle solution was prepared and stored in a different room. All material used for the solution preparation, sample processing and assays was either made of glass or of BPA-free plastics.

2.2. Animal husbandry

All animal procedures were carried out in accordance with the accepted standards of humane animal care under agreement 311155515 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture and validated by the local ethical committee for animal experimentation (project number: 2016 0323 10542323) and by the French Ministry of Higher Education and Research (project number: 00890.01) for experiments 2 and 1, respectively. The study was performed on adult Lacaune ewes in the sheep research facility at the National Veterinary School of Toulouse, France. The ewes were kept under natural photoperiodic and temperature conditions, with free access to water, hay *ad libitum* and plant based pellets (Brebilac® RAGT, Rodez, France). The absence of BPA contamination of water, hay and pellets was checked by assaying BPA in 100 mg samples of each matrix homogenized in 1 mL of acetonitrile. BPA was not detected in any of the samples (LOD 10 ng/g of food).

In experiment 1, animals were penned individually the day before the administrations and for 24h following administrations. For experiment 2, all animals in a same group were kept together and no direct contact was allowed between animals from different groups, with separate food and water supplies provided for each group.

2.3. Experimental design

Experiment 1: relative bioavailability via subcutaneous and dietary routes of administration

This experiment was designed to evaluate the equivalence, in terms of internal exposure to BPA, of the S.C. route of administration used for convenience in this experiment and the dietary one thought to be the main route of exposure in human populations. It was conducted on 4 ewes (3-5 year old; 50-73 kg) and was divided into 2 periods conducted at least 13 days apart. The first period was devoted to the S.C. route of administration (5 mg/kg of body weight). During the second period, the same ewes received BPA via the diet (10 mg/kg of body weight). Before the dietary period, ewes were fasted overnight to facilitate intake of the BPA-treated pellets. The ewes ingested the pellets within 2 – 9 minutes. Free access to hay and water was maintained after the administrations. The different doses for the different routes were based on previous studies and were chosen to produce BPA concentrations above our assay limit of quantification, for at least 8-10 hours after the administrations. Use of different doses for the two routes was possible because there is evidence that the parameters of BPA pharmacokinetics in several species including sheep are linear functions of the dose (Collet et al., 2010; Taylor et al., 2011; Tominaga et al., 2006) over a dose range of 5 to 10 mg/kg. Results regarding the dietary route have been described in detail in a previous publication (Guignard et al., 2016).

Serial jugular blood samples were collected before all administrations and 0.5 – 1 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 – 24 h after the S.C. administration or 0.03 – 0.08 – 0.16 – 0.25 – 0.5 – 1 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 – 26 h after the dietary exposure. For the dietary administration, time 0 was the time when the ewes had finished ingesting the pellets. The blood samples were centrifuged at 3000g at 4°C for 20min, then the serum was decanted and stored in propylene tubes at -20°C until assayed.

Experiment 2: determination of the lowest BPA dose associated with maternal thyroid disruption

This experiment was conducted on 22 pregnant ewes (1-3 year old; 55-103 kg) artificially inseminated on the same day after hormonal synchronization of estrus. A vitamin and iodine/selenium-enriched

mineral supplement (Alimal gestante® Alliance Elevage, Souvigny, France) was provided to cover the specific requirements of gestation. The ewes were weighed twice a month. The amount of pellets was regularly adjusted to pregnancy requirements and changes in body weight. The ewes were randomly allocated to 4 treatment groups balanced for TT4 concentration, body weight and age. From GD28 to GD132-134, each group received different daily doses of BPA by S.C. administration i.e., low dose group 0.5 µg/(kg.d) (n=6); medium dose group 50 µg/(kg.d) (n=5); high dose 5000 µg/(kg.d) (n=5) and vehicle group (n=6). The administered volume was regularly adjusted to the most recently recorded body weight.

Maternal blood samples were collected twice a week during the treatment period, just before the next BPA administration. The first maternal blood sample was taken on GD28 before the first BPA or vehicle administration. On GD62, serial blood samples were collected from animals in the high dose treatment group (0 - 1.5 – 4 - 8 and 10 h post administration).

At GD133-135, i.e. about two weeks before the expected term, the fetuses were delivered by cesarean section under rachianesthesia and local anesthesia of the muscle wall (5 mL of lidocaine in the sacrolombar space and 10 mL along the incision line on the abdominal wall; Lurocaine®, Vetoquinol SA, Lure, France). Maternal and fetal jugular blood, cord blood and amniotic fluid were collected at delivery after which the ewes and fetuses were immediately euthanized by intravenous overdose of sodium pentobarbital (Doléthal®, Vetoquinol France, 60 mg/kg of pentobarbital i.v.).

2.4. BPA, BPA-GLUC and BPA-SULF assay

BPA, BPA-GLUC and BPA-SULF (BPA sulfate) concentrations were simultaneously measured in the serum samples collected during experiment 1, in the amniotic fluid, cord blood and maternal and fetal blood samples collected at delivery, and in the serial samples collected from the high dose group in experiment 2, using a previously described UPLC/MS/MS method (Lacroix et al., 2011). The validated LOQs were 1 ng/mL for BPA and 5 ng/mL for BPA-GLUC/S. The mean intra- and inter-day coefficients of variation for three concentration levels of BPA and BPA-GLUC were lower than 15%.

2.5. Pharmacokinetic analyses

All pharmacokinetic analyses were performed with the Phoenix® software, version 6.4 (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA).

Experiment 1:

Serum concentration–time profiles of BPA and BPA-GLUC were first analyzed using a non-compartmental approach. The areas under the BPA and BPA-GLUC serum concentrations curves (BPA and BPA-GLUC AUC_{last}) were calculated using the linear trapezoidal rule from dosing time to the last quantifiable (i.e. >LOQ) serum concentration sampling time. The AUC from t=0 to infinity was obtained by adding to AUC_{last} the area extrapolated from the last observation to infinity obtained by dividing the last observed quantifiable serum concentration by the slope of the terminal phase estimated by linear regression, using the best fit option of Phoenix®. As previously explained (Gayrard et al., 2013; Guignard et al., 2016), to avoid any confusion due to high concentration resulting from direct drainage of the mouth by the jugular veins, the data obtained during the first 10minutes after final pellet ingestion were not taken into account in the calculation of BPA AUC_{inf} . The digestive absorption of BPA being close to 100% (Doerge et al., 2010), the molar ratio AUC_{inf} BPA-GLUC / AUC_{inf} BPA could be used as an index of BPA metabolism. The relative bioavailability of BPA by dietary and subcutaneous routes was compared using the following equation:

$$Relative\ bioavailability = \frac{BPA\ AUC_{inf}\ diet}{BPA\ AUC_{inf}\ S.C.} \times \frac{BPA\ dose\ S.C.}{BPA\ dose\ diet}$$

The time courses of serum BPA concentrations obtained in the 4 ewes after the S.C. administration were fitted to a triexponential equation, corresponding to an extravascular administration, to generate the pharmacokinetic (PK) parameters required to predict the time course of BPA blood concentrations for the lowest doses in experiment 2:

$$C(t) = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} + C \cdot e^{-K_{01} \cdot t}$$

Experiment 2:

Given the known BPA PK parameters and our assay LOQ, the maternal serum concentrations of BPA were likely to be non-quantifiable after repeated S.C. administrations of BPA at 0.5 or 50 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$. Time-concentration profiles of BPA were therefore simulated, using the PK parameters and the model of experiment 1, to estimate the animal internal exposure. BPA disposition was assumed to be linear overtime, as no accumulation or increase in the metabolism of BPA or BPA-GLUC had been observed with repeated administrations (Collet et al., 2010; Viguié et al., 2013) and because gestation does not affect BPA metabolic rate in the ewe (Corbel et al., 2013). The goodness-of-fit was determined using data obtained from the serial samples collected from ewes receiving the highest dose at GD62.

2.6. TH assays

Total and free T4 and total T3 concentrations were measured in one every two samples collected twice a week in ewes from GD28 to GD128 and from fetal jugular samples collected at delivery using a RIA kit (T4 MAb RIA kit, MP Biomedicals, Illkirch, France). The LOQ of the RIA assays (lowest value with an intra-assay CV lower than 20% and an accuracy above 90%) was validated at 10 ng/mL and 0.4 ng/mL for total T4 and T3, respectively. For free T4, a limit of sensitivity was set at the lowest concentration of the standard curve providing that the intra-assay CV was below 20% (3.2 pg/mL). The mean intra- and inter-assay CVs for three QC pools were systematically below 10%.

The balance between T4 activation into T3 and its inactivation to rT3, through different deiodinase activities, particularly within the placenta, has a key role in ensuring adequate TH supply to the fetus to meet its needs. We therefore used a previously described UPLC/MS/MS assay (Roques et al., 2012) to simultaneously determine TT4 and rT3 concentrations in the cord blood samples and in maternal samples collected after TT4 modification had been established, at GD 41 – 44 – 48 – 51 – 55 – 58 – 72 – 86 – 100 – 114 and 128. The LOD for each assay run was defined as the calculated concentration corresponding to a peak area at a given elution time, equal to three fold the area obtained by solvent injection. These LOD were 2.8, 0.5 and 0.15 ng/mL for TT4, rT3 and TT3, respectively. Mean intra- and inter-assay CVs for three QC pools were systematically below 15% and accuracy was between 88 and 108%.

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Systat® (Systat Software Inc., San Jose California, USA). The effect of the treatment on the time course of maternal TT4, fT4 and TT3 in the weekly samples was analyzed by using a two-way repeated-measures ANOVA, with time, treatment and their interaction as fixed factors and animals nested in the treatment as a random effect factor. A Bonferroni test was performed to identify the dose that individually would give a different serum TH profile to the one observed in the control group.

The effect of the treatment on hormone concentrations measured in fetal and maternal blood at delivery was analyzed with a one-way ANOVA.

3. Results

3.1. Relative bioavailability by subcutaneous and dietary routes of administration (Experiment 1)

Fig. 1 (A-B) shows the mean (\pm S.E.M.) serum BPA and BPA-GLUC concentration-time profiles following S.C. (5 mg/kg) or dietary (10 mg/kg) administration of BPA. The concentrations were not normalized by the dose. The concentration-time profiles varied greatly between the two routes. With the dietary route, the maximum serum concentration (C_{max}) was attained very quickly (at 0.12 h for 2 ewes and 0.20 h for 2 others) and BPA concentrations decreased quickly to reach the assay LOQ within 8 h post-administration. For the S.C. route, C_{max} was obtained later (after 2 h for 3 ewes and 1 h for one ewe) and the BPA concentrations decreased more slowly. The mean normalized by the dose BPA C_{max} for the S.C. route was only 4.6 ± 1.5 fold higher than for the dietary route (Fig. 1 C). By contrast to BPA, the BPA-GLUC concentration time course for the two routes of exposure was very similar and the maximum concentration attained with both routes, when normalized by the administered dose, was about 2.4 nmol/mL (Fig. 1 D).

Administration by S.C. route led to a higher overall internal exposure to BPA characterized by a much higher normalized by the dose AUC_{inf} (Fig. 2 A). The calculated relative bioavailability of BPA for the dietary as compared to S.C. route was 3.3 ± 0.3 %. The AUC_{inf} of BPA-GLUC was very similar for both routes of administration (Fig. 2 B). The ratio of BPA-GLUC to BPA AUC_{inf} was about 25 fold higher for the dietary route than for the S.C. route (Fig. 2 C). This can be explained by the extensive hepatic first-pass effect that immediately transforms BPA into BPA-GLUC after BPA intestinal absorption.

Overall, the maximum serum concentration of BPA obtained after subcutaneous administration was not dramatically higher than after dietary administration. However, BPA high level exposure was more prolonged after administration by S.C. route than by dietary route. Interestingly, the internal exposure to BPA-GLUC after both routes of administration was almost identical.

3.2. Maternal and fetal monitoring of BPA and BPA-GLUC internal exposure (Experiment 2)

Table 1 describes the mean BPA, BPA-GLUC and BPA-SULF concentrations measured in the maternal and fetal jugular blood, cord blood and amniotic fluid collected at delivery for the medium and high BPA dose groups. Concentrations were below the assay LOQ in all samples from the control group. BPA

concentrations were quantifiable in all collected blood samples only for animals in the highest dose group and in the amniotic fluid from the medium and high dose groups. It was quantifiable in cord blood samples from 4/10 and 5/10 lambs from the low and medium dose groups, respectively. BPA-GLUC concentrations could be systematically measured in fetal jugular blood, cord blood and amniotic fluid samples from the medium and high dose groups and in a few fetal jugular (5/10), cord blood (3/10) and amniotic fluid (3/7) samples from the low dose group. Overall, BPA-GLUC concentrations in the fetal compartment were much higher than the BPA fetal concentrations or the BPA-GLUC maternal concentrations. BPA was detectable in the maternal blood only for the highest dose group. BPA-GLUC in the maternal blood was detectable in a few samples of the low and medium doses groups and was systematically quantified in all the ewes from the high dose group. When quantifiable, BPA maternal concentrations were very similar to the amniotic ones, while for BPA-GLUC amniotic fluid concentrations were much higher than the maternal ones and within the same range of the fetal ones.

BPA-SULF could be measured in samples from the fetal compartment (jugular fetal and cord blood) in all samples from the medium and high dose groups. For the amniotic fluid and maternal samples, it was rarely measurable in samples from the medium dose group. In the fetal and cord blood samples from the high dose group, BPA-SULF was detected at levels about 50 to 80 fold higher than BPA and about 20 fold lower than BPA-GLUC. BPA-SULF concentration in amniotic fluid were about 10 fold lower than that in the fetus while they were about 10 fold higher than that of the maternal compartment.

3.3. Maternal and fetal thyroid status (Experiment 2)

Fig. 4 shows the time course of mean total T4, free T4 and total T3 concentrations measured in the maternal serum samples throughout the treatment period for each BPA group compared individually to the control group. For total T4, no significant interaction between time and treatment could be evidenced ($p=0.37$).

The time course of maternal free T4 serum concentrations appeared to be affected by the treatments (interaction time x treatment, $p<0.001$). A significant difference between the control group and the medium ($p=0.003$) and high ($p=0.015$) dose groups was observed which was characterized by a decrease in fT4 concentrations. Visual inspection of the graph indicates that this decrease was initiated around GD 40 (i.e. after about 12 days of treatment) in BPA-treated animals.

Throughout pregnancy, the time course of TT3 concentrations in the mothers was significantly affected by the treatment (interaction time x treatment, $p=0.04$). The profile of the medium dose group differed

from that of the control group ($p=0.03$). Overall, TT3 concentrations were lower in BPA-treated animals from GD 60-70 (visual inspection). This interaction was not significant for the high dose group ($p=0.44$)

Disruption of the maternal thyroid status was further characterized by measuring rT3 jointly to TT4 using HPLC/MS in samples collected from the 41st day of gestation, i.e. after fT4 concentrations have started to decrease in the medium dose group. A treatment effect could be evidenced on TT4 concentrations with no interaction with the time. On rT3 profiles, a trend ($p=0.09$) toward an interaction between time and treatment was evidenced suggesting that modifications of the rT3 patterns might occur later than for T4. The time course of the rT3/TT4 ratio (Fig. 5) was significantly affected by BPA exposure (interaction time x treatment $p=0.04$) over the period considered. These modifications were due to differences between the control and medium dose groups with a time-dependent effect on the rT3 to TT4 ratio ($p=0.024$) characterized by a higher rT3 to TT4 ratio in the BPA group from GD50 to 90, approximately.

Neither TT4 nor fT4 in fetal jugular blood (Fig. 6) were affected by BPA treatments at any of the doses tested (individual comparison with the control group, $p>0.05$). TT3 was never detectable in fetal jugular blood.

The thyroid hormone concentrations in cord blood were measured by HPLC/MS. TT3 in the fetuses was almost always below our assay LOD. No effect of the treatment on rT3, TT4 concentrations and rT3/TT4 ratio could be evidenced in cord blood.

4. Discussion

Our study is one of the rare studies to directly assess the equivalence between a route of exposure commonly used in experimental studies of BPA toxicity and the dietary route acknowledged as the main route of exposure for human populations. Our findings suggest that the bioavailability of BPA might be 30 fold lower when administered by dietary route than by subcutaneous route. Our current results indicate that the difference between the two routes of exposure is mainly related to the overall BPA exposure and much less to the peak serum concentrations which are relatively similar. Our results also show that BPA-GLUC exposure, unlike that of BPA, is very similar for both routes of administration. BPA-GLUC is usually assumed to be devoid of biological activity. However, in some sensitive tissues, the balance between BPA detoxification by conjugation into BPA-GLUC and BPA-GLUC reactivation by deconjugation into BPA is in favor of deconjugation (Corbel et al., 2014). Although the mechanism enabling BPA-GLUC (a hydrophilic compound) to reach the intracellular space remains unknown, these observations indicate that internal exposure to BPA metabolite might also be of biological significance

and should be more thoroughly considered in toxicological studies. Furthermore, it is noteworthy that BPA-GLUC blood profiles differ markedly after gavage administration as compared to the dietary one (Guignard et al., 2016). Thus when considering potential effects of BPA-GLUC, gavage might not be better than the subcutaneous route for evaluating BPA oral toxicity.

Our TK model enabled us to estimate the internal exposure of ewes treated by chronic exposure via the subcutaneous route. Interestingly, both the medium and low doses selected were predicted to reproduce BPA serum concentrations in ewes within the range of concentrations commonly reported in the most recent studies in pregnant women i.e., from 100 pg/mL (Teeguarden et al., 2016) to 4 ng/mL (Shekhar et al., 2016). However, in both those studies, free BPA would account for about 60-80% of total BPA while in our study the ratio of BPA-GLUC to BPA was markedly in favor of BPA-GLUC in both the mother and the fetus at delivery, i.e. at least 24 h after the last BPA administration.

Concerning fetal exposure, our exposure schemes made it possible to encompass the range of aglycone BPA concentrations reported in fetal compartments in humans, whether in amniotic fluid or cord blood. Indeed, for BPA, the geometric mean of about 4.8 ng/mL in the amniotic fluid of full-term human newborns (Shekhar et al., 2016) is similar to the concentrations measured in the amniotic fluid of lambs from the medium dose group in our study. Similarly, cord blood concentrations in human newborns (about 1.2 ng/mL; Chevalier et al., 2015) are very close to the few measurable values obtained in the cord blood of lambs from our medium dose group. Our study evidenced a high accumulation rate of BPA-GLUC in the fetal compartment in agreement with other study with short term exposure. Indeed, in our current study, as in the short term fetal exposure study performed at GD120 (Corbel et al., 2013), amniotic fluid concentrations were about 4 fold lower than concentration in fetal blood (jugular or cord blood). However, in a first study with chronic gestational exposure (Viguié et al., 2013), BPA-GLUC concentrations in full term lambs were 2 fold higher in amniotic fluid than in fetal blood. The most likely explanation for such fetal age –dependent differences in fetal exposure to BPA-GLUC could rely on the ontogeny of UGT activity in the fetal sheep with a late rise toward the end of pregnancy (Pretheeban et al., 2011) similarly to human (Divakaran et al., 2014). The biological significance of the very high fetal exposure to BPA-GLUC produced in our sheep model and its relevance to humans remains to be elucidated. From this standpoint, it is noteworthy that some data in monkeys suggest that, similarly to what is observed in the ovine fetus, BPA-GLUC accumulates in the fetal compartment (Patterson et al., 2013).

BPA-SULF appeared to accumulate as well in the fetal compartment. However, it is noteworthy that it does not follow the same pattern in the fetal compartment than BPA-GLUC. BPA-SULF concentrations in the amniotic fluid are indeed about 10 fold lower than in the fetal compartment. This suggests that

BPA-SULF might not be eliminated from the fetal blood through the kidney and thus the amniotic fluid or that BPA-SULF is very rapidly and efficiently cleared from the amniotic fluid.

Our results concerning the thyroid status of the mother reveal a certain degree of thyroid disruption oriented toward a decrease in concentrations of the circulating hormones, fT4 and TT3. The medium dose (50 µg/(kg.d)) seemed to be pivotal as this level of BPA treatment significantly affected the time courses of both hormones. Interestingly, the time course of TT3, the biologically active hormone, tended to be significantly modified by our lowest dose (0.5 µg/(kg.d)). This suggests that pregnant females might be sensitive to BPA-induced thyroid disruption even at environmentally-relevant exposure. Although our highest dose (5000 µg/(kg.d)) enabled us to reproduce the hypothyroxinemia described in a previous study, surprisingly, modifications of the time course were only observed for fT4 and not for TT4.

The fact that BPA induced a disrupting effect on some thyroid parameters at the medium and/or low doses but not at the high dose suggests a non-monotonic effect of BPA on thyroid function in pregnant animals. Nevertheless, this interpretation needs to be treated with caution and more doses and a larger number of animals would be required to evidence and characterize such a complicated dose-response relationship.

No effect of BPA treatments on fetal thyroid status could be evidenced in cord and jugular blood samples. This contrasts with our previous results in sheep (Viguié et al., 2013). One major difference between this study and the previous study in sheep is related to the gestational stage and fetal age and/or the different fetal exposure to BPA/BPA-GLUC. In our earlier experiment, the lambs were extracted at term, whereas in the current experiment they were extracted 10 to 14 days before term. Thus, the final stage of thyroid maturation might not yet have occurred in these animals. This explanation is fully consistent with the fact that TT3 could not be detected in the fetal blood samples. Indeed, TT3 concentration in the blood of sheep fetuses, as well as human fetuses (Fisher, 2002), is only detectable in the later stages of pregnancy (the last week for sheep; (Fisher et al., 1994). It is noteworthy that, in rodents, BPA-induced thyroid disruption due to maternal exposure was mainly evidenced during the postnatal period, which corresponds in this species to the final stage of maturation of thyroid function (Xu et al., 2007; Zoeller et al., 2005), i.e., equivalent to the two missing weeks required, in the current experiment, for the ewes to attain full term pregnancy.

Another explanation for such a discrepancy might arise from the difference in mineral supply provided to the animal. Indeed, in the current experiment, ewes received a pellet ration containing a mineral supply adapted to pregnancy requirements and thus enriched in mineral iodine (calcium iodate about 1.5 mg/day) and selenium (sodium selenite about 0.62 mg/day). Iodine supply might have somehow

compensated at least in part the BPA-induced thyroid disruptive process or made the fetal thyroid function less sensitive to thyroid disruption. This kind of relationship between sensitivity to thyroid disruption and iodine status is supported by epidemiological observations in humans. The inverse maternal urinary BPA /newborn girl TSH relationship was shown to depend, at least in part, on the maternal iodine status in the human biomonitoring "HOME" survey (Romano et al., 2015), suggesting that the maternal iodine supply might somehow affect the sensitivity of the developing fetus to chemical thyroid disruption. Other examples of interaction between the iodine status and diverse thyroid stressors have been found in humans such as mercury in pregnant women (Llop et al., 2015) or perfluoroalkyl acids in anti-TPO antibody positive humans (Webster et al., 2016). Interestingly, an *in vitro* study on the FRTL-5 cell line showed that BPA at concentrations above the μM range can inhibit iodide uptake (Wu et al., 2016). If such a mechanism were to hold true *in vivo*, it could effectively explain why and how the iodine status of the animals could impact their sensitivity to BPA-induced thyroid disruption.

The balance between deiodinase activities converting T4 into either the bioactive T3 or inactive rT3 is a key factor in the maintenance of fetal thyroid homeostasis. This is why we measured rT3 and T4 concentrations in cord blood and in some bi-weekly maternal samples, using MS detection, in an attempt to gain new insights into the balance between T4 and rT3 and the potential mechanisms of BPA action. The results obtained with MS in maternal samples, collected from GD 41 to 128, suggest that a modification of the deiodination balance, characterized by a time-dependent modulation of the rT3/TT4 ratio, occurred in mothers receiving the medium BPA dose compared to those in the vehicle group. The placenta is a key actor in fetal thyroid balance. It not only expresses deiodinases, in particular type 3, to produce a balance between the active and inactive thyroid hormone supply to the fetus, it also synthesizes transthyretin which regulates the transplacental transfer of maternal thyroxine to the fetal compartments (Landers et al., 2009) and regulates iodide exchanges through NIS (Na/I symporter) expression. *In vitro* data suggest that the placenta is a sensitive target tissue for BPA, including at environmentally relevant doses (Mannelli et al., 2015; Sieppi et al., 2016; Tait et al., 2015). However, no evaluation of the impact of BPA on thyroid-relevant placental functions are currently available. BPA affects NIS-mediated thyroid uptake in a rat thyroid cell line *in vitro* (Wu et al., 2016) but, so far, there is no evidence that it can alter deiodinase expression and/or activity in any tissues. In the light of our current results indicating that in pregnant ewes BPA exposure modifies the balance between T4 and rT3 at a late stage of pregnancy, it could be very interesting to assess the effect of BPA on placental deiodinase activities.

5. Conclusion

Our study carried out in an animal model relevant to humans in terms of thyroid and gestation physiologies shows that BPA can affect maternal thyroid function and equilibrium during pregnancy. This effect was expressed at levels of internal exposure (as assessed by serum aglycone BPA concentrations) similar to those described in humans i.e. for BPA blood concentrations below the ng/ml range. Although within the framework of this study, these maternal modifications could not be tied with alterations in some patterns of fetal TH serum concentration, the possibility remains that TH action and concentrations in target tissues, particularly in the brain, might have been affected. Interestingly, our data suggest that BPA exposure might somehow modify the deiodination balance, thus pinpointing a possible effect of BPA on the thyroid-related endocrine function of the placenta.

Acknowledgements

We thank the INRA experimental unit of Domaine de Lafage for providing the animals and the staff from the ENVT sheep experimental unit for their involvement in animal care.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. D Guignard benefited from PhD Grant of the doctoral School SEVAB from the Institut National Polytechnique of Toulouse, France.

References

- Chapin, R.E., Adams, J., Boekelheide, K., Gray, L.E., Hayward, S.W., Lees, P.S.J., McIntyre, B.S., Portier, K.M., Schnorr, T.M., Selevan, S.G., Vandenberg, J.G., Woskie, S.R., 2008. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 83, 157–395. doi:10.1002/bdrb.20147
- Chevalier, N., Brucker-Davis, F., Lahlou, N., Coquillard, P., Pugeat, M., Pacini, P., Panaïa-Ferrari, P., Wagner-Mahler, K., Fénelichel, P., 2015. A negative correlation between insulin-like peptide 3 and bisphenol A in human cord blood suggests an effect of endocrine disruptors on testicular descent during fetal development. *Hum. Reprod.* 30, 447–453. doi:10.1093/humrep/deu340
- Chevrier, J., Gunier, R.B., Bradman, A., Holland, N.T., Calafat, A.M., Eskenazi, B., Harley, K.G., 2013. Maternal urinary bisphenol a during pregnancy and maternal and neonatal thyroid function in the CHAMACOS study. *Environ. Health Perspect.* 121, 138–144. doi:10.1289/ehp.1205092

- 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. doi:10.1093/toxsci/kfq186
- 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. doi:10.1016/j.reprotox.2014.06.001
- 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. doi:10.1095/biolreprod.112.106369
- Doerge, D.R., Twaddle, N.C., Vanlandingham, M., Fisher, J.W., 2010. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 158–165. doi:10.1016/j.taap.2010.06.008
- Fini, J.-B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J.-P., Demeneix, B.A., 2007. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5908–5914.
- Fisher, D.A., 2002. Endocrinology of fetal development, in: *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders, pp. 811–842.
- Fisher, D.A., Dussault, J.H., Sack, J., Chopra, I.J., 1976. Ontogenesis of hypothalamic--pituitary--thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat. *Recent Prog. Horm. Res.* 33, 59–116.
- Fisher, D.A., Polk, D.H., Wu, S.Y., 1994. Fetal thyroid metabolism: a pluralistic system. *Thyroid* 4, 367–371.
- Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Collet, S.H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2013. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ. Health Perspect.* 121, 951–956. doi:10.1289/ehp.1206339
- Goto, Y., Kitamura, S., Kashiwagi, K., Oofusa, K., Tooi, O., Yoshizato, K., Sato, J., Ohta, S., Kashiwagi, A., 2006. Suppression of amphibian metamorphosis by bisphenol A and related chemical substances. *J. Health Sci.* 52, 160–168. doi:10.1248/jhs.52.160

Guignard, D., Gauderat, G., Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Picard-Hagen, N., Puel, S., Toutain, P.-L., Viguié, C., 2016. Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. *Food Chem. Toxicol.* doi:10.1016/j.fct.2016.04.004

Hard, G.C., 1998. Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 106, 427–436.

Heimeier, R.A., Das, B., Buchholz, D.R., Shi, Y.-B., 2009. The Xenoestrogen Bisphenol A Inhibits Postembryonic Vertebrate Development by Antagonizing Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology* 150, 2964–2973. doi:10.1210/en.2008-1503

Iwamuro, S., Sakakibara, M., Terao, M., Ozawa, A., Kurobe, C., Shigeura, T., Kato, M., Kikuyama, S., 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 189–198. doi:10.1016/S0016-6480(03)00188-6

Kaneko, M., Okada, R., Yamamoto, K., Nakamura, M., Mosconi, G., Polzonetti-Magni, A.M., Kikuyama, S., 2008. Bisphenol A acts differently from and independently of thyroid hormone in suppressing thyrotropin release from the bullfrog pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 574–580. doi:10.1016/j.ygcen.2007.09.009

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

Landers, K.A., McKinnon, B.D., Li, H., Subramaniam, V.N., Mortimer, R.H., Richard, K., 2009. Carrier-Mediated Thyroid Hormone Transport into Placenta by Placental Transthyretin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2610–2616. doi:10.1210/jc.2009-0048

Llop, S., Lopez-Espinosa, M.-J., Murcia, M., Alvarez-Pedrerol, M., Vioque, J., Aguinagalde, X., Julvez, J., Aurrekoetxea, J.J., Espada, M., Santa-Marina, L., Rebagliato, M., Ballester, F., 2015. Synergism between exposure to mercury and use of iodine supplements on thyroid hormones in pregnant women. *Environ. Res.* 138, 298–305. doi:10.1016/j.envres.2015.02.026

Mannelli, C., Ietta, F., Avanzati, A.M., Skarzynski, D., Paulesu, L., 2015. Biological Tools to Study the Effects of Environmental Contaminants at the Feto–Maternal Interface. *Dose-Response* 13. doi:10.1177/1559325815611902

Meeker, J.D., Calafat, A.M., Hauser, R., 2010. Urinary Bisphenol A Concentrations in Relation to Serum Thyroid and Reproductive Hormone Levels in Men from an Infertility Clinic. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1458–1463. doi:10.1021/es9028292

Meeker, J.D., Ferguson, K.K., 2011. Relationship between Urinary Phthalate and Bisphenol A Concentrations and Serum Thyroid Measures in U.S. Adults and Adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007–2008. *Environ. Health Perspect.* 119, 1396–1402. doi:10.1289/ehp.1103582

Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5185–5190. doi:10.1210/jc.2002-020209

Patterson, T.A., Twaddle, N.C., Roegge, C.S., Callicott, R.J., Fisher, J.W., Doerge, D.R., 2013. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267, 41–48. doi:10.1016/j.taap.2012.12.006

Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* Elmsford NY 24, 199.

Romano, M.E., Webster, G.M., Vuong, A.M., Thomas Zoeller, R., Chen, A., Hoofnagle, A.N., Calafat, A.M., Karagas, M.R., Yolton, K., Lanphear, B.P., Braun, J.M., 2015. Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: The HOME Study. *Environ. Res.* 138, 453–460. doi:10.1016/j.envres.2015.03.003

Roques, B.B., Lacroix, M.Z., Puel, S., Gayraud, V., Picard-Hagen, N., Jouanin, I., Perdu, E., Martin, P.G., Viguié, C., 2012. CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 127, 29–41. doi:10.1093/toxsci/kfs094

Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.05.002

Shekhar, S., Sood, S., Showkat, S., Lite, C., Chandrasekhar, A., Vairamani, M., Barathi, S., Santosh, W., 2016. Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1016/j.ygcen.2016.05.025

Sheng, Z.-G., Tang, Y., Liu, Y.-X., Yuan, Y., Zhao, B.-Q., Chao, X.-J., Zhu, B.-Z., 2012. Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 133–142. doi:10.1016/j.taap.2011.12.018

Sieppi, E., Vähäkangas, K., Rautio, A., Ietta, F., Paulesu, L., Myllynen, P., 2016. The xenoestrogens, bisphenol A and para-nonylphenol, decrease the expression of the ABCG2 transporter protein in human term placental explant cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 429, 41–49. doi:10.1016/j.mce.2016.03.034

Sriprapradang, C., Chailurkit, L., Aekplakorn, W., Ongphiphadhanakul, B., 2013. Association between bisphenol A and abnormal free thyroxine level in men. *Endocrine* 44, 441–447. doi:10.1007/s12020-013-9889-y

Sun, H., Shen, O.-X., Wang, X.-R., Zhou, L., Zhen, S., Chen, X., 2009. Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay. *Toxicol. In Vitro* 23, 950–954. doi:10.1016/j.tiv.2009.05.004

Tait, S., Tassinari, R., Maranghi, F., Mantovani, A., 2015. Bisphenol A affects placental layers morphology and angiogenesis during early pregnancy phase in mice. *J. Appl. Toxicol. JAT* 35, 1278–1291. doi:10.1002/jat.3176

Taylor, J.A., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P.A., Toutain, P.-L., Laffont, C.M., VandeVoort, C.A., 2011. Similarity of Bisphenol A Pharmacokinetics in Rhesus Monkeys and Mice: Relevance for Human Exposure. *Environ. Health Perspect.* 119, 422–430. doi:10.1289/ehp.1002514

Teeguarden, J.G., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Doerge, D.R., 2016. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food Chem. Toxicol.* 92, 129–142. doi:10.1016/j.fct.2016.03.023

Terrien, X., Fini, J.-B., Demeneix, B.A., Schramm, K.-W., Prunet, P., 2011. Generation of fluorescent zebrafish to study endocrine disruption and potential crosstalk between thyroid hormone and corticosteroids. *Aquat. Toxicol.* 105, 13–20. doi:10.1016/j.aquatox.2011.04.007

Tominaga, T., Negishi, T., Hirooka, H., Miyachi, A., Inoue, A., Hayasaka, I., Yoshikawa, Y., 2006. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC–MS/MS method. *Toxicology* 226, 208–217. doi:10.1016/j.tox.2006.07.004

Viguié, C., Collet, S.H., Gayraud, V., Picard-Hagen, N., Puel, S., Roques, B.B., Toutain, P.-L., Lacroix, M.Z., 2013. Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 154, 521–528. doi:10.1210/en.2012-1401

vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Belcher, S.M., Birnbaum, L.S., Crain, D.A., Eriksen, M., Farabollini, F., Guillette, L.J., Hauser, R., Heindel, J.J., Ho, S.-M., Hunt, P.A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Keri, R.A., Knudsen, K.E., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Marcus, M., McLachlan, J.A., Myers, J.P., Nadal, A., Newbold, R.R., Olea, N., Prins, G.S., Richter, C.A., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Vandenberg, L.N., Walser-Kuntz, D.R., Watson, C.S., Welshons, W.V., Wetherill, Y., Zoeller, R.T., 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 24, 131–138. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.005

Vom Saal, F.S., VandeVoort, C.A., Taylor, J.A., Welshons, W.V., Toutain, P.-L., Hunt, P.A., 2014. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 45, 105–116. doi:10.1016/j.reprotox.2014.01.007

Wang, N., Zhou, Y., Fu, C., Wang, H., Huang, P., Wang, B., Su, M., Jiang, F., Fang, H., Zhao, Q., Chen, Y., Jiang, Q., 2015. Influence of Bisphenol A on Thyroid Volume and Structure Independent of Iodine in School Children. *PLOS ONE* 10, e0141248. doi:10.1371/journal.pone.0141248

Wang, T., Lu, J., Xu, M., Xu, Y., Li, M., Liu, Y., Tian, X., Chen, Y., Dai, M., Wang, W., Lai, S., Bi, Y., Ning, G., 2013. Urinary bisphenol a concentration and thyroid function in Chinese adults. *Epidemiol. Camb. Mass* 24, 295–302. doi:10.1097/EDE.0b013e318280e02f

Webster, G.M., Rauch, S.A., Marie, N.S., Mattman, A., Lanphear, B.P., Venners, S.A., 2016. Cross-Sectional Associations of Serum Perfluoroalkyl Acids and Thyroid Hormones in U.S. Adults: Variation According to TPOAb and Iodine Status (NHANES 2007-2008). *Environ. Health Perspect.* 124, 935–942. doi:10.1289/ehp.1409589

Wu, K.-M., Farrelly, J.G., 2006. Preclinical development of new drugs that enhance thyroid hormone metabolism and clearance: inadequacy of using rats as an animal model for predicting human risks in an IND and NDA. *Am. J. Ther.* 13, 141–144. doi:10.1097/01.mjt.0000209673.01885.b0

Wu, Y., Beland, F.A., Fang, J.-L., 2016. Effect of triclosan, triclocarban, 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, and bisphenol A on the iodide uptake, thyroid peroxidase activity, and expression of genes involved in thyroid hormone synthesis. *Toxicol. In Vitro.* doi:10.1016/j.tiv.2016.01.014

Xu, X., Liu, Y., Sadamatsu, M., Tsutsumi, S., Akaike, M., Ushijima, H., Kato, N., 2007. Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neurosci. Res.* 58, 149–155. doi:10.1016/j.neures.2007.02.011

Yang, J., Chan, K.M., 2015. Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol A (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquat. Toxicol.* 159, 138–147. doi:10.1016/j.aquatox.2014.12.011

Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–612. doi:10.1210/en.2004-1018

Zoeller, T.R., 2010. Environmental chemicals targeting thyroid. *Horm. Athens* 9, 28–40.

Table 1: mean (\pm SEM) BPA and BPA-GLUC/S concentrations (nmol/mL) measured in the maternal and fetal jugular blood, cord blood and amniotic fluid after treatment of pregnant ewes with BPA from GD 28 to 132-134. LOQ were validated at 1 ng/mL and 5 ng/ml for BPA and BPA-GLUC/S, respectively (4.4, 12.4 and 16.2nmol/L for BPA, BPA-GLUC and BPA-SULF, respectively). Mean concentration was noted as "<LOQ" when the concentrations in more than half the samples were below LOQ. When BPA and/or its metabolites were measurable in at least half the samples, the non-measurable values were replaced by the LOQ/2 for the mean calculation.

		Cord blood			Fetal blood			Amniotic fluid			Maternal blood		
		BPA	BPA-GLUC	BPA-SULF	BPA	BPA-GLUC	BPA-SULF	BPA	BPA-GLUC	BPA-SULF	BPA	BPA-GLUC	BPA-SULF
Medium dose 50 μ g/(kg.d) 0.2 μ mol/(kg.d)	Mean	0.007	1.180	0.046	<LOQ	1.09	0.040	0.012	0.284	<LOQ	<LOQ	0.022	<LOQ
	S.E.M.	0.002	0.077	0.01		0.058	0.006	0.005	0.034			0.008	
	n/tot	5/10	10/10	10/10	2/10	10/10	10/10	7/8	8/8	3/8	0/5	3/5	2/5
High dose 5000 μ g/(kg.d) 20 μ mol/(kg.d)	Mean	0.106	95.873	5.277	0.058	95.698	4.555	0.259	28.041	0.502	0.236	1.624	0.056
	S.E.M.	0.012	11.540	0.766	0.005	14.422	0.454	0.055	2.582	0.206	0.030	0.153	0.005
	n/tot	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	5/5	5/5

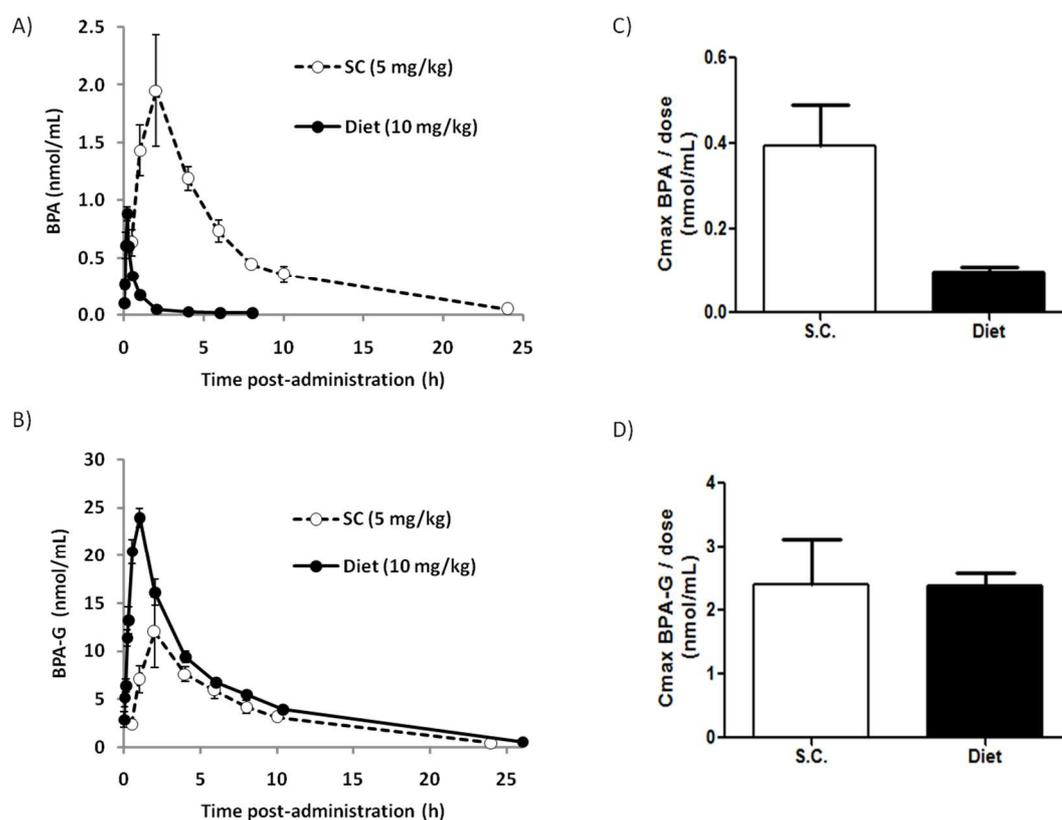


Fig. 1: A-B) mean (\pm S.E.M.) serum BPA (A) and BPA-GLUC (B) concentration-time profiles obtained for the same ewes ($n=4$) after subcutaneous (5 mg/kg) and dietary (10 mg/kg) administrations. Blood samples were collected 0.5 – 1 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 and 24 h after subcutaneous administration and 0.03 – 0.08 – 0.16 – 0.25 – 0.5 – 1 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 and 24 h after dietary administration. The serum concentrations were not normalized by the dose. C-D) Mean (\pm S.E.M.) maximum concentration of BPA (C) and BPA-GLUC (D) normalized by the BPA dose obtained after subcutaneous and dietary administrations.

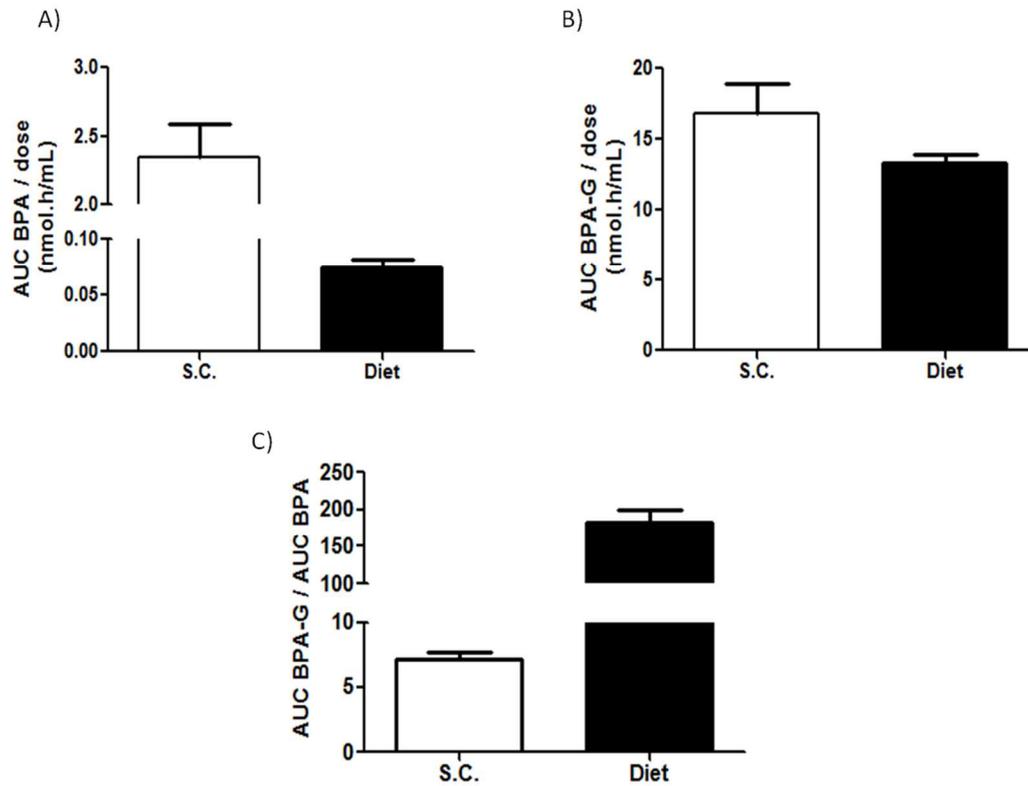


Fig. 2: A-B) mean (\pm S.E.M.) AUC_{inf} of BPA (A) and BPA-GLUC (B) concentrations normalized by the BPA dose obtained after subcutaneous (5 mg/kg) and dietary (10 mg/kg) administrations in the same ewes ($n=4$). The BPA concentrations obtained during the first 10 minutes after the end of food intake were not taken into account in the AUC estimation. C) Mean (\pm S.E.M.) ratio of the BPA to the BPA-GLUC molar dose-normalized AUC_{inf} after subcutaneous and dietary administrations.

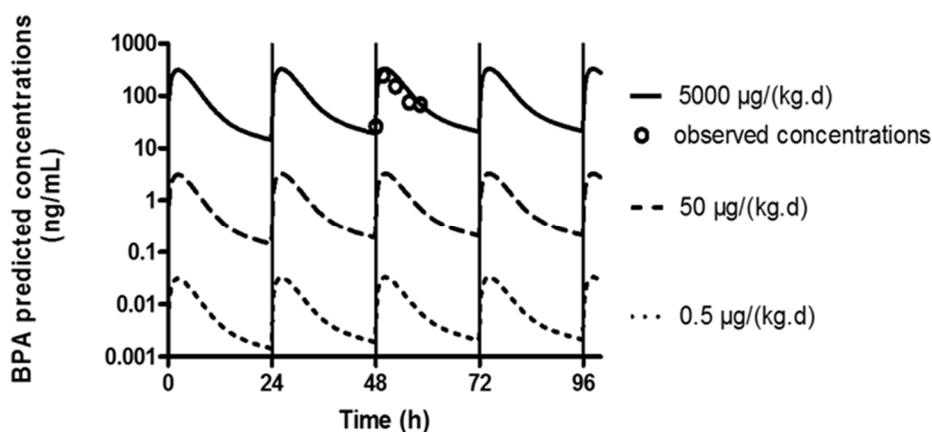


Fig. 3: predicted serum concentrations of BPA in pregnant ewes treated with repeated subcutaneous administrations of BPA (0.5 – 50 and 5000 µg/(kg.d)). Concentrations were predicted using a bi-compartmental model and appropriate pharmacokinetic parameters previously established in the ewe for a dose of 5 mg/(kg.d). Observed concentrations are the BPA serum concentrations measured in blood samples collected from one representative ewe treated with BPA (5000 µg/(kg.d); S.C.) from GD 28 to 132-134. Blood samples were collected at GD 62 at time 0 - 1.5 - 4 - 8 and 10 h after the S.C. administration.

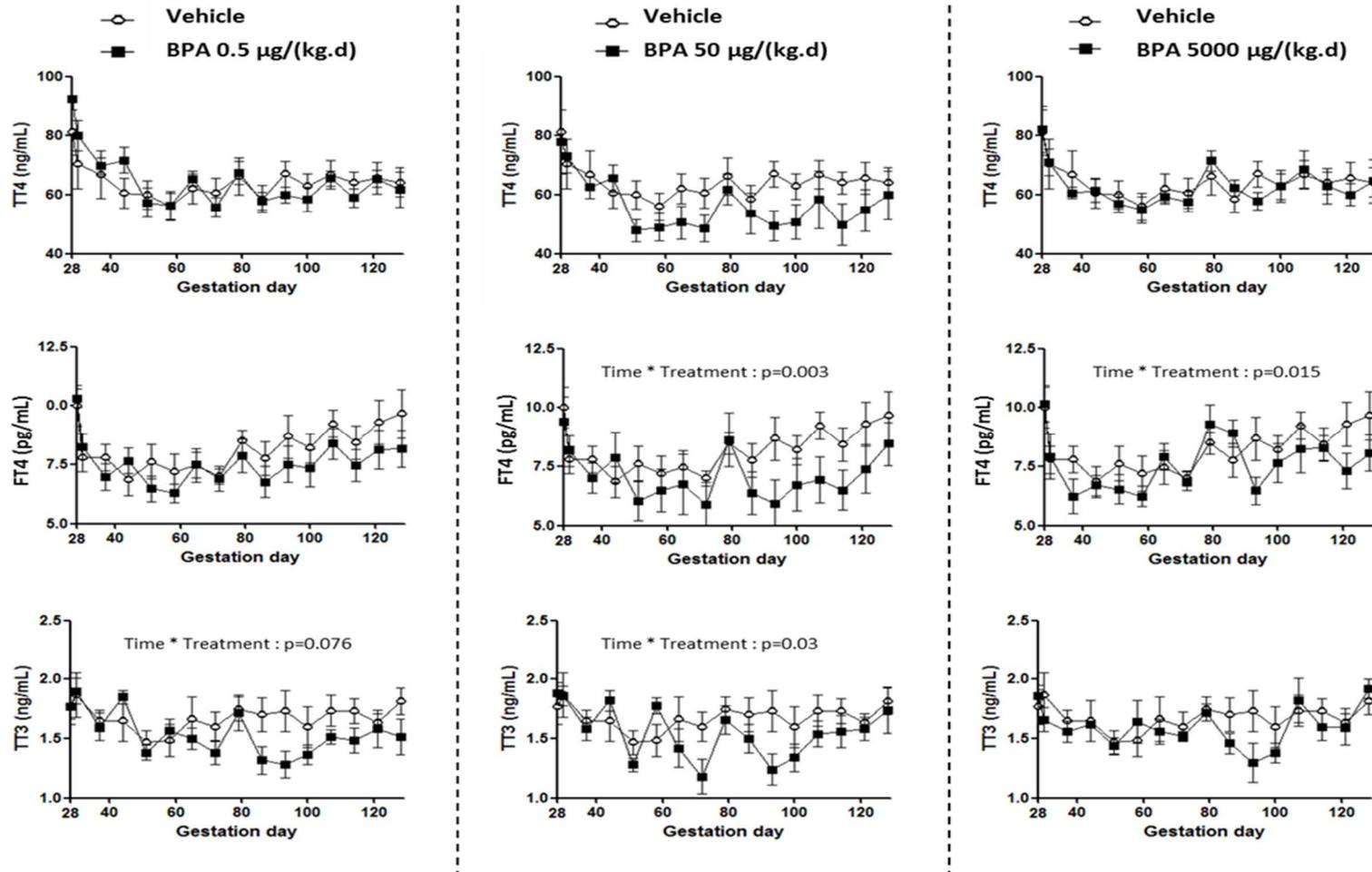


Fig. 4: time course of mean (\pm SEM) total T4, free T4 and total T3 serum concentrations in pregnant ewes treated subcutaneously with vehicle (n=6) or BPA (0.5 ($\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$), n=6). 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, n=5 or 5000 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, n=5) from GD 28 to 132-134. Blood samples were collected on GD 28 – 30 – 37 – 44 – 51 – 58 – 65 – 72 – 79 – 86 – 93 – 100 – 107 – 114 – 121 and 128.

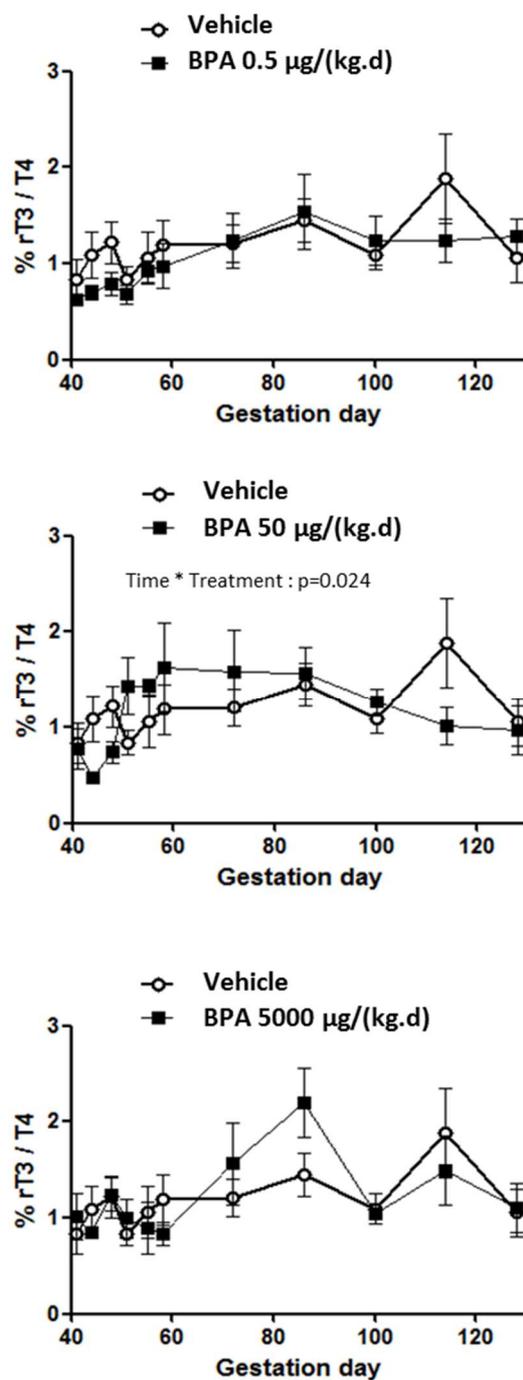


Fig. 5: time course of mean (\pm S.E.M.) ratio (%) of rT3 to total T4 serum concentrations measured by HPLC/MS in pregnant ewes treated subcutaneously with control or BPA 0.5 – 50 and 5000 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ from GD 40 to 132-134. Blood samples were collected on GD 41 – 44 – 48 – 51 – 55 – 58 – 72 – 86 – 100 – 114 and 128.

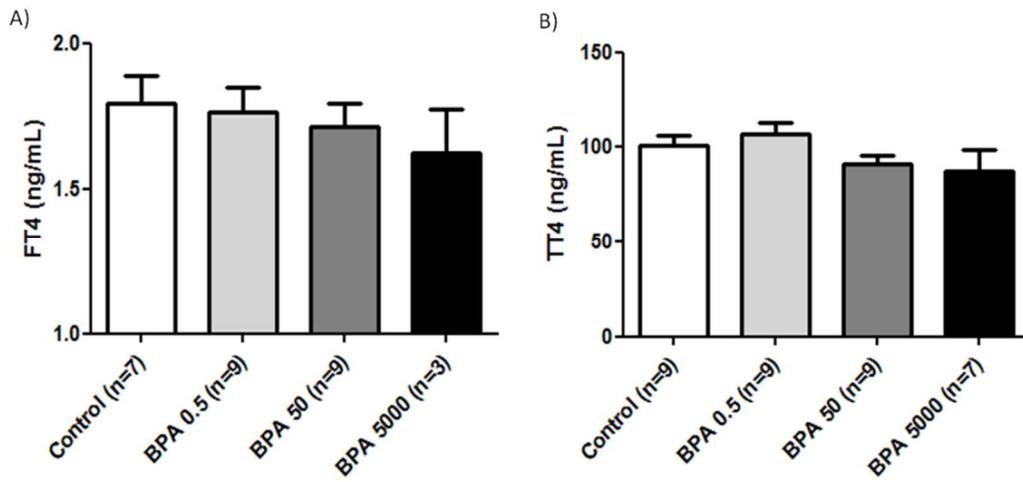


Fig. 6: mean (\pm S.E.M.) free (A) and total (B) T4 serum concentrations measured by a RIA method in fetal jugular blood collected at GD132-134. Fetuses came from mothers treated with vehicle or BPA 0.5 – 50 and 5000 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ from GD 28 to 132-134 S.C.

C. Conclusion

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer la plus faible dose de BPA associée à une perturbation thyroïdienne, sur le modèle de brebis gestante, un modèle pertinent pour l'étude des conséquences d'une perturbation thyroïdienne.

Les résultats obtenus ont confirmé que le traitement au BPA était associé à une inhibition de la fonction thyroïdienne maternelle caractérisée par une diminution des concentrations sériques de T4 libre et de T3 totale au cours de la gestation. Cette inhibition était notamment retrouvée chez les brebis traitées à la dose 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (SC). La dose 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (SC) diminuait la concentration maternelle de T3 (environ 16% inférieure au groupe contrôle). Pour la TT4, le traitement au BPA tendait à diminuer les concentrations maternelles.

Ces résultats sont d'autant plus préoccupants que les doses induisant une hypothyroïdie maternelle (0,5 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) conduisent chez les mères, d'après le modèle cinétique établi dans la première partie, à des concentrations circulantes en BPA comparables à celles décrites chez l'homme.

Sur le plan mécanistique, il est intéressant de noter que le traitement au BPA était associé à une modification du ratio des concentrations sériques maternelles rT3/TT4. Cette observation suggère une modulation des voies d'activation et d'inhibition de la T4 respectivement en T3 et rT3 et lève donc l'attention sur un éventuel effet du BPA sur l'activité des désiodases responsables de la conversion des hormones thyroïdiennes.

Chez le fœtus, aucune modification des concentrations en hormones thyroïdiennes circulantes n'a été mise en évidence sur les prélèvements collectés à l'euthanasie. Toutefois, il est possible que des altérations du statut thyroïdien fœtal aient eu lieu au cours de la gestation.

III. Exploration des effets d'une exposition prénatale au BPA sur le développement du SNC

A. Introduction et objectifs

Dans la partie précédente, nous avons montré, sur le modèle de brebis gestante, que l'exposition au BPA à une faible dose, modifie l'homéostasie thyroïdienne maternelle au cours de la gestation. Cette observation est d'autant plus préoccupante que le développement du fœtus, et en particulier de son SNC, est largement sous la dépendance des hormones thyroïdiennes maternelles. Ainsi, bien que les modifications thyroïdiennes maternelles n'aient pas été associées à une perturbation du statut thyroïdien fœtal, il est probable que l'effet inhibiteur du BPA sur la fonction thyroïdienne maternelle n'ait pas permis de couvrir l'intégralité des besoins physiologiques du SNC fœtal.

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que l'exposition prénatale au BPA induit des altérations histologiques et biochimiques du développement du SNC fœtal. Les étapes clés de la neurogenèse sont notamment altérées. Cependant, ces altérations n'ont que très rarement été mises en relation avec une potentielle perturbation thyroïdienne induite par le BPA.

Dans ce contexte, cette dernière partie avait pour objectif d'identifier des biomarqueurs d'effets d'une exposition prénatale à une faible dose de BPA sur le développement de différentes structures cérébrales parallèlement aux effets du BPA sur le statut thyroïdien maternel et fœtal.

Compte tenu de la multiplicité des cibles potentielles du BPA et de l'hétérogénéité biochimique et fonctionnelle du SNC, une approche non-ciblée telle que la métabolomique apparaissait comme une approche prometteuse dans l'exploration des conséquences sur le développement du SNC d'une exposition au BPA. Ce type d'approche avait déjà permis de mettre en évidence, dans une étude précédente, des modulations du métabolome du SNC de nouveau-nés murins exposés durant la période périnatale à une faible dose de BPA. Ces travaux avaient été menés sur la globalité du SNC. L'étude actuelle se proposait de gagner un degré de résolution en réalisant l'approche métabolomique sur des structures cérébrales spécifiques, le but étant d'affiner les hypothèses établies quant aux conséquences neurofonctionnelles d'une exposition prénatale au BPA en se basant sur les fonctions propres à chaque structure.

Ces travaux sont présentés sous forme d'article (Article 3) et feront l'objet d'une publication prochainement soumise dans une revue scientifique multidisciplinaire.

B. Article 3

"A low dose of bisphenol A impacts the maternal thyroid function and the metabolome of fetal brain regions in ovine species"

D. Guignard; C. Canlet; M. Tremblay-Franco; R. Gautier; F. Jourdan; V. Gayrard; N. Picard-Hagen; D. Zalko; C. Viguié; N. Cabaton

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES, Environmental Sciences

Title: A low dose of bisphenol A impacts the maternal thyroid function and the metabolome of fetal brain regions in ovine species

D. Guignard; C. Canlet; M. Tremblay-Franco; R. Gautier; F. Jourdan; V. Gayraud; N. Picard-Hagen; D. Zalko; C. Viguié; N. Cabaton

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: Catherine Viguié

TOXALIM UMR 1331, INRA INP UPS

23 chemin des Capelles, BP 87614

31076 Toulouse cedex3, France

Phone: (33) 561 193 913

Email: catherine.viguie@toulouse.inra.fr

Keywords: bisphenol A; endocrine disruptor; low dose; prenatal exposure; metabolomics; brain structures; toxicology

Abstract

Fetal brain development is largely dependent upon maternal thyroid hormones. The gestational exposure to bisphenol A (BPA), an environmental contaminant suspected to disrupt thyroid homeostasis, might alter the brain ontogenesis. Perinatal exposure to BPA has previously been demonstrated to induce moderate maternal and fetal hypothyroxinemia in sheep and to alter brain metabolome in mice.

In this study, we explored the impact of a prenatal BPA exposure on the metabolome of fetal brain regions. Two groups of pregnant ewes (n=13 each) were subcutaneously exposed to vehicle or BPA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ from GD28 to GD137. Maternal thyroid hormones were monitored during the treatment period. At GD138, 11 specific fetal brain structures were dissected and extracted. Aqueous extracts were individually submitted to ^1H nuclear magnetic resonance analysis. Multivariate statistics were performed to identify the discriminant endogenous metabolites between groups.

Maternal BPA concentrations were predicted to fluctuate between 0.02 and 0.35 ng/mL. BPA treatment induced a significant time-dependent decrease of maternal total T4 serum concentrations and tended to increase maternal reverse T3 concentrations at the delivery. For 9 out of the 11 brain regions collected, PLS-DA models significantly discriminated NMR spectra of both groups. Several metabolic pathways were found to be modulated by BPA, including excitatory (aspartate, glutamine, glutamate) and inhibitory (GABA and taurine) amino acids pathways (dorsal part of hippocampus, cerebellar vermis, dorsal part of hypothalamus, lateral part of frontal cortex).

This study suggests that a prenatal exposure to a BPA low dose affects the fetal brain ontogenesis possibly through a thyroid-dependent mechanism.

Introduction

Over the past decades, the prevalence of neurodevelopmental disorders such as attention deficit hyperactivity disorders (ADHD) or autism spectrum disorders (ASD) has increased (1–4). Human exposure to endocrine disrupting chemicals (EDC), in particular those targeting the thyroid function during fetal development, is strongly suspected to contribute to this increase. Some recent evaluations reported that EDC exposure in Europe might contribute substantially to neurobehavioral deficits and disease with a high probability of more than 150 billion euros costs/year (5).

BPA, a well-known food and environmental contaminant with an ubiquitous human exposure including fetal exposure, has been shown to affect both the thyroid axis and the central nervous system (CNS) in animal experimental models as well as in human. Interestingly, maternal urinary BPA concentration was shown to be negatively correlated to maternal total T4 blood concentration and to TSH in males neonates in the CHAMACO cohort (6) and to TSH in females neonates in the HOME cohort (7). In rodents, a BPA treatment of pregnant and lactating dams was associated with transitory modifications of free and/or total T4 concentrations in dams and their offspring in the neonatal period (8, 9). These changes in circulating T4 were associated with changes in the expression of neurogranin, a thyroid-regulated marker for neuro-differentiation, or of SRC-1, a cofactor involved in the regulation of the transcription of thyroid target genes, in the male pup hippocampus. In pregnant ewes, a more relevant model to human than rodent from the standpoint of thyroid regulation and the CNS ontogeny, BPA treatment throughout the 4/5th of the gestation was associated with hypothyroxinemia (about 30% decrease in total T4) in both the mothers and the newborn lambs (10). Given the strict dependency of the CNS ontogenesis upon maternal and fetal thyroid homeostasis (11–13), it can reasonably be assumed that this BPA-induced hypothyroxinemia could affect the fetus neural development (14).

Although it has been rarely studied in relation to potential thyroid disruption, numerous effects of developmental exposure to BPA on the CNS and neurocognitive development have been evidenced in laboratory animals. Increased anxiety (15, 16) and hyperactivity-like (17) behaviors were observed in mice perinatally exposed to BPA. Prenatal exposure to BPA was associated to abnormal synaptogenesis in the hippocampus of monkey (18) and mouse (19, 20) and to alterations of neocortical development in the mouse (17, 21). In mice, the concentrations of dopamine, serotonin and their metabolites were modified in the hippocampus, amygdala, caudate nuclei, thalamus, striatum and pons in response to a perinatal BPA exposure (20, 21). Most interestingly, low-dose exposure to BPA exhibited modulations on the metabolome and produced signature changes that depended upon the dose on the whole brain of young mouse born to and fed by BPA-treated dams throughout gestation and lactation (24). Those

modifications concerned mainly excitatory/inhibitory amino acids pathways, two key actors of both neural development and plasticity.

The current study aimed to explore jointly thyroid disruption and effects on specific brain structures of a prenatal exposure to a low dose of BPA relevant to human exposure. Given the broad field of action of EDC, a global approach such as metabolomics was a very promising approach to evidence BPA-induced modulations. This was not applied on whole brain but on targeted brain structures and allowing facing to the heterogeneity of the organ and making one step forward in the prediction of the neurofunctional consequences.

Results

Results are given as mean \pm SEM values

Monitoring of BPA and BPA-G internal exposure

Maternal serum concentrations of BPA and its main metabolite BPA glucuronide (BPA-G) were below the limit of quantification (LOQ) for both groups. The pharmacokinetic models predicted maternal serum concentrations in BPA-treated animals ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; SC) to fluctuate between 0.02-0.35 and 0.3-3.5 ng/mL for BPA and BPA-G respectively (Fig. S1).

BPA and BPA-G concentrations in different fetal compartments are shown in Table 1. For the vehicle group, they were below the LOQ. For the BPA group, BPA concentrations were quantifiable on 16 over 21 samples of amniotic fluid but were not quantifiable in fetal jugular and cord blood. BPA-G concentrations were always quantifiable in amniotic fluid ($23.8 \pm 4.8 \text{ ng/mL}$), fetal blood ($24.5 \pm 2.3 \text{ ng/mL}$) and cord blood ($22.8 \pm 3.1 \text{ ng/mL}$).

Maternal and fetal thyroid status

Fig. 1 shows the time course of mean total T4 concentrations in pregnant ewes. BPA treatment was associated with a significant time-dependent decrease of maternal total T4 serum concentrations ($p=0.0176$). Reverse T3 serum concentrations tended to be increased in ewes of the BPA group collected at the delivery ($p=0.06$; Fig. 2).

On fetal blood collected at the delivery, free and total T3 concentrations were below the LOQ for both groups. Free and total T4 did not differ between groups.

Metabolomic approach

A valid PLS-DA model could be built with the dataset generated from NMR spectra of eight brain structures. As shown in Fig. S2 for the vehicle group, the analysis of metabolomic profiles allowed discriminating the different structures.

The PCA score plots initially established on pre-processed NMR spectra of individual brain structures didn't evidence a sex effect. Thus, the sex effect was not taken into account for further analyses on PLS-DA. PLS-DA allowed discriminating the treatment groups for all but 2 structures. The metabolic imprinting of the lateral hemispheres of the cerebellum and a ventral area of the diencephalon encompassing a small part of the ventral hippocampus and the entorhinal cortex did not differ between groups. Fig. 3 shows the PLS-DA score plots generated from the data of the best discriminated structures: the lateral part of the frontal cortex, the dorsal part of the hippocampus, the dorsal part of the hypothalamus and the cerebellar vermis. The PLS-DA score plots corresponding to other brain structures are available in Fig. S3. The list of identified endogenous metabolites discriminating treatment groups and their modulations is presented in Table 2. Discriminant metabolites from the dorsal hypothalamus were mapped into the metabolic network in order to identify modulated metabolic pathways (Fig. 4).

Discussion

The main objective of the present study was to identify biomarkers of effects of a prenatal exposure to a low dose of BPA on different developing brain regions with a metabolomic approach, jointly to its effects on maternal and fetal thyroid status. Our study evidenced in sheep, a pertinent model to study thyroid disruption, that a low BPA gestational exposure ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) impacts both the maternal thyroid function and the metabolome of fetal brain regions.

Maternal BPA and BPA-G serum concentrations predicted by a PK model using well-characterized BPA parameters in the sheep were relevant to the human internal exposure as described by serum concentrations reported in biomonitoring surveys (25–27). Fetal exposure was almost totally limited

to BPA-G. This is fully consistent with previous data obtained in our laboratory on the same animal model reflecting a BPA-G accumulation in the fetal compartment throughout gestation (28).

As it has already been published in the ewe with a dose of $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (10), gestational exposure to a low dose of BPA was associated to a disruption of the time course of total T4 serum concentrations. Increased reverse T3 concentration was also evidenced in the mothers suggesting an alteration of the desiodase 3 activity (29). However, in contrast with the results of this high dose previous study, no fetal thyroid disruption could be evidenced. This discrepancy could be attributed to the difference between the two doses. However, as the effect was similar in the dams, there might be other explanation. For example, it can be hypothesized that the experiment was not performed on the right window of time to evidence effects of the treatment on the fetal thyroid function. Indeed, the delivery occurred 7 days earlier in the current study as compared to the previous one whereas, in ovine species, high modifications of the fetal thyroid function took place in the last days of gestation (30). This hypothesis is also supported by the observation of a thyroid disruption only at PND 15 in offspring born to rats exposed to BPA ($1\text{-}10$ and $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) from GD 6 to PND 4 - 8 - 15 or 35 (9), knowing that rat thyroid system development is delayed by 2 weeks compared to human newborn (30, 31). It underlines the necessity to get a more dynamical evaluation of the fetal thyroid function.

Until the last third of gestation, ovine fetal thyroid axis is not yet completely functional and fetus is still dependent upon maternal thyroid hormones (30). Accordingly, a transitory maternal hypothyroxinemia affects the CNS ontogenesis (14). Thus, consequences on the fetal CNS development of the BPA-induced thyroid disruption evidenced in our study in the dams remain plausible.

The global impacts of the BPA treatment on the developmental brain structures could be evidenced by the metabolomic approach. Interestingly, the discriminant metabolites differed between the brain regions, but for a same metabolite, switches were generally preserved between brain regions.

Modulation of the neurotransmitters and amino-acids signaling

Metabolic pathways of excitatory (aspartate, glutamate) and inhibitory (GABA, taurine) neurotransmitters and amino-acids were affected by the BPA treatment in all structures but brainstem. GABA, glutamate and glutamine were increased, aspartate and its acetylated metabolite N-acetylaspartate were decreased and taurine was modulated differently between brain structures. Our results are consistent with the increased brain concentrations of GABA, glutamate and glutamine measured in mice perinatally exposed to BPA $0.025 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (32). In the fetal ovine hippocampus, we found an increase of the glutamine, a metabolite of glutamate (32), and a decrease of aspartate which

are consistent with the increased ratio glutamate / aspartate revealed by NMR in the hippocampus of mice perinatally exposed to BPA (33). A biochemical study showed that GABA and glutamate concentrations were sex-dependently modulated in 9 brain regions of mice perinatally exposed to BPA (500 µg/kg), notably in amygdala, hypothalamus and hippocampus (34). The metabolic pathway of GABA was also sex-dependently affected in the hippocampus of adult mice treated by high doses of BPA (0.4 – 4 - 40 mg/kg/d) for 12 weeks in association with emotional behaviors changes (35). The current metabolomic data bring new evidences to affirm that BPA exposure affect, even at a low dose, the metabolic pathway of neurotransmitters signaling.

Modulations of the neurotransmitters signaling could also be consequent to thyroid disruption. Indeed, alterations of the glutamate / glutamine metabolism and a decreased GABA concentration were observed on the metabolome of the cerebellum of adult rats treated with perchlorate, a thyroid inhibitor (36). Other metabolomics studies evidenced a down-regulation of glutamate and taurine on the plasma metabolome of adult rats treated with thyroid inhibitors (37, 38). Biochemical studies revealed an impact of hypothyroidism on GABA and glutamate brain concentrations (39). One study showed that GABA concentration was increased in the offspring cerebellum born to hypothyroid rats treated by methimazole from GD1 to lactation day 21 (40).

The modulation of the neurotransmitters concentrations in the targeted brain regions might disrupt key mechanisms of their ontogenesis as neural proliferation, differentiation and migration (41–43). Such alterations have already been evidenced in hippocampus, prefrontal cortex and cerebellum of animals treated by BPA (18–21, 44, 45). More specifically, the increased GABA concentrations observed in the cerebellar vermis could impact the proliferation of the immature cerebellar granule cells (46) and the neuritic outgrowth (47). Glutamate, modulated in the amygdala and the dorsal part of the hypothalamus, and aspartate, affected in the frontal cortex and the dorsal part of hippocampus, are 2 agonists of NMDA receptors (NMDA-R) which are much involved in the CNS ontogenesis. Thus, the NMDA-R antagonism decreases the proliferation rate of striatal neuroblasts whereas the NMDA-R activation promotes dendritic outgrowth and branching of hippocampal cells (43). In the developing cortex, NMDA-R are involved in the neuronal migration and in the morphological changes into a bipolar shape (48). Activation of AMPA/KAR receptors (2 other types of glutamate receptors) controls oligodendrocyte precursor cells proliferation and differentiation (43).

Furthermore, modulations of taurine as observed in the frontal cortex, the ventral part of hypothalamus and in the caudate nuclei can induce developmental brain impairments because taurine increases the proliferation of human or mice neural precursor cells and mice cultured hippocampal

slices (49, 50). Taurine also regulates the radial migration of neurons in the fetal mouse developing neocortex (51).

Modulation of the choline metabolic pathway

Choline and its metabolites glycerophosphorylcholine and phosphorylcholine were modulated in all brain structures except amygdala and brainstem. This is consistent with the alteration of the choline metabolic pathway evidenced on the urine metabolome of adult rats treated by BPA (52) or on the brain metabolome of mice perinatally exposed to BPA (24). Choline pathway alteration comforted the hypothesis of an impact of BPA on neurogenesis because maternal choline-deficient diet disrupts migration and differentiation of progenitor neuronal-type cells (53) and alters long-term potentiation (54) in hippocampus of offspring. Due to the fundamental role of choline in cell membranes structure, a disruption of the membrane integrity can also be hypothesized in affected brain regions. Furthermore, given the direct link between choline and acetylcholine, a disruption of this neurotransmitter might be expected, especially since a decreased activity of the choline acetyltransferase (ChAT) in the hippocampus (55, 56) and the acetylcholine esterase (AChE) in the cortex and striatum (57) have been evidenced in hypothyroid rats.

Impact on the energy metabolic pathway

Beside its role as agonist of NMDA receptor, aspartate is involved in the tricarboxylic acid cycle due to its permanent balance with oxaloacetate (58). Thus, its decreased concentrations in the frontal cortex and the hippocampus might reflect a disruption of the oxidative energy metabolism in these structures. This hypothesis is consistent with the alteration of creatine and phosphocreatine in the dorsal part of the hypothalamus and in the medial part of the frontal cortex. Indeed, creatine is involved in energy metabolism through its conversion into phosphocreatine and ATP by the creatine kinase. The impact of the modulation of the energy metabolic on CNS is furthermore reinforced by the decreased concentrations of creatine itself which protects neuronal axons from energy depletion in normal conditions (59).

Alteration of the amino-acids metabolism

Expression of amino-acids (alanine, isoleucine, leucine, threonine and valine) was shown to be modulated in the different brain regions as already observed in CNS and urine metabolome of rats treated by BPA (24, 60).

Neurofunctional and neurobehavioral consequences

The modulations observed in the targeted brain structures can be correlated to their known functions, bringing new elements in the identification of the neurobehavioral consequences of a prenatal BPA exposure. Thus, the metabolome of both parts of the hypothalamus were much modulated by BPA. The impact on hypothalamic ontogenesis reflected in particular by the neurotransmitters signaling affection could participate on the endocrine dysregulation observed in BPA studies. Furthermore, hypothalamus and amygdala are implicated in the emotional regulation. The modulations observed in these brain regions could explain the behavioral changes as anxiety or hyperactivity observed in rats perinatally exposed to BPA (16, 61, 62). Even if a direct link is difficult to establish, this hypothesis is strengthened by the global disruption of GABA, glutamate and glutamine identified in several brain structures consistently with alterations observed on the NMR spectra of humans suffering from attention deficit hyperactivity disorders (63, 64). As already evidenced in monkeys or rodents exposed to BPA (44, 62, 65), neurocognitive disorders as learning impairments can also be hypothesized in regards to the modulations observed in hippocampus, the main structure involved in the memory process. Given the fundamental roles of the cerebellar vermis and the frontal cortex in the control of movements, the many metabolic pathways affected in these brain regions suggest that BPA could induce subtle motor alterations.

In summary, our study shows impacts of a prenatal BPA exposure on the metabolome of targeted brain regions of the ovine fetus jointly to a disruption of the maternal thyroid homeostasis. Many clues suggest that some of these modulations are dependant of the thyroid disruption but the clear distinction of thyroid and non-thyroid dependent mechanisms remains to establish. Globally and consistently with results of other studies, the metabolomics data evidenced alterations of key mechanisms of brain development potentially responsible of neurobehavioral disruptions and neurocognitive deficits.

Materials and Methods

All material used for the preparation of solutions, samplings, processing and analyses were either in glass or in BPA-free plastic containers.

Chemicals

Bisphenol A 99% purity (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was dissolved in corn oil / absolute ethanol (6/1:V/V) to obtain a concentration of 200 µg/mL. A new solution was prepared monthly.

Animal husbandry and treatments

All animal procedures were carried out in accordance with the accepted standards of humane animal care under agreement 311155515 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture and validated by the local ethical committee (project number 2016 0323 10542323). The study was performed on adult pregnant Lacaune ewes (1-4 yr old) in the sheep research facility of the National Veterinary School of Toulouse. Ewes were artificially inseminated with semen from a single ram. Animals were kept under natural photoperiodic and temperature conditions, with free access to water, hay *ad libitum* and vegetables pellets (Brebislac® RAGT, Rodez, France); a vitamin and iodine-enriched mineral supplementation (Alimal gestante® Alliance Elevage, Souvigny, France) was provided to cover the specific requirements of gestation. The quantity of pellets was regularly adjusted to pregnancy requirements and changes in body weight.

Ewes were randomly allocated to 2 groups (n = 13 per group) balanced for total T4 serum concentration, bodyweight and age. They received BPA (5 µg.kg⁻¹.d⁻¹; SC) or vehicle treatment from GD 28 to GD 137-138. The administered volume was regularly adjusted to the most recently recorded body weight.

On GD 138-139, ewes were euthanized by overdose of pentobarbital (60 mg/kg IV of Dolethal® Vetoquinol, Lure, France) and fetuses were quickly delivered by cesarean section and euthanized (60 mg/kg of Dolethal®, IV). Finally, 26 (15 males; 11 females) and 24 (13 males; 11 females) fetuses were delivered from control and BPA-treated ewes, respectively. When the ewes were bearing more than two fetuses, only the two first born were kept in the study.

Monitoring of BPA and BPA-G internal exposure

Sampling

Fetal blood, cord blood and amniotic fluid were collected immediately after fetal delivery. Blood samples were centrifuged for 20 min at 3000 g and 4°C, serum was decanted and stored at -20°C until assay.

BPA and BPA-G concentrations measurements

BPA and BPA-G concentrations were measured in maternal, fetal jugular and cord blood and in amniotic fluid using a previously described UPLC/MS/MS method (66). The LOQ were validated at 1 and 5 ng/mL for BPA and BPA-G, respectively.

Pharmacokinetic analyses

Given the BPA and BPA-G known pharmacokinetic parameters in the ewe and our assay LOQ, BPA and BPA-G concentrations were likely to be non-quantifiable. A pharmacokinetic model based on a tri-exponential equation (SI) was thus used to predict the time courses of maternal serum concentrations of BPA and BPA-G after repeated subcutaneous administrations. To simulate the time courses, a set of mean PK parameters obtained in 4 ewes during the courses of another experiment was used.

Characterization of maternal and fetal thyroid status

Sampling

Maternal blood samples were collected twice a week to monitor the time course of serum thyroid hormones concentrations. The first sample was collected at GD 28 before the first BPA / vehicle administration. Fetal jugular and cord blood were collected from the fetus right after delivery.

Thyroid hormones assays

Total T4 (TT4) concentrations were determined on maternal blood samples collected during the treatment period using RIA kits (DE4533, Demeditec, Kiel-Wellsee, Germany). TT4, TT3 and rT3 concentrations on maternal and fetal blood collected at the delivery were measured with a UPLC/MS/MS method. The mean intra-assay and inter-assay CV of three quality control pools were less than 15% respectively for all assays. The LOQ was validated for TT4 at 10 and 1 ng/mL for the RIA and the chromatographic methods respectively and at 0.1 ng/mL for TT3 and rT3 as the lowest value with a CV and an accuracy lower than 20%.

Statistical analyses

The effect of treatment on the time course of maternal TT4 concentrations during the treatment period was analyzed using a two-way ANOVA with time, treatment and their interaction as fixed factors and the animals nested in the treatment as random effect factor. Thyroid hormones concentrations measured on samples collected at the delivery were compared between treatment groups using an unpaired t-test. Analyses were performed with the software R (v3.2.3).

Metabolomic approach

Brain structures sampling

Whole fetal brains were immediately removed and dissected after fetal delivery. The following brain structures were collected: the medial (MFC) and the lateral (LFC) parts of the frontal cortex, the caudate nuclei (CN), the ventral (HypV) and the dorsal (HypD) hypothalamic parts, the amygdala (AMG), the largest part of the hippocampus (HipD; including the whole dentate gyrus and all parts above the fimbria) and a smallest part of the ventral hippocampus along with the entorhinal cortex (HipV), the cerebellar vermis (CerV), the cerebellar hemispheres (CerH) and the brainstem (BS). Samples were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. Brain structures dissection is described more precisely in supplemental information.

Sample preparation for ¹H-NMR spectroscopy

Frozen brain structures were reduced to powder under liquid nitrogen preservation (Retsch MM400). Approximately 100 mg of powdered frozen tissue was homogenized with a tissuelyser (FastPrep 24, MP Biomedicals, Santa Ana, USA) in 400 µL of methanol and 85 µL of distilled water. 400 µL of dichloromethane and 200 µL of distilled water were added before centrifuging at 2870 g for 15 min at 4°C. Supernatants were collected and lyophilized. Lyophilisates were then reconstituted in 700 µL of sodium potassium phosphate buffer (pH=7 – 0.25M) containing 1mM TMSP, as a chemical reference at 0 ppm.

¹H-NMR spectroscopy

¹H-NMR spectroscopy was run as previously described (67). Briefly, all ¹H-NMR spectra were obtained at 300 K using a Bruker Avance III HD 600 MHz NMR spectrometer (operating at 600.13 MHz for ¹H resonance frequency, Bruker Biospin, Germany) equipped with a 5 mm CPQCI cryogenic probe. A standard Bruker noesypr1d (90°-*t*₁-90°-*t*_{mix}-90°-FID) sequence was used to suppress signals from water

molecules, where t_1 is a 4 μ s delay time and t_{mix} is the mixing time. A total of 128 transients were collected in 32,000 data points using a spectral width of 20 ppm, a relaxation delay of 2 sec, and an acquisition time of 1.36 sec. The Free Induction Decay (FID) obtained was multiplied by 0.3 Hz of exponential line broadening before Fourier transformation. All spectra were manually phased and baseline corrected and referenced to TMS (chemical shift 0 ppm) using Bruker TopSpin 3.2 software (Bruker, Rheinstetten, Germany).

Data pre-treatment and multivariate analysis

Using the software AMIX® (version 3.9, Bruker, Rheinstetten, Germany), the spectral region δ 10 - 0.5 ppm was segmented into structures of 0.01 ppm width. Spectral regions corresponding to the signal of water and methanol were suppressed. To account for differences in sample amount, each integrated region was normalized to the total spectral area.

The multivariate statistical analyses used to identify the discriminant variables between both treatments groups have already been described (24, 67). Briefly, a PCA followed by a PLS-DA associated to an OSC data filtration were performed to identify the most important variables for the separation of the treatments groups. Percentage of the explained variance (R^2Y parameter), predictive ability (Q^2 parameter > 0.4 (68)) and robustness (permutation test) of the statistical models were verified. A Kruskal-Wallis test was then performed to determine the variables significantly different between both treatments groups. To finish, spectral assignment was based on matching data to reference spectra in a home-made database completed by other databases (<http://www.hmdb.ca>), and reports in the literature.

The data of two fetuses (one of each group) were suppressed from the dataset because they were systematically outliers of statistical models. No explanation in terms of thyroid status and/or BPA exposure could be found.

Identification of the modulated metabolic pathways

The web-server Metexplore (www.metexplore.fr) was used to open the way for the interpretation of the detected modulations (69). Briefly, a global ovine metabolic network was computed from the KEGG pathway database *Ovis aries* (1800 reactions) and biomarkers identified for each brain region were mapped into. Sub-networks were then extracted to visualize the metabolic pathways linking the biomarkers and hypothesizing on the involved mechanisms and the consequences of a prenatal exposure to a low dose of BPA.

Acknowledgements

We thank the INRA experimental unit of Domaine de Lafage for providing the animals and the staff from the ENVT sheep experimental unit for their involvement in animal care. We thank Sylvie Puel for performing BPA and BPAG assays.

References

1. de Cock M, Maas YGH, van de Bor M (2012) Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 101(8):811–818.
2. Schug TT, Blawas AM, Gray K, Heindel JJ, Lawler CP (2015) Elucidating the Links Between Endocrine Disruptors and Neurodevelopment. *Endocrinology* 156(6):1941–1951.
3. Braun JM, et al. (2011) Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children. *Pediatrics* 128(5):873–882.
4. Kim B-N, et al. (2009) Phthalates Exposure and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in School-Age Children. *Biol Psychiatry* 66(10):958–963.
5. Bellanger M, Demeneix B, Grandjean P, Zoeller RT, Trasande L (2015) Neurobehavioral Deficits, Diseases, and Associated Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab* 100(4):1256–1266.
6. Chevrier J, et al. (2013) Maternal urinary bisphenol a during pregnancy and maternal and neonatal thyroid function in the CHAMACOS study. *Environ Health Perspect* 121(1):138–144.
7. Romano ME, et al. (2015) Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: The HOME Study. *Environ Res* 138:453–460.
8. Xu X, et al. (2007) Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neurosci Res* 58(2):149–155.
9. Zoeller RT, Bansal R, Parris C (2005) Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146(2):607–612.
10. Vigié C, et al. (2013) Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* 154(1):521–528.

11. Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N (2012) Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* 33(4):842–852.
12. Préau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, Demeneix B (2015) Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1849(2):112–121.
13. Haddow JE, et al. (1999) Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* 341(8):549–555.
14. Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Escobar del Rey F (2000) Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J Clin Endocrinol Metab* 85(11):3975–3987.
15. Ryan BC, Vandenberg JG (2006) Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm Behav* 50(1):85–93.
16. Matsuda S, et al. (2012) Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39(2):273–279.
17. Komada M, et al. (2014) Newborn mice exposed prenatally to bisphenol A show hyperactivity and defective neocortical development. *Toxicology* 323:51–60.
18. Elsworth JD, et al. (2013) Prenatal exposure to bisphenol A impacts midbrain dopamine neurons and hippocampal spine synapses in non-human primates. *NeuroToxicology* 35:113–120.
19. Xu X, et al. (2013) Perinatal exposure to bisphenol-A inhibits synaptogenesis and affects the synaptic morphological development in offspring male mice. *Chemosphere* 91(8):1073–1081.
20. Kimura E, et al. (2015) Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and aged mice. *Arch Toxicol*. doi:10.1007/s00204-015-1485-x.
21. Itoh K, Yaoi T, Fushiki S (2012) Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. *Neuropathology* 32(4):447–457.
22. Matsuda S, et al. (2013) Perinatal exposure to bisphenol A enhances contextual fear memory and affects the serotonergic system in juvenile female mice. *Horm Behav* 63(5):709–716.
23. Nakamura K, Itoh K, Yoshimoto K, Sugimoto T, Fushiki S (2010) Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters brain monoamine concentration in adult mice. *Neurosci Lett* 484(1):66–70.
24. Cabaton NJ, et al. (2013) Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 121(5):586–593.

25. Kuroda N, et al. (2003) Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J Pharm Biomed Anal* 30(6):1743–1749.
26. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y (2002) Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod Oxf Engl* 17(11):2839–2841.
27. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y (2004) Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 51(2):165–169.
28. Corbel T, et al. (2013) Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure. *Biol Reprod* 89(1):11.
29. Bianco A, Salvatore D, Gereben B, Berry M, Larsen P (2002) Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23(1):38–89.
30. Fisher DA, Polk DH, Wu SY (1994) Fetal thyroid metabolism: a pluralistic system. *Thyroid* 4(3):367–371.
31. Howdeshell KL (2002) A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3:337–348.
32. Zalko D, et al. (2016) Bisphenol A Exposure Disrupts Neurotransmitters Through Modulation of Transaminase Activity in the Brain of Rodents. *Endocrinology* 157(5):1736–1739.
33. Kunz N, et al. (2011) Developmental and metabolic brain alterations in rats exposed to bisphenol A during gestation and lactation. *Int J Dev Neurosci* 29(1):37–43.
34. Ogi H, Itoh K, Ikegaya H, Fushiki S (2015) Alterations of neurotransmitter norepinephrine and gamma-aminobutyric acid correlate with murine behavioral perturbations related to bisphenol A exposure. *Brain Dev* 37(8):739–746.
35. Xu X, et al. (2015) Sex-specific effects of long-term exposure to bisphenol-A on anxiety- and depression-like behaviors in adult mice. *Chemosphere* 120:258–266.
36. Constantinou C, Chrysanthopoulos PK, Margarity M, Klapa MI (2011) GC–MS Metabolomic Analysis Reveals Significant Alterations in Cerebellar Metabolic Physiology in a Mouse Model of Adult Onset Hypothyroidism. *J Proteome Res* 10(2):869–879.
37. Montoya GA, et al. (2014) Mechanistic analysis of metabolomics patterns in rat plasma during administration of direct thyroid hormone synthesis inhibitors or compounds increasing thyroid hormone clearance. *Toxicol Lett* 225(2):240–251.
38. Wu S, et al. (2013) Metabolic Profiling Provides a System Understanding of Hypothyroidism in Rats and Its Application. *PLoS ONE* 8(2):e55599.

39. Wiens SC, Trudeau VL (2006) Thyroid hormone and γ -aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144(3):332–344.
40. Ahmed OM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG (2010) Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *Int J Dev Neurosci* 28(6):437–454.
41. Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130(3):567–580.
42. Nakamichi N, Takarada T, Yoneda Y (2009) Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling. *J Pharmacol Sci* 110(2):133–149.
43. Nguyen L, et al. (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305(2):187–202.
44. Elsworth JD, et al. (2015) Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys: BPA Alters Spine Synapses and Cognition. *J Comp Neurol* 523(8):1248–1257.
45. Mathisen GH, et al. (2013) Prenatal exposure to bisphenol A interferes with the development of cerebellar granule neurons in mice and chicken. *Int J Dev Neurosci* 31(8):762–769.
46. Fiszman ML, Borodinsky LN, Neale JH (1999) GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 115(1):1–8.
47. Michler A (1990) Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci* 8(4):463–472.
48. Uchino S, et al. (2010) Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex. *Neuroscience* 169(2):609–618.
49. Hernández-Benítez R, Vangipuram SD, Ramos-Mandujano G, Lyman WD, Pasantes-Morales H (2013) Taurine enhances the growth of neural precursors derived from fetal human brain and promotes neuronal specification. *Dev Neurosci* 35(1):40–49.
50. Shivaraj MC, et al. (2012) Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain. *PLoS One* 7(8):e42935.
51. Furukawa T, et al. (2014) Roles of taurine-mediated tonic GABA_A receptor activation in the radial migration of neurons in the fetal mouse cerebral cortex. *Front Cell Neurosci* 8:88.
52. Chen M, et al. (2014) Metabolomic Analysis Reveals Metabolic Changes Caused by Bisphenol A in Rats. *Toxicol Sci* 138(2):256–267.

53. Albright CD, Tsai AY, Friedrich CB, Mar MH, Zeisel SH (1999) Choline availability alters embryonic development of the hippocampus and septum in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 113(1-2):13–20.
54. Jones JP, Meck WH, Williams CL, Wilson WA, Swartzwelder HS (1999) Choline availability to the developing rat fetus alters adult hippocampal long-term potentiation. *Brain Res Dev Brain Res* 118(1-2):159–167.
55. Provost TL, Juárez de Ku LM, Zender C, Meserve LA (1999) Dose- and age-dependent alterations in choline acetyltransferase (ChAT) activity, learning and memory, and thyroid hormones in 15- and 30-day old rats exposed to 1.25 or 12.5 PPM polychlorinated biphenyl (PCB) beginning at conception. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23(5):915–928.
56. Sawin S, Brodish P, Carter CS, Stanton ME, Lau C (1998) Development of cholinergic neurons in rat brain regions: dose-dependent effects of propylthiouracil-induced hypothyroidism. *Neurotoxicol Teratol* 20(6):627–635.
57. Baldissarelli J, et al. (2016) Hypothyroidism Enhanced Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Activities in Rat Synaptosomes can be Prevented by the Naturally Occurring Polyphenol Quercetin. *Cell Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s10571-016-0342-7.
58. Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (2006) *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Elsevier Academic Press). 7th Ed.
59. Shen H, Goldberg MP (2012) Creatine pretreatment protects cortical axons from energy depletion in vitro. *Neurobiol Dis* 47(2):184–193.
60. Zeng J, et al. (2013) Effect of Bisphenol A on Rat Metabolic Profiling Studied by Using Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol*:130620151839006.
61. Zhou R, et al. (2015) Perinatal exposure to low-dose of bisphenol A causes anxiety-like alteration in adrenal axis regulation and behaviors of rat offspring: a potential role for metabotropic glutamate 2/3 receptors. *J Psychiatr Res* 64:121–129.
62. Wang C, et al. (2014) Changes in memory and synaptic plasticity induced in male rats after maternal exposure to bisphenol A. *Toxicology* 322:51–60.
63. Maltezos S, et al. (2014) Glutamate/glutamine and neuronal integrity in adults with ADHD: a proton MRS study. *Transl Psychiatry* 4(3):e373.
64. Bollmann S, et al. (2015) Developmental changes in gamma-aminobutyric acid levels in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Transl Psychiatry* 5(6):e589.
65. Xu X, Zhang J, Wang Y, Ye Y, Luo Q (2010) Perinatal exposure to bisphenol-A impairs learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Horm Behav* 58(2):326–333.

66. Lacroix MZ, et al. (2011) Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85(4):2053–2059.
67. Tremblay-Franco M, et al. (2015) Dynamic Metabolic Disruption in Rats Perinatally Exposed to Low Doses of Bisphenol-A. *PLOS ONE* 10(10):e0141698.
68. McCombie G, et al. (2009) omega-3 oil intake during weight loss in obese women results in remodelling of plasma triglyceride and fatty acids. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc* 5(3):363–374.
69. Cottret L, et al. (2010) MetExplore: a web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W132–137.

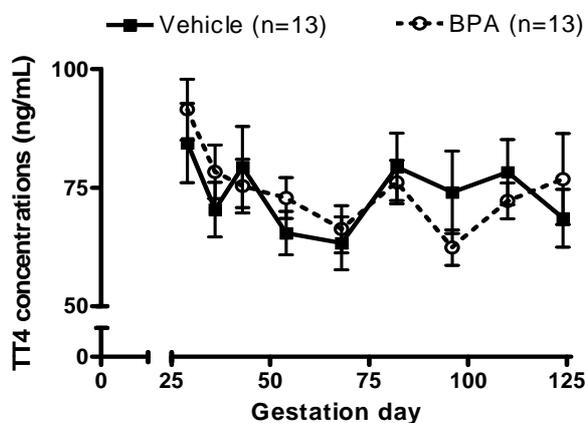
Figures

Fig. 1: time course of mean (\pm SEM) total T4 serum concentrations in pregnant ewes treated with vehicle or BPA ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$; SC) from the GD28 to GD137. The time course of mean total T4 concentrations differed significantly between the two groups (interaction time X treatment: $p < 0.05$)

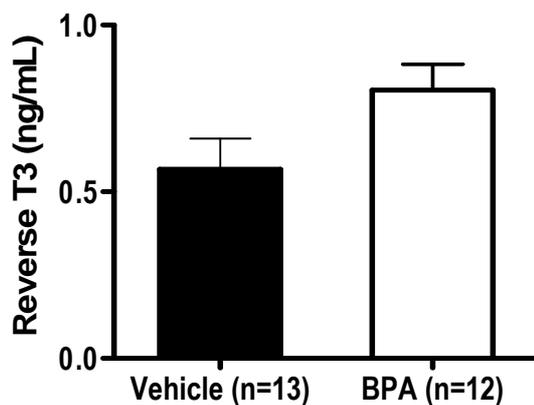


Fig. 2: mean (\pm SEM) reverse-T3 serum concentration in ewes on the 138-139th gestation day ($p=0.06$)

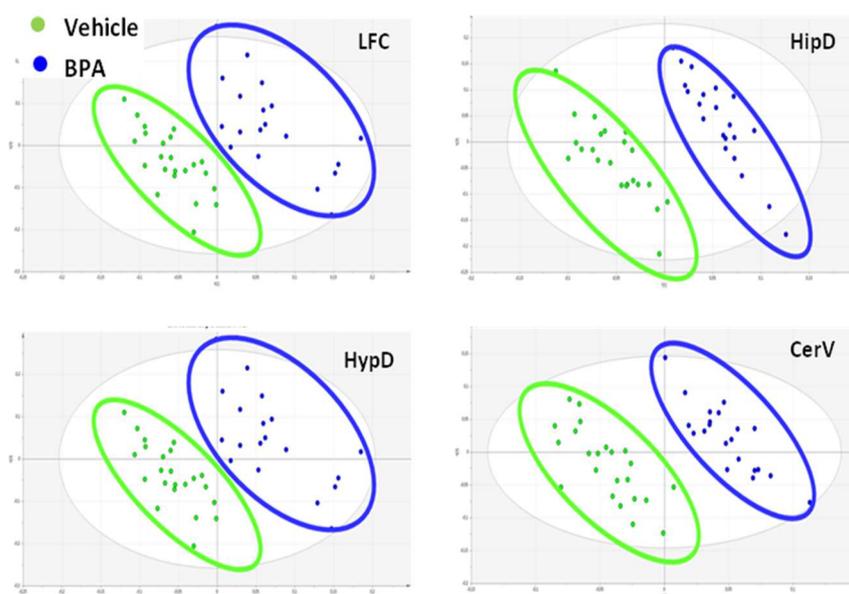


Fig. 3: two-dimensional PLS-DA score plots of integrated ¹H-NMR spectra of brain structures. (LFC) PLS-DA results for the lateral part of the frontal cortex (vehicle, n=23; BPA, n=20; 3 latent components; R²_Y=0,984 ; Q²=0,801); (HipD) PLS-DA results for the dorsal area of the hippocampus (vehicle, n=23; BPA, n=21; 2 latent components; R²_Y=0,924; Q²=0,695); (HypD) PLS-DA results for the dorsal area of the hypothalamus (vehicle, n=23; BPA, n=19; 4 latent components; R²_Y=0,978; Q²=0,855); (CerV) PLS-DA results for the cerebellar vermis (vehicle, n=23; BPA, n=21; 4 latent components; R²_Y=0,992; Q²=0,932).

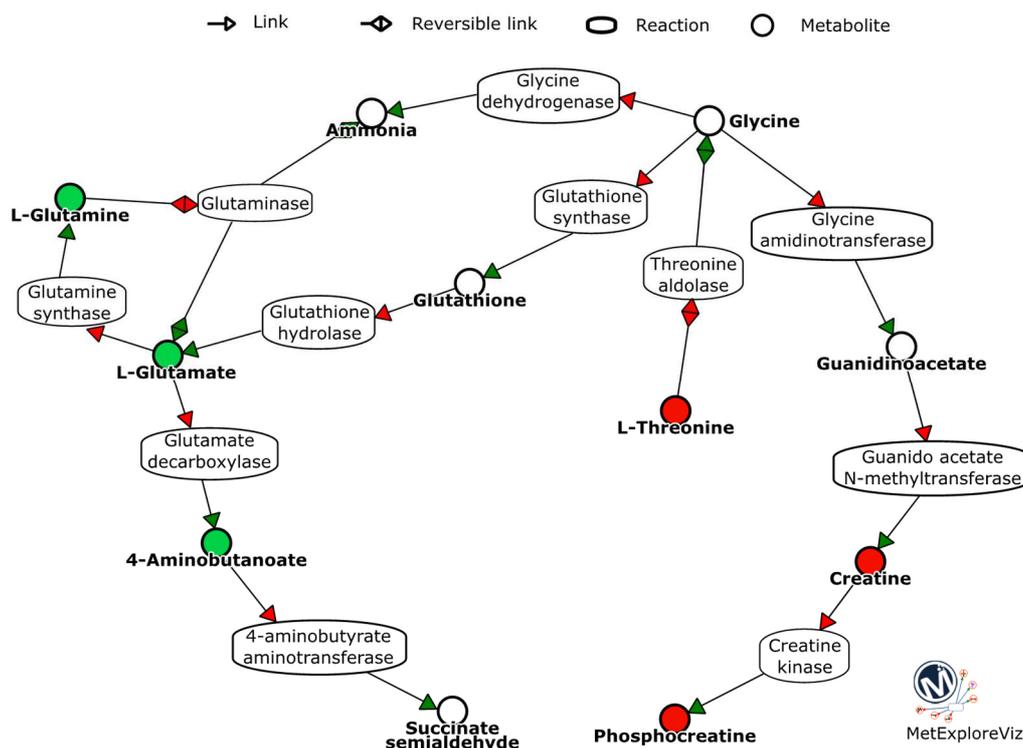


Fig. 4: subnetwork extracted from the global ovine metabolic network after mapping of the metabolites that discriminate treatment groups in the dorsal hypothalamus. Green-filled and red-filled are increased and decreased, respectively (obtained from the web-server Metexplore®; www.metexplore.toulouse.inra.fr)

Table 1: BPA and BPA-G concentrations (ng/mL) measured in the fetal blood, cord blood and amniotic liquid in the different treatment groups: vehicle and BPA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (mean \pm SEM). BPA and BPA-G LOQ were 1 and 5 ng/mL respectively.

Treatment group	Fetal blood		Cord blood		Amniotic fluid	
	BPA	BPA-G	BPA	BPA-G	BPA	BPA-G
Vehicle	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
BPA	<LOQ	24.5 \pm 2.3	<LOQ	22.8 \pm 3.1	<LOQ	23.8 \pm 4.8

Table 2: endogenous metabolites variations induced by BPA exposure ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) in different brain structures of fetuses compared with vehicle group: the medial part of frontal cortex (MFC); lateral part of frontal cortex (LFC); the caudate nuclei (CN); the dorsal hippocampal area (HipD); the amygdala (AMG); the ventral (HypV) and the dorsal (HypD) hypothalamic areas; the cerebellar vermis (CerV) and the brainstem (BS).

Metabolites	¹ H NMR chemical shift δ (ppm)	MFC	LFC	CN	HipD	AMG	HypD	HypV	CerV	BS
Acetate	1.91 (s)						+		+	
Alanine	1.46 (d)		+							
Aspartate	2.66 (dd); 2.80 (dd); 3.89 (dd)	-	-		-					
Choline	3.19 (s)	-	-						+	
Creatine, phosphocreatine	3.02 (s); 3.92 (s)	-					-			
GABA	1.89 (m); 2.28 (t); 3.00 (t)						+		+	
Glutamate	2.09 (m); 2.35 (m); 3.77 (dd)					+	+			
Glutamine	2.13 (m); 2.45 (m); 3.77 (t)	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glycerophosphorylcholine	3.20 (s)				-		-	-	-	-
Isoleucine, leucine, valine	0.95 (t); 0.98 (d); 1.0 (d); 1.03 (d)					-				+
Lactate, threonine	1.31 (d); 4.10 (q)		+				-	-	-	
Myo-inositol	3.27 (t); 3.52 (dd); 3.61 (t); 4.05 (t)	-	-						-	
N-acetylaspartate	2.03 (s); 2.70 (dd)			-	-				-	
Phosphorylcholine	3.21 (s)			+	+					
Taurine	3.25 (t); 3.42 (t)		+	-	-			+		

Abbreviations: +, significantly increased concentration; -, significantly decreased concentration; GABA, γ -aminobutyric acid. Chemical shifts (ppm) are relative to TMSP ($^1\text{H}, \delta$). Multiplicity of signals is indicated in parentheses: d, doublet; dd, doublet of doublet; m, multiplet; q, quadruplet; s, singlet; t, triplet.

Supplemental InformationPharmacokinetic analyses

The maternal serum BPA and BPA-G concentrations obtained after repeated subcutaneous administrations of BPA ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) were fitted to the following tri-exponential equation corresponding to extravascular administrations:

$$C(t) = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} + C \cdot e^{-K_{01} \cdot t}$$

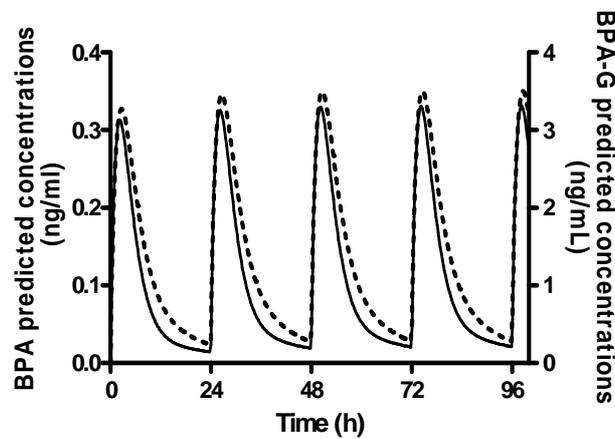


Fig. S1: repeated maternal dosing simulation. BPA (continuous line) and BPA-G (discontinuous line) serum concentrations (ng/mL) simulated after subcutaneous administrations of BPA $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (discontinuous line) repeated every 24 h in an adult pregnant sheep.

Brain structures dissection

Fresh brains were placed on a cold surface and cut into 0.5 to 1 cm thick coronal sections. For all structures, left and right sides samples were pooled. Dorsomedial and laterals part of the frontal cortex corresponding to motor areas and the caudate nucleus were collected from the same section. A section encompassing the preoptic and hypothalamic regions was delimited by a section plan just anterior to the optic chiasm and by a posterior plan corresponding to the anterior limit of the mammillary bodies. The amygdala, the dorsal and ventral preoptic/hypothalamic areas were collected from this section.

The hypothalamic areas were limited laterally by the medial border of the optic tracts and dorsally by the dorsal border of the mammillothalamic tract and/or the roof of the third ventricle. The limit between the ventral and dorsal hypothalamus was set at the dorsal limit of the fornix.

Brain structures discrimination

An ANOVA-Simultaneous Component Analysis (A-SCA) was first performed with brain region, treatment and their interaction as factors. The factors brain region ($p=0.0002$) and treatment ($p=0.0274$) were statistically significant. A PCA was then performed for each factor.

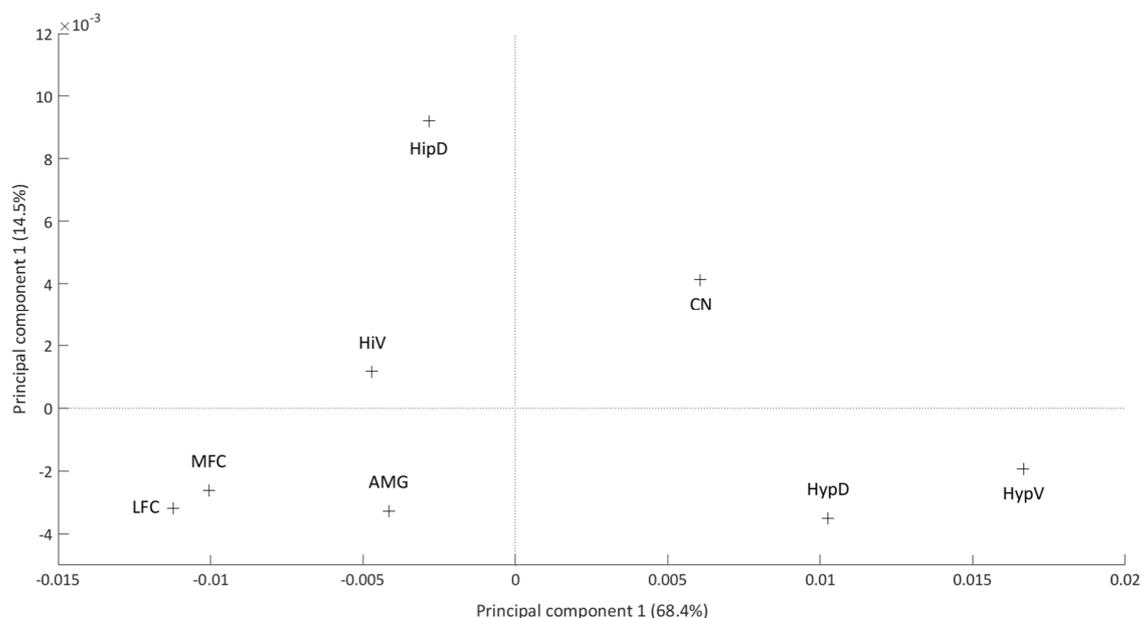


Fig. S2: Two-dimensional PCA score plot of brain extract samples integrated $^1\text{H-NMR}$ spectra. The horizontal axis represents the first principal component (68.4%). The vertical axis represents the second principal component (14.5%). Each dot represents an averaged score of a brain region. (MFC) the medial part of frontal cortex; (LFC) the lateral part of frontal cortex; the amygdala (AMG); the ventral (HipV) and the dorsal (HipD) hippocampal parts; the dorsal hippocampal part; (CN) the caudate nuclei (CN); the ventral (HypV) and the dorsal (HypD) hypothalamic parts.

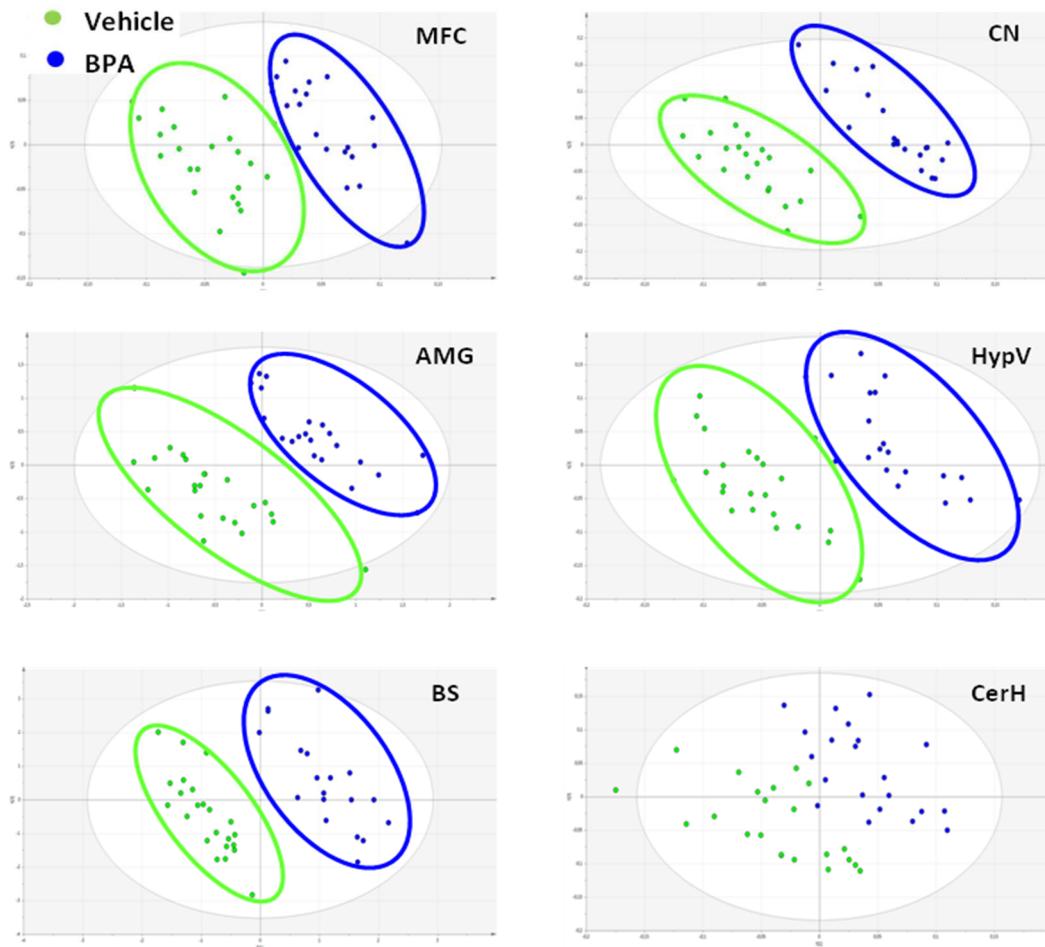
Treatment group discrimination

Fig. S3: two-dimensional PLS-DA score plots of integrated ¹H-NMR spectra of brain structures. (MFC) PLS-DA results for the medial part of the frontal cortex (vehicle, n=23; BPA, n=21; 1 latent component; R²_Y=0,984 ; Q²=0,801); (CN) PLS-DA results for the caudate nuclei (vehicle, n=22; BPA, n=21; 3 latent components; R²_Y=0,973; Q²=0,896); (AMG) PLS-DA results for the amygdala (vehicle, n=23; BPA, n=21; 3 latent components; R²_Y=0,974; Q²=0,846); (HypV) PLS-DA results for the ventral part of the hypothalamus (vehicle, n=23; BPA, n=21; 2 latent components; R²_Y=0,911; Q²=0,642); (BS) PLS-DA results for the ventral part of the brainstem (vehicle, n=23; BPA, n=19; 3 latent components; R²_Y=0,949; Q²=0,984); (CerH) PLS-DA results for the cerebellar hemispheres (vehicle, n=23; BPA, n=21).

C. Conclusion

Cette étude a mis en évidence, sur le modèle ovin, que l'exposition prénatale à une faible dose de BPA ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$; S.C.) induit une perturbation de la fonction thyroïdienne maternelle et des altérations du métabolome de structures cérébrales fœtales.

La voie des neurotransmetteurs et acides-aminés excitateurs et inhibiteurs est modulée dans le cortex frontal, les noyaux caudés, l'hypothalamus, l'hippocampe, les amygdales et le cervelet des fœtus exposés au BPA. Cette voie est fortement impliquée dans les étapes essentielles de la neurogenèse telles que la prolifération, la différenciation et la migration neuronale. Elle joue également un rôle clé dans le phénomène de plasticité neuronale dont l'altération, en particulier dans l'hippocampe, est associée à des troubles de la mémoire et de l'apprentissage. La modulation de cette voie métabolique dans les différentes structures cérébrales suggère que l'exposition prénatale au BPA est à l'origine de ce type de troubles neurocognitifs.

Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence d'une altération de la voie de la choline et de ses dérivés dans le cortex frontal, les noyaux caudés, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet. En effet, la voie de la choline est fortement impliquée dans la prolifération, la migration et la différenciation des précurseurs neuronaux et dans l'angiogenèse, en particulier dans l'hippocampe. L'altération de cette voie suggère également que le BPA altère la constitution membranaire. Les modulations du métabolome retrouvées dans le cortex frontal, l'hippocampe et l'hypothalamus convergent aussi vers une perturbation du métabolisme énergétique dans ces structures.

Par ailleurs, les nombreuses altérations retrouvées sur le métabolome des amygdales et de l'hypothalamus, deux centres de la régulation des émotions, sont en accord avec les troubles du comportement (anxiété, hyperactivité) suggérés par les études épidémiologiques et animales.

Les résultats de cette dernière partie montrent donc que l'exposition prénatale au BPA, à des doses induisant des concentrations circulantes en BPA similaires à celles décrites chez l'homme, conduit à des altérations du développement du SNC. Certaines altérations sont susceptibles de résulter indirectement des effets inhibiteurs du BPA sur la fonction thyroïdienne maternelle.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les objectifs de cette thèse étaient 1) de déterminer les conséquences d'une exposition gestationnelle au BPA sur le développement du SNC conjointement aux effets sur la fonction thyroïdienne et 2) de documenter l'exposition interne au BPA inhérente à différentes voies d'administration.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi de mener nos travaux sur le modèle ovin. En effet, bien que la majorité des études toxicologiques soient menées sur le modèle rongeur, et préférentiellement chez le rat, ce modèle présente de nombreux défauts pour l'étude de la fonction thyroïdienne et du développement du SNC.

Notre étude a permis de mettre en évidence que le BPA induit, chez la brebis, une modulation de l'homéostasie thyroïdienne au cours de la gestation, caractérisée par une diminution des concentrations circulantes de T4 libre et de T3 totale. Outre par le modèle utilisé, cette étude se démarque par les doses de BPA pour lesquelles les effets perturbateurs thyroïdiens ont été mis en évidence. En effet, alors que ces effets avaient majoritairement été démontrées *in vitro* ou *in vivo* à des doses élevées de BPA, les modifications ont été observées ici à des doses de BPA conduisant à des concentrations sanguines maternelles pertinentes par rapport aux données d'exposition interne décrites chez l'homme ^{182,185}.

Sur le plan mécanistique, la modification du ratio des concentrations maternelles sériques rT3/TT4 nous a conduits à suggérer que le BPA modifie l'activité des désiodases. Compte-tenu du rôle prépondérant des désiodases placentaires dans la régulation de la balance des concentrations T3/rT3 dans le compartiment fœtal, il convient d'explorer plus en profondeur les effets du BPA sur l'activité de ces désiodases.

Même si les modifications de l'homéostasie thyroïdienne observées chez la mère n'étaient pas associées à des modifications des concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes chez nos fœtus, contrairement à ce que nous avons observé précédemment sur des nouveau-nés à terme ⁶¹, il est probable que l'hypothyroxinémie maternelle n'ait pas permis de subvenir intégralement aux besoins physiologiques du fœtus.

L'application d'une méthode aussi sensible que la métabolomique ¹H-RMN nous a permis de révéler des modulations subtiles du développement du SNC induites par une exposition *in utero* à une faible dose de BPA. Les dimensions du SNC ovin autorisaient l'isolement de structures cérébrales en quantité suffisante, nous permettant alors d'élaborer des pistes en termes de conséquences sur la base des fonctions propres de chaque structure. Les profils métaboliques obtenus suggèrent que le BPA est à l'origine d'altérations de la neurogenèse dans différentes structures cérébrales et impacte la plasticité neuronale dans ces structures. Ces résultats viennent conforter les études mettant en évidence la

survenue de troubles neurocognitifs tels que des troubles de l'apprentissage et de la mémoire chez des animaux exposés ^{225,229,230}. Le BPA semble également moduler la structure membranaire et le métabolisme énergétique de certaines structures cérébrales. Par ailleurs, alors que l'association entre exposition périnatale au BPA et survenue de troubles du comportement tels que l'anxiété ou l'hyperactivité est de plus en plus étoffée par les études épidémiologiques ^{295,296} et animales ^{228,230,232}, les modulations du métabolome mises en évidence dans les amygdales et l'hypothalamus, deux centres de la régulation des émotions, conforte cette hypothèse.

Bien que certaines modulations métabolomiques puissent être attribuées aux conséquences de la perturbation thyroïdienne maternelle sous-jacente, le protocole utilisé n'a pas permis de discriminer les effets sur le SNC résultant d'une perturbation thyroïdienne de ceux directement imputables aux effets neurotoxiques du BPA. La discrimination de ces deux mécanismes reste donc à approfondir.

Les travaux de cette thèse ont permis de proposer un schéma physiopathologique expliquant les conséquences d'une exposition gestationnelle au BPA sur les fonctions thyroïdiennes maternelle et fœtale et sur le développement du SNC (Figure 33).

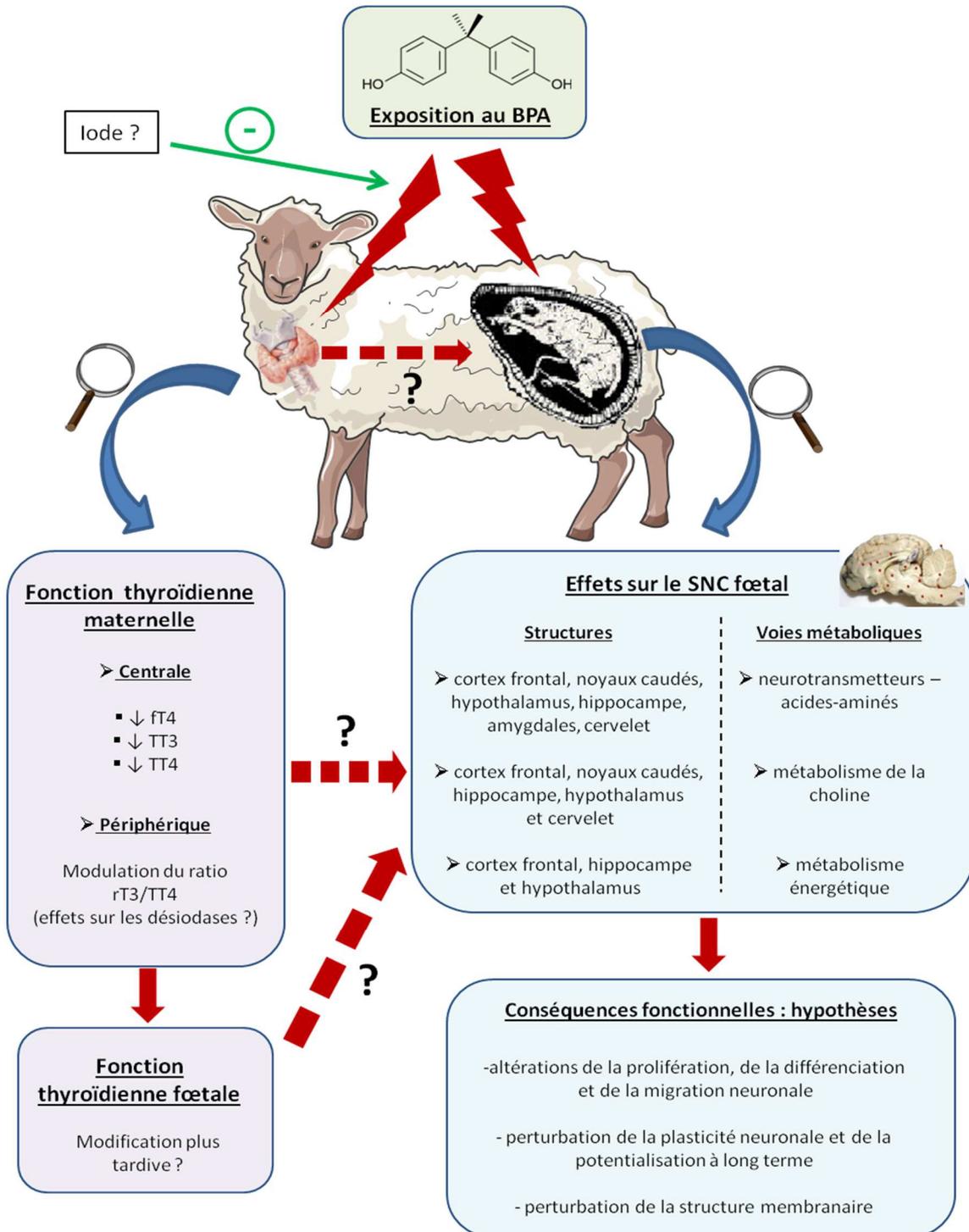


Figure 33 : proposition d'un schéma physiopathologique des effets d'une exposition prénatale au BPA sur la fonction thyroïdienne et le développement du SNC. Les travaux ont mis en évidence que l'exposition gestationnelle au BPA, à une faible dose, altère la fonction thyroïdienne maternelle et le métabolome de différentes structures du SNC fœtal. Les modulations du métabolome ont permis d'établir des hypothèses quant aux conséquences fonctionnelles d'une exposition prénatale au BPA sur le développement du SNC. La démonstration des effets indirects de la perturbation thyroïdienne maternelle, induite par le BPA, sur le développement du SNC fœtal reste à établir.

Par ailleurs, compte-tenu des nombreuses incertitudes entourant l'exposition du BPA, et plus généralement des contaminants alimentaires et des perturbateurs endocriniens, nous avons porté une attention particulière à caractériser l'exposition interne attachée aux différentes voies d'administration (alimentaire, sous-cutanée et gavage). Les analyses pharmacocinétiques ont mis en évidence des différences importantes entre les voies.

Comme attendu, en raison de son échappement à l'effet de premier passage hépatique, la voie sous-cutanée conduit à une biodisponibilité 30 fois plus importante que par voie alimentaire. De façon plus surprenante, alors que le gavage a toujours été considéré comme identique à la voie alimentaire sur le plan pharmacocinétique, la biodisponibilité du BPA par gavage est en réalité 3 fois plus faible. De plus, les concentrations maximales observées par voie alimentaire sont plus proches de celles obtenues par voie sous-cutanée (concentration surestimée par un facteur 4) que par gavage (sous-estimation par un facteur 16).

La voie alimentaire conduit donc à un profil pharmacocinétique intermédiaires entre la voie sous-cutanée et le gavage qui s'explique par le double mécanisme d'absorption du BPA (Figure 34). Qui plus est, le fort degré de kératinisation de la muqueuse buccale ovine, en comparaison de l'homme, suggère que la fraction absorbée par voie sublinguale est en réalité encore plus importante chez l'homme. On peut donc logiquement penser que chez l'homme, la concentration maximale et la biodisponibilité du BPA obtenues par voie alimentaire se rapprochent encore davantage de celles mesurées par voie SC.

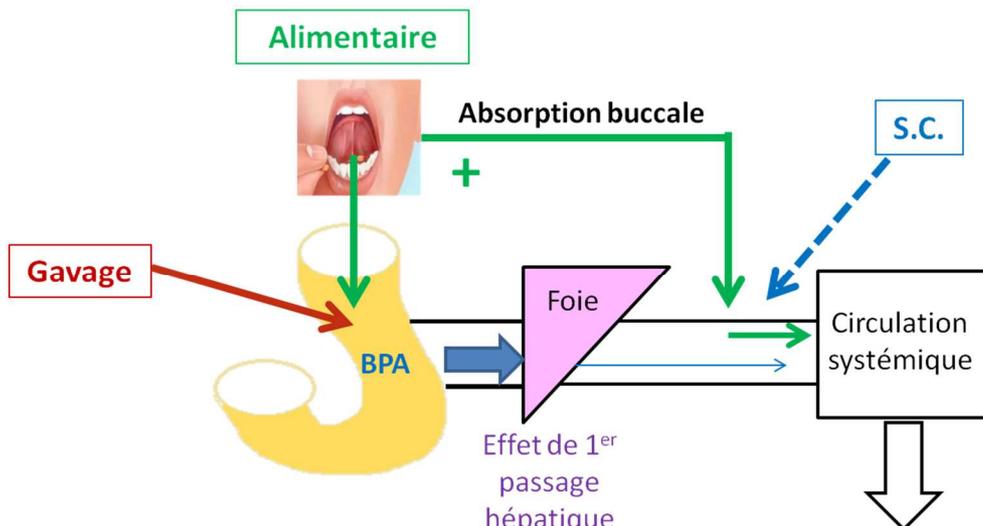


Figure 34 : mécanismes d'absorption attachés aux administrations par voie alimentaire, sous-cutanée et gavage du BPA

Ces résultats mettent en évidence que sur le plan pharmacocinétique, la voie sous-cutanée est tout aussi pertinente que le gavage. Ils démontrent que, pendant des années, les agences ont retiré à tort

de l'évaluation du risque les données obtenues suite à une exposition au BPA par voie sous-cutanée, ne se focalisant alors que sur une infime partie des données scientifiques sur le BPA. Par ailleurs, ces résultats soulignent une nouvelle fois la nécessité de ne pas chercher à relier en toxicologie les effets biologiques d'un composé à la dose administrée mais à ses concentrations circulantes.

Cette discussion soulève certains points restant à élucider. Ce dernier chapitre a donc pour objectif de mettre en perspective ce travail de thèse en proposant des pistes pour compléter notre étude.

- *L'exposition périphérique reflète-t-elle réellement celle au niveau du tissu cible ?*

Il serait intéressant de compléter les profils d'exposition interne au BPA des fœtus en mesurant les concentrations de BPA et BPA-G dans les tissus cérébraux puisque celles-ci sont susceptibles de différer des concentrations systémiques. En effet, suite à l'administration par voie intraveineuse de BPA à une souris au 20^{ème} jour de gestation conduit, chez le fœtus, la concentration tissulaire en BPA dans le cerveau est 11 fois supérieure à celle mesurée dans le sang. A l'inverse, la concentration tissulaire en BPA-G est 200 fois plus faible que dans la concentration sérique ³¹. Cette divergence entre concentration tissulaire et concentration circulante peut probablement s'expliquer, en partie du moins, par la forte lipophilie du BPA qui facilite son transfert à travers la barrière hémato-encéphalique et la faible activité des enzymes de phase II dans le SNC.

En outre, nos résultats sont cohérents avec des données antérieures montrant que le BPA-G s'accumule fortement dans le compartiment fœtal ^{61,297}. Ceci conduit à une très forte exposition du fœtus à ce métabolite dont on sait par ailleurs qu'un certain nombre de tissus, y compris chez le fœtus ont la capacité de le déconjuguer ³⁰. La question demeure donc de l'existence d'une telle possibilité au sein du SNC fœtal qui pourrait conduire à une surexposition *in situ* au BPA sans pour autant se traduire par des concentrations sanguines trop importantes. Un tel mécanisme serait d'autant plus préjudiciable que le fœtus serait exposé à un stade précoce en relation avec l'ontogenèse tardive des systèmes de détoxification de phase II chez le fœtus.

Néanmoins, une telle hypothèse soulève la problématique de l'exposition tissulaire et cellulaire au BPA-G, un composé extrêmement hydrophile. La barrière hémato-encéphalique est immature jusqu'à des stades tardifs du développement et ne devrait donc pas constituer un problème. En revanche, il est difficile de concevoir par quel mécanisme ce conjugué peut pénétrer au sein des cellules, plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique et les lysosomes, pour atteindre de l'équipement enzymatique nécessaire à sa réactivation.

La quantification du BPA et du BPA-G dans les différentes structures cérébrales permettrait par ailleurs de voir si les concentrations retrouvées sont liées aux modulations observées sur le métabolome. Cela permettrait notamment de vérifier si l'absence de discrimination des groupes de traitement (véhicule et BPA) pour les hémisphères cérébelleux et la partie ventrale de l'hippocampe (associée à du cortex enthorhinal) pourrait être liée à une moindre exposition de ces structures au BPA et/ou son métabolite. Si tel était le cas, ceci plaiderait plutôt en faveur d'une action directe du BPA sur le SNC.

- *Comment discriminer les effets directs du BPA sur le développement du SNC des effets indirects résultant d'une perturbation thyroïdienne maternelle et/ou fœtale ?*

Bien que les effets du BPA sur le développement du SNC aient été étudiés en parallèle de ses effets sur la fonction thyroïdienne maternelle et fœtale, nous ne pouvons pas certifier que les effets observés sur le SNC résultent de la perturbation thyroïdienne maternelle. En effet, le BPA peut agir directement sur le SNC, indépendamment d'une modulation de la fonction thyroïdienne (Figure 35).

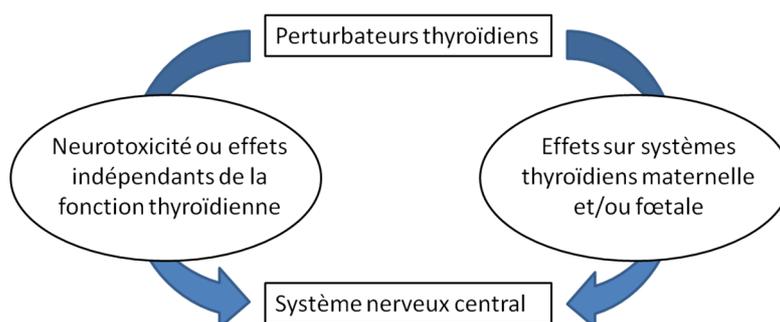


Figure 35 : mécanismes d'action possibles des effets du BPA sur le développement du SNC

Il serait intéressant d'isoler une des deux composantes. Pour cela, on peut chercher à reproduire artificiellement, mais sans recourir à une intervention chimique, les perturbations thyroïdiennes observées chez les mères traitées au BPA. Dans un deuxième temps, on détermine si on obtient des modifications du métabolome similaires à celles retrouvées chez les fœtus exposés au BPA.

On peut également envisager de supplémenter les mères en hormones thyroïdiennes pour voir si on rétablit les profils métabolomiques à la normale. Cette dernière piste est cependant difficilement envisageable tant que le mécanisme du BPA impliqué dans la perturbation thyroïdienne n'est pas clairement défini. En effet, si le BPA agit en modulant l'activité des désiodases, la supplémentation en hormones thyroïdiennes ne permettra pas nécessairement de rétablir l'homéostasie thyroïdienne et par conséquent les perturbations du métabolome.

- Quelles pistes peut-on envisager pour préciser les effets et les mécanismes d'action d'une exposition gestationnelle au BPA sur la fonction thyroïdienne maternelle et fœtale ?

La mesure des concentrations en hormones thyroïdiennes (T4, T3 et rT3) et de l'activité des désiodases au sein des structures cérébrales peut nous aider à caractériser le mécanisme d'action du BPA sur la fonction thyroïdienne. Les résultats obtenus chez les mères suggèrent un effet du BPA sur les désiodases. Il est donc probable que l'activité des désiodases cérébrales fœtales soit également modulée par le traitement au BPA, ce qui entrainerait localement une altération des concentrations de T3 et rT3 (Figure 36). Au cours de l'ontogenèse du SNC, l'activité des désiodases cérébrales est très élevée. Ainsi, sur les premiers essais réalisés sur le cortex cérébelleux, la T4 est non-délectable et la T3 est présente en forte concentration alors qu'elle est indélectable dans le sang fœtal.

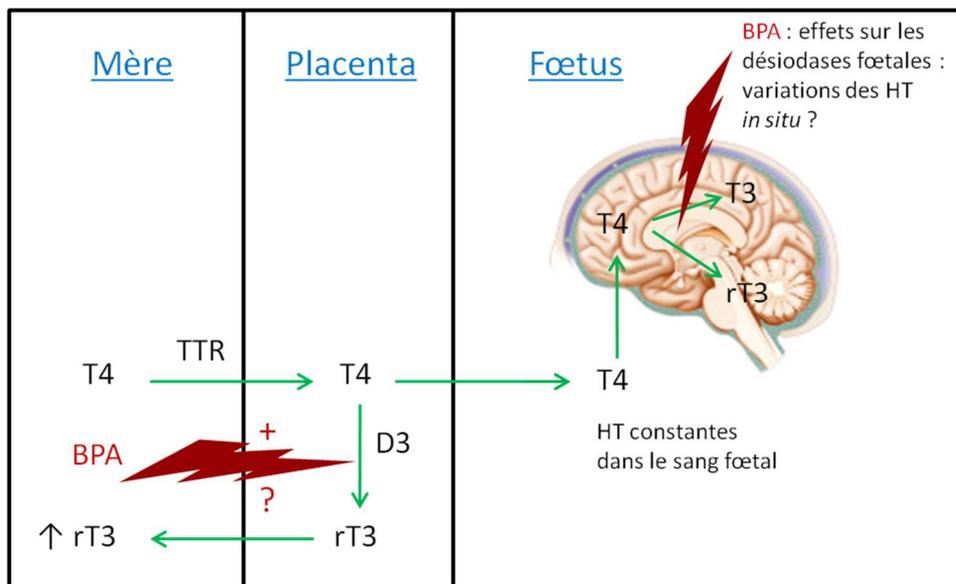


Figure 36 : effets probables du BPA sur l'activité des désiodases placentaires et cérébrales

L'impact du BPA sur les désiodases et sur les concentrations thyroïdiennes dans le SNC pourrait être structure-dépendant. En effet, il existe une forte spécificité spatiale et temporelle de l'activité des désiodases dans le SNC¹⁰⁷. Le blocage de l'activité d'une désiodase à un temps donné pourrait donc affecter le statut thyroïdien de certaines structures cérébrales et en épargner d'autres.

La détermination des concentrations en hormones thyroïdiennes dans les structures cérébrales permettra de voir si le statut thyroïdien des structures est corrélé aux modulations du métabolome observées et aux concentrations en BPA et BPA-G mesurées *in situ*.

Une des hypothèses avancées pour expliquer chez le fœtus l'absence d'effet du BPA sur les concentrations sanguines en hormones thyroïdiennes repose sur l'immaturation de l'axe thyroïdien fœtal au moment de l'extraction (plus de 10 jours avant le terme). Néanmoins, il faut aussi noter que le statut thyroïdien fœtal n'a pu être évalué qu'au moment de la césarienne. On ne peut pas donc exclure que des modifications aient eu lieu plus précocement au cours de la gestation. Il serait alors intéressant de réaliser un protocole expérimental permettant d'obtenir une vision plus dynamique de l'effet du BPA sur la fonction thyroïdienne fœtale au cours de la gestation. Cela pourrait notamment reposer sur des prélèvements répétés de sang fœtal comme le permet le modèle de fœtus ovin instrumenté développé au sein du laboratoire ^{297,298}.

D'autre part, il est possible que les hormones circulantes ne constituent pas des marqueurs suffisamment sensibles pour mettre en évidence des modifications subtiles de la fonction thyroïdienne fœtale. En effet, certains modèles de souris génétiquement modifiées présentent des perturbations thyroïdiennes sans modifications des hormones thyroïdiennes circulantes. Ainsi, la mutation du gène *Thra* codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR α 1 confère un phénotype très proche de celui retrouvé dans un contexte d'hypothyroïdie congénitale, à ceci près que les concentrations fœtales en hormones thyroïdiennes ne sont pas diminuées ²⁹⁹. A 15 jours post-natals, les souris présentent un ralentissement de la prise de poids, des anomalies de l'ossification, des troubles de l'arborisation des cellules de Purkinje dans le cervelet et une augmentation de l'expression du gène *TSHB* dans l'hypophyse. Dans une autre étude, un gène codant pour une forme mutée du récepteur TR β 1 a été intégré dans le génome de souris et placé sous le contrôle d'un promoteur s'exprimant uniquement dans les cellules de Purkinje ¹³⁰. Une nouvelle fois, ces souris présentaient les caractéristiques d'une hypothyroïdie sans que les concentrations plasmatiques en T3 et T4 ne soient modifiées. L'expression de différents gènes régulés par les hormones thyroïdiennes (*IP3*, *ROR α* , *BDNF*, *NT-3* et *MBP*) était perturbée. Ces gènes représentent peut-être des marqueurs plus sensibles d'une perturbation thyroïdienne que les concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes.

De façon surprenante, nous n'avons pas reproduit avec la forte dose de BPA (5 mg.kg⁻¹.j⁻¹) la diminution des concentrations fœtales de T3 et T4 décrite à cette même dose dans l'étude de Viguié *et al.* ⁶¹. Toutefois, contrairement au protocole expérimental suivi au cours de cette thèse, les brebis n'avaient pas reçu de supplémentation minérale en iode. Nous avons donc suggéré que l'apport en iode diminuait la sensibilité de la fonction thyroïdienne aux effets perturbateurs thyroïdiens du BPA. Autrement dit, une carence en iode favoriserait l'action inhibitrice du BPA sur la fonction thyroïdienne. Ceci est d'autant plus préoccupant qu'une résurgence de l'incidence des carences en iode est observée depuis quelques années dans certains pays européens ^{300,301}. Ainsi, sur des cohortes de femmes enceintes suédoises (n=459) et britanniques (n=230), la concentration urinaire en iode était

respectivement de 98 (interquartile : 57 – 148)³⁰² et 56,8 µg/L (interquartile : 31,1 – 104)³⁰³. Or, selon les recommandations de l'OMS, les besoins en iode chez la femme enceinte sont assurés lorsque la concentration urinaire en iode est comprise entre 150 et 249 µg/L.

Afin d'éclaircir le rôle de l'apport iodé sur l'effet perturbateur thyroïdien du BPA, il serait intéressant de traiter parallèlement deux groupes de brebis gestantes supplémentées ou non en iode et de comparer le statut thyroïdien maternel et fœtal de chaque groupe.

- *Comment confirmer et enrichir les hypothèses établies à partir des données obtenues par l'approche métabolomique ?*

La métabolomique a permis d'établir un grand nombre d'hypothèses quant aux effets d'une exposition prénatale au BPA sur le développement du SNC. Il serait désormais intéressant de tester ces hypothèses via des approches plus ciblées. Ainsi, il a été suggéré que l'exposition prénatale au BPA peut perturber certaines étapes de la neurogenèse impliquées dans la plasticité neuronale. Pour tester cette hypothèse, il peut être intéressant de mener une approche immunohistochimique et d'étudier des marqueurs de la plasticité neuronale.

On peut envisager un marquage immunohistochimique de la PSA-NCAM (polysialylated-neural cell adhesion molecule). La PSA-NCAM est utilisée comme marqueur de la migration neuronale et de la synaptogenèse dans le SNC de vertébrés en développement^{304,305}. Elle correspond à la forme sialylée du facteur NCAM, un facteur impliqué dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire. C'est également un marqueur de neuroplasticité chez l'adulte impliqué dans la régulation de différents systèmes neuroendocriniens tels que la régulation du système ocytocinergique ou de l'axe gonadotrope, en particulier chez la brebis^{306,307}.

D'autre part, les altérations de l'expression du glutamate dans les amygdales et l'hypothalamus conduisent à s'intéresser à son récepteur spécifique : le récepteur NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique). L'expression de ce récepteur serait liée aux capacités de potentialisation à long terme^{308,309} et reste, en outre, régulé par les hormones thyroïdiennes. Ainsi, son expression est diminuée dans les régions CA1, CA2 et CA3 ainsi que dans le gyrus denté de rats adultes thyroïdectomisés³¹⁰.

Les facteurs de croissance neuronale apparaissent également comme des marqueurs d'intérêt pour tester les effets du BPA sur la neurogenèse. En effet, l'exposition de rates gestantes au BPA induit des troubles de la mémoire associés à une diminution de l'expression hippocampale de BDNF (brain-derived neurotrophic factor) chez les rats mâles âgés de 21 jours³¹¹. Par ailleurs, l'exposition

périnatale de rats au propylthiouracil, un inhibiteur de la synthèse des hormones thyroïdiennes, conduit à une diminution de l'expression du gène *Ngf* (nerve growth factor)¹³⁹ et du facteur BDNF³¹² dans l'hippocampe, persistant respectivement 70 et 30 jours après l'arrêt de l'exposition.

Par ailleurs, l'approche métabolomique a mis en évidence la modulation par le BPA de l'expression de nombreux acides aminés et neuromédiateurs dans le SNC (GABA, glutamate, aspartate, taurine...). Malheureusement, la sensibilité de la spectroscopie RMN n'a pas permis de détecter certains neuromédiateurs clés présents en trop faible concentration tels que la dopamine, l'adrénaline, la noradrénaline et la sérotonine. Or, ces neuromédiateurs semblent être impactés lors d'une exposition au BPA ou dans un contexte d'hypothyroïdie. Ainsi, l'exposition de souris gestantes au BPA (250 ng.kg⁻¹.j⁻¹; SC) entraîne une augmentation de la dopamine et de sa métabolisation en DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) dans l'hippocampe et les amygdales des descendants mâles à l'âge adulte²²⁸. Chez les descendantes femelles âgées de 4 mois, l'exposition périnatale au BPA est associée à une augmentation dans l'hippocampe des concentrations de 5-HIAA (5-hydroxyindole-3-acetic acid ; un métabolite de la sérotonine) et du ratio 5-HIAA/sérotonine²²⁷. D'autre part, sur un modèle de rat génétiquement modifié pour développer une hypothyroïdie congénitale, le transport nigro-striatal de la dopamine est modifié¹²⁴.

Dans ce contexte, nous souhaitons donc confirmer et enrichir les données obtenues en métabolomique par un dosage ciblé de neurotransmetteurs catécholaminergiques et sérotoninergiques et d'acides aminés en chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence³¹³. Ceci permettra d'affiner l'analyse des voies métaboliques, de conforter les hypothèses avancées ou même d'en générer de nouvelles. Il apportera aussi une dimension quantitative. Ce dosage est actuellement en cours de développement au sein de l'unité, en collaboration avec le plateau Axiom-Métatoul.

Par ailleurs, le SNC étant majoritairement constitué de lipides, il semblerait intéressant de compléter le schéma physiopathologique établi à partir des données de métabolomique par une analyse en lipidomique des structures cérébrales. Cette dernière devrait permettre de couvrir l'autre grande partie du réseau métabolique et de mettre éventuellement en évidence la modulation de voies métaboliques encore non explorées. Une étude pilote est d'ailleurs menée actuellement en collaboration avec le LABERCA (Nantes, France) sur deux des structures cérébrales collectées (le vermis médian du cervelet et la partie latérale du cortex frontal). Bien qu'encore très peu appliqué aux perturbateurs endocriniens, ce type d'approche semble prometteur, en particulier pour les composés perturbant la fonction thyroïdienne dont on sait qu'elle constitue un acteur clé de la régulation du

métabolisme lipidique. Une récente étude a d'ailleurs identifié, sur le lipidome du cervelet, 23 biomarqueurs lipidiques discriminant des rats thyroïdectomisés de rats contrôle³¹⁴. Ces biomarqueurs étaient impliqués dans le métabolisme des sphingolipides ou des glycérophospholipides et dans la β -oxydation des acides gras. De façon intéressante, la supplémentation en T4 des rats thyroïdectomisés tendait à rétablir à la normale l'expression de ces biomarqueurs.

- *Les modulations du métabolome observées avec le BPA sont-elles également partagées par les analogues du BPA ?*

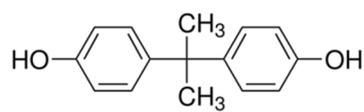
Le durcissement de la réglementation entourant l'utilisation du BPA, en particulier en France, conduit les industriels à se tourner vers des composés de structures chimiques légèrement différentes : les analogues du BPA (Figure 37). Bien que les données toxicologiques autour de ces composés soient encore peu nombreuses, quelques études stipulent que ces analogues présentent également certaines propriétés perturbatrices thyroïdiennes.

Ainsi, l'exposition au bisphénol AF d'œufs puis de larves de zebrafish diminue les concentrations de TT4, TT3 et fT4 à une dose de 50 $\mu\text{g/L}$ et de fT3 à une dose de 5 $\mu\text{g/L}$. Cette diminution est associée une augmentation de l'expression du gène *Tsh- β* à une dose de 50 $\mu\text{g/L}$ de bisphénol AF³¹⁵.

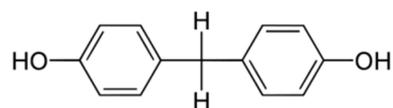
Le bisphénol F semble aussi posséder des propriétés perturbatrices thyroïdiennes puisqu'il induit, sur des larves de zebrafish, une diminution de TT4 et une augmentation de TT3 à 200 $\mu\text{g/L}$, attribuable à l'augmentation dès 20 $\mu\text{g/L}$ de l'expression du gène codant pour la désiodase de type 2⁸⁰.

L'exposition pendant 75 jours de zebrafish au bisphénol S entraîne une diminution des concentrations de T3 et T4 à 10 et 100 $\mu\text{g/L}$ chez les mâles et à 100 $\mu\text{g/L}$ chez les femelles³¹⁶. Dans une autre étude, le traitement au bisphénol S de zebrafish pendant le développement larvaire induit des altérations des neurones GnRH3 bloquées par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes²³⁷.

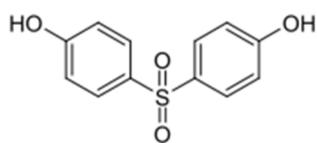
Dans ce contexte, il serait donc intéressant d'étudier si l'exposition prénatale à des analogues du BPA induit, chez le modèle ovin, des perturbations thyroïdiennes et des modulations du métabolome similaires à celles observées avec le BPA.



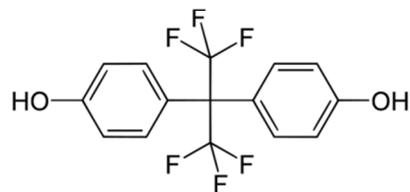
Bisphénol A



Bisphénol F



Bisphénol S



Bisphénol AF

Figure 37 : structure chimique du bisphénol A et de certains analogues du BPA

Références

Les références bibliographiques des trois articles présentés dans ce manuscrit apparaissent à la fin de chaque article et ne sont pas incrémentés à la liste ci-dessous.

1. Bellanger, M., Demeneix, B., Grandjean, P., Zoeller, R. T. & Trasande, L. Neurobehavioral Deficits, Diseases, and Associated Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 1256–1266 (2015).
2. Kavlock, R. J. *et al.* 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 Suppl 4**, 715–740 (1996).
3. Beronius, A., Rudén, C., Håkansson, H. & Hanberg, A. Risk to all or none? A comparative analysis of controversies in the health risk assessment of Bisphenol A. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **29**, 132–146 (2010).
4. Foster, P. M. D. & McIntyre, B. S. Endocrine Active Agents: Implications of Adverse and Non-Adverse Changes. *Toxicol. Pathol.* **30**, 59–65 (2002).
5. EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the env: Identification/Characterisation of EDs: scientific criteria and test methods. *EFSA J.* **11**, 3132 (2013).
6. Vandenberg, L. N. in *Vitamins & Hormones* **94**, 129–165 (Elsevier, 2014).
7. Zoeller, R. T. *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* **153**, 4097–4110 (2012).
8. Rhomberg, L. R. & Goodman, J. E. Low-dose effects and nonmonotonic dose–responses of endocrine disrupting chemicals: Has the case been made? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **64**, 130–133 (2012).
9. Zoeller, T. R. Environmental chemicals targeting thyroid. *Horm. Athens* **9**, 28–40 (2010).

10. EFSA. *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in food stuffs: PART II - Toxicological assessment and risk characterisation*. (2015).
11. Tharp, A. P. *et al.* Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8190–8195 (2012).
12. Vandenberg, L. N. *et al.* Exposure to Environmentally Relevant Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A Alters Development of the Fetal Mouse Mammary Gland. *Endocrinology* **148**, 116–127 (2007).
13. Wadia, P. R. *et al.* Low-Dose BPA Exposure Alters the Mesenchymal and Epithelial Transcriptomes of the Mouse Fetal Mammary Gland. *PLoS ONE* **8**, e63902 (2013).
14. Melnick, R. *et al.* Summary of the National Toxicology Program’s report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ. Health Perspect.* **110**, 427–431 (2002).
15. Brucker-Davis, F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid* **8**, 827–856 (1998).
16. Vandenberg, L. N. *et al.* Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* **33**, 378–455 (2012).
17. Kamrin, M. A. The ‘low dose’ hypothesis: validity and implications for human risk. *Int. J. Toxicol.* **26**, 13–23 (2007).
18. Sharpe, R. M. Is It Time to End Concerns over the Estrogenic Effects of Bisphenol A? *Toxicol. Sci.* **114**, 1–4 (2010).
19. Welshons, W. V. *et al.* Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. *Environ. Health Perspect.* **111**, 994–1006 (2003).
20. Kohn, M. C. & Melnick, R. L. Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 113–123 (2002).
21. Beausoleil, C. *et al.* Low dose effects and non-monotonic dose responses for endocrine active chemicals: Science to practice workshop: Workshop summary. *Chemosphere* **93**, 847–856 (2013).

22. Vom Saal, F. S. *et al.* Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2056–2061 (1997).
23. Delclos, K. B. *et al.* Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod. Toxicol.* **15**, 647–663 (2001).
24. Calafat, A. M. *et al.* Exposure to Bisphenol A and Other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants. *Environ. Health Perspect.* **117**, 639–644 (2009).
25. Kim, S. *et al.* Association between Several Persistent Organic Pollutants and Thyroid Hormone Levels in Cord Blood Serum and Bloodspot of the Newborn Infants of Korea. *PLoS One* **10**, e0125213 (2015).
26. Fisher, M. *et al.* Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* **15**, 59 (2016).
27. Richter, C. A. *et al.* In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol. Elmsford NY* **24**, 199 (2007).
28. de Cock, M., Maas, Y. G. H. & van de Bor, M. Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992* **101**, 811–818 (2012).
29. Fudvoye, J., Bourguignon, J.-P. & Parent, A.-S. in *Vitamins & Hormones* **94**, 1–25 (Elsevier, 2014).
30. Corbel, T. *et al.* Conjugation and Deconjugation Reactions within the Fetoplacental Compartment in a Sheep Model: A Key Factor Determining Bisphenol A Fetal Exposure. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 467–476 (2015).
31. Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Vanlandingham, M., Brown, R. P. & Fisher, J. W. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague–Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **255**, 261–270 (2011).

32. Taylor, J. A., Welshons, W. V. & vom Saal, F. S. No Effect of Route of Exposure (Oral; Subcutaneous Injection) on Plasma Bisphenol A throughout 24 hr after Administration in Neonatal Female Mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **25**, 169–176 (2008).
33. Isoherranen, N. & Thummel, K. E. Drug metabolism and transport during pregnancy: how does drug disposition change during pregnancy and what are the mechanisms that cause such changes? *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **41**, 256–262 (2013).
34. Vessey, M. P. Epidemiological studies of the effects of diethylstilboestrol. *IARC Sci. Publ.* 335–348 (1989).
35. Blanc, B., Bretelle, F. & Agostini, A. *Le Distilbène trente ans après: Les enfants des 2èmes et 3èmes générations*. (Springer Science & Business Media, 2008).
36. Fénichel, P., Brucker-Davis, F. & Chevalier, N. The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren--the transgenerational effect. *Ann. Endocrinol.* **76**, 253–259 (2015).
37. Liew, Z. *et al.* Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Childhood Autism in Association with Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances: A Nested Case–Control Study in the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* (2014). doi:10.1289/ehp.1408412
38. Roberts, E. M. *et al.* Maternal Residence Near Agricultural Pesticide Applications and Autism Spectrum Disorders Among Children in the California Central Valley. *Environ. Health Perspect.* (2007). doi:10.1289/ehp.10168
39. Zoeller, R. T. *et al.* Thyroid Hormone, Brain Development, and the Environment. **110**, (2002).
40. Gilbert, M. E., Rovet, J., Chen, Z. & Koibuchi, N. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* **33**, 842–852 (2012).
41. Préau, L., Fini, J. B., Morvan-Dubois, G. & Demeneix, B. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* **1849**, 112–121 (2015).

-
42. Gutleb, A. C., Cambier, S. & Serchi, T. Impact of Endocrine Disruptors on the Thyroid Hormone System. *Horm. Res. Paediatr.* (2016). doi:10.1159/000443501
 43. Sharma, V. *et al.* Effects of Rixinoids on Thyrotrope Function and the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. *Endocrinology* **147**, 1438–1451 (2006).
 44. Decherf, S., Seugnet, I., Fini, J.-B., Clerget-Froidevaux, M.-S. & Demeneix, B. A. Disruption of thyroid hormone-dependent hypothalamic set-points by environmental contaminants. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 172–182 (2010).
 45. Tonacchera, M. *et al.* Relative potencies and additivity of perchlorate, thiocyanate, nitrate, and iodide on the inhibition of radioactive iodide uptake by the human sodium iodide symporter. *Thyroid* **14**, 1012–1019 (2004).
 46. Breous, E., Wenzel, A. & Loos, U. The promoter of the human sodium/iodide symporter responds to certain phthalate plasticisers. *Mol. Cell. Endocrinol.* **244**, 75–78 (2005).
 47. Patrick, L. Thyroid disruption: mechanisms and clinical implications in human health. *Altern. Med. Rev.* **14**, 326–347 (2009).
 48. Crofton, K. M. *et al.* Thyroid-Hormone-Disrupting Chemicals: Evidence for Dose-Dependent Additivity or Synergism. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1549–1554 (2005).
 49. Schmutzler, C. *et al.* The Ultraviolet Filter Benzophenone 2 Interferes with the Thyroid Hormone Axis in Rats and Is a Potent *in Vitro* Inhibitor of Human Recombinant Thyroid Peroxidase. *Endocrinology* **148**, 2835–2844 (2007).
 50. Larsen, P. R., Davies, T. F., Schlumberger, M.-J. & Hay, I. D. in *Williams Textbook of Endocrinology* 331–373 (Saunders, 2002).
 51. Boas, M., Feldt-Rasmussen, U. & Main, K. M. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* **355**, 240–248 (2012).
 52. Meerts, I. A. *et al.* Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin *in vitro*. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **56**, 95–104 (2000).

53. Weiss, J. M. *et al.* Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **109**, 206–216 (2009).
54. Curran, P. G. & DeGroot, L. J. The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocr. Rev.* **12**, 135–150 (1991).
55. Bianco, A. C. & Kim, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* **116**, 2571–2579 (2006).
56. Bianco, A., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. & Larsen, P. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* **23**, 38–89 (2002).
57. Klammer, H. *et al.* Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary–thyroid function in rats. *Toxicology* **238**, 192–199 (2007).
58. Morse *et al.* Interference of polychlorinated bisphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **122**, 27–33
59. Viluksela, M., Raasmaja, A., Lebofsky, M., Stahl, B. U. & Rozman, K. K. Tissue-specific effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the activity of 5'-deiodinases I and II in rats. *Toxicol. Lett.* **147**, 133–142 (2004).
60. Zhou, L. X. *et al.* Cytochrome P450 catalyzed covalent binding of methoxychlor to rat hepatic, microsomal iodothyronine 5'-monodeiodinase, type I: does exposure to methoxychlor disrupt thyroid hormone metabolism? *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 390–394 (1995).
61. Viguié, C. *et al.* Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology* **154**, 521–528 (2013).
62. Crofton, K. M. Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures. *Int. J. Androl.* **31**, 209–223 (2008).

-
63. Schuur, A. G., Brouwer, A., Bergman, A., Coughtrie, M. W. & Visser, T. J. Inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *Chem. Biol. Interact.* **109**, 293–297 (1998).
 64. Nishimura, N., Yonemoto, J., Miyabara, Y., Sato, M. & Tohyama, C. Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Endocrinology* **144**, 2075–2083 (2003).
 65. Roques, B. Bases mécanistiques des effets d'un insecticide agrovétérinaire, le fipronil, et/ou de ses métabolites sur la fonction thyroïdiennes chez le rat. (2012).
 66. Friesema, E. C. H. *et al.* Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 1435–1437 (2004).
 67. Ceballos, A. *et al.* Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* **150**, 2491–2496 (2009).
 68. Mayerl, S. *et al.* Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 1987–1999 (2014).
 69. Richardson, V. M. *et al.* Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**, 244–250 (2008).
 70. Shimada, N. & Yamauchi, K. Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T3)-uptake system of tadpole red blood cells: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T3 response. *J. Endocrinol.* **183**, 627–637 (2004).
 71. Jugan, M.-L., Levi, Y. & Blondeau, J.-P. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 939–947 (2010).
 72. Miyazaki, W., Iwasaki, T., Takeshita, A., Kuroda, Y. & Koibuchi, N. Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone receptor-mediated transcription through a novel mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 18195–18202 (2004).

-
73. Kojima, H. *et al.* Nuclear Hormone Receptor Activity of Polybrominated Diphenyl Ethers and Their Hydroxylated and Methoxylated Metabolites in Transactivation Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1210–1218 (2009).
 74. Fini, J.-B. *et al.* An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5908–5914 (2007).
 75. DeVito, M. *et al.* Screening methods for thyroid hormone disruptors. *Environ. Health Perspect.* **107**, 407–415 (1999).
 76. Ghisari, M. & Bonefeld-Jorgensen, E. C. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol. Lett.* **189**, 67–77 (2009).
 77. Kitamura, S. *et al.* Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicol. Sci.* **84**, 249–259 (2005).
 78. Mengeling, B. J. & Furlow, J. D. Pituitary specific retinoid-X receptor ligand interactions with thyroid hormone receptor signaling revealed by high throughput reporter and endogenous gene responses. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **29**, 1609–1618 (2015).
 79. Grimm, F. A., Lehmler, H.-J., He, X., Robertson, L. W. & Duffel, M. W. Sulfated metabolites of polychlorinated biphenyls are high-affinity ligands for the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Environ. Health Perspect.* **121**, 657–662 (2013).
 80. Huang, G., Tian, X., Fang, X. & Ji, F. Waterborne exposure to bisphenol F causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae. *Chemosphere* **147**, 188–194 (2016).
 81. Heimeier, R. A., Das, B., Buchholz, D. R. & Shi, Y.-B. The Xenoestrogen Bisphenol A Inhibits Postembryonic Vertebrate Development by Antagonizing Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology* **150**, 2964–2973 (2009).
 82. Li, S., Li, M., Wang, Q., Gui, W. & Zhu, G. Exposure to butachlor causes thyroid endocrine disruption and promotion of metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Chemosphere* **152**, 158–165 (2016).

-
83. Terrien, X., Fini, J.-B., Demeneix, B. A., Schramm, K.-W. & Prunet, P. Generation of fluorescent zebrafish to study endocrine disruption and potential crosstalk between thyroid hormone and corticosteroids. *Aquat. Toxicol.* **105**, 13–20 (2011).
 84. Denver, R. J. in *Current Topics in Developmental Biology* **103**, 195–227 (Elsevier, 2013).
 85. Power, D. M. *et al.* Evolution of the Thyroid Hormone-Binding Protein, Transthyretin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **119**, 241–255 (2000).
 86. Döhler, K. D., Wong, C. C. & von zur Mühlen, A. The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. *Pharmacol. Ther. [B]* **5**, 305–318 (1979).
 87. Fisher, D. A., Dussault, J. H., Sack, J. & Chopra, I. J. Ontogenesis of hypothalamic--pituitary--thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat. *Recent Prog. Horm. Res.* **33**, 59–116 (1976).
 88. Oppenheimer, J. H. & Schwartz, H. L. Molecular Basis of Thyroid Hormone-Dependent Brain Development 1. *Endocr. Rev.* **18**, 462–475 (1997).
 89. Fisher, D. A., Polk, D. H. & Wu, S. Y. Fetal thyroid metabolism: a pluralistic system. *Thyroid* **4**, 367–371 (1994).
 90. Fisher, D. A. in *Williams Textbook of Endocrinology* 811–842 (Saunders, 2002).
 91. Leghait, J. Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez deux espèces: le rat et le mouton. (Université de Toulouse III Paul Sabatier, 2008).
 92. Savu, L. *et al.* A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG). *Biochim. Biophys. Acta* **1097**, 19–22 (1991).
 93. Vranckx, R. *et al.* Regulation of rat thyroxine-binding globulin and transthyretin: studies in thyroidectomized and hypophysectomized rats given tri-iodothyronine or/and growth hormone. *J. Endocrinol.* **142**, 77–84 (1994).
 94. Hurley, P. M. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ. Health Perspect.* **106**, 437–445 (1998).

-
95. Wu, K.-M. & Farrelly, J. G. Preclinical development of new drugs that enhance thyroid hormone metabolism and clearance: inadequacy of using rats as an animal model for predicting human risks in an IND and NDA. *Am. J. Ther.* **13**, 141–144 (2006).
 96. Glinoer, D., McGuire, R. A., Gershengorn, M. C., Robbins, J. & Berman, M. Effects of estrogen on thyroxine-binding globulin metabolism in rhesus monkeys. *Endocrinology* **100**, 9–17 (1977).
 97. Brent, G. A. Maternal thyroid function: interpretation of thyroid function tests in pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* **40**, 3–15 (1997).
 98. Hassan, M. A. *et al.* Consideration on some hormone binding proteins patterns during pregnancy. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* **23**, 85–87 (1991).
 99. Glinoer, D. What happens to the normal thyroid during pregnancy? *Thyroid* **9**, 631–635 (1999).
 100. Hotelling, D. R. & Sherwood, L. M. The effects of pregnancy on circulating triiodothyronine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 783–786 (1971).
 101. Ballabio, M., Poshychinda, M. & Ekins, R. P. Pregnancy-induced changes in thyroid function: role of human chorionic gonadotropin as putative regulator of maternal thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 824–831 (1991).
 102. Vonnahme, K. A. *et al.* Maternal dietary intake alters organ mass and endocrine and metabolic profiles in pregnant ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.* **141**, 131–141 (2013).
 103. Aumont, G., Lamand, M. & Tressol, J. C. Iodine nutrition in ewes: effects of low to high iodine intake on iodine content of biological fluids in pregnant and lactating ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* **29**, 113–125 (1989).
 104. Morreale de Escobar, G., Obregon, M. J. & Escobar del Rey, F. Is Neuropsychological Development Related to Maternal Hypothyroidism or to Maternal Hypothyroxinemia? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3975–3987 (2000).
 105. Escobar, G. M. de, Obregón, M. J. & Rey, F. E. del. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **18**, 225–248 (2004).

-
106. Calvo, R. M. *et al.* Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1768–1777 (2002).
107. Kester, M. H. A. *et al.* Iodothyronine Levels in the Human Developing Brain: Major Regulatory Roles of Iodothyronine Deiodinases in Different Areas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3117–3128 (2004).
108. Bernal, J. & Pekonen, F. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. *Endocrinology* **114**, 677–679 (1984).
109. Glinoer, D. & Delange, F. The potential repercussions of maternal, fetal, and neonatal hypothyroxinemia on the progeny. *Thyroid* **10**, 871–887 (2000).
110. Lavado-Autric, R. *et al.* Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J. Clin. Invest.* **111**, 1073–1082 (2003).
111. Haddow, J. E. *et al.* Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N. Engl. J. Med.* **341**, 549–555 (1999).
112. Pop, V. J. *et al.* Maternal hypothyroxinaemia during early pregnancy and subsequent child development: a 3-year follow-up study. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **59**, 282–288 (2003).
113. Finken, M. J. J., van Eijdsden, M., Loomans, E. M., Vrijkotte, T. G. M. & Rotteveel, J. Maternal Hypothyroxinemia in Early Pregnancy Predicts Reduced Performance in Reaction Time Tests in 5- to 6-Year-Old Offspring. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1417–1426 (2013).
114. Zoeller, R. T. & Rovet, J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J. Neuroendocrinol.* **16**, 809–818 (2004).
115. Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M. J., St Germain, D. L. & Bernal, J. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10391–10396 (1997).
116. Bernal, J. in *Endotext* (eds. De Groot, L. J. *et al.*) (MDText.com, Inc., 2015).
117. Williams, G. R. Neurodevelopmental and Neurophysiological Actions of Thyroid Hormone. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 784–794 (2008).

-
118. Madeira, M. D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A. & Tavares, M. A. Unbiased estimate of cerebellar granule cell numbers in hypothyroid and in sex-age-matched control rats. *J. Für Hirnforsch.* **29**, 587–594 (1988).
119. Nicholson, J. L. & Altman, J. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res.* **44**, 13–23 (1972).
120. Madeira, M. D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A. & Tavares, M. A. Unbiased estimate of hippocampal granule cell numbers in hypothyroid and in sex-age-matched control rats. *J. Für Hirnforsch.* **29**, 643–650 (1988).
121. Uchida, K., Yonezawa, M., Nakamura, S., Kobayashi, T. & Machida, T. Impaired neurogenesis in the growth-retarded mouse is reversed by T3 treatment. *Neuroreport* **16**, 103–106 (2005).
122. Stenzel, D., Wilsch-Bräuninger, M., Wong, F. K., Heuer, H. & Huttner, W. B. Integrin $\alpha\beta3$ and thyroid hormones promote expansion of progenitors in embryonic neocortex. *Dev. Camb. Engl.* **141**, 795–806 (2014).
123. Fauquier, T. *et al.* Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TR 1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development. *Development* **141**, 166–175 (2014).
124. Shimokawa, N. *et al.* Altered Cerebellum Development and Dopamine Distribution in a Rat Genetic Model with Congenital Hypothyroidism. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 164–175 (2014).
125. Cuevas, E. *et al.* Transient maternal hypothyroxinemia at onset of corticogenesis alters tangential migration of medial ganglionic eminence-derived neurons. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 541–551 (2005).
126. Ausó, E. *et al.* A Moderate and Transient Deficiency of Maternal Thyroid Function at the Beginning of Fetal Neocortico-genesis Alters Neuronal Migration. *Endocrinology* **145**, 4037–4047 (2004).
127. Goodman, J. H. & Gilbert, M. E. Modest Thyroid Hormone Insufficiency during Development Induces a Cellular Malformation in the Corpus Callosum: A Model of Cortical Dysplasia. *Endocrinology* **148**, 2593–2597 (2007).

-
128. Koibuchi, N. The Role of Thyroid Hormone on Functional Organization in the Cerebellum. *The Cerebellum* **12**, 304–306 (2013).
129. Wang, Y. *et al.* Developmental hypothyroxinaemia and hypothyroidism limit dendritic growth of cerebellar Purkinje cells in rat offspring: involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and stathmin. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **40**, 398–415 (2014).
130. Yu, L. *et al.* Aberrant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. *Endocrinology* **156**, 1565–1576 (2015).
131. Ibhazehiebo, K. *et al.* Disruption of thyroid hormone receptor-mediated transcription and thyroid hormone-induced Purkinje cell dendrite arborization by polybrominated diphenyl ethers. *Environ. Health Perspect.* **119**, 168–175 (2011).
132. Kimura-Kuroda, J., Nagata, I. & Kuroda, Y. Disrupting effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on neuronal development of cerebellar Purkinje cells: A possible causal factor for developmental brain disorders? *Chemosphere* **67**, S412–S420 (2007).
133. Comer, C. P. & Norton, S. Early development in the caudate and thyroid of methimazole-treated rats. *Neurotoxicology* **6**, 25–35 (1985).
134. Horn, S. & Heuer, H. Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol. Cell. Endocrinol.* **315**, 19–26 (2010).
135. Manzano, J., Cuadrado, M., Morte, B. & Bernal, J. Influence of Thyroid Hormone and Thyroid Hormone Receptors in the Generation of Cerebellar γ -Aminobutyric Acid-Ergic Interneurons from Precursor Cells. *Endocrinology* **148**, 5746–5751 (2007).
136. Sharlin, D. S., Tighe, D., Gilbert, M. E. & Zoeller, R. T. The Balance between Oligodendrocyte and Astrocyte Production in Major White Matter Tracts Is Linearly Related to Serum Total Thyroxine. *Endocrinology* **149**, 2527–2536 (2008).
137. Calzà, L., Fernández, M. & Giardino, L. Role of the Thyroid System in Myelination and Neural Connectivity. *Compr. Physiol.* 1405–1421 (2015).

-
138. Malone, M. J., Rosman, N. P., Szoke, M. & Davis, D. Myelination of brain in experimental hypothyroidism. An electron-microscopic and biochemical study of purified myelin isolates. *J. Neurol. Sci.* **26**, 1–11 (1975).
139. Gilbert, M. E., Sanchez-Huerta, K. & Wood, C. Mild Thyroid Hormone Insufficiency During Development Compromises Activity-Dependent Neuroplasticity in the Hippocampus of Adult Male Rats. *Endocrinology* **157**, 774–787 (2016).
140. Cortes, C. *et al.* Hypothyroidism in the Adult Rat Causes Incremental Changes in Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neuronal and Astrocyte Apoptosis, Gliosis, and Deterioration of Postsynaptic Density. *Thyroid* **22**, 951–963 (2012).
141. Gilbert, M. E. *et al.* Thyroid Hormone Insufficiency during Brain Development Reduces Parvalbumin Immunoreactivity and Inhibitory Function in the Hippocampus. *Endocrinology* **148**, 92–102 (2007).
142. Wiens, S. C. & Trudeau, V. L. Thyroid hormone and γ -aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **144**, 332–344 (2006).
143. Sawano, E., Takahashi, M., Negishi, T. & Tashiro, T. Thyroid hormone-dependent development of the GABAergic pre- and post-synaptic components in the rat hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.* **31**, 751–761 (2013).
144. Constantinou, C., Margarity, M. & Valcana, T. Region-specific effects of hypothyroidism on the relative expression of thyroid hormone receptors in adult rat brain. *Mol. Cell. Biochem.* **278**, 93–100 (2005).
145. Ahmed, O. M., Abd El-Tawab, S. M. & Ahmed, R. G. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *Int. J. Dev. Neurosci.* **28**, 437–454 (2010).

-
146. Hassan, W. A., Aly, M. S., Rahman, T. A. & Shahat, A. S. Impact of experimental hypothyroidism on monoamines level in discrete brain regions and other peripheral tissues of young and adult male rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **31**, 225–233 (2013).
147. Kalaria, R. N. & Prince, A. K. Effects of thyroid deficiency on the development of cholinergic, GABA, dopaminergic and glutamate neuron markers and DNA concentrations in the rat corpus striatum. *Int. J. Dev. Neurosci.* **3**, 655–666 (1985).
148. Vasilopoulou, C. G., Constantinou, C., Giannakopoulou, D., Giompres, P. & Margarity, M. Effect of adult onset hypothyroidism on behavioral parameters and acetylcholinesterase isoforms activity in specific brain regions of male mice. *Physiol. Behav.* **164**, 284–291 (2016).
149. Baldissarelli, J. *et al.* Hypothyroidism Enhanced Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Activities in Rat Synaptosomes can be Prevented by the Naturally Occurring Polyphenol Quercetin. *Cell. Mol. Neurobiol.* (2016). doi:10.1007/s10571-016-0342-7
150. Sawin, S., Brodish, P., Carter, C. S., Stanton, M. E. & Lau, C. Development of cholinergic neurons in rat brain regions: dose-dependent effects of propylthiouracil-induced hypothyroidism. *Neurotoxicol. Teratol.* **20**, 627–635 (1998).
151. Provost, T. L., Juárez de Ku, L. M., Zender, C. & Meserve, L. A. Dose- and age-dependent alterations in choline acetyltransferase (ChAT) activity, learning and memory, and thyroid hormones in 15- and 30-day old rats exposed to 1.25 or 12.5 PPM polychlorinated biphenyl (PCB) beginning at conception. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **23**, 915–928 (1999).
152. Bernal, J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 249–259 (2007).
153. Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. & Feldman, D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2279–2286 (1993).
154. Hoekstra, E. J. & Simoneau, C. Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 386–402 (2013).

-
155. ANSES. *Evaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine - Tome 1*. (2013).
156. Bemrah, N. *et al.* Assessment of dietary exposure to bisphenol A in the French population with a special focus on risk characterisation for pregnant French women. *Food Chem. Toxicol.* **72**, 90–97 (2014).
157. Van Landuyt, K. L. *et al.* How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **27**, 723–747 (2011).
158. Kang, Y.-G., Kim, J.-Y., Kim, J., Won, P.-J. & Nam, J.-H. Release of bisphenol A from resin composite used to bond orthodontic lingual retainers. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop. Off. Publ. Am. Assoc. Orthod. Its Const. Soc. Am. Board Orthod.* **140**, 779–789 (2011).
159. Wetherill, Y. B. *et al.* In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* **24**, 178–198 (2007).
160. Matthews, J. B., Twomey, K. & Zacharewski, T. R. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 149–157 (2001).
161. Signorile, P. G. *et al.* Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen. Comp. Endocrinol.* **168**, 318–325 (2010).
162. Rubin, B. S., Murray, M. K., Damassa, D. A., King, J. C. & Soto, A. M. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* **109**, 675 (2001).
163. Moore-Ambriz, T. R. *et al.* Exposure to bisphenol A in young adult mice does not alter ovulation but does alter the fertilization ability of oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **289**, 507–514 (2015).
164. Cabaton, N. J. *et al.* Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* **119**, 547–552 (2011).
165. Murray, T. J., Maffini, M. V., Ucci, A. A., Sonnenschein, C. & Soto, A. M. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **23**, 383–390 (2007).

-
166. Seachrist, D. D. *et al.* A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* **59**, 167–182 (2016).
167. Wei, J. *et al.* Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology* **152**, 3049–3061 (2011).
168. Rubin, B. S. *et al.* Perinatal BPA exposure alters body weight and composition in a dose specific and sex specific manner: The addition of peripubertal exposure exacerbates adverse effects in female mice. *Reprod. Toxicol.* (2016). doi:10.1016/j.reprotox.2016.07.020
169. Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E. & Nadal, A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ. Health Perspect.* **114**, 106–112 (2006).
170. Alonso-Magdalena, P. *et al.* Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1243–1250 (2010).
171. Alonso-Magdalena, P., García-Arévalo, M., Quesada, I. & Nadal, Á. Bisphenol-A Treatment During Pregnancy in Mice: A New Window of Susceptibility for the Development of Diabetes in Mothers Later in Life. *Endocrinology* **156**, 1659–1670 (2015).
172. Cantonwine, D. E. *et al.* Urinary Concentrations of Bisphenol A and Phthalate Metabolites Measured during Pregnancy and Risk of Preeclampsia. *Environ. Health Perspect.* (2016). doi:10.1289/EHP188
173. Fenichel, P. *et al.* Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum. Reprod.* **27**, 983–990 (2012).
174. Yang, Y. J. *et al.* Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environ. Res.* **109**, 797–801 (2009).
175. EFSA. *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in food stuffs : Part I - Exposure assessment.* (2015).
176. EFSA. *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in food stuffs: Executive summary.* (2015).

-
177. Dekant, W. & Völkel, W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **228**, 114–134 (2008).
178. Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A. & Needham, L. L. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* **116**, 39–44 (2008).
179. Carwile, J. L. *et al.* Polycarbonate Bottle Use and Urinary Bisphenol A Concentrations. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1368–1372 (2009).
180. Mao, L., Sun, C., Zhang, H., Li, Y. & Wu, D. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. *Anal. Chim. Acta* **522**, 241–246 (2004).
181. García-Prieto, A., Lunar, M. L., Rubio, S. & Pérez-Bendito, D. Determination of urinary bisphenol A by coacervative microextraction and liquid chromatography-fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **630**, 19–27 (2008).
182. Teeguarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I. & Doerge, D. R. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food Chem. Toxicol.* **92**, 129–142 (2016).
183. Veiga-Lopez, A. *et al.* Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E1394–E1403 (2015).
184. Huygh, J. *et al.* Considerable exposure to the endocrine disrupting chemicals phthalates and bisphenol-A in intensive care unit (ICU) patients. *Environ. Int.* **81**, 64–72 (2015).
185. Guida, M. *et al.* Bisphenol A and congenital developmental defects in humans. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **774**, 33–39 (2015).
186. Aris, A. Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reprod. Toxicol.* **45**, 8–13 (2014).

187. Shekhar, S. *et al.* Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *Gen. Comp. Endocrinol.* (2016). doi:10.1016/j.ygcen.2016.05.025
188. Mørck, T. J. *et al.* Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* **30**, 131–137 (2010).
189. Corbel, T. *et al.* Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reprod. Toxicol.* **47**, 51–58 (2014).
190. Edlow, A. G., Chen, M., Smith, N. A., Lu, C. & McElrath, T. F. Fetal bisphenol A exposure: Concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod. Toxicol.* **34**, 1–7 (2012).
191. Lee, Y. J. *et al.* Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod. Toxicol.* **25**, 413–419 (2008).
192. Schönfelder, G. *et al.* Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* **110**, A703–A707 (2002).
193. Kuroda, N. *et al.* Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, 1743–1749 (2003).
194. Chou, W.-C. *et al.* Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* **10**, 94 (2011).
195. Kosarac, I., Kubwabo, C., Lalonde, K. & Foster, W. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **898**, 90–94 (2012).
196. Gerona, R. R. *et al.* Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 12477–12485 (2013).

-
197. Xu, X. *et al.* Associations of cadmium, bisphenol A and polychlorinated biphenyl co-exposure in utero with placental gene expression and neonatal outcomes. *Reprod. Toxicol.* **52**, 62–70 (2015).
198. Chevalier, N. *et al.* A negative correlation between insulin-like peptide 3 and bisphenol A in human cord blood suggests an effect of endocrine disruptors on testicular descent during fetal development. *Hum. Reprod.* **30**, 447–453 (2015).
199. Collet, S. H. *et al.* Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2015). doi:10.1016/j.taap.2015.02.024
200. Tang, H. A NOVEL MODEL FOR PREDICTION OF HUMAN DRUG CLEARANCE BY ALLOMETRIC SCALING. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1297–1303 (2005).
201. van de Waterbeemd, H. & Gifford, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 192–204 (2003).
202. Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G. & Dekant, W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1281–1287 (2002).
203. Völkel, W., Bittner, N. & Dekant, W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **33**, 1748–1757 (2005).
204. Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Vanlandingham, M. & Fisher, J. W. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **247**, 158–165 (2010).
205. Pottenger, L. H. *et al.* The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **54**, 3–18 (2000).
206. Collet, S. Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A. (2012).
207. Gayrard, V. *et al.* High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ. Health Perspect.* **121**, 951–956 (2013).

-
208. Kuester, R. K. & Sipes, I. G. Prediction of Metabolic Clearance of Bisphenol A (4,4'-Dihydroxy-2,2-diphenylpropane) using Cryopreserved Human Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1910–1915 (2007).
209. Farbos, M. Toxicocinétique comparée du bisphénol A chez cinq espèces et extrapolation de l'animal à l'homme. (2012).
210. Ye, X., Zhou, X., Hennings, R., Kramer, J. & Calafat, A. M. Potential external contamination with bisphenol A and other ubiquitous organic environmental chemicals during biomonitoring analysis: an elusive laboratory challenge. *Environ. Health Perspect.* **121**, 283–286 (2013).
211. Teeguarden, J., Hanson-Drury, S., Fisher, J. W. & Doerge, D. R. Are typical human serum BPA concentrations measurable and sufficient to be estrogenic in the general population? *Food Chem. Toxicol.* **62**, 949–963 (2013).
212. vom Saal, F. S. & Welshons, W. V. Evidence that bisphenol A (BPA) can be accurately measured without contamination in human serum and urine, and that BPA causes numerous hazards from multiple routes of exposure. *Mol. Cell. Endocrinol.* **398**, 101–113 (2014).
213. Rubin, B. S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**, 27–34 (2011).
214. Stahlhut, R. W., Welshons, W. V. & Swan, S. H. Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both. *Environ. Health Perspect.* **117**, 784–789 (2009).
215. Liao, C. & Kannan, K. High levels of bisphenol A in paper currencies from several countries, and implications for dermal exposure. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 6761–6768 (2011).
216. Biedermann, S., Tschudin, P. & Grob, K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 571–576 (2010).
217. Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S. & Perdu, E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* **82**, 424–430 (2011).

-
218. Demierre, A.-L., Peter, R., Oberli, A. & Bourqui-Pittet, M. Dermal penetration of bisphenol A in human skin contributes marginally to total exposure. *Toxicol. Lett.* **213**, 305–308 (2012).
219. Tominaga, T. *et al.* Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC–MS/MS method. *Toxicology* **226**, 208–217 (2006).
220. Teeguarden, J. G. *et al.* 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **288**, 131–142 (2015).
221. Elsworth, J. D. *et al.* Prenatal exposure to bisphenol A impacts midbrain dopamine neurons and hippocampal spine synapses in non-human primates. *NeuroToxicology* **35**, 113–120 (2013).
222. Elsworth, J. D. *et al.* Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys. *J. Comp. Neurol.* **523**, 1248–1257 (2015).
223. Kimura, E. *et al.* Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and aged mice. *Arch. Toxicol.* (2015). doi:10.1007/s00204-015-1485-x
224. Xu, X. *et al.* Perinatal exposure to bisphenol-A inhibits synaptogenesis and affects the synaptic morphological development in offspring male mice. *Chemosphere* **91**, 1073–1081 (2013).
225. Wang, C. *et al.* Changes in memory and synaptic plasticity induced in male rats after maternal exposure to bisphenol A. *Toxicology* **322**, 51–60 (2014).
226. Tiwari, S. K. *et al.* Inhibitory Effects of Bisphenol-A on Neural Stem Cells Proliferation and Differentiation in the Rat Brain Are Dependent on Wnt/ β -Catenin Pathway. *Mol. Neurobiol.* **52**, 1735–1757 (2015).
227. Matsuda, S. *et al.* Perinatal exposure to bisphenol A enhances contextual fear memory and affects the serotonergic system in juvenile female mice. *Horm. Behav.* **63**, 709–716 (2013).
228. Matsuda, S. *et al.* Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **39**, 273–279 (2012).

-
229. Miyagawa, K., Narita, M., Narita, M., Akama, H. & Suzuki, T. Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol-A. *Neurosci. Lett.* **418**, 236–241 (2007).
230. Xu, X., Zhang, J., Wang, Y., Ye, Y. & Luo, Q. Perinatal exposure to bisphenol-A impairs learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Horm. Behav.* **58**, 326–333 (2010).
231. Leranath, C., Hajszan, T., Szigeti-Buck, K., Bober, J. & MacLusky, N. J. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14187–14191 (2008).
232. Komada, M. *et al.* Newborn mice exposed prenatally to bisphenol A show hyperactivity and defective neocortical development. *Toxicology* **323**, 51–60 (2014).
233. Nakamura, K. *et al.* Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of bisphenol A. *J. Neurosci. Res.* **84**, 1197–1205 (2006).
234. Cao, J. *et al.* Prenatal Bisphenol A Exposure Alters Sex-Specific Estrogen Receptor Expression in the Neonatal Rat Hypothalamus and Amygdala. *Toxicol. Sci.* **133**, 157–173 (2013).
235. Inagaki, T., Smith, N., Lee, E. K. & Ramakrishnan, S. Low dose exposure to Bisphenol A alters development of gonadotropin-releasing hormone 3 neurons and larval locomotor behavior in Japanese Medaka. *NeuroToxicology* **52**, 188–197 (2016).
236. Kinch, C. D., Ibhazehiebo, K., Jeong, J.-H., Habibi, H. R. & Kurrasch, D. M. Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201417731 (2015). doi:10.1073/pnas.1417731112
237. Qiu, W. *et al.* Actions of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine System During Early Development in Zebrafish. *Endocrinology* **157**, 636–647 (2016).
238. Yokosuka, M. *et al.* Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **22**, 1–9 (2008).

239. Iwakura, T. *et al.* In vitro effects of bisphenol A on developing hypothalamic neurons. *Toxicology* **272**, 52–58 (2010).
240. Ogi, H., Itoh, K., Ikegaya, H. & Fushiki, S. Alterations of neurotransmitter norepinephrine and gamma-aminobutyric acid correlate with murine behavioral perturbations related to bisphenol A exposure. *Brain Dev.* **37**, 739–746 (2015).
241. Zhou, R. *et al.* Abnormal synaptic plasticity in basolateral amygdala may account for hyperactivity and attention-deficit in male rat exposed perinatally to low-dose bisphenol-A. *Neuropharmacology* **60**, 789–798 (2011).
242. Nakamura, K., Itoh, K., Yoshimoto, K., Sugimoto, T. & Fushiki, S. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters brain monoamine concentration in adult mice. *Neurosci. Lett.* **484**, 66–70 (2010).
243. Mathisen, G. H. *et al.* Prenatal exposure to bisphenol A interferes with the development of cerebellar granule neurons in mice and chicken. *Int. J. Dev. Neurosci.* **31**, 762–769 (2013).
244. Shikimi, H., Sakamoto, H., Mezaki, Y., Ukena, K. & Tsutsui, K. Dendritic growth in response to environmental estrogens in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci. Lett.* **364**, 114–118 (2004).
245. Zsarnovszky, A., Le, H. H., Wang, H.-S. & Belcher, S. M. Ontogeny of Rapid Estrogen-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in the Rat Cerebellar Cortex: Potent Nongenomic Agonist and Endocrine Disrupting Activity of the Xenoestrogen Bisphenol A. *Endocrinology* **146**, 5388–5396 (2005).
246. Meeker, J. D., Calafat, A. M. & Hauser, R. Urinary Bisphenol A Concentrations in Relation to Serum Thyroid and Reproductive Hormone Levels in Men from an Infertility Clinic. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 1458–1463 (2010).
247. Meeker, J. D. & Ferguson, K. K. Relationship between Urinary Phthalate and Bisphenol A Concentrations and Serum Thyroid Measures in U.S. Adults and Adolescents from the National

- Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007–2008. *Environ. Health Perspect.* **119**, 1396–1402 (2011).
248. Sriphrapadang, C., Chailurkit, L., Aekplakorn, W. & Ongphiphadhanakul, B. Association between bisphenol A and abnormal free thyroxine level in men. *Endocrine* **44**, 441–447 (2013).
249. Chevrier, J. *et al.* Maternal urinary bisphenol a during pregnancy and maternal and neonatal thyroid function in the CHAMACOS study. *Environ. Health Perspect.* **121**, 138–144 (2013).
250. Romano, M. E. *et al.* Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: The HOME Study. *Environ. Res.* **138**, 453–460 (2015).
251. Zoeller, R. T., Bansal, R. & Parris, C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* **146**, 607–612 (2005).
252. Xu, X. *et al.* Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neurosci. Res.* **58**, 149–155 (2007).
253. Iwamuro, S. *et al.* Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **133**, 189–198 (2003).
254. Iwamuro, S., Yamada, M., Kato, M. & Kikuyama, S. Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor α and β and down-regulation of retinoid X receptor γ in *Xenopus* tail culture. *Life Sci.* **79**, 2165–2171 (2006).
255. Pelayo, S. *et al.* Triiodothyronine-induced changes in the zebrafish transcriptome during the eleutheroembryonic stage: Implications for bisphenol A developmental toxicity. *Aquat. Toxicol.* **110-111**, 114–122 (2012).
256. Gentilcore, D. *et al.* Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology* **304**, 21–31 (2013).

-
257. Wu, Y., Beland, F. A. & Fang, J.-L. Effect of triclosan, triclocarban, 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, and bisphenol A on the iodide uptake, thyroid peroxidase activity, and expression of genes involved in thyroid hormone synthesis. *Toxicol. In Vitro* (2016). doi:10.1016/j.tiv.2016.01.014
258. Moriyama, K. *et al.* Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5185–5190 (2002).
259. Sun, H. *et al.* Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay. *Toxicol. In Vitro* **23**, 950–954 (2009).
260. Yang, J. & Chan, K. M. Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol A (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquat. Toxicol.* **159**, 138–147 (2015).
261. Sheng, Z.-G. *et al.* Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **259**, 133–142 (2012).
262. Nicholson, J. K. & Lindon, J. C. Systems biology: Metabonomics. *Nature* **455**, 1054–1056 (2008).
263. Bingol, K. *et al.* Metabolomics Beyond Spectroscopic Databases: A Combined MS/NMR Strategy for the Rapid Identification of New Metabolites in Complex Mixtures. *Anal. Chem.* **87**, 3864–3870 (2015).
264. Martin, J.-C. *et al.* Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study. *Metabolomics* **11**, 807–821 (2015).
265. Keun, H. C. Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacol. Ther.* **109**, 92–106 (2006).
266. Clarke, C. J. & Haselden, J. N. Metabolic Profiling as a Tool for Understanding Mechanisms of Toxicity. *Toxicol. Pathol.* **36**, 140–147 (2008).
267. Shen, X.-L. *et al.* Combining biochemical with (1)H NMR-based metabolomics approach unravels the antidiabetic activity of genipin and its possible mechanism. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **129**, 80–89 (2016).
268. Alonso, A., Marsal, S. & Julià, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 23 (2015).

-
269. Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J. & Kaliszan, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113**, 108–120 (2015).
270. Lindon, J. C., Holmes, E. & Nicholson, J. K. Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development. *Pharm. Res.* **23**, 1075–1088 (2006).
271. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E. ‘Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **29**, 1181–1189 (1999).
272. Worley, B. & Powers, R. Multivariate analysis in metabolomics. *Curr. Metabolomics* **1**, 92–107 (2013).
273. Cuperlovic-Culf, M. & Culf, A. S. Applied metabolomics in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **11**, 759–770 (2016).
274. Kroeger, M. How omics technologies can contribute to the ‘3R’ principles by introducing new strategies in animal testing. *Trends Biotechnol.* **24**, 343–346 (2006).
275. Guo, A. C. *et al.* ECMDDB: The E. coli Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* **41**, D625–D630 (2013).
276. Cottret, L. *et al.* MetExplore: a web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* **38**, W132–137 (2010).
277. Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B. & Wishart, D. S. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* **43**, W251–W257 (2015).
278. Skoog, Holler & Nieman. in *Principes d’analyse instrumentale* 445–497 (de boeck, 2003).
279. Bothwell, J. H. F. & Griffin, J. L. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **86**, 493–510 (2011).
280. Dona, A. C. *et al.* A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **14**, 135–153 (2016).

-
281. Mun, J.-H. *et al.* Discrimination of Basal Cell Carcinoma from Normal Skin Tissue Using High-Resolution Magic Angle Spinning ^1H NMR Spectroscopy. *PLoS One* **11**, e0150328 (2016).
282. Rezaei-Tavirani, M. *et al.* Advantage of Applying OSC to (^1H) NMR-Based Metabonomic Data of Celiac Disease. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **10**, 548–552 (2012).
283. McCombie, G. *et al.* omega-3 oil intake during weight loss in obese women results in remodelling of plasma triglyceride and fatty acids. *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.* **5**, 363–374 (2009).
284. Jung, Y.-S., Lee, J., Seo, J. & Hwang, G.-S. Metabolite profiling study on the toxicological effects of polybrominated diphenyl ether in a rat model. *Environ. Toxicol.* (2016). doi:10.1002/tox.22322
285. Lu, C. *et al.* NMR-based metabonomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **248**, 178–184 (2010).
286. Salihovic, S. *et al.* The metabolic fingerprint of p,p'-DDE and HCB exposure in humans. *Environ. Int.* **88**, 60–66 (2016).
287. Wu, S. *et al.* Metabolic Profiling Provides a System Understanding of Hypothyroidism in Rats and Its Application. *PLoS ONE* **8**, e55599 (2013).
288. Montoya, G. A. *et al.* Mechanistic analysis of metabolomics patterns in rat plasma during administration of direct thyroid hormone synthesis inhibitors or compounds increasing thyroid hormone clearance. *Toxicol. Lett.* **225**, 240–251 (2014).
289. Cabaton, N. J. *et al.* Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* **121**, 586–593 (2013).
290. Zalko, D. *et al.* Bisphenol A Exposure Disrupts Neurotransmitters Through Modulation of Transaminase Activity in the Brain of Rodents. *Endocrinology* **157**, 1736–1739 (2016).
291. Tremblay-Franco, M. *et al.* Dynamic Metabolic Disruption in Rats Perinatally Exposed to Low Doses of Bisphenol-A. *PLOS ONE* **10**, e0141698 (2015).
292. Zeng, J. *et al.* Effect of Bisphenol A on Rat Metabolic Profiling Studied by Using Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 130620151839006 (2013). doi:10.1021/es400490f

-
293. Chen, M. *et al.* Metabolomic Analysis Reveals Metabolic Changes Caused by Bisphenol A in Rats. *Toxicol. Sci.* **138**, 256–267 (2014).
294. Chapin, R. E. *et al.* NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* **83**, 157–395 (2008).
295. Tewar, S. *et al.* Association of Bisphenol A exposure and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in a national sample of U.S. children. *Environ. Res.* **150**, 112–118 (2016).
296. de Cock, M., De Boer, M. R., Lamoree, M., Legler, J. & Van De Bor, M. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals and birth weight-A prospective cohort study. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 1–8 (2015). doi:10.1080/10934529.2015.1087753
297. Corbel, T. *et al.* Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure. *Biol. Reprod.* **89**, 11 (2013).
298. Gauderat, G. *et al.* Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environ. Int.* **86**, 52–59 (2016).
299. Quignodon, L., Vincent, S., Winter, H., Samarut, J. & Flamant, F. A Point Mutation in the Activation Function 2 Domain of Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$ Expressed after CRE-Mediated Recombination Partially Recapitulates Hypothyroidism. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2350–2360 (2007).
300. Vanderpump, M. P. J. *et al.* Iodine status of UK schoolgirls: a cross-sectional survey. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 2007–2012 (2011).
301. Lazarus, J. H. Iodine Status in Europe in 2014. *Eur. Thyroid J.* **3**, 3–6 (2014).
302. Granfors, M. *et al.* Iodine deficiency in a study population of pregnant women in Sweden. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **94**, 1168–1174 (2015).
303. Bath, S. C., Furnidge-Owen, V. L., Redman, C. W. & Rayman, M. P. Gestational changes in iodine status in a cohort study of pregnant women from the United Kingdom: season as an effect modifier. *Am. J. Clin. Nutr.* **101**, 1180–1187 (2015).
304. Cremer, H. *et al.* PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* **18**, 213–220 (2000).

-
305. Gascon, E., Vutskits, L. & Kiss, J. Z. Polysialic acid–neural cell adhesion molecule in brain plasticity: From synapses to integration of new neurons. *Brain Res. Rev.* **56**, 101–118 (2007).
306. Vigié, C. *et al.* Potential for Polysialylated Form of Neural Cell Adhesion Molecule-Mediated Neuroplasticity within the Gonadotropin-Releasing Hormone Neurosecretory System of the Ewe 1. *Endocrinology* **142**, 1317–1324 (2001).
307. Lehman, M. N. *et al.* Seasonal plasticity in the brain: the use of large animal models for neuroanatomical research. *Reprod. Camb. Engl. Suppl.* **59**, 149–165 (2002).
308. Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39 (1993).
309. Takeda, A., Itagaki, K., Ando, M. & Oku, N. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in zinc-mediated modification of CA1 long-term potentiation in the developing hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **90**, 551–558 (2012).
310. Lee, P. R., Brady, D. & Koenig, J. I. Thyroid Hormone Regulation of N-Methyl-d-Aspartic Acid Receptor Subunit mRNA Expression in Adult Brain. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 87–92 (2003).
311. Wang, C. *et al.* Impairment of object recognition memory by maternal bisphenol A exposure is associated with inhibition of Akt and ERK/CREB/BDNF pathway in the male offspring hippocampus. *Toxicology* **341-343**, 56–64 (2016).
312. Shafiee, S. M., Vafaei, A. A. & Rashidy-Pour, A. Effects of maternal hypothyroidism during pregnancy on learning, memory and hippocampal BDNF in rat pups: Beneficial effects of exercise. *Neuroscience* **329**, 151–161 (2016).
313. Lacroix, M. Optimisation d'une méthode de dosage de neurotransmetteurs par le couplage LC/Fluo/MS : études théoriques du marquage au NDA par spectrométrie de masse haute résolution, modélisation moléculaire et étude quantitative de relations structure-temps de rétention (3D-QSRR). (Toulouse 3, 2007).

314. Wu, S. *et al.* Lipidomic profiling reveals significant alterations in lipid biochemistry in hypothyroid rat cerebellum and the therapeutic effects of Sini decoction. *J. Ethnopharmacol.* **159**, 262–273 (2015).
315. Tang, T. *et al.* Thyroid Disruption in Zebrafish Larvae by Short-Term Exposure to Bisphenol AF. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **12**, 13069–13084 (2015).
316. Naderi, M., Wong, M. Y. L. & Gholami, F. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* **148**, 195–203 (2014).

TITLE: Impacts of a prenatal exposure to bisphenol A on the thyroid function and the metabolome of the fetal central nervous system

SUMMARY: Bisphenol A (BPA) is able to disturb the thyroid function. Given the key role of thyroid function in the development of the central nervous system (CNS), gestational exposure to BPA is a matter of particular concern. Our goal was to evaluate the consequences of a BPA gestational exposure on the developing CNS jointly to its effects on the thyroid function within a context of a well-documented internal exposure compared to BPA human exposure. BPA exposure of pregnant ewes disrupted the maternal thyroid homeostasis and modulated the metabolome of specific fetal brain regions. The different modulations we observed suggested that BPA might alter neurogenesis, neuronal plasticity, membrane structure and energy metabolism. Interestingly, the BPA dose inducing maternal thyroid disruption and fetal CNS modulations led to BPA serum concentrations similar to those described in human biomonitoring studies.

KEYWORDS: bisphenol A ; endocrine disruptor ; thyroid disruptor ; central nervous system ; prenatal exposure ; metabolomics ; pharmacokinetics ; ovine model

AUTEUR : Davy GUIGNARD

TITRE : Impacts d'une exposition prénatale au bisphénol A sur la fonction thyroïdienne et le métabolome du système nerveux central fœtal

DIRECTEURS DE THESE : Madame le Docteur Catherine VIGUIE
Monsieur le Docteur Nicolas CABATON

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : le 3 novembre 2016 à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

RESUME : Le bisphénol A (BPA) présente des propriétés perturbatrices thyroïdiennes. Compte-tenu du rôle essentiel du système thyroïdien sur le développement du système nerveux central, l'exposition de la femme enceinte au bisphénol A est très préoccupante. Ainsi, cette thèse visait à déterminer les conséquences d'une exposition gestationnelle au BPA sur le développement du SNC conjointement aux effets sur la fonction thyroïdienne dans un contexte d'exposition interne parfaitement documenté et évalué par rapport aux expositions décrites chez l'être humain. L'exposition de brebis gestantes au BPA perturbait l'homéostasie thyroïdienne maternelle et modulait chez le fœtus, le métabolome de différentes structures cérébrales. Les modulations observées suggéraient que le BPA pouvait altérer la neurogenèse, la plasticité neuronale, la structure membranaire et le métabolisme énergétique au niveau central. La dose induisant les perturbations de la fonction thyroïdienne maternelle et du système nerveux central fœtal conduisait à des concentrations sériques en BPA similaires à celles décrites chez l'homme.

MOTS-CLES : bisphénol A ; perturbateur endocrinien ; perturbateur thyroïdien ; système nerveux central ; exposition prénatale ; métabolomique ; pharmacocinétique ; modèle ovin

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, INRA-ENVT
180 chemin de Tournefeuille
31300 TOULOUSE