



HAL
open science

Evaluation des paramètres toxicocinétiques des analogues de bisphénols : développement d'approches de type Relation Quantitative Structure-Activité (QSAR)

Clemence Gely

► To cite this version:

Clemence Gely. Evaluation des paramètres toxicocinétiques des analogues de bisphénols : développement d'approches de type Relation Quantitative Structure-Activité (QSAR). Toxicologie et chaîne alimentaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30176 . tel-04416388

HAL Id: tel-04416388

<https://theses.hal.science/tel-04416388v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Clémence GELY

Le 24 novembre 2021

Evaluation des paramètres toxicocinétiques des analogues de bisphénols : développement d'approches de type Relation Quantitative Structure-Activité (QSAR)

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition**

Unité de recherche :
TOXALIM - Laboratoire de Toxicologie Alimentaire

Thèse dirigée par
Nicole HAGEN-PICARD et Marlène LACROIX

Jury

M. Nicolas VENISSE, Rapporteur
M. Davy GUILLARME, Rapporteur
Mme Caroline WEST, Examinatrice
M. Cyril FEIDT, Examineur
Mme Véronique GAYRARD, Examinatrice
Mme Nicole HAGEN-PICARD, Directrice de thèse
Mme Marlène LACROIX, Co-directrice de thèse

Remerciements

A Mr. Nicolas Venisse et Mr. Davy Guillaume qui ont accepté de consacrer leur temps à la lecture et l'appréciation de ce manuscrit. A Mme. Véronique Gayrard, Mme. Caroline West et Mr. Cyril Feidt qui ont accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur. Je remercie l'ensemble des membres du jury pour la discussion qui a suivi la présentation de mes travaux de thèse, elle a été très enrichissante.

A Nicole Hagen-Picard et Marlène Lacroix pour votre encadrement et votre accompagnement lors de ces trois ans de thèse. Vous m'avez appris beaucoup, Nicole en toxicocinétique (je n'arrive toujours pas à dire syncytiotrophoblaste) et Marlène en chimie analytique (à manier le Xevo avec brio) et sur les modèles QSAR. Merci à toutes les deux d'avoir permis et encouragé ma participation à plusieurs congrès et pour votre aide lors de la rédaction du manuscrit et des publications (on ne compte plus le nombre de versions) ainsi que la préparation de la soutenance.

Marlène merci pour avoir répondu à mes nombreuses « petites questions » et pour avoir accueilli « mon » chien.

Nicole merci pour votre disponibilité et votre réactivité, nos coups de téléphone du week-end me manqueront. On se croiera sûrement autour d'une sortie de plongée.

A Alain Bousquet-Mélou, pour m'avoir accueilli dans l'unité InTheRes même si je suis à moitié Toxalim, à moitié InTheRes et pour m'avoir formé en pharmacocinétique lors du DU.

A Mr. Toutain, pour avoir partagé vos connaissances en toxicocinétique et tous vos conseils qui m'ont été d'une grande utilité.

A Karen Gaudin et Jean-Christophe Garrigues pour avoir accepté de participer à mes comités de thèse au cours desquels vous m'avez donné des conseils avisés. Jean-Christophe, je vous remercie pour m'avoir initié aux modèles QSAR et avoir participé à mes répétitions de soutenance, à bientôt à l'Afsep peut-être !

A Véronique Gayrard pour votre disponibilité pour répondre à mes questions sur les bisphénols mais aussi sur l'école doctorale. Je vous remercie également pour votre participation aux manip, les corrections d'articles, du manuscrit et votre implication dans mon projet de thèse, vous êtes un peu ma troisième encadrante. Notre Aveyron natale nous rassemblera très probablement.

Remerciements

Aux membres de l'équipe EXPER qui a évolué pendant ces trois années de thèse, anciens (Catherine) et nouveaux (Roger, Laila, Jessica, Yannick, Fabiana et Sara) pour vos questions toujours pertinentes et la participation aux répétitions et à ma soutenance. Un grand merci aux doctorants de l'équipe Fabiana, Sara et Yannick, pour nos repas ensemble (rare mais très sympa) ! Yannick et Sara, je vous souhaite tous mes vœux de réussite pour vos travaux de thèse.

Aux membres de l'unité InTheRes, pour leur accueil, leur sympathie et les discussions toujours animées à la cafet' (autour de bonnes viennoiseries) !

A la team Analytique d'InTheRes qui s'est agrandi au fil des années ! Merci à Alicia pour ton aide dans les manip non seulement en analytique mais aussi pour récupérer le pipi des cochons ;) et pour faire les petites croix, merci pour nos conversations du soir devant une fuite sur la chimie et bien d'autres choses ! Merci à Felipe pour avoir fait aussi pleins de petites croix et pour vos blagues que je ne comprenais pas toujours, merci à Jean-François pour votre intégration à l'équipe et pour votre super tasse qui me permet de me réchauffer en savourant un thé. Chloé, je te souhaite une bonne continuation !

A l'équipe de gestion, Valérie, Katia et Lis pour votre disponibilité pour les commandes et Katia pour l'organisation de ma soutenance.

Aux + ou – jeunes d'InTheRes (vous vous reconnaitrez) pour nos repas partagés à la cantine et l'échange de tous ces GIF qui m'ont bien fait rigoler.

A Ophélie et Elisa merci pour votre bonne humeur, pas toujours très discrète, qui ont fait de mes journées du pur bonheur. A Karine merci pour tous les bons moments passés (petite dédicace au Bazar quand même). A Malika pour ton aide précieuse sur les stats et nos discussions autour de nos racines communes !

A la team des « vers », notre cohabitation a été courte mais très agréable.

A mes collègues du bureau des « stagiaires », Aurore et Lilha merci pour votre sympathie, votre écoute et nos conversations plus ou moins sérieuses. Quentin, je te remercie pour ces quatre super années passées à tes côtés, ma thèse n'aurait pas eu la même saveur sans toi-même si certaines de tes blagues sont un peu pourries ! Nos manip cochons me manqueront !

A Béa pour ton aide pour les phases animales et m'avoir appris beaucoup de choses sur Phoenix. Grâce à toi, je sais prélever les cochons comme un chef, je te laisse les chevaux !

Remerciements

Aux zootechniciens, Noémie, Cédric et Matthieu pour votre aide indispensable durant les phases animales. Théo, je te remercie pour ta participation à mon projet de thèse, je te souhaite bon courage pour la fin de la rédaction de ta thèse vétérinaire.

A Flore pour m'avoir donné envie de faire une thèse, je ne le regrette pour rien au monde.

Aux représentants des doctorants à SEVAB, pour toutes les réunions bières puis visio que nous avons partagé.

A mes amis toulousain (Sofia, Marine, Marjo), aveyronnais et Antoine, pour m'avoir permis de m'évader lors des nombreuses soirées et après en votre compagnie !

A mes parents, mes sœurs (Camille et Albane) et ma grand-mère (Tatie Manée) pour avoir toujours été là pour moi et votre soutien dans tout ce que j'entreprends !

Valorisations scientifiques

➤ Publications

Gély, C.A., Huesca, A., Picard-Hagen, N., Toutain, P.L., Berrebi, A., Gauderat, G., Gayrard, V., Lacroix, M.Z., 2021. **A new LC/MS method for specific determination of human systemic exposure to bisphenol A, F and S through their metabolites: Application to cord blood samples.** Environ. Int. 151, 106429. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106429>

Gély, C.A., Lacroix, M.Z., Morin, M., Vayssière, C., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., 2021. **Comparison of the materno-fetal transfer of fifteen structurally related bisphenol analogues using an ex vivo human placental perfusion model.** Chemosphere 276, 130213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130213>

Gayrard, V., Lacroix, M.Z., **Gély, C.A.**, Grandin, F.C., Léandri, R., Bouchard, M., Roques, B., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2020. **Toxicokinetics of bisphenol S in rats for predicting human bisphenol S clearance from allometric scaling.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 386, 114845. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114845>

Khmiri, I., Côté, J., Mantha, M., Khemiri, R., Lacroix, M., **Gély, C.A.**, Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., Gayrard, V., Bouchard, M., 2020. **Toxicokinetics of bisphenol-S and its glucuronide in plasma and urine following oral and dermal exposure in volunteers for the interpretation of biomonitoring data.** Environ. Int. 138, 105644. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105644>

Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Grandin, F.C., Collet, S.H., Mila, H., Viguié, C., **Gély, C.A.**, Rabozzi, B., Bouchard, M., Léandri, R., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. **Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs.** Environ. Health Perspect. 127, 077005. <https://doi.org/10.1289/EHP4599>

Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Viguié, C., Mila, H., de Place, A., Vayssière, C., Morin, M., Corbett, J., Gayrard, C., **Gély, C.A.**, Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. **Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure? Placental transfer across the perfused human placenta.** Chemosphere 221, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.065>

➤ Communications orales :

• Présentations orales :

Gély, Clémence, Jean Christophe Garrigues, Nicole Picard-Hagen, Véronique Gayrard, et Marlène Lacroix. 2019. « **The use of bisphenols chromatographic retentions to describe their biological activities** ». Présenté à ITP2019, Toulouse, France, Du 02 au 04 septembre 2019.

Gély, Clémence, Alicia Huesca, Felipe Ramon-Portugal, Véronique Gayrard, Jean Christophe Garrigues, et Marlène Lacroix. 2021. « **Prédiction du transfert materno-fetal**

de bisphénols par un modèle QSAR à l'aide de descripteurs moléculaires et chromatographiques ». Présenté à SEP2021, Paris, France, 5 au 7 octobre 2021.

Gély, Clémence, Marlène Lacroix, Mathieu Morin, Christophe Vayssière, Véronique Gayrard, et Nicole Picard-Hagen. 2020. « **Evaluation du transfert materno-fetal de bisphénols avec un modèle ex vivo de perfusion de placenta humain** ». Présenté au Colloque de l'ARET, en ligne le 21 octobre 2020.

Gély, Clémence, Nicole Picard-Hagen, Laurent Debrauwer, Roger Leandri, Véronique Gayrard, et Marlène Lacroix. 2019a. « **Evaluation de l'exposition humaine aux bisphénols par une méthode LC/MS/MS originale optimisée avec les plans d'expérience** ». Présenté à SEP2019, Paris, France, du 26 mars au 28 mars 2019.

- **Communications affichées / Flash communications :**

Gély, Clémence, Nicole Picard-Hagen, Laurent Debrauwer, Roger Leandri, Véronique Gayrard, et Marlène Lacroix. 2019b. « **Développement d'une méthode LC/MS/MS optimisée avec les plans d'expérience pour évaluer l'exposition humaine aux bisphénols A, F et S.** » Présenté à ReproScience, Toulouse, France, 24 au 26 avril 2019.

Gély, Clémence, Nicole Picard-Hagen, Véronique Gayrard, Marlène Lacroix, et Michèle Bouchard. 2019. « **Validation d'une méthode de dosage simultané du Bisphénol S et de son métabolite conjugué le bisphénol glucuronide par le profil d'exactitude** ». Présenté à SEP2019, Paris, France, du 26 mars au 28 mars 2019.

Abréviations

3-3 BPA : 4,4'-isopropylidenedi-0-cresol

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination

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

AUC : Area Under the Curve (Aire sous la courbe)

BP4-4 : Dihydroxybiphenyl

BPA : Bisphénol A

BPAF : Bisphénol AF

BPAG : Bisphénol A Glucuronide

BPAP : Bisphénol AP

BPAS : Bisphénol A sulfate

BPB : Bisphénol B

BPBP : Bisphénol BP

BPC : Bis(4-hydroxyphenyl)-2,2-dichloroethylene

BPE : Bisphénol E

BPF : Bisphénol F

BPFL : Bisphénol FL

BPM : Bisphénol M

BPS : Bisphénol S

BPs : Bisphénols

BPSG : Bisphénol S Glucuronide

BPSS : Bisphénol S Sulfate

BPZ : Bisphénol Z

Cl : Clairance

CLP : classification, étiquetage et emballage

Cmax : Concentration maximale

DHDPE : 4,4'-oxydiphenol

DJA : Dose Journalière Admissible

DJT : Dose Journalière Tolérée

ECHA : European Chemicals Agency

EDI : Estimate daily intake, dose journalière estimée

EFSA : European Food Safety Agency

EMA : European Medicines Agency

F : biodisponibilité absolue

FDA : Food and Drug Administration

GST : Glutathions S transférase

IV : Intraveineuse

LMS : Limite de Migration Spécifique

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

MOPAC : Molecular Orbital PACkage

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

NOAEL : Non Observed Adverse Effect Level

OECD : Organisation for Economic Cooperation and Development

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P-gp : P-glycoprotéine

QSAR : Quantitative Structure-Activity relationship

QSPR : Quantitative Structure-Property relationship

QSRR : Quantitative Structure-Retention relationship

REACH : Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of CHemicals substances

RMSE : Root-mean-square-error

T_{1/2} : Temps de demi-vie

TK : Toxicocinétique

t_{max} : Temps d'occurrence des concentrations maximales

UGT : UDP-Glucuronosyltransférase

UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography

V_d : volume de distribution

VO : Voie Orale

Listes des figures

Figure 1 : Structure chimiques des bisphénols, comprenant deux noyaux phénols reliés par un groupement alkyl.	25
Figure 2 : Représentation schématique de l'exposition externe, de l'exposition interne en bisphénol total et en bisphénol non conjugué.	28
Figure 3 Estimation de la dose journalière moyenne en $\mu\text{g}/\text{jour}$ de BPA ou de ses analogues à laquelle l'Homme est exposé, à partir des concentrations urinaires. Le nombre indiqué sur chaque histogramme correspond au nombre d'échantillons urinaires (d'après [25]).	33
Figure 4 : Représentation schématique du devenir des bisphénols dans l'organisme et de la relation entre l'exposition externe et les concentrations plasmatiques en bisphénols non-conjugués (actifs) et en métabolites conjugués (non-actifs).	41
Figure 5 : Représentation schématique du décours temporel des concentrations plasmatiques après une administration par voie intraveineuse (en rouge) et après une administration par voie orale (en bleu) et l'aire sous la courbe (AUC) représenté en bleu.	42
Figure 6 : Représentation schématique des voies de métabolisation des bisphénols.	44
Figure 7 : Représentation schématique du devenir du BPA et du BPS après une administration par voie orale. Créé avec BioRender.com	47
Figure 8 : Résumé des principaux résultats du devenir d'une dose de BPA/BPS administrée par gavage orogastrique à des porcelets [76].	48
Figure 9 : Echange transplacentaire du BPS, du BPA et de leur principal métabolite : le BPSG et le BPAG, ces résultats sont issus des études de Grandin et al. 2018 et Gauderat et al. 2017.	57
Figure 10 : Principe et étapes du développement d'un modèle QSAR.	60
Figure 11 : Nombre de publications par années mentionnant le mot clé « QSAR » entre 1970 et 2021 dans la base de données bibliographique « PubMed.gov » (National Library of Medicine, MD, USA).	61
Figure 12 : Représentation du BPA avec sa formule brute, sa formule topologique et sa représentation dans l'espace (Chem 3D Ultra software (V17.1, Perkin Elmer informatics)).	62
Figure 13 : Représentation du graphe $G=(V,E)$ de la molécule du BPA avec la numérotation des atomes.	63
Figure 14 : Surface de la molécule accessible par le solvant (ligne continue blanche), de la surface de van der Waals (sphères en pointillés, ligne bleue) et de la surface de Connolly (ligne rouge) pour le BPA [170].	66
Figure 15 : Représentation schématique de l'analyse discriminante linéaire (A), de l'analyse de cluster représentée sous forme d'un dendrogramme (B) et de l'arbre de classification (C) avec x et y des conditions.	74
Figure 16 : Représentation schématique des réseaux artificiels de neurones.	76
Figure 17 : Méthode de construction et de validation des QSAR.	77
Figure 18 : Comparaison pour les 12 BPs étudiés, des mécanismes TK déterminant l'exposition maternelle : biodisponibilité par voie orale, clairance plasmatique et volume de distribution, évalués sur un modèle porcin et du taux de transfert placentaire materno-foetal évalué sur un modèle de placenta humain perfusé. Ces données TK ont permis d'estimer la fraction de la dose externe maternelle qui entre dans le compartiment foetal, exprimée par rapport à celui du BPA.	172

Listes des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques (masse molaire, log P et pKa) des bisphénols étudiés dans cette étude. -----	26
Tableau 2 : Taux de détection des bisphénols dans les aliments issus du commerce et représentant la consommation courante (céréales, viandes, poissons, œufs, produits laitiers, végétaux, boissons, matières grasses, biscuits..) à partir de différentes études. -----	30
Tableau 3 : Fréquence de détection (frq) et concentration médiane (C) des bisphénols totaux dans les urines humaines exprimée en ng/mL.-----	37
Tableau 4 : Fréquence de détection et concentration médiane des bisphénols totaux dans le sang de cordon ombilical en ng/mL. -----	39
Tableau 5 : Synthèse des données toxicocinétiques récentes des bisphénols déterminées à partir d'études <i>in vivo</i> après des administrations par voie intraveineuse.-----	51
Tableau 6 : Synthèse des données toxicocinétiques récentes des bisphénols déterminées à partir d'études <i>in vivo</i> après des administrations par voie extravasculaire : orale et transcutanée.-----	53
Tableau 7 : Matrice adjacente de la molécule de BPA avec $[A]_{ij} = 1$ si (i, j) sont adjacents sinon $[A]_{ij} = 0$. -----	64
Tableau 8 : Matrice distance de la molécule de BPA avec dans chaque case la valeur d_{ij} le nombre de liaisons du chemin le plus court entre l'atome i et l'atome j. -----	64
Tableau 9 : Modèles permettant de prédire le potentiel perturbateur endocrinien des substances. -----	69
Tableau 10 : Propriétés ADME prédites par des modèles QSAR.-----	70
Tableau 11 : Paramètres de validation des modèles QSAR avec le formule de calcul et leur critère de validation. -----	78

Sommaire

Remerciements	2
Valorisations scientifiques	5
Abréviations.....	7
Listes des figures.....	9
Listes des tableaux.....	10
Sommaire	11
Résumé	13
Abstract	14
Introduction générale	15
Chapitre 1 : Etude bibliographique	22
Partie 1 : Les bisphénols analogues du BPA	22
1. Utilisation du Bisphénol A et polémique	22
2. Les substituts du bisphénol A.....	23
3. Propriétés physico-chimiques.....	24
Partie 2 : Exposition humaine aux bisphénols.....	28
1. Sources d'exposition aux bisphénols.....	29
1.1. Exposition alimentaire.....	29
1.2. Produits d'hygiène	30
1.3. Exposition par inhalation.....	31
1.4. Tickets de caisse	31
1.5. Conclusion.....	32
2. Etudes de biosurveillance.....	32
2.1. Données urinaires.....	32
2.2. Données plasmatiques	34
2.3. Exposition fœtale aux bisphénols	39
Partie 3 : Toxicocinétique des bisphénols	41
3. Métabolisme	43
4. Clairance et volume de distribution.....	45
5. Absorption et biodisponibilité par voie orale	47
6. Absorption et biodisponibilité par voie cutanée	49
7. Liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques.....	49
8. Temps de demi-vie.....	50
9. Mécanismes d'exposition fœtale	56
Partie 4 : Etudes quantitative des relations structure – activité (QSAR).....	60
1. Principe et historique	60
2. Descripteurs moléculaires	62
2.1. Descripteurs 1D	62
2.2. Descripteurs 2D	63
2.3. Descripteurs 3D	65
2.4. Descripteurs de chimie quantique.....	66
2.5. Descripteurs physico-chimiques	67
3. Données de sortie	67

3.1.	QSAR et perturbateurs endocriniens	68
3.2.	QSAR et ADME	69
3.3.	QSAR et chromatographie.....	70
4.	Construction du modèle QSAR.....	72
4.1.	Sélection des descripteurs.....	72
4.2.	Outils de modélisation	73
5.	Validation des modèles QSAR	76
5.1.	Validation interne	77
5.2.	Validation externe	79
	Objectifs et stratégie de la thèse	81
	Chapitre 2 : Etudes expérimentales.....	86
1.	Développement d'une méthode analytique pour les études de biosurveillance : le dosage de bisphénols glucuronides (BPAG, BPSG et BPFPG) à l'état de trace dans le sang de cordon ombilical	86
1.1.	Contexte et objectifs	86
1.2.	Article 1.....	88
1.3.	Conclusion.....	97
2.	Etude du transfert placentaire de 14 bisphénols analogues du BPA sur un modèle de placenta humain perfusé.....	99
2.1.	Contexte et objectifs	99
2.2.	Article 2.....	101
2.3.	Conclusion.....	111
3.	Etude de la disposition de douze bisphénols suite à leur ingestion sur un modèle porcin.....	113
3.1.	Contexte et objectifs	113
3.2.	Article 3.....	114
3.3.	Conclusion.....	138
4.	Développement d'un outil prédictif du passage placentaire des bisphénols avec une étude de type relation-structure-activité	140
4.1.	Contexte et objectifs	140
4.2.	Article 4.....	141
4.3.	Conclusion.....	166
	Discussion générale & perspectives.....	167
	Références	176
	Annexes.....	194
1.	Données complémentaires : Développement d'une méthode analytique pour les études de biosurveillance : le dosage de bisphénols glucuronides (BPAG, BPSG et BPFPG) à l'état de trace dans le sang de cordon ombilical (Annexe 1).....	194
2.	Etude du transfert placentaire de 14 bisphénols analogues du BPA sur un modèle de placenta humain perfusé (Annexe 2).....	199
3.	Etude de la disposition de douze bisphénols suite à leur ingestion sur un modèle porcin (Annexe 3) ...	201
4.	Développement d'un outil prédictif du passage placentaire des bisphénols avec une étude de type relation-structure-activité (Annexe 4).....	215

Résumé

Suite aux restrictions de l'utilisation du Bisphénol A (BPA), les industriels l'ont progressivement remplacé par des molécules de structure analogue. Or, ces substituts ne sont pas encore réglementés et des études toxicologiques indiquent que le potentiel perturbateur endocrinien de la plupart de ces bisphénols (BPs) émergents est comparable à celui du BPA. Ainsi, pour éviter une substitution regrettable du BPA, il est nécessaire d'évaluer le potentiel d'exposition à ces substances, afin de contribuer à l'évaluation du risque lié à l'exposition humaine à ces bisphénols émergents.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était (1) d'évaluer l'exposition fœtale humaine au BPA, au BPS et au BPF, (2) de déterminer le devenir de 12 à 15 analogues structuraux de BPs dans l'organisme en évaluant leurs mécanismes toxicocinétiques (TK) déterminant l'exposition interne maternelle et l'exposition fœtale, et (3) de développer des méthodes QSAR capables de prédire le transfert materno-fœtal de ces bisphénols. Ces études ont nécessité divers développements analytiques adaptés pour atteindre ces objectifs.

Dans un premier temps, une méthode de dosage des métabolites glucuronide du BPA, BPS et BPF à l'état de traces avec une limite de quantification de 0,05 ng/mL, a été développée et a permis de quantifier ces métabolites dans le sang de cordon ombilical, démontrant ainsi leur capacité à franchir la barrière placentaire. Cela nous a conduit, dans un second temps, à évaluer les mécanismes de transfert placentaire materno-fœtal de quinze BPs sur un modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé. Deux groupes de BPs ont ainsi été identifiés : 7 BPs dont le passage placentaire met en jeu un mécanisme de diffusion passive et 8 BPs dont le mécanisme de transfert par diffusion passive est très limité et qui pourrait impliquer des transporteurs d'efflux.

Le fœtus est exposé aux bisphénols via sa mère. Or, une étude précédente réalisée au laboratoire sur un modèle porcin, pertinent vis-à-vis de l'Homme pour sa fonction digestive, a montré que l'exposition interne au BPS actif est 250 fois supérieure à celle du BPA, pour une exposition par voie orale similaire. Cette différence a mis en évidence la nécessité de caractériser les paramètres TK déterminant l'exposition interne maternelle à ces analogues du BPA. L'étude toxicocinétique, réalisée sur un modèle porcin, a montré une forte variation de la biodisponibilité orale de 12 BPs, de 1 % pour le BPA à 60 % pour le BPS. Ces résultats TK apportent des informations essentielles pour éviter la substitution du BPA par des BPs hormonalement actifs, présentant un potentiel d'exposition élevé.

Ces différences toxicocinétiques entre des BPs de structure similaire, renforcent la nécessité de développer des modèles prédictifs des mécanismes d'exposition. Pour établir la preuve de concept selon laquelle les descripteurs chromatographiques autres que les paramètres de rétention pourraient contribuer finement à la caractérisation du comportement moléculaire dans la biophase, nous avons développé un modèle de type relation structure-activité (QSAR) pour prédire le transfert placentaire des BPs. L'élaboration d'une base de données chromatographiques des quinze BPs sur treize colonnes analytiques a ainsi permis de construire et de valider un modèle prédictif du transfert placentaire materno-fœtal des BPs.

L'ensemble de ces données TK et le développement de modèle prédictif de l'exposition humaine permettront d'éclairer les décisions des agences réglementaires pour éviter les substitutions regrettables.

Abstract

Due to restrictions on the use of BPA, manufacturers have progressively replaced it with structurally related molecules. These substitutes are not yet regulated, but several toxicological studies indicate that the endocrine disrupting potential of most of these emerging bisphenols (BPs) is comparable to that of BPA. In order to avoid regrettable substitution and then to contribute to the risk assessment of human exposure to these BPs, it is necessary to evaluate the exposure potential of these substances.

In this context, the aim of this thesis was: (1) to assess human fetal exposure to BPA, BPS and BPF, (2) to evaluate the disposition of 12 to 15 structural analogues of BPs and the toxicokinetic (TK) mechanisms determining maternal and fetal internal exposure and (3) to develop QSAR methods to predict the materno-fetal transfer of these BPs. These studies required several analytical developments adapted to fulfill these objectives.

Firstly, the development of a method for the quantification of trace glucuronide metabolites of BPA, BPS and BPF with a limit of quantification of 0.05 ng/mL, made possible to detect the metabolites in human cord blood, demonstrating the capacity of these BPs to cross the placental barrier. That's why, we evaluated in a second step, the materno-fetal placental transfer of fifteen bisphenols in an *ex vivo* perfused human placenta model. Two groups of BPs were characterized depending on their placental transfer mechanism, involving a passive diffusion mechanism for 7 BPs or with a very limited diffusion transfer, which may involve efflux transporters for 8 BPs.

The fetus is exposed to bisphenols via his mother. A previous study performed in our laboratory on a piglet model, relevant to humans for its digestive function, showed that, after a similar oral exposure, internal exposure to active BPS is 250 times higher than that of BPA. This great difference highlighted the need to characterise the TK parameters determining maternal internal exposure. A toxicokinetic study, performed on the same piglet model exposed to 12 BPs, showed great variation of oral bioavailability ranging from 1% for BPA to 60% for BPS. These TK results provide critical information to avoid substitution of BPA by hormonally active BPs with high exposure potential.

These toxicokinetic differences observed for structurally analogs BPs reinforce the need to develop models to predict their exposure mechanisms. To establish the proof of concept that chromatographic descriptors other than retention parameters could contribute finely to the characterisation of molecular behavior in the biophase, we developed a quantitative structure-activity relationship (QSAR) model to predict placental transfer of BPs. The development of a chromatographic database of the fifteen bisphenols on thirteen analytical columns allowed the building and validation a predictive model of the maternal-fetal placental transfer of BPs.

All of these TK data and the development of predictive model of human exposure are essential to inform decision-making processes for the regulatory agencies and to avoid regrettable substitutions of BPA.

Introduction générale

Le système endocrinien met en jeu des messagers chimiques et joue un rôle primordial dans la régulation des fonctions de croissance, de métabolisme, de reproduction, de développement fœtal, de comportement, d'immunité ou du système nerveux [1], [2]. Par conséquent, toute perturbation de ce système peut être à l'origine de troubles.

Au cours de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, un lien a été établi entre des altérations, notamment du système reproducteur, de différentes espèces de la faune sauvage et la présence de contaminants chimiques dans leur environnement [3]. Par ailleurs, des études épidémiologiques dans les pays occidentaux, ont montré une diminution d'un facteur deux de la production spermatique chez l'Homme sur une période de 50 ans, parallèlement à une augmentation des anomalies du tractus génital (cancer des testicules, hypospadias et cryptorchidie). L'évolution de ces altérations, regroupées sous le terme de syndrome dysgénésique testiculaire suggère qu'elles pourraient avoir une origine commune [4]. Au cours du colloque de Wingspread (Wisconsin, USA), organisée par Theo Colborn en 1991 [5], les scientifiques de différentes disciplines ont émis l'hypothèse selon laquelle ces altérations chez l'Homme et chez la faune, pourraient relever d'une perturbation endocrinienne induite par des substances présentes dans l'environnement. C'est ainsi que le terme perturbateur endocrinien est apparu. L'OMS définit en 2002 un perturbateur endocrinien comme : « une substance ou un mélange de substances qui altèrent les fonctions du système endocrinien et de ce fait induit des effets néfastes sur un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations » [6].

Ainsi, le pesticide DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) est l'un des premiers composés synthétiques pour lequel des anomalies du système reproducteur, associées à une altération du système endocrinien, a été mise en évidence chez les alligators exposés à cette substance [7]. Le DES (diéthylstilbestrol), un œstrogène synthétique, prescrit notamment aux femmes enceintes pour prévenir les fausses couches, constitue également un exemple démonstratif de perturbation endocrinienne, avec des anomalies de l'appareil génital (notamment adénocarcinome) chez les filles exposées *in utero* et sur plusieurs générations [8].

Les perturbateurs endocriniens altèrent le système hormonal de l'organisme par différents mécanismes [2], [9] :

- Mimer l'action d'une hormone naturelle et ainsi générer une réponse qui n'a pas lieu d'être

- Bloquer la transmission d'un signal hormonal en empêchant une hormone de se fixer aux récepteurs
- Perturber le transport, la production ou la dégradation d'hormones naturelles ou de récepteurs.

D'un point de vue réglementaire, selon les critères définis par ECHA (European Chemicals Agency), pour qu'une substance soit considérée comme un perturbateur endocrinien, il est nécessaire (1) de démontrer un effet néfaste sur l'organisme ou sur sa descendance, (2) de mettre en évidence un mode d'action endocrinien et (3) d'établir une relation entre l'effet néfaste observé et le mode d'action endocrinien [10]. Cette relation, souvent difficile à démontrer, ne permet pas systématiquement d'identifier comme perturbateurs endocriniens, des substances ayant un mécanisme endocrinien, à l'instar de certains bisphénols. Toutefois, après de nombreux travaux et polémiques scientifiques, le classement du BPA par l'ECHA comme substance extrêmement préoccupante, au titre de ses propriétés perturbatrices endocriniennes, pour la santé humaine et l'environnement, a été adopté en juin 2017 [11].

Mettre en évidence la relation entre l'exposition à des perturbateurs endocriniens et leurs effets, constitue un véritable challenge car [2], [4], [12] :

- Les perturbateurs endocriniens induisent des effets néfastes à long terme, dont certains, comme la production spermatique, peuvent être observés plusieurs années après l'exposition (après la puberté) ou même sur plusieurs générations successives,
- La relation dose-réponse peut être non-monotone, c'est-à-dire que leurs effets à des doses élevées peuvent être plus faibles que ceux observés à de faibles doses,
- La population est exposée à de faibles doses de perturbateurs endocriniens et de façons répétée, tout au long de la vie,
- Les effets observés dépendent de la fenêtre d'exposition, i.e. : la période de vie. Ainsi, les effets des perturbateurs endocriniens sont plus importants lors de période où le système hormonal est finement régulé, c'est-à-dire lors du développement prénatal, néonatal et durant la puberté,
- La population est exposée à un mélange de substances potentiellement perturbatrices endocriniennes, il est donc nécessaire de prendre en compte les effets cocktails.

Le développement de nouvelles technologies et les innovations dans les domaines de l'industrie induisent la production constante de nouvelles substances chimiques dont l'origine et l'usage sont très variés. Certaines sont utilisées pour un usage industriel (détergents, éthers de glycol, plastifiants...), d'autres pour l'agriculture (insecticides, herbicides,

fongicides) et beaucoup se retrouvent dans les produits de consommation courante (colorants, cosmétiques, emballages, contenants alimentaires etc.). Par conséquent, nous sommes exposés, tout comme les animaux, à de très nombreuses substances dont certaines sont capables d'interférer avec les régulations endocrines. Les effets potentiels de ces polluants environnementaux sur les écosystèmes et sur la santé humaine sont devenus une préoccupation majeure, tant sur le plan scientifique que sociétal [6].

Parmi les plastiques, le bisphénol A, un monomère largement utilisé dans la production de polycarbonates et de résines époxy, a fait l'objet de nombreuses études démontrant ses effets perturbateurs endocriniens [13]–[16]. En conséquence, plusieurs pays ont progressivement interdit son utilisation dans les contenants et les ustensiles alimentaires. Le BPA a alors été remplacé par des molécules ayant des propriétés plastiques similaires et des structures analogues. Le bisphénol S est le principal remplaçant du BPA mais l'utilisation de nombreux autres bisphénols est croissante, comme le BPB, le BPF, le BPC, le BPAP, le BPAF, le 3-3BPA, le BPFL, le BPM, le BPP et le BPZ [17].

Ainsi, des études de biosurveillance ont montré la présence de plusieurs bisphénols dans les urines humaines et dans les produits de consommation quotidienne [18]–[26]. Les données toxicologiques sur ces bisphénols émergents sont relativement rares mais, des études *in vitro* ont montré que le potentiel perturbateur endocrinien de ces analogues est similaire à celui du BPA [16], [27]–[34].

Cependant, l'extrapolation de ces données toxicologiques *in vitro* à l'*in vivo* nécessite la prise en compte des propriétés toxicocinétiques (TK). Ainsi, pour que le remplacement du BPA ne s'ajoute pas aux cas de « substitutions regrettables », il est nécessaire de développer des méthodes capables de prédire le devenir de ces différents analogues structuraux dans l'organisme, ces données étant actuellement limitées au BPA et au BPS.

La gestation constitue une période à risque pour l'exposition aux bisphénols. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'évaluer l'exposition fœtale au BPA, au BPS et au BPF et de déterminer le devenir des différents analogues structuraux du BPA dans l'organisme à partir des mécanismes toxicocinétiques déterminant l'exposition interne humaine et fœtale aux bisphénols et de développer des modélisations QSAR capables de prédire ces mécanismes.

Ces travaux de recherche ont été réalisés à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse sous la direction de Nicole Picard-Hagen et de Marlène Lacroix, dans l'équipe « Exposition, Perturbation Endocrino-métabolique et Reproduction (EXPER) » de Toxalim, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1331, INRAE (Institut National de la Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et

l'environnement), ENVT (École Nationale Vétérinaire de Toulouse), EIP (Ecole d'Ingénieur Purpan), UPS (Université Paul Sabatier) et au sein de la plateforme analytique de l'UMR 1436, InTheRes (Innovations Thérapeutiques et Résistances), INRAE, ENVT. L'équipe EXPER développe des approches intégratives pour évaluer l'exposition aux contaminants alimentaires et leurs effets sur les fonctions métaboliques et de reproduction, notamment pendant la période critique du développement. Le plateau analytique de l'unité InTheRes développe et valide des méthodes de quantification des antibiotiques et antiparasitaires, mais également d'autres contaminants chimiques, dans des matrices complexes telles que les fluides biologiques, les matrices environnementales ou les milieux *in vitro*.

Une synthèse bibliographique nécessaire à la compréhension de ces travaux de thèse constitue le premier chapitre de ce manuscrit. La première partie présente les informations concernant les utilisations, la réglementation et les propriétés physico-chimiques du Bisphénol A et de ses analogues. La deuxième partie décrit les différentes sources d'exposition aux bisphénols et synthétise les données relatives à l'exposition humaine aux bisphénols. La troisième partie expose les données toxicocinétiques actuellement disponibles sur le BPA et ses analogues. Pour finir, la quatrième partie présente la méthodologie des études quantitatives de type relation structure-activité (QSAR), notamment les types de descripteurs utilisés, leurs différentes applications et les outils mathématiques nécessaires aux développements et à la validation des modèles QSAR.

A la suite de la synthèse bibliographique, les objectifs de la thèse sont définis ainsi que la stratégie utilisée pour y répondre.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit présente les études expérimentales réalisées afin de répondre aux objectifs du projet de thèse. Tout d'abord, une méthode de dosage a été développée pour évaluer l'exposition prénatale au BPA et à ses principaux substituants, le BPS et le BPF, à travers la quantification de biomarqueurs pertinents, les métabolites glucuroconjugués. La deuxième étude compare le passage placentaire materno-fœtal de 15 bisphénols émergents. La troisième partie expérimentale évalue, sur un modèle porcin, les mécanismes déterminant l'exposition interne aux bisphénols, administrés en cocktail par voie orale ou intraveineuse. La dernière partie expérimentale décrit le développement d'un modèle QSAR pour prédire le passage placentaire des bisphénols avec une attention particulière sur l'intérêt d'intégrer des données chromatographiques au modèle, par rapport aux descripteurs moléculaires classiques.

Une discussion générale met en perspective l'ensemble de ces résultats par rapport à l'évaluation des risques liés à l'exposition à cette famille de bisphénols, et indique des voies de recherche futures.

Chapitre 1 :

Étude bibliographique

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Partie 1 : Les bisphénols analogues du BPA

1. Utilisation du Bisphénol A et polémique

Le bisphénol A (BPA) a été le premier bisphénol synthétisé en 1891, mais son utilisation commerciale n'a été étudiée que pendant la période entre les deux guerres. Dans les années 1930, Edward Charles Dodds, un chercheur en médecine, a identifié les propriétés oestrogéniques du BPA. Cependant, en raison de la découverte, quelques années plus tard, du diethylstilbestrol, un oestrogénomimétique puissant utilisé à des fins thérapeutiques, le bisphénol A n'a jamais été utilisé en tant que médicament. Cette découverte n'a pas empêché son utilisation dans l'industrie des plastiques [35]. C'est au début des années 1950 que les premières résines époxy à base de BPA ont été synthétisées et par la suite commercialisées pour leurs propriétés thermodurcissables. Ces résines époxy ont été utilisées comme revêtement de protection des canalisations, des boîtes de conserve et comme adhésif pour poser les sols et sceller les dents. En 1957, un chimiste a découvert que lorsque le BPA était polymérisé en de longues chaînes, il formait un plastique solide et transparent : le polycarbonate. Ces propriétés plastifiantes ont permis au BPA d'être utilisé dans de nombreux domaines tels que l'emballage alimentaire, l'automobile, l'électronique... Avec l'essor de l'utilisation du plastique les décennies suivantes, la production annuelle de BPA était de 1,15 millions de tonnes/an en Europe dans les années 2000 [36]. Le BPA a également été utilisé en tant que révélateur de pigment dans les papiers thermiques.

Cependant, dans certaines conditions de pH et de température élevée, les chaînes de polymère à l'interface du milieu s'hydrolysent entraînant une migration du BPA du contenant alimentaire vers le contenu. Par conséquent, le BPA est considéré comme un contaminant des produits alimentaires. A la fin des années 90, des études ont montré des effets oestrogénomimétiques du BPA sur les fœtus après une exposition prénatale [13]. Des études d'effet du BPA sur la reproduction et de toxicité systémique, selon les normes BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire), ont été menées par Tyl et al. sur trois générations de rats de souche Sprague-Dawley et sur deux générations de souris CD-1. Pour les deux espèces, la NOAEL (dose sans effet nocif observable) pour des effets chroniques a été estimée à 50 mg/kg/jour [14], [15], conduisant à une dose journalière admissible (DJA : dose que l'on peut ingérer chaque jour tout au long de sa vie, sans effet indésirable) de 50 µg/kg en prenant un facteur de sécurité de 1000. Cependant, d'autres études (qui ne répondent pas aux normes BPL) ont montré des effets pour des doses inférieures à la DJA [37], [38]. Ces données ont

conduit à de fortes divergences dans la communauté scientifique concernant la validité des modèles permettant de mettre en évidence les effets du BPA à faibles doses [38], [39].

En 2008, le National Toxicology Programm (NTP) a publié une revue sur les effets du BPA sur la fonction de reproduction et le développement, qui a conclu que les effets du BPA sont préoccupants [40]. Ces travaux ont conduit à une réévaluation de la DJA par l'EFSA, qui a été fixée à 4 µg/kg [41]. En juin 2017, l'agence Européenne (ECHA) a identifié le bisphénol A comme substance extrêmement préoccupante pour la santé humaine et l'environnement, en raison de ses propriétés perturbant le système endocrinien.

Compte tenu des divergences scientifiques et par principe de précaution, plusieurs pays ont mis en place des restrictions sur l'utilisation du BPA. Le Canada a été le premier pays à interdire la vente et l'importation de biberons contenant du BPA, suivi par la Commission Européenne en 2011 et la Food and Drug Administration (FDA aux USA) en 2012.

Par ailleurs, en Europe, le BPA est réglementé dans les objets en plastique destinés à être en contact avec les aliments [42]. A la suite d'une décision du conseil constitutionnel, le BPA est interdit en 2015 dans tous les contenants alimentaires ou ustensiles en France [43]. En 2018, la limite de migration spécifique (LMS) européenne du BPA provenant des vernis et revêtements en contact avec l'alimentation a été établie à 0,05 mg de BPA/kg de denrée alimentaire [44] et elle est fixée à 0,04 mg/L dans le plastique des jouets pour enfant [45]. Pour les papiers thermiques, la commission européenne a interdit à partir du 2 janvier 2020, la mise sur le marché de papiers thermiques contenant une teneur en BPA supérieure ou égale à 0,02% [46].

2. Les substituts du bisphénol A

Suite aux restrictions réglementaires, les industriels ont commencé à remplacer le BPA par des molécules ayant des propriétés plastiques similaires, en particulier par le BPS mais aussi d'autres bisphénols de structures analogues à celle du BPA tels que le BPF, BPB, BPM, BPAP et le BPAF [47]. Dans les papiers thermiques, le BPA a été substitué en partie par le BPS. Ainsi, la quantité de BPS utilisée pour la fabrication de papier thermique a doublé entre 2016 et 2017 [48].

La réglementation européenne REACH [49] (pour Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals), entrée en vigueur le 1er juin 2007, vise à réguler voire à restreindre l'utilisation des produits chimiques contenant les substances les plus dangereuses dans l'Union Européenne. Pour cela, les industriels doivent fournir un dossier d'enregistrement du produit qui est évalué pour s'assurer que sa mise sur le marché ne présente pas de risque pour la santé humaine ou l'environnement. Tous les produits chimiques fabriqués ou

importés à plus d'une tonne par an sont concernés, mais le niveau d'exigences pour l'évaluation varie en fonction du tonnage des substances mises sur le marché. Dans le cadre de la réglementation REACH, les perturbateurs endocriniens sont considérés comme des substances extrêmement préoccupantes, au même titre que les produits chimiques cancérigènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction ou les substances persistantes ou bioaccumulables. La procédure d'autorisation s'applique alors à ces substances, sans limite de tonnage, l'objectif étant de réduire leur utilisation et de les remplacer par des produits plus sûrs. Ainsi, compte tenu de la multiplicité des bisphénols utilisés pour remplacer le BPA dans ses différentes utilisations, les volumes de production de chacun d'entre eux sont faibles et de ce fait, certains bisphénols échappent à la réglementation REACH s'ils ne sont pas identifiés comme perturbateur endocrinien.

Le BPS est enregistré sous la réglementation REACH en raison d'une production ou d'une importation européenne supérieure à 10 000 tonnes par an. Les analogues du BPA suivants, BPB, BPF, BPC, BPAP, BPAF, 3-3BPA, BPFL, BPM, BPP, BP4-4 et BPZ, sont enregistrés dans l'annexe III de REACH (critère : 1 à 10 tonnes produites ou importées en Europe). Par ailleurs, le BPM et le BPB sont enregistrés dans la liste prioritaire d'évaluation des substances hautement préoccupantes en raison de leurs propriétés potentielles de perturbateur endocrinien [50]. Le BPBP est classé comme étant toxique pour l'environnement, pouvant provoquer des réactions allergiques cutanées et soupçonné de nuire à la fertilité et le BPE n'est pas identifié dans REACH.

Ainsi, le bisphénol S et le 4,4'-dihydroxybiphenyl (BP4-4) sont autorisés dans les objets plastiques destinés à être en contact avec les aliments avec un taux de migration maximal de 0,05 mg/kg et de 6 mg/kg, respectivement [42].

3. Propriétés physico-chimiques

Les bisphénols sont une famille de molécules caractérisées par deux phénols liés, généralement, par un pont méthyle (figure 1), à l'exception du BPS (pont sulfure) et du BP4-4 (liaison directe). Ils sont synthétisés par condensation de cétones, d'aldéhydes ou de hydroxyméthylphénols avec des phénols, qui ont donné le nom à cette famille de molécules. Leur diversité structurale est liée à la possibilité d'ajouter des substituants sur les cycles aromatiques et également de substituer ou modifier le pont carbonate liant les deux phénols. Ce sont des substances incolores, inodores et solides à température ambiante [51].

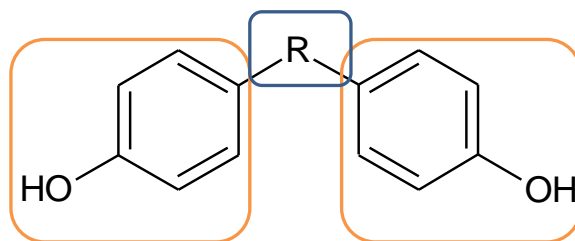


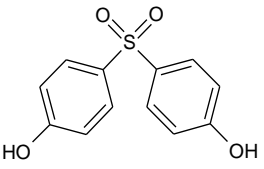
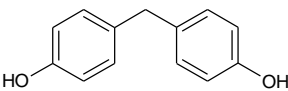
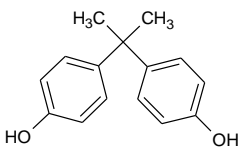
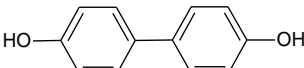
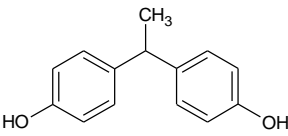
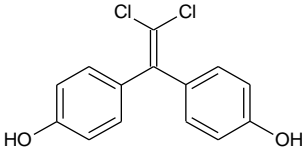
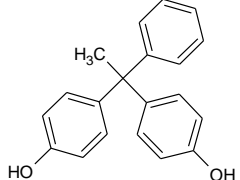
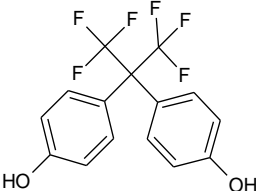
Figure 1 : Structure chimiques des bisphénols, comprenant deux noyaux phénols reliés par un groupement alkyl. Note : La diversité structurale est liée à l'ajout de substituants au niveau du pont alkyl (R) ou sur les cycles aromatiques.

Les propriétés physico-chimiques des bisphénols étudiés dans ces travaux de thèse sont présentées dans le tableau 1. Les bisphénols sont des molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 500 g/mol). Ils présentent une faible solubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques est dépendante de leurs substituants. Les plus lipophiles sont le BPM et le BPP avec un logP de 7, alors que le BPS qui est le composé le moins lipophile, présente un logP de 2,15. Leurs pKa sont supérieurs à 9, excepté pour le BPAF et le BPS, signifiant qu'à pH physiologique (7,4), ils se trouvent également sous leur forme non-ionique.

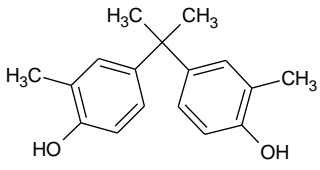
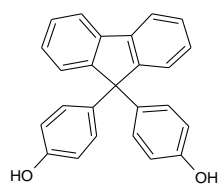
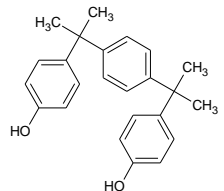
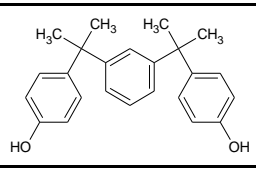
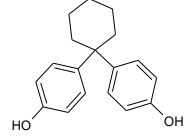
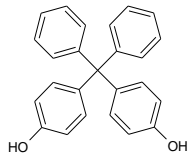
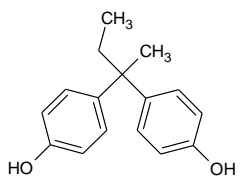
Ces caractéristiques physico-chimiques pourraient se traduire par des propriétés toxicocinétiques différentes.

Etude bibliographique - Partie 1

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques (masse molaire, log P et pKa) des bisphénols étudiés dans cette étude.

Nom de la molécule	Numéro CAS	Poids moléculaire (g/mol)	Structure chimique	Log $P_{o/w}^a$	pKa ^b
4,4'-sulfonyldiphenol (BPS)	80-09-1	250		2,15	8,44
4,4'-methylenediphenol (BPF)	620-92-8	200		2,91	9,66
4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol (BPA)	80-05-7	228		3,32	9,52
[1,1'-biphenyl]-4,4'-diol (BP4-4)	92-88-6	186		2,52	9,45
4,4'-(ethane-1,1-diyl)diphenol (BPE)	2081-08-05	214		3,18	9,59
4,4'-(2,2-dichloroethene-1,1-diyl)diphenol (BPC)	14868-03-2	280		3,95	9,23
4,4'-(1-phenylethane-1,1-diyl)diphenol (BPAP)	1571-75-1	290		5,00	9,36
4,4'-(perfluoropropane-2,2-diyl)diphenol (BPAF)	1478-61-1	336		5,02	8,90

Etude bibliographique - Partie 1

Nom de la molécule	Numéro CAS	Poids moléculaire (g/mol)	Structure chimique	Log $P_{o/w}$ ^a	pKa ^b
4,4'-isopropylidenedi-0-cresol (3-3 BPA)	79-97-0	256		4,81	9,74
4,4'-(9H-fluorene-9,9-diyl)diphenol (BPFL)	3236-71-3	350		5,59	9,14
4,4'-(1,4-phenylenebis(propane-2,2-diyl))diphenol (BPP)	2167-51-3	346		7,04	9,49
4,4'-(1,3-phenylenebis(propane-2,2-diyl))diphenol (BPM)	13595-25-0	346		7,04	9,47
4,4'-(cyclohexane-1,1-diyl)diphenol (BPZ)	843-55-0	268		5,00	9,45
4,4'-(diphenylmethylene)diphenol (BPBP)	1844-01-5	352		6,02	9,21
4,4'-(butane-2,2-diyl)diphenol (BPB)	77-40-7	242		4,44	9,49

^aChemDraw17.1 (ChemPropPro)

^bChemDraw17.1 (Molecular Networks)

Partie 2 : Exposition humaine aux bisphénols

L'évaluation du risque lié à l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE) nécessite d'une part, de caractériser l'effet perturbateur endocrinien de la substance et d'autre part, de connaître l'exposition interne de l'Homme à ces composés. Dans la suite de cette étude bibliographique, nous nous focaliserons sur l'exposition aux bisphénols. Il est important de distinguer l'exposition externe de l'exposition interne (Figure 2). L'exposition externe correspond à la dose de bisphénol à laquelle l'Homme est exposé par différentes voies via son environnement. La quantité de substance qui est absorbée et donc qui se retrouve dans la circulation générale, que ce soit sous sa forme parente ou métabolisée, correspond à la dose interne. Elle peut être évaluée par la détermination des concentrations plasmatiques ou urinaires (si l'élimination est majoritairement rénale) des bisphénols et de leurs métabolites chez l'Homme.

Les effets des bisphénols sont déterminés par les concentrations plasmatiques de la molécule parente. En effet, pour la plupart des bisphénols, seul le bisphénol non métabolisé a une activité de perturbateur endocrinien, leur principal métabolite, le bisphénol mono-glucuronide n'a pas d'effets oestrogéniques [52]. La quantité en bisphénol natif qui atteint la circulation générale correspond à l'exposition interne au bisphénol non-conjugué, celle-ci peut être prédite par modélisation à partir de l'exposition externe et de données issues des études pharmacocinétiques (absorption, métabolisation, élimination...) [47], [53].

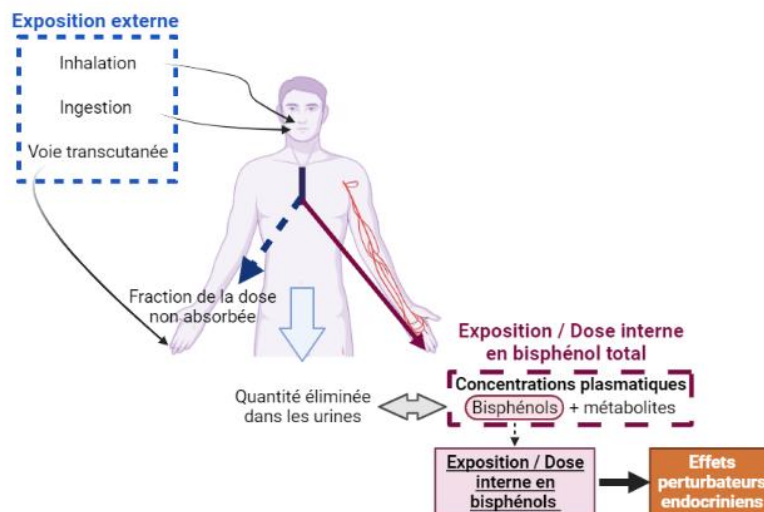


Figure 2 : Représentation schématique de l'exposition externe, de l'exposition interne en bisphénol total et en bisphénol non conjugué.

Note : L'exposition externe correspondant à la dose à laquelle l'Homme est exposé via son environnement, la dose/exposition interne en bisphénol total, correspondant à la dose absorbée i.e : quantité qui atteint la circulation générale sous forme native ou métabolisée et la dose/exposition interne en bisphénol aglycone correspond à la dose qui atteint la circulation générale sous forme de bisphénol non conjugué. Pour les substances fortement éliminées par le rein, l'exposition interne au bisphénol natif ou métabolisé peut être déterminée à partir de la quantité de bisphénol total éliminée dans les urines. Créé avec BioRender.com

1. Sources d'exposition aux bisphénols

L'Homme est exposé aux bisphénols de façon ubiquitaire par son environnement. Il peut être exposé par différentes voies : l'ingestion via l'alimentation, la voie transcutanée via notamment le contact avec les tickets thermiques et les produits d'hygiène et l'inhalation des poussières. Actuellement, la principale voie d'exposition au BPA est l'ingestion [54]. Dans cette partie, les différentes sources d'exposition aux bisphénols sont présentées.

1.1. Exposition alimentaire

Les aliments peuvent être contaminés par les bisphénols contenus dans les emballages constitués en polycarbonate ou contenant des résines époxy. En effet, dans certaines conditions de température ou de pH, les polymères de bisphénols peuvent s'hydrolyser libérant ainsi des monomères [55]. La migration des bisphénols augmente lors de la pasteurisation des boîtes de conserve présentant un revêtement interne en résine époxy du fait des températures élevées [56].

La teneur en bisphénols dans les denrées alimentaires de consommation courante (céréales, viandes, poissons, produits laitiers, végétaux, boissons...) a fait l'objet de plusieurs études présentées dans le tableau 2. Le BPA est le bisphénol le plus souvent détecté dans les produits alimentaires, avec un taux de détection moyen de 68%, suivi du BPS (26%) et du BPF (15%). D'autres bisphénols émergents ont également été détectés mais moins fréquemment, c'est le cas pour le BPAF, le BPAP, le BPP, le BPZ et le BPB. Une étude sur la présence de bisphénols dans les laits en poudre destinés aux nourrissons en Inde a identifié la présence de BPA et de BPS dans 76% et 28% des échantillons, respectivement [57].

Dans une étude réalisée en Espagne, seul le BPA, le BPB et le BPE ont été détectés dans les aliments, avec un taux de détection plus élevé pour le BPA [58]. Dans cette étude, les aliments contenus dans des boîtes de conserve ont une teneur en BPA supérieure à celle du même type d'aliment contenu dans les récipients en verre.

La contamination en bisphénols des aliments par les emballages alimentaires a été confirmée dans l'étude de Santé publique France [55] qui a montré des concentrations urinaires plus élevées en BPS chez les individus consommant des aliments pré-emballés.

Tableau 2 : Taux de détection des bisphénols dans les aliments issus du commerce et représentant la consommation courante (céréales, viandes, poissons, œufs, produits laitiers, végétaux, boissons, matières grasses, biscuits..) à partir de différentes études.

Pays		BPA	BPS	BPF	BPAF	BPAP	BPB	BPP	BPZ	3-3BPA	BPE	BPFL	Références
USA	F(%)	57	21	10	11	11	3	3	2	-	-	-	[18]
	LOD (ng/g)	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,025	0,025	0,05	-	-	-	
Inde (lait en poudre)	F(%)	76	28	-	ND	-	-	-	13	ND	ND	ND	[57]
	LOD (ng/g)	0,09	0,09	-	0,18	-	-	-	0,18	0,28	0,19	0,29	
USA	F(%)	-	32	15	-	-	1	4	28	-	-	-	[59]
	LOQ (ng/g)	-	0,3	0,3	-	-	0,3	0,3	0,5	-	-	-	
Chine	F(%)	70	23	19	13	8	2	7	3	-	-	-	[19]
	LOD (ng/g)	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,025	0,025	0,05	-	-	-	
Taux de détection moyen (%)		68	26	15	12	10	2	5	12	-	-	-	

- non évalué dans l'étude, ND non détecté

Les teneurs de bisphénols détectés dans les aliments permettent de déterminer l'apport journalier en bisphénols lié à l'alimentation, en considérant des repas-types. Dans l'étude de Liao et Kannan, les apports journaliers alimentaires moyen chez l'adulte pour le BPA, BPAF, BPAP, BPB, BPF, BPP, BPS et le BPZ, étaient compris entre 0,346 ng/kg pc/j (pc = poids corporel) pour le BPB et 44,6 ng/kg pc/j pour le BPA [18]. Le conditionnement des aliments entraîne une variation des apports journaliers qui s'élèvent, pour les boîtes de conserve en polycarbonate à 230 ng/kg pc/j pour le BPA, 4 ng/kg pc/j pour le BPB, 10 ng/kg pc/j pour le BPE et pour les contenants en verre, à 30 ng/kg pc/j pour le BPA, 5 ng/kg pc/j pour le BPB et 7 ng/kg pc/j pour le BPE, respectivement [58]. Les apports alimentaires journaliers en bisphénols sont variables en fonction des études. L'exposition alimentaire au BPA a été estimée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) entre 0,4 et 1,4 µg/kg pc/j en 2011 [60]. Cette exposition est inférieure à la DJA établie par l'EFSA, qui est de 4 µg/kg [61].

1.2. Produits d'hygiène

Plusieurs études ont recherché et quantifié différents bisphénols dans les produits d'hygiène. Aux Etats-Unis et en Chine, de nombreux analogues, BPA, BPAF, BPAP, BPB, BPF, BPP, BPS, BPZ ont été détectés dans les produits d'hygiène avec une concentration médiane pour tous les bisphénols confondus de 4,07 ng/g. Le BPA, BPAF, BPAP et BPS ont été détectés dans 13,4, 8,7, 10 et 10,8% des échantillons, respectivement, avec notamment du BPAP détecté dans presque la moitié des dentifrices [20]. Dans une autre étude, le taux de détection de différents bisphénols était de 38,7% pour le BPAF, 21,3% pour le BPA, 33,3% pour le BPS, alors que les bisphénols suivants, BPF, BPP, BPZ et BPAP, étaient très peu détectés avec un taux inférieur à 10%. Cependant, pour le BPA, les produits d'hygiène contribuent à seulement 0,24% de l'exposition quotidienne interne à ce bisphénol [21]. Peu de données sur l'estimation de l'exposition par les produits d'hygiène aux autres bisphénols

analogues du BPA sont disponibles, notamment, en raison du manque d'informations sur le taux d'absorption cutanée des différents analogues.

1.3. Exposition par inhalation

En raison de l'utilisation des bisphénols pour la fabrication de nombreux revêtements ou vernis d'intérieur, l'inhalation des poussières constitue une source d'exposition à ces substances. Certaines études ont recherché les bisphénols dans les poussières à l'intérieur de l'habitat ou des voitures, les taux de détection étaient élevés, de 80 à 100 % pour le BPA, de 77 à 100% pour le BPS, de 57 à 83% pour le BPF et de 21,2 à 70% pour le BPAF. Quant aux BPZ, BPP, BPAP et BPB, ils étaient très peu détectés dans les poussières collectées entre 2012 et 2015, alors qu'une étude de 2020, rapporte un taux de détection du BPZ de 70%, du BPP de 35% et du BPAP de 75% pour des limites de quantification plus élevées. Le BPA est le bisphénol dont la concentration est la plus élevée, avec une concentration médiane comprise entre 0,440 et 2,98 µg/g selon les études [22], [23], [62]. Les jeunes enfants, plus proches du sol, sont plus exposés aux bisphénols que le reste de la population (environ 10 ng/kg pc/j pour les enfants entre 1 et 5 ans contre 2 ng/kg pc/j pour les adultes aux Etats-Unis) [23], [62]. Parmi le BPA, le BPS et le BPF, c'est le BPA qui présente la plus forte exposition externe journalière estimée via l'inhalation de poussières en considérant une absorption totale des bisphénols. Toutefois, cette voie d'exposition représenterait moins de 10% de l'exposition externe due à l'ingestion [62].

1.4. Tickets de caisse

Suite à la restriction réglementaire récente, en 2020, de l'utilisation de BPA en tant que révélateur de pigment dans les tickets de caisse thermiques [46], les industriels ont substitué le BPA majoritairement par le BPS et par un autre composé dérivé du BPS, le D-8 (4-Hydroxyphenyl 4-Isoproxyphenylsulfone). D'autres substances sans noyau phénol, comme le Pergafast 201, sont utilisées comme substituts des bisphénols dans certains papiers thermiques [24], [63]. Les teneurs de BPA et de BPS dans les papiers thermiques commercialisés entre 2011 et 2018 sont comprises entre 0,93 et 1,89% et entre 1,2 et 1,4% (mg de bisphénol pour 100 mg de papier), respectivement [63]–[65]. Dans deux études allemandes évaluant le BPA et le BPS dans des papiers thermiques disponibles entre 2015 et 2019, le BPA est détecté dans environ 40% des tickets thermiques contre seulement 14% pour le BPS. Malgré les restrictions mises en vigueur en 2020, aucune tendance vers la diminution du taux de détection du BPA dans les papiers thermiques allemands n'a été observée entre 2015 et 2019 [66], [67].

Les données suggèrent des différences de concentrations en BPA et en BPS dans les papiers thermiques entre les continents. Dans les papiers thermiques américains, elles sont

supérieures à celles dans les papiers européens, 15,5 mg/g en moyenne dans les tickets américains contre 11 mg/g pour le BPA et 11,5 mg/g contre 6,2 mg/g pour le BPS dans les papiers européens. En Asie, les concentrations déterminées semblent du même ordre de grandeur qu'en Europe mais peu de données sont disponibles [68]. L'exposition au BPA par les tickets de caisse correspondrait à moins de 15% de la DJA (4 µg/kg pc/j) pour les personnes les plus exposées, comme les caissières par exemple (95^{ème} percentile) et moins de 1% pour la population générale, en prenant en compte une absorption transcutanée du BPA de 27% [69]. L'exposition au BPA et au BPS liée à leur présence dans les tickets de caisse serait bien présente mais faible.

1.5. Conclusion

Les données actuelles montrent que les bisphénols sont omniprésents dans notre environnement, dans l'alimentation, les tickets thermiques, les cosmétiques et les poussières, il y a donc de nombreuses sources d'exposition à ces molécules. Malgré les restrictions d'utilisation du BPA, celui-ci reste le bisphénol le plus détecté, suivi du BPS. Cependant, une dizaine de bisphénols utilisés en remplacement du BPA dans de nombreux produits, mais avec des tonnages plus limités, sont également présents dans notre environnement. Ainsi, leurs effets et le niveau d'exposition de la population doivent être documentés pour évaluer le risque lié au remplacement du BPA par ces analogues.

2. Etudes de biosurveillance

2.1. Données urinaires

Des études *in vitro*, sur des fractions sub-cellulaires hépatiques humaines et de rat et sur des lignées cellulaires hépatiques humaines et rénales ont montré que le BPA, le BPS, le BPAF et le BPF sont majoritairement métabolisés en métabolites conjugués, glucuronides et sulfates [52], [70], [71]. Ces composés conjugués, plus polaires, sont généralement éliminés dans les urines. Ainsi, des études toxicocinétiques *in vivo* chez différentes espèces, les rongeurs, le porc, le singe et l'Homme, ont montré que le BPA, le BPS, le BPF et le BPAF, administré par voie orale, sont majoritairement éliminés dans les urines [72]–[78]. Il existe actuellement peu de données évaluant le devenir des autres bisphénols dans l'organisme.

Par conséquent, les études de biosurveillance évaluent généralement l'exposition interne aux bisphénols à partir de la quantité de bisphénol total excrétée dans les urines, en considérant que les urines constituent la voie majeure d'élimination.

Le tableau 3 résume la fréquence de détection et les concentrations urinaires médianes en bisphénol total rapportées dans les études de biosurveillance publiées récemment. La figure 3 représente les doses journalières de bisphénols auxquelles une personne est exposée, en

moyenne dans le monde, estimées à partir des concentrations urinaires publiées entre 2000 et 2019. L'Homme est environ 4 fois plus exposé au BPA qu'au BPS et au BPF. Ces quantités moyennes de bisphénols excrétés par jour (2,53, 0,60 et 0,68 $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{jour}$, BPA, BPS et BPF [25]) sont cohérentes, bien que plus faible pour le BPS, par rapport aux estimations des apports alimentaires journaliers pour un adulte de 80kg, respectivement 3,6, 0,1 et 0,6 $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{jour}$ pour le BPA, le BPS et le BPF [18]. Les bisphénols les plus souvent détectés dans les urines sont le BPA, le BPS, le BPF et le BPAF avec des taux de détection très variables suivant les études et les pays, entre 7 et 100 %, 3 et 100 %, 2 et 100% et 0 et 100 %, respectivement. Les autres bisphénols sont souvent peu recherchés et rarement détectés (tableau 3).

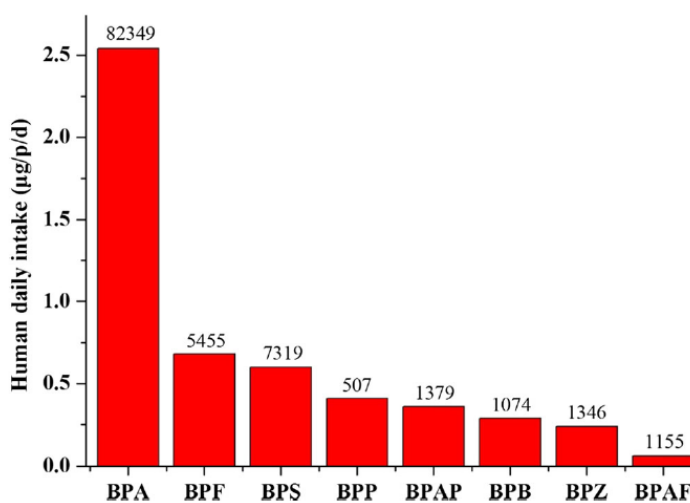


Figure 3 Estimation de la dose journalière moyenne en $\mu\text{g}/\text{jour}$ de BPA ou de ses analogues à laquelle l'Homme est exposé, à partir des concentrations urinaires. Le nombre indiqué sur chaque histogramme correspond au nombre d'échantillons urinaires (d'après [25]).

L'étude de l'exposition journalière aux bisphénols dans les 30 pays, effectuée par Wang et al. (2020), a permis d'observer que l'exposition aux bisphénols est variable en fonction des pays [25]. Par exemple, l'exposition journalière en BPA moyenne entre 2000 et 2016 variait de 0,61 $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{kg}$ en Tunisie à 5,18 $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{kg}$ en Italie [79]. Il est difficile d'identifier des éléments déterminant ces variations, au sein même d'un pays les expositions sont variables [80]. Néanmoins, des liens avec la proximité de certaines usines ou les réglementations concernant le BPA des différents pays sont envisagés [25], [81], [82].

L'exposition est variable en fonction de l'âge de la population étudiée, d'après l'étude de santé publique France, les jeunes enfants sont en moyenne plus exposés au BPA, BPS et BPF, que les adultes [55].

Les concentrations urinaires de certains bisphénols ont varié au cours des années, ce qui peut être expliqué par les restrictions concernant l'utilisation du BPA. Ainsi, les

concentrations urinaires en BPA total ont diminué entre 2008 et 2018, de 2,21 ng/mL à 1,05 ng/mL, respectivement [26]. De la même façon, dans d'autres études [83], [84], une décroissance des concentrations urinaires en BPA de 57 % a été observée entre 2009 et 2017 [85]. Durant la même période, les concentrations en BPS ont tendance à augmenter ainsi que son taux de détection [84], [85], le BPS est détecté dans seulement 25 % des échantillons urinaires en 2000 contre 74 % en 2014 [83]. L'augmentation des concentrations urinaires est également observée pour le BPF, même si elle est moins prononcée [84], [85]. Peu d'études sont disponibles sur l'évolution temporelle des concentrations ou des fréquences de détection des bisphénols autres que le BPA, BPF et BPS. Cependant, le BPAF est faiblement détecté dans les échantillons urinaires à partir des années 2010 (environ 1 ou 2 %) alors qu'il n'était pas détecté dans les années 2000 [83]. Par ailleurs, même si le taux de détection du 3-3BPA et du BPG est resté faible entre 2009 et 2017, inférieur à 20 %, la concentration maximale détectée a augmenté, de 11,4 à 371 ng/mL pour le 3-3BPA et de 9,54 à 311 ng/mL, pour le BPG [85].

Le type d'emballage alimentaire présente un impact sur l'exposition interne en bisphénols. Ainsi, dans une étude comparant le taux de bisphénols excrétés dans les urines humaines après une consommation d'aliments conditionnés dans différents types d'emballages, le groupe consommant des aliments conditionnés en boîte de conserve (emballages en polycarbonate) présente une quantité de BPA total dans les urines supérieure au groupe consommant des aliments conditionnés dans du verre, 0,81 µg/j et 0,53 µg/j, respectivement. Le BPAF, BPF, BPB, BPZ et BPE ont été très peu ou pas détectés dans les échantillons urinaires, ce qui n'a pas permis de faire une comparaison des deux groupes [86]. De la même façon, la consommation occasionnelle de produits contenus en boîte de conserve ou pré-emballés a été associée à une augmentation de l'exposition alimentaire au BPS [55].

La contribution de la manipulation des tickets de caisse sur l'exposition au bisphénols a été évaluée sur une population de caissiers. Les concentrations urinaires en BPA et BPS étaient augmentées après la période de travail [64], [65], mais cette différence n'a pas été confirmée pour le BPA dans une autre étude [63]. En revanche, les concentrations urinaires en BPA et BPS des caissiers après avoir travaillé ont été supérieures à celles de la population générale [63].

2.2. Données plasmatiques

Les concentrations plasmatiques sont des marqueurs de l'exposition interne. Cependant, elles présentent plusieurs inconvénients : (1) les concentrations sont faibles en raison de l'élimination rapide des bisphénols comme le BPA ou le BPS ; (2) les contaminations possibles des prélèvements sanguins au moment de la collecte ou du traitement des

échantillons peuvent conduire à des valeurs erronées. Ainsi, les données publiées doivent être considérées avec circonspection.

Dans l'étude de Jin [87], le BPA, le BPS et le BPAF non conjugués ont été détectés dans 46, 56 et 31 % des plasmas d'adulte en Chine avec des limites de détection de 5, 17 et 6 pg/mL, respectivement. Dans d'autres études, le BPA, le BPS, le BPP, le BPAF et le BPAP totaux ont été détectés dans le sérum de femmes enceintes habitant dans une zone de recyclage de déchets électroniques avec des fréquences de détection comprises entre 53 et 76 % pour le BPA, 27 et 30 % pour le BPS, 8% et 13% pour le BPP, 13 et 25% pour le BPAF et 7% et 13 % pour le BPAP, avec des limites de quantification comprises entre 0,01 et 0,2 ng/mL [82]. Les bisphénols émergents non conjugués ont été détectés dans le plasma de 60 femmes enceintes du sud de la Chine avec une fréquence de détection du BPA, du BPAF et du BPE, de 100 % ; du BPS de 97% ; du BPF et du BPAP de 30% pour des limites de détection de 22, 4, 10, 3, 32 et 4 pg/g, respectivement [88].

Etude bibliographique - Partie 2

Tableau 3 : Fréquence de détection (frq) et concentration médiane (C) des bisphénols totaux dans les urines humaines exprimée en ng/mL.

Année de la cohorte	Pays	Population	BPA			BPS			BPF			Autres bisphénols Fréquences / Concentrations / LOQ, LOD	Références
			Frq %	C ng/mL	LOQ / LOD ng/mL	Frq %	C ng/mL	LOQ / LOD ng/mL	Frq %	C ng/mL	LOQ / LOD ng/mL		
2016-2019	Slovénie	Enfants	99	1,9	0,25	27	<LOQ	0,25	85	0,085	0,03	-	[89]
		Adolescents	100	1,6		35	<LOQ		87	0,11			
2017-2018	Belgique	Adolescents	86	1,05	0,3	83	0,12	0,04	97	0,14	0,02	BPAF : 12 % / <LOQ / 0,02 ng/mL BPB : 57 % / 0,03 / 0,02 ng/mL BPZ : 37 % / <LOQ / 0,03 ng/mL	[26]
2014-2016	France	Adultes	100	2,45a	0,01	100	0,42a	0,003	100	0,28a	0,01	-	[90]
		Enfants	100	2,15a		99,9	0,16a		100	0,13a			
2015	Chine	Enfants	93	0,84	0,1	56	0,06	0,02	12	0,2	0,1	BPAF : 66 % / < 0,02 ng/mL BPP : 39 % / 0,35 / 0,09 ng/mL BPZ : 18 % / < 0,05 ng/mL BPAP : 44 % / < 0,04 ng/mL	[80]
2000-2014	Etats-Unis	Adultes	74-99	0,15 - 2**	0,1	19-74	<0,1-0,25**	0,1	42-88	0,15-0,54**	0,1	-	[83]
2016-2017	Norvège	Adultes	96	1,36	0,04	29	0,16	0,1	4	0,08	0,07	BPAF : ND / 0,02 ng/mL BPB : ND / 0,03 ng/mL	[91]
2009;2013; 2017	Danemark	Jeunes hommes	92	1,33	0,07	86	0,18	0,02	87	0,32	0,05	BPE : 11 / <0,06 ng/mL 3-3BPA : 19 / <0,06 ng/mL BPBP : 16 / <0,48 ng/mL	[85] Valeur pour l'année 2017
2019	Suisse	Enfants	7	2,4*	0,09-0,15	3	6,41*	0,01-0,2	2	2,7*	0,09-0,15	BPAF / BPB / BPZ / BPAP / 3-3BPA / BPBP : ND / ND / 0,09-0,15 ng/mL BPP : 4 % / 20,54* / 0,09-0,15 ng/mL BPM : 25 % / 53,07* / 0,09-0,15 ng/mL BPE : 2 % / 5,85* / 0,09-0,15 ng/mL BPC : 23 % / 11,22* / 0,09-0,15 ng/mL	[92]
2009-2014	Suède	Femmes enceintes	96	0,87	0,22	68	0,043	0,03	98	0,29	0,03	-	[84]
2017	Chine	Femmes	100	0,9**	0,01-	100	0,05**	0,01-	-	-	-	BPAF : 100% / 0,1** / 0,01-0,02 ng/mL	[82]

Etude bibliographique - Partie 2

		enceintes / zone de démantèlement d'objet électronique			0,2			0,2				BPB / BPZ : ND / 0,01-0,02 ng/mL BPP : 7 % / <0,02** / 0,01-0,02 ng/mL BPAP : 47 % / <0,02** / 0,01-0,02 ng/mL		
2004-2005	Pays-Bas	Femmes enceintes	77,1	1,65	0,15	70,5	0,35	0,05	41,2	0,58	0,18	BPAF : ND / 0,79 ng/mL / BPB : 9,2 % / 0,17 / 0,03 ng/mL BPZ : 13,1 / 0,17 / 0,12 ng/mL / BPAP : 8 % / 0,25 / 0,07 ng/mL BPP : 1,7 % / 0,16 / 0,11 ng/mL	[93]	
2018	Chine	Etudiants	99	3,57	0,02	88	0,24	0,01	80	0,16	0,01	BPAF : 85 / 0,03 / 0,005 ng/mL / BPP : 34 % / < 0,01 ng/mL BPZ : 68 / 0,11 / 0,05 ng/mL BPAP : 83 / 0,12 / 0,01 ng/mL	[22]	
2014-2017	France	Femmes enceintes 2 ^{ème} trimestre	99	2,01	0,04	25	<LOD	0,1	ND			-	BPAF : ND	[94]
		Femmes enceintes 3 ^{ème} trimestre	98	1,8		28	<LOD		ND					
		Enfants 2 mois	99	0,71		33	<LOD		ND					
		Enfants 12 mois	100	4,17		78	<0,4		ND					
2013-2015	Chine	Femmes enceintes	76,9	1,4	0,04	86,8	0,38	0,04	98,3	0,65	0,02	-	[95]	
2013-2014	Etats-Unis	Adultes	95,7	1,24	0,2	89,4	0,37	0,1	66,5	0,35	0,2	-	[96]	
		Enfants		1,25			0,29			0,32				
	France	Caissiers	-			96	2,53	0,1	-			-	[64]	
		Non caissiers				100	0,67							
2012-2013	France	Femmes enceintes	99		0,1	97	0,67	0,1	-			-	[97]	
2013-2014	France	Caissiers	-	8,92	0,02	-			-			-	[65]	
		Non caissiers	-	3,54										
2011-2013	Etats-Unis	Caissiers après le travail	-			-	0,54a	0,01-0,02	-			-	[63]	

ND bisphénol suivi mais non détecté, - bisphénol non suivi dans l'étude ; ^a concentrations en µg/g de créatinine ; *moyenne ; ** moyenne géométrique

2.3. Exposition fœtale aux bisphénols

L'exposition des femmes enceintes est particulièrement critique en raison des effets délétères potentiels des bisphénols sur le fœtus. D'une façon générale, les femmes enceintes présentent une exposition similaire à celle de la population générale [82], [84], [93], [94], [97], [98] (Tableau 3).

Le passage placentaire du bisphénol A et du bisphénol S a été démontré sur un modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé [99], [100], ce qui signifie que le fœtus peut être exposé aux bisphénols via sa mère. Quelques études ont mesuré les concentrations sériques de BPA et de ses analogues dans le sang de cordon ombilical, les résultats sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Fréquence de détection et concentration médiane des bisphénols totaux dans le sang de cordon ombilical en ng/mL.

Pays / année		BPA	BPS	BPF	BPAF	BPP	BPAP	BPB	BPZ	BPE	Références
Chine* (n=106) / 2017	Concentration (ng/mL)	1,5	0,028	-	<0,01	<0,02	<0,02	ND	ND	-	[82]
	Fréquence (%)	88	63	-	24	19	22	ND	ND	-	
	LOD (ng/mL)	0,1	0,01	-	0,01	0,02	0,02	0,01-0,2	-	-	
Chine (n=60) / 2017- 2018	Concentration aglycone (ng/g)	0,123	0,0058	ND	0,081	-	<LOD	ND	ND	0,043	[88]
	Fréquence (%)	100	93	-	100	-	17	-	-	100	
	LOD (ng/g)	0,022	0,003	0,032	0,004	-	0,004	0,006	0,012	0,010	
Chine (n=61) / 2012- 2013	Concentration moyenne (ng/mL)	0,56	ND	-	ND	-	-	ND	-	-	[101]
	Fréquence (%)	52	12	-	-	-	-	-	-	-	
	LOD (ng/mL)	0,01	0,03	-	0,01	-	-	0,05	-	-	
USA (n=30)	Fréquence (%)	3,3	ND	50	57	-	-	3,3	-	ND	[102]
	LOD (ng/mL)	1,7	0,5	2,5	0,14	-	-	0,5	-	1,9	

*Population sur une zone de démantèlement d'objets électroniques

Ces études évaluent principalement l'exposition fœtale via la détermination des concentrations en bisphénol total dans le sang de cordon ombilical. Les concentrations détectées sont variables en fonction des études mais, pour le BPA et le BPS, elles semblent plus élevées lorsque les femmes enceintes sont exposées dans des zones contaminées comme des zones d'usines de démantèlement d'objets électroniques [82]. Les bisphénols émergents (BPS, BPF, BPAF, BPP, BPAP, BPE) ont été détectés dans les sangs de cordon ombilical. Ceci montre un possible transfert de la mère vers le fœtus de ces analogues du BPA. Néanmoins, il n'existe pas de relation entre les concentrations maternelles et fœtales [101], [102].

En conclusion, les données urinaires issues des études de biosurveillance permettent d'estimer l'exposition humaine interne aux bisphénols, dont l'absorption est élevée et qui sont excrétés majoritairement dans les urines, ce qui a été démontré pour le BPA et le BPS

[77], [78], [103]–[105]. Les études de biosurveillance ont montré qu'environ 100% de la population est exposée aux bisphénols en particulier au BPA, BPS et BPF. Quelques études ont évalué l'exposition à d'autres bisphénols émergents, mais les taux de détection sont plus faibles. Ces données montrent la réalité de la substitution du BPA par le BPS et le BPF et par d'autres bisphénols émergents dont le potentiel perturbateur endocrinien n'a pas encore été évalué et qui peuvent donc présenter un risque pour la population. Les effets observés sont déterminés par les concentrations circulantes en bisphénols aglycones, qui sont difficiles à quantifier en raison des fluctuations importantes et du risque de contamination des échantillons. Il est donc nécessaire de déterminer les paramètres toxicocinétiques des bisphénols afin de prédire la dose interne de bisphénol non conjugué, chez l'Homme.

Partie 3 : Toxicocinétique des bisphénols

La détermination des paramètres toxicocinétiques des bisphénols est essentielle pour prédire et comprendre l'exposition interne aux bisphénols actifs. Le devenir des bisphénols dans l'organisme met en jeu des mécanismes d'absorption, de métabolisation, de distribution et d'élimination (figure 4).

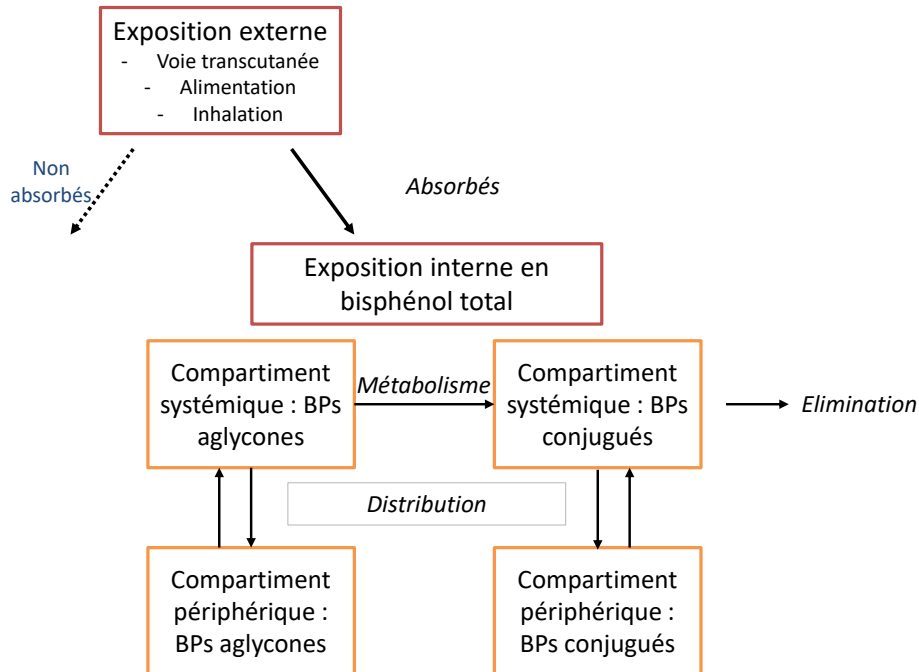


Figure 4 : Représentation schématique du devenir des bisphénols dans l'organisme et de la relation entre l'exposition externe et les concentrations plasmatiques en bisphénols non-conjugués (actifs) et en métabolites conjugués (non-actifs).

Note : L'exposition/dose interne au bisphénol total est la dose absorbée c'est-à-dire qui atteint la circulation générale sous forme aglycone et métabolisée. L'exposition/dose interne au BPs actifs est la dose qui a atteint la circulation générale sous la forme non conjuguée, biodisponible. Les bisphénols non-conjugués et conjugués sont distribués entre le compartiment central (vascularisé) et les compartiments périphériques.

Les propriétés toxicocinétiques des BPs peuvent être déterminées à l'aide de modèles *in vivo* et *in vitro* ou *ex vivo*. Le métabolisme est généralement évalué sur des hépatocytes isolés ou des fractions subcellulaires hépatiques ou intestinales ; la liaison aux protéines est évaluée par microfiltration ou dialyse à l'équilibre ; l'absorption est déterminée sur des modèles d'épiderme de peau, d'épithélium intestinal Des études *in vivo* réalisées sur des modèles pertinents vis-à-vis de l'Homme permettent d'évaluer différents paramètres toxicocinétiques clés pour comprendre le devenir d'une substance dans l'organisme. Ces paramètres sont évalués à partir du décours temporel des concentrations plasmatiques après administration par voie intraveineuse et extravasculaire de la substance (Figure 5).

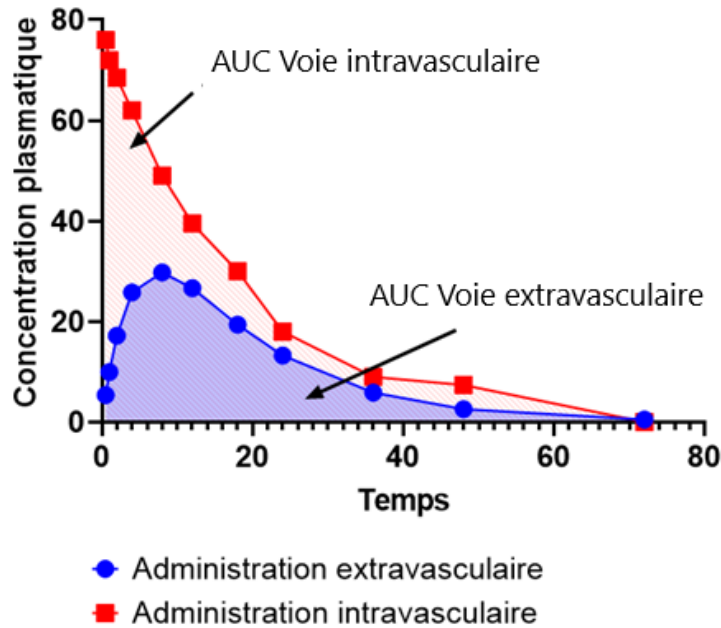


Figure 5 : Représentation schématique du déroulement temporel des concentrations plasmatiques après une administration par voie intraveineuse (en rouge) et après une administration par voie orale (en bleu) et l'aire sous la courbe (AUC) représenté en bleu.

Les paramètres classiquement caractérisés sont :

- L'élimination, évaluée par la clairance (Cl) qui est la capacité de l'organisme à éliminer la molécule, selon la formule suivante : $Clairance = \frac{Dose}{AUC}$, après administration par voie intraveineuse.
- Le temps de demi-vie d'élimination ($T_{1/2}$) est un paramètre hybride qui dépend de la clairance et du volume de distribution. Pour un modèle monocompartimental, il correspond au temps nécessaire pour que la concentration à l'état de pseudo-équilibre soit diminuée de moitié, selon la formule suivante :

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2) \cdot Vd}{Cl}, \text{ avec } Vd, \text{ le volume de distribution et } Cl, \text{ la clairance.}$$

- L'absorption après une voie extravasculaire, correspond à la quantité de substance qui atteint la circulation générale, que ce soit sous forme inchangée ou métabolisée. Pour les substances majoritairement éliminées par voie urinaire, elle peut être évaluée par comparaison des quantités totales urinaires de bisphénol après administration intra et extravasculaire.
- La biodisponibilité (F) représente à la fraction de la dose qui atteint la circulation générale sous sa forme non métabolisée. Elle quantifie la proportion de bisphénol qui est absorbée et disponible pour produire des effets systémiques.

Elle est calculée par $F = \frac{AUC_{extravasculaire} * Dose_{extravasculaire}}{Dose_{intravasculaire} * AUC_{intravasculaire}}$, avec AUC (aire sous la courbe figure 5).

- La distribution décrit le passage du composé du sang vers les différents tissus de l'organisme, c'est un phénomène en équilibre et donc réversible. La distribution est un phénomène important car les effets observés dépendent des concentrations de la substance distribuée au niveau de la biophase. La distribution est évaluée par le volume de distribution (Vd) qui est le facteur de proportionnalité entre la quantité de substance et la concentration plasmatique au cours du temps :

$$- Vd = \frac{Quantité (t)}{Concentration plasmatique (t)}$$

C'est un volume fictif qui correspond au volume dans lequel la substance devrait être distribuée pour atteindre les concentrations plasmatiques à l'équilibre. Il influence la forme de la courbe de concentration plasmatique en fonction du temps. La comparaison avec les volumes physiologiques (volume plasmatique...) permet de déterminer si la substance est distribuée ou si elle reste dans les compartiments vascularisés. La liaison des molécules aux protéines plasmatiques spécifiques (comme l'albumine) peut moduler le phénomène de distribution des bisphénols et détermine la fraction libre, donc biologiquement active de la substance.

Les voies d'administration considérées dans cette partie sont :

- la voie intraveineuse (IV) qui permet l'évaluation de paramètres TK fondamentaux tels que la clairance plasmatique ;
- la voie orale considérée comme la voie majeure d'exposition aux bisphénols chez l'Homme.
- La voie transcutanée qui représente aussi une potentielle voie d'exposition chez l'Homme.

Les données toxicocinétiques des bisphénols déterminées après administration par ces voies sont synthétisées dans les tableaux 5 et 6.

3. Métabolisme

Le métabolisme des bisphénols a été étudié *in vitro* et *in vivo*, et met en jeu de manière prépondérante des réactions de phase II, notamment la glucuroconjugaison et la sulfoconjugaison, et de manière plus limitée, des réactions de phase I (réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse [52], [106], [107] (figure 6).

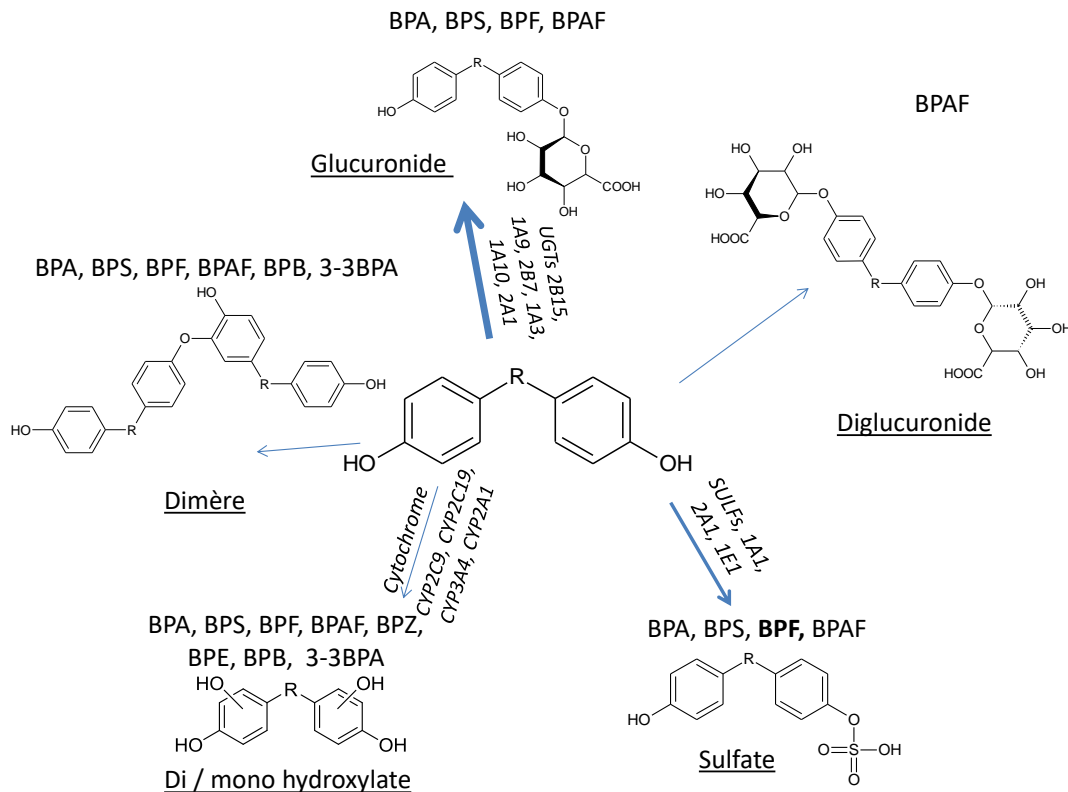


Figure 6 : Représentation schématique des voies de métabolisation des bisphénols.

Note : Sont indiqués les bisphénols pour lesquels les métabolites ont été identifiés. Les métabolites glucurono- et sufo-conjugués sont les métabolites majoritaires des bisphénols. UGT : Uridine diphospho-glucuronosyltransférase, SULF : sulfotransférases, CYP : Cytochrome P450.

Les activités métaboliques de phase I catalysées par les enzymes CYP450 microsomaux ont été étudiées *in vitro*. Ces études ont montré la formation de différents métabolites, dont certains peuvent être hautement réactifs, notamment des dimères pour le BPAF, BPF, BPB, 3-3BPA et BPS [71], [108], [109], et des métabolites mono et dihydroxylés pour ces mêmes bisphénols auxquels s'ajoutent le BPE et le BPZ [71], [72], [108]–[111].

Pour l'ensemble des bisphénols étudiés, la voie prépondérante de métabolisation des bisphénols est la glucuronocouplage, conduisant à un métabolite mono-conjugué [112]–[114]. Les UGT (Uridine diphospho-glucuronosyltransférase) impliquées sont différentes suivant les espèces et les bisphénols. Ainsi chez l'Homme, le BPS et le BPA sont majoritairement métabolisés, respectivement par les enzymes UGT1A9 et UGT2B15 hépatiques, alors que le BPF est majoritairement métabolisé par l'enzyme UGT1A10 qui se situe dans l'intestin [112], [113] et le BPAF est métabolisé par l'enzyme UGT2B7 qui est exprimée au niveau du foie, du rein et de l'intestin [115]. L'UGT2A1, une enzyme principalement exprimée dans les voies respiratoires, a montré une forte activité à la fois vis-à-vis du BPF et du BPS et également du BPA [112].

Les autres métabolites du BPA, et vraisemblablement aussi du BPS et du BPF sont le conjugué monosulfate produit par les sulfotransférases (SULT) [116], et divers conjugués sulfates/glucuronides [116], [117]. Pour le BPA, les enzymes majoritairement impliquées sont les SULF1A1, 2A1 et 1E1 [116].

Des différences interspécifiques de métabolisation ont été observées pour le BPA, le BPS et le BPAF *in vitro* : les rongeurs ont une clairance métabolique supérieure à celle du singe et de l'Homme [72], [114], [118].

Des études *in vivo*, après administration par voie orale, ont montré que c'est essentiellement la forme glucuroconjuguée du BPA, BPS, BPF et BPAF qui est détectée dans le sang et les urines (Tableau 6). Ainsi, après une administration orale de BPA chez l'Homme, environ 60% de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA total correspond au BPAG et 12,4 % à 23 % au BPA-S [78], [119]. En outre, les bisphénols sont majoritairement éliminés dans les urines. Ainsi, chez l'Homme, après une administration par voie orale, 100 % de la dose de BPA (87 % sous forme de BPAG et seulement 3% sous forme de BPA-S) [78], [119] et plus de 50 % de la dose de BPS sont retrouvées dans les urines [77], [105]. Après une administration orale chez le rat et la souris, le rapport d'AUC de BPS total sur l'AUC de BPS aglycone est de 18. Environ 50 % de la dose de BPS est retrouvée dans les urines sous forme glucuronide et 20 % et 4 % sous forme sulfate chez la souris et chez le rat [72], [120]. Cette forte métabolisation est également observée pour le BPAF avec un rapport d'AUC_{BPS total}/AUC_{BPS aglycone} très élevé, de 127 à 175 chez le rat et de 16 à 35 chez la souris [121]. Chez le rat, après une administration par voie orale, 43-54 % de la dose est retrouvée dans les urines et 15-20 % dans les fèces. Le BPF-S est le métabolite majoritaire retrouvé dans les urines (>50 %), indiquant que la sulfo-conjugaison pourrait être une voie prépondérante de métabolisation [73].

Par ailleurs, un cycle de recirculation entéro-hépatique a été mis en évidence chez les rongeurs pour le BPA, le BPS et le BPF [73], [121], [122]. Ce cycle peut entraîner un rebond de concentrations plasmatiques en bisphénol non-conjugué.

4. Clairance et volume de distribution

La clairance est le paramètre TK qui permet d'évaluer la capacité d'élimination des substances par l'organisme. Ce paramètre ne peut être déterminé qu'après une administration par voie intraveineuse (Tableau 5). La clairance totale est définie comme la somme de la clairance hépatique ou non hépatique (rénale, intestinale). Pour les bisphénols, la clairance hépatique est prépondérante. Il peut exister également une élimination par voie

biliaire ce qui peut entraîner un cycle entéro-hépatique, comme cela a été observé chez les rongeurs, pour le BPA, le BPS et le BPF [73], [121], [122].

Les clairances plasmatiques, dans différentes espèces, du BPA et du BPS sont relativement similaires (Tableau 5) [123], [124]. Chez la brebis et le porc, la clairance du BPS est entre 2 et 3,5 fois plus faible que celle du BPA [76], [125], ce qui indique que le BPS est éliminé moins efficacement que le BPA. En outre, le BPS est plus persistant chez le rat que chez les autres espèces, avec un temps moyen de résidence (MRT) 5 à 13 fois plus élevé chez le rat, en partie en raison d'un volume de distribution 5 à 21 fois plus élevé [124].

La clairance du BPAF est proche de celle du BPS chez le rat femelle (0,75 L/(h*kg) versus 1,2 L/(h*kg)) et chez la souris (environ 3 L/(h*kg)) [72], [126].

Après une administration du BPS par voie IV, la fraction de la dose de BPS récupérée dans l'urine, principalement sous forme de BPSG, au bout de 24 heures était de 29,5 % et 37,5 % chez le rat (respectivement, Waidyanatha et al. 2018 [72] et Gayrard et al. 2020 [124]), contre 76,8 ± 20,1 % chez les porcelets et 90 ± 34 % chez les brebis gravides [125]. Chez le porcelet, le BPA et le BPS non conjugués dans l'urine représentaient respectivement 0,044 et 0,027 % des doses IV de BPA et de BPS, ce qui indique que la clairance rénale est négligeable et que la clairance du BPS et du BPA est principalement due à leur conjugaison. Chez le rat, après une administration IV de BPS, un cycle entéro-hépatique a été observé, associé à une excrétion fécale de BPS et de ses métabolites, correspondant à 32,5 % de la dose [72]. Après une administration IV de BPAF à des rats, une forte élimination biliaire a été observée, résultant en une élimination majoritairement fécale [118].

Une approche allométrique a été utilisée pour prédire les clairances du BPA et du BPS chez l'Homme à partir des données précédemment obtenues chez différentes espèces animales et a confirmé la faible clairance du BPS par rapport à celle du BPA (0,79 L/(kg*h) versus 1,55 L/(kg*h)) [123], [124]. Le volume de distribution à l'équilibre prédit chez l'Homme est d'environ 1 L/kg pour le BPA [123] et 2,26 L/kg pour le BPS [124]. Ces valeurs sont supérieures au volume de plasma chez l'Homme associé au volume d'eau intracellulaire qui est d'environ 0,11 L/kg [127], ce qui signifie que le BPS et le BPA sont largement distribués dans les tissus.

Le volume de distribution du BPA, BPS et BPAF a été évalué chez les rongeurs (tableau 5) : les volumes de distribution à l'équilibre (V_{ss}) du BPA (12 L/kg pour le rat mâle et 19,6 L/kg pour la souris femelle) [123] sont supérieurs à ceux du BPS (3,64 L/kg [124] pour le rat femelle) et du BPAF (de 0,7 L/kg (rat mâle et femelle) et 8,32 L/kg et 1,38 L/kg (souris mâles et femelles, respectivement) [126]. Ces volumes de distribution sont très largement

supérieurs au volume de plasma des différentes espèces, ce qui signifie que ces substances sont distribuées dans l'organisme.

5. Absorption et biodisponibilité par voie orale

L'exposition aux bisphénols se fait majoritairement par l'alimentation et de façon plus limitée par voie transcutanée. Le devenir du BPA et du BPS dans l'organisme après une administration par voie orale est représenté schématiquement sur la figure 7.

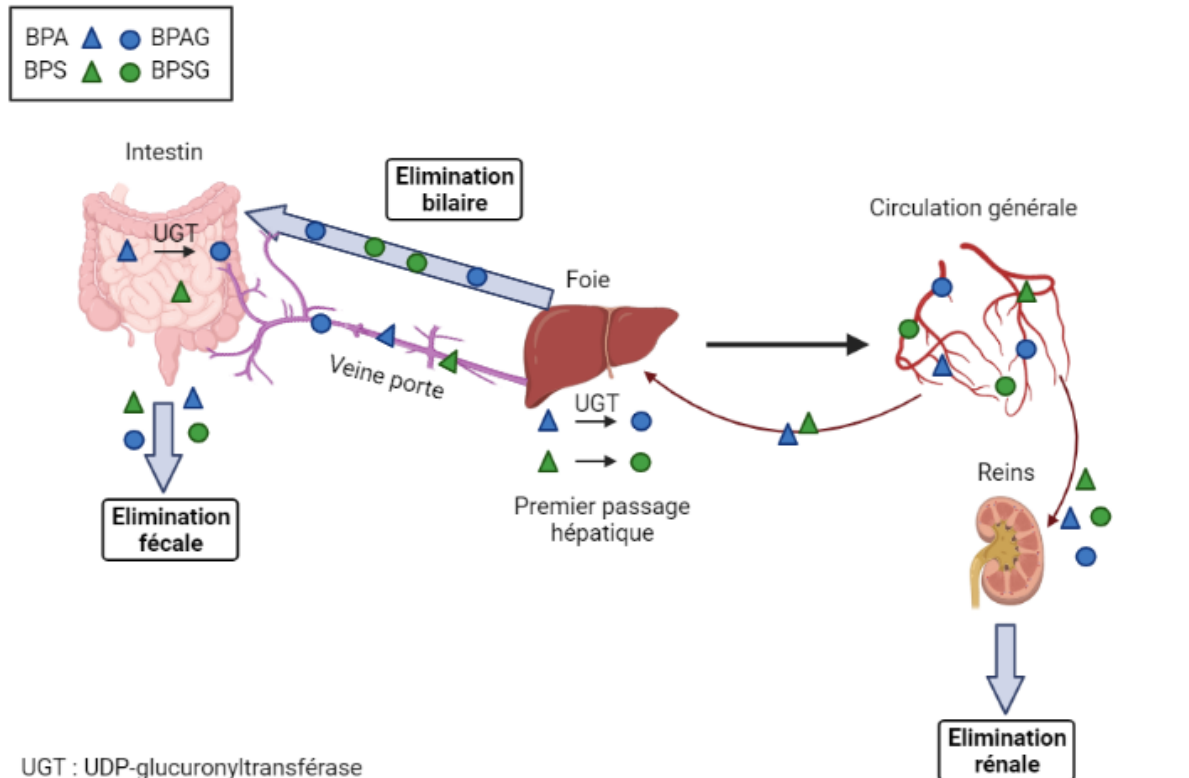


Figure 7 : Représentation schématique du devenir du BPA et du BPS après une administration par voie orale. Créé avec BioRender.com

Note : Après une administration par voie orale, le BPA et le BPS franchissent la barrière intestinale, une partie du BPA est métabolisée par les UGT (UDP-glucuronyltransférase). En revanche, les UGT intestinales humaines recombinantes sont très peu actives sur le BPS et il est très peu métabolisé par les UGT intestinales chez le porc [76], [112]. Une fois absorbés, les bisphénols et leurs métabolites atteignent la circulation sanguine au niveau de la veine porte et passent dans le foie. Dans le foie, le BPA et le BPS sont métabolisés en acide glucuronide. Cette métabolisation correspond à l'effet de premier passage hépatique et détermine la biodisponibilité. Le BPA, le BPS et leurs métabolites atteignent ensuite la circulation générale. Une fraction des métabolites peut être sécrétée dans la bile et excrétée dans l'intestin, décrivant ainsi un cycle entéro-hépatique : dans l'intestin, ces métabolites peuvent être hydrolysés et/ou être éliminés dans les fèces ou être réabsorbés pour atteindre la veine porte. Les bisphénols sont alors éliminés principalement sous forme glucuronidée, dans les urines (élimination rénale).

Compte tenu de l'excrétion urinaire majoritaire pour les bisphénols (A et S), l'absorption est généralement déterminée par les quantités de bisphénol total retrouvées dans les urines. Des études TK évaluant la disposition du BPA et du BPS après une administration orale, chez l'Homme [77], [78], [104], [105], chez le singe [128], chez le porc [76], chez la brebis [125] et chez les rongeurs [122], [123], [129] ont montré qu'une grande partie de la dose est

récupérée dans l'urine, indiquant que le BPA et le BPS sont fortement absorbés par voie orale.

Sur un modèle porcin pertinent pour l'Homme en termes de physiologie gastro-intestinale, un modèle TK semi-physiologique a été construit pour évaluer la disposition du BPS et du BPA par voie orale (figure 8) [76].

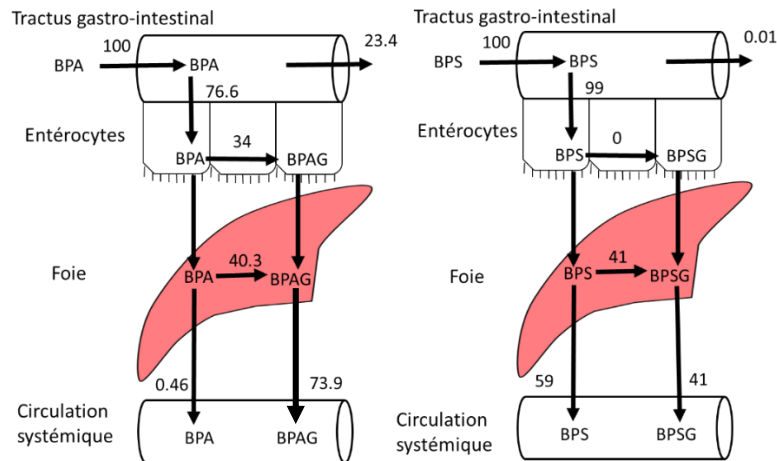


Figure 8 : Résumé des principaux résultats du devenir d'une dose de BPA/BPS administrée par gavage orogastrique à des porcelets [76].

Les résultats ont permis de montrer que la quasi-totalité (99%) du BPS administrée par voie orale était absorbée alors que le taux d'absorption du BPA était de 77%. Le BPS n'est pas métabolisé dans les entérocytes tandis que l'intestin contribuerait à la glucuroconjugaison de 34% de la fraction absorbée de BPA lors du premier passage intestinal. Alors que seulement 41% de la fraction absorbée de BPS est glucuroconjuguée dans le foie, la quasi-totalité (99%) du BPA non métabolisé dans les entérocytes est glucuroconjuguée lors du premier passage hépatique. L'absorption quasi-totale du BPS associée à l'absence de métabolisme dans les entérocytes et à un métabolisme hépatique présystémique modéré conduit à une biodisponibilité systémique du BPS environ 100 fois supérieure à celle du BPA (57.4 vs 0.50%). Cette faible biodisponibilité du BPA, inférieure à 1% a été retrouvée chez le singe [74], [130]. Chez le rat et la souris, le BPS a une biodisponibilité comprise entre 9% et 30% [131], [132].

Chez l'Homme, la biodisponibilité n'a pas été déterminée en raison de l'impossibilité d'administrer du BPA à l'Homme par voie intraveineuse. Cependant, en accord avec les données TK obtenues dans le modèle porcin, les études TK chez l'Homme utilisant du BPS marqué ont mis en évidence des différences majeures entre la cinétique du BPA et celle du BPS avec des niveaux systémiques de BPS actif bien plus élevés que ceux du BPA [77], [78], [105]. En considérant une absorption de 100 % et un métabolisme essentiellement

hépatique, la biodisponibilité du BPS par voie orale a été estimée à 62 % [77], une valeur similaire à celle obtenue dans le modèle porcin. En outre, une importante recirculation entéro-hépatique a été observée, comme cela a été rapporté chez le rat pour le BPS [124], [131] et dans des modèles PBPK, chez l'Homme [133].

La toxicocinétique des autres bisphénols émergents est actuellement très peu documentée. Après une administration par gavage chez le rat et la souris, il a été montré que le BPAF est rapidement absorbé chez la souris ($T_{max} = 30$ min) et chez le rat ($T_{max} = 2h20$) et sa biodisponibilité est faible d'environ 1 % chez le rat et 6 % chez la souris [126], et relativement proche de celle du BPA. De plus, chez le rat, une étude TK comparative du BPS et du BPAF a montré que, pour une même dose, l'AUC du BPS aglycone est 10 à 42 fois plus élevée que celle du BPAF, indiquant que la biodisponibilité du BPS est supérieure à celle du BPAF. Cependant, en raison d'une plus faible métabolisation du BPAF chez la souris, cette différence n'a pas été observée chez cette espèce [121].

6. Absorption et biodisponibilité par voie cutanée

L'exposition aux bisphénols par voie transcutanée a fait l'objet de quelques études pour le BPA et le BPS, même si ce n'est pas la principale voie d'exposition. Une étude *in vitro* a exploré l'absorption cutanée et la biotransformation du BPS et du BPA à travers le modèle de peau humaine dérivé de kératinocytes. La perméabilité cutanée du BPS était inférieure à celle du BPA [134]. Le pourcentage de dose absorbée de BPA était compris entre 3% et 41% selon le solvant utilisé, sébum et eau respectivement, alors que moins de 1% de la dose de BPS déposée passe la barrière cutanée [134], [135]. En outre, ces deux substances sont très peu métabolisées par la peau. Des études TK *in vivo* ont évalué la disposition du BPA et/ou BPS après une administration transcutanée (Tableau 6) [77], [134], [136]. L'évaluation du profil plasmatique et de la courbe temporelle du taux urinaire de BPS et de BPSG a indiqué que l'absorption cutanée de BPS était très limitée ($<0,2\%$, [77]) alors que celle du BPA est comprise entre 1 et 2,2% [136].

7. Liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques

La liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques module les processus de biodistribution et donc la concentration de bisphénols dans la biophase. Peu d'études ont investigué la liaison des bisphénols aux protéines plasmatiques. Le taux de liaison de BPA aux protéines plasmatiques a été évalué dans le plasma de singe et chez le rat par ultrafiltration, elle est d'environ 94% pour les deux espèces [128], [137]. Chez l'Homme et la brebis, cette liaison déterminée par dialyse à l'équilibre est du même ordre de grandeur, de 94-95% [138], [139]. Le BPA est majoritairement lié à l'albumine.

Le pourcentage de liaison du BPS aux protéines plasmatiques, évalué par dialyse à l'équilibre chez le rat et l'Homme, est compris entre 82 et 88% et il est plus faible que pour le BPA [132].

La liaison de 8 bisphénols émergents (BPA, BPS, BPF, Bisphénol E (BPE), BPB, BPAF, Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) et Bisphénol M (BPM)) à deux protéines plasmatiques (l'albumine et l'alpha-1-glycoprotéine acide) a été déterminée par chromatographie liquide biomimétique, en utilisant des colonnes dont les phases stationnaires contiennent des protéines plasmatiques. Cette étude montre que la liaison des bisphénols aux protéines est non spécifique et dépend de leur hydrophobicité, avec une liaison plus importante pour les bisphénols liposolubles. Le pourcentage de bisphénol lié à l'albumine a également été estimé par des méthodes *in silico*, il est plus faible pour le BPS (87%) comparativement aux autres bisphénols : BPF (92%), BPE (94%), BPA (96%), BPB et BADGE (97%), BPAF et BPM (99%) [140].

8. Temps de demi-vie

Le temps de demi-vie est un paramètre hybride prenant en compte la clairance et la distribution, il a été évalué pour le BPA, le BPS et le BPAF sur différentes espèces. Chez le singe, le $T_{1/2}$ du BPA est d'environ 3 h après une administration intraveineuse [74], [130] et de 11 h après une administration orale. Chez l'Homme après une administration par voie orale, le $T_{1/2}$ du BPA est d'environ 6 h [78], [119], du même ordre de grandeur que celui du BPS, entre 4 et 8 h [77], [105]. Le $T_{1/2}$ du BPS chez le rat, après une exposition par voie orale, est compris entre 3 h et 4 h [131], [132], le même $T_{1/2}$ a été observé après une administration par voie intraveineuse [132] et chez la souris, il est compris entre 6 et 12 h [131]. Après une administration IV chez les rongeurs, le $T_{1/2}$ du BPAF est compris entre 5 et 8 h chez le rat et il est d'environ 3h chez la souris. Après administration orale, une augmentation du $T_{1/2}$ avec la dose est observée chez le rat, avec un $T_{1/2}$ compris entre 9 h et 44 h ceci n'a pas été observé chez la souris avec un $T_{1/2}$ de 4,7 h chez le mâle et de 9 h chez la femelle [126].

En conclusion, ces données montrent que le BPA, le BPS et le BPAF sont rapidement métabolisés et éliminés après administration par voie intraveineuse et orale avec des temps de demi-vie inférieurs à 12 h.

Tableau 5 : Synthèse des données toxicocinétiques récentes des bisphénols déterminées à partir d'études *in vivo* après des administrations par voie intraveineuse. Les données sont obtenues à partir des concentrations plasmatiques en bisphénol aglycone.

Caractéristiques de l'étude				Paramètres toxicocinétiques					
Voie intraveineuse									
Espèces	Bisphénols	Dose	Nb individu	Clairance plasmatique (L/(h*kg))	T 1/2 (h) / MRT (h)	Volume de distribution (L/kg)	Fraction de la dose retrouvée dans les urines (%)	Contribution du bisphénol parent et des formes conjuguées en % des AUC	Références
Singe	BPA	100 µg/kg	4	-	2,8	-	-		[130]
Rat	[14C]BPS	50 mg/kg	4	-	-	-	43,9 ± 4,0 % (en 72 h)		[72]
Souris	[14C]BPS	50 mg/kg	4	-	-	-	68,0 ± 12,8 % (en 72 h)		
Rat	BPS	0,5 mg/kg	5	8,8	3,80	15,3	-	BPS : 2,3 % ; BPSG : 74,5 % ; BPS-S : 23,2 %	[132]
Singe	BPA _{d6}	100 µg/kg	4	-	3,6	15	-		[74]
Porc	BPS	5 mg/kg	16	0,95 ± 0,24	0,75 ± 0,53	0,30	76,8 ± 20,1 %		[76]
	BPA	5 mg/kg	15	3,41 ± 1,23	-	1,0	97,0±27,6%		
Brebis	BPS	5 mg/kg	4	0,57 ± 0,13	1,80 ± 0,44 / 0,30 ± 0,04	0,17 ± 0,44	-		[125]
Brebis gravide	BPS	5 mg/kg	6	0,99	2,37 / 0,38	0,38	90 ± 34 % (en 24h)		[141]
Rat	BPS	5 mg/kg	15	0,92 (F)	- / 3,96	3,64	37,5 ± 12,3% (en 24 h) dont 93,5 ± 7,1% en BPSG		[124]
Rat	BPS	34 mg/kg	3	1,14 ± 0,261 (M) et 1,25 ± 0,24 (F)	4,67 ± 0,43 (M) et 7,46 ± 1,10 (F)	0,47 ± 0,18 (M) et 0,36 ± 0,01 (F) compartiment central	-	AUC BPS total environ 4 fois supérieure à AUC BPS	[131]
Souris			3	2,45 ± 0,424 (M) et 3,01 ± 0,65 (F)	3,00 ± 0,46 (M) et 1,93 ± 0,26 (F)	0,61 ± 0,16 (M) et 0,57 ± 0,19 (F) compartiment central	-	AUC BPS total environ 6 fois supérieure à AUC BPS	

(M) mâle, (F) femelle

Suite tableau 5

Caractéristiques de l'étude			Paramètres toxicocinétiques						
Voie intraveineuse									
Espèces	Bisphénols	Dose	Nb individu	Clairance plasmatique (L/(h*kg))	T 1/2 (h) / MRT (h)	Volume de distribution (L/kg)	Fraction de la dose retrouvée dans les urines (%)	Contribution du bisphénol parent et des formes conjuguées en % des AUC	Références
Cheval	BPA	5 mg/kg	4	0,75 ± 0,15	0,94 ± 0,085 / 0,63 ± 0,052	0,47 ± 0,073	-		[123]
Brebis			5	1,56 ± 0,17	1,3 ± 0,29 / 0,58 ± 0,089	0,88 ± 0,11			
Porc			8	3,48 ± 0,40	0,97 ± 0,30 / 0,84 ± 0,21	2,90 ± 0,83			
Chien			6	1,82 ± 0,06	0,62 ± 0,065 / 0,53 ± 0,045	1,05 ± 0,082			
Rat			6	3,76	5,6 / 2,2	11,88			
Souris			40	2,09	13,3 / 4,6	19,6			
Humain	BPS	Allométrie	-	0,79	- / 0,96	2,26	-		[124]
Humain	BPA	Allométrie	-	1,55	0,95 / 0,64	1	-		[123]
Rat	BPAF	34 mg/kg	3	0,753 ± 0,102 (M) ; 0,751 ± 0,118 (F)	8,01 ± 1,28 (M) ; 5,15 ± 1,15 (F)	0,7 ± 0,146 (M) et 0,697 ± 0,166 (F)	-	AUC BPAF total environ 3 fois supérieure à AUC BPAF	[126]
Souris		34 mg/kg	3	4,51 ± 0,547 (M) ; 2,15 ± 0,426 (F)	3,76 ± 0,316 (M) ; 3,03 ± 0,218 (F)	8,32 ± 1,64 (M) et 1,36 ± 0,499 (F)	-	AUC BPAF total entre 3 et 4 fois supérieure à AUC BPAF	

(M) mâle, (F) femelle

Etude bibliographique - Partie 3

Tableau 6 : Synthèse des données toxicocinétiques récentes des bisphénols déterminées à partir d'études *in vivo* après des administrations par voie extravasculaire : orale et transcutanée. . Les données sont obtenues à partir des concentrations plasmatiques en bisphénol aglycone.

Voie orale									
Espèces	Bisphénols	Dose	Nb individu	Temps maximum (h)	T 1/2 (h) / MRT (h)	Biodisponibilité (%)	Fraction de la dose retrouvée dans les urines (%)	Contribution du bisphénol parent et des formes conjuguées en % des AUC	Références
Humain	BPA	30 µg/kg	10	1,6	5,5h	-	104%	BPA : 0,23 % ; BPAG : 64 % et BPAS 12,4%	[119]
Rat	BPS	23, 76,8, 209 mg/kg/jour 7 jours d'administration prélèvement 24 h après la dernière administration	15	-	entre 4,41 à 5,69	-	-	AUC BPS total 18 fois supérieure à AUC BPS	[121]
	BPAF	23, 70,5, 193 mg/kg/jour 7 jours d'administration prélèvement 24 h après la dernière administration	15	-	entre 7,10–10,5	-	-	AUC BPAF total entre 127 et 175 fois supérieure à AUC BPAF	
Souris	BPS	131, 428, 1176 mg/kg/jour 7 jours d'administration prélèvement 24 h après la dernière administration	30	-	entre 6,11 et 10,4	-	-	AUC BPS total entre 17 et 20 fois supérieure à AUC BPS	
	BPAF	69,4, 236, 1590 mg/kg/jour 7 jours d'administration prélèvement 24 h après la dernière administration	30	-	entre 4,55 et 6,66	-	-	AUC BPAF total entre 16 et 35 fois supérieure à AUC BPAF	

(M) mâle, (F) femelle

Suite tableau 6

Voie orale									
Espèces	Bisphénols	Dose	Nb individu	Temps maximum (h)	T 1/2 (h) / MRT (h)	Biodisponibilité (%)	Fraction de la dose retrouvée dans les urines (%)	Contribution du bisphénol parent et des formes conjuguées en % des AUC	Références
Rat	BPS	34, 110, 340 mg/kg	3	0,35 et 1,97 (augmente avec la dose)	entre 5,77 et 11,9 (augmente avec la dose)	9,1 ; 15,2 ; 20,9 % (augmente avec la dose)	-	AUC BPS total entre 15 et 32 fois supérieure à AUC BPS	[131]
Souris		34, 110, 340 mg/kg	3	-	entre 2,86 - 4,21	entre 11,2 et 18,7 %	-	AUC BPS total entre 12 et 15 fois supérieure à AUC BPS	
Singe	BPA _{d6}	100 µg/kg	5	0,25 – 1	11	0,48 %	-	AUC BPA : 0,14 % de l'AUC total	[130]
Rat	[3H]BPF	7 mg/kg et 100 mg/kg	8	-	-	-	entre 42,8 et 53,7 % (majoritairement BPFs)	-	[73]
Rat	[14C]BPS	50, 150, 500 mg/kg	4	-	-	-	entre 43,9 et 72,2 % (diminue avec la dose)	-	[72]
Souris		50, 150 mg/kg	4	-	-	-	en moyenne 70 % (72h)	-	
Rat	BPS	5 mg/kg	4	0,5	3,89 ± 1,03	33,5 %	66,7 % (24h)	BPS : 1,2 % ; BPSG : 88,6 % ; BPS-S : 10,2 %	[132]
Souris	BPS	10, 100 et 1000 µg/kg	6	-	-	-	environ : 50 % BPSG ; 14 % BPSS ; 6 % BPS (48h)	-	[120]
Humain	BPA _{d6}	100 µg/kg	14	1,3 ± 0,52	6,2 ± 2,6	-	84–109% (en 24h) : 87 % BPAG /3% BPAS	62 % BPAG ; 23 % BPAS ; 1% BPA	[78]
Singe	BPA	100 µg/kg	4	0.5	0,39±0,24	0,94 ± 0,58 %	-	BPA 0,19 ± 0,18% de AUC totale	[74]
Rat	BPAF	34, 110, 340 mg/kg	3	Entre 0,8 et 2,2 (M) entre 0,66 et 1,3 (F)	Entre 10,2 et 18,4 (M) entre 8,7 et 44,4 (F)	entre 0,84 et 1,07 %	-	AUC BPAF total environ 50 et 200 fois supérieure à AUC BPAF	[126]
Souris		34 mg/kg	3	Entre 0,455 ± 0,21 (M) entre 0,342 ± 0,07 (F)	Entre 4,73 ± 5,8 (M) entre 9,02 ± 4,74 (F)	5,64 % (M) ; 3,13 % (F)	-	AUC BPAF total entre 13 et 23 fois supérieure à AUC BPAF	

(M) mâle, (F) femelle

Suite tableau 6

Voie orale									
Espèces	Bisphénols	Dose	Nb individu	Temps maximum (h)	T 1/2 (h) / MRT (h)	Biodisponibilité (%)	Fraction de la dose retrouvée dans les urines (%)	Contribution du bisphénol parent et des formes conjuguées en % des AUC	Références
Chien	BPA	5 mg/kg administration sublinguale	5	0,21 ± 0,15	-	70 ± 31 %	-	Rapport BPAG/BPA entre 1 et 13	[142]
		20 mg/kg administration sublinguale	5	0,33 ± 0,13	-	0,72 ± 0,28 %	-	Rapport BPAG/BPA entre 237 et 634	
Porc	BPS	200 µmol/kg et 40 µmol/kg	10	0,53±0,28	-	55,7%	86,5 ± 23,9% (24h)	AUC BPSG entre 5 fois supérieure à AUC BPS	[76]
	BPA	200 µmol/kg et 438 µmol/kg	12	0,95±0,55	-	0,5%	62,2±15,8% (24h)	AUC BPAG environ 730 fois supérieure à AUC BPA	
Humain	BPSd8	0,1 mg/kg	6	0,7 ± 0,1	7,9 ± 1,1 / 7,7 ± 1,0	62 ± 5%	BPS : 1.72 ± 1.3 et BPSG : 54 ± 10% (72h)	-	[77]
Humain	BPSd4	8,75 µg/kg	7	0,57 ± 0,31	4,06 ± 0,38		BPS total 82% (entre 59–104%) et BPS : 2,5 entre 0,9–4,1% (48h)	30 % de l'AUC composé de BPS	[105]
Voie transcutanée									
Humain	BPSd8	1 mg/kg appliqué sur 40 cm ² sur l'avant-bras pendant 6h	6	-	-	<0,1%	BPSd8 : 0,004 ± 0,003 ; BPSGd8 0,09 ± 0,07% (72h)	-	[77]
Humain	BPA _{d6}	100 µg/kg appliqué sur l'avant-bras 4.91 cm ² pendant 12h	6/12	-	17,6 ± 7,69 (n=6)	Fraction absorbée (BPA Total) entre 1 et 2,2 %	0,998 ± 0,546 % n= 12 (72h)	8,81 ± 1,65 % (n=6) de BPA _{d6}	[136]

(M) mâle, (F) femelle

9. Mécanismes d'exposition fœtale

La gestation constitue une période critique vis-à-vis des bisphénols perturbateurs endocriniens potentiels. Ainsi, pour évaluer les risques liés à l'exposition *in utero* aux bisphénols, il est nécessaire de déterminer l'exposition fœtale, qui résulte d'une interaction complexe entre les clairances placentaires bidirectionnelles et le métabolisme maternel et fœtal.

La disposition du BPA a été étudiée dans l'unité materno-fœtale chez le singe après une administration par voie intraveineuse. L'exposition du fœtus, estimée par l'AUC du BPA aglycone, est plus faible que celle de la mère d'un facteur d'environ 0,45. Cependant, le BPA est plus persistant dans le compartiment fœtal, ainsi, la demi-vie d'élimination du BPA aglycone chez le fœtus est deux fois plus élevée que chez sa mère, de 5,3 h versus 2,8 h [130].

Le modèle de brebis gravide instrumentée en fin de gestation, un modèle physiologique pertinent vis-à-vis de l'Homme [143], a également été utilisé pour évaluer les mécanismes déterminant l'exposition fœtale au BPA, BPS et BPF [141], [144], [145]. La figure 9 résume les échanges transplacentaires du BPA et du BPS sur le modèle de brebis gravide. Dans le compartiment maternel, le BPS, comme le BPA sont principalement métabolisés en glucuronide et majoritairement éliminés dans les urines. La fraction de la dose de BPS transférée de la mère au fœtus (0,40 %) sont environ 10 fois inférieure à celle du BPA. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus sur le placenta humain perfusé (cf infra). Cependant, après son transfert dans le compartiment fœtal, seulement 26 % de la dose de BPS, contre 74 % pour le BPA, est rapidement éliminée par passage materno-foetal. Le fœtus métabolise le BPA et le BPS en leur métabolite principal, le bisphénol glucuronide. Environ la moitié du BPS restant dans le compartiment fœtal est glucurono-conjugué par le fœtus. Par ailleurs, le BPAG et le BPSG ont un passage fœto-maternel très limité, qui conduit à une accumulation de ces formes conjuguées dans le compartiment foetal. Ainsi, l'élimination du BPAG et du BPSG par le placenta est très lente et nécessite sa réactivation préalable en bisphénol aglycone dans le compartiment fœtal. Par conséquent, malgré un transfert materno-fœtal plus faible du BPS par rapport au BPA, la plus grande persistance du BPS dans le compartiment fœtal conduit à une exposition fœtale similaire au BPS et au BPA après une même exposition gestationnelle répétée [141], [144].

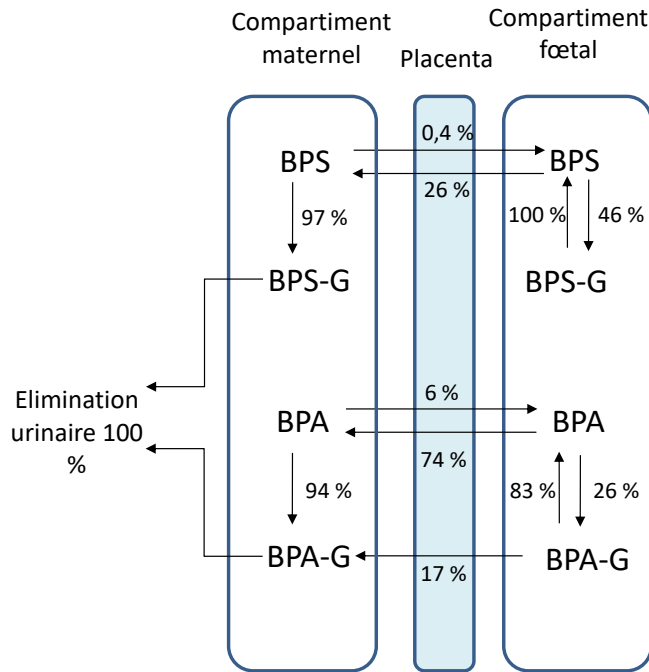


Figure 9 : Echange transplacentaire du BPS, du BPA et de leur principal métabolite : le BPSG et le BPAG, ces résultats sont issus des études de Grandin et al. 2018 et Gauderat et al. 2017.
 Note : le pourcentage représente la fraction d'une dose qui passe la barrière placentaire ou la fraction des molécules parentes qui se métabolisent en conjugués glucuronides.

Gingrich et al. (2019) [145] ont déterminé les évolutions temporelles des concentrations de BPA, BPS et BPF total (conjugué et non conjugué) dans le plasma de brebis gravides après une exposition sous-cutanée de 0,5 mg/kg. Le rapport fœto/maternel des concentrations de bisphénol total était de 1,31, 0,03 et 0,42, respectivement pour le BPA, le BPS et le BPF, ce qui indique que le BPF passe la barrière placentaire. Cependant, il n'est pas possible de comprendre les mécanismes déterminant l'exposition fœtale au BPF sans l'évaluation des concentrations de bisphénol aglycone.

Les transferts placentaires du BPA et du BPS ont également été étudiés sur un modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé. Le BPA passe facilement la barrière placentaire dans la direction materno-fœtale avec un taux de transfert de $36,0 \pm 8,34\%$ et $24,2 \pm 8,74\%$ à une dose de 45ng/mL et 250 ng/mL, respectivement. Ce taux de transfert est similaire à celui de l'antipyrine, une molécule utilisée comme marqueur de diffusion passive, ce qui indique que le mécanisme de transfert placentaire de BPA s'effectue par diffusion passive [100]. L'indice de clairance materno-fœtale du BPS (0,0852) était environ 10 fois plus faible que celui du BPA [99]. Dans le sens fœto-maternel, le taux de transfert du BPA est de $16,1 \pm 2,28\%$ et de $14,2 \pm 1,52\%$ à 45 et 250 ng/mL, alors que celui du BPS est de $5,85 \pm 1,22\%$. Les métabolites principaux du BPA et du BPS, le BPAG et le BPSG, passent très peu la barrière placentaire avec des taux de transfert de $3,81 \pm 1,41\%$ et $0,339 \pm 0,264\%$, respectivement, ce qui suggère que l'exposition du fœtus aux bisphénols conjugués pourrait résulter du métabolisme fœtal, au moins en fin de gestation. Dans le sens fœto-maternel, le taux de

transfert du BPAG est de $7,77 \pm 2,39\%$ et celui du BPSG est de $3,97 \pm 0,92\%$ [99], [100]. Ces données ont permis d'estimer le transfert de la mère au fœtus du BPA et du BPS chez la femme et le faible passage des métabolites ainsi que d'identifier la clairance fœtale du BPA et du BPS.

Récemment, des modèles toxicocinétiques physiologiques (PBTK) [146] ou semi-physiologiques [144] ont été développés pour prédire l'exposition fœtale. Ces modèles montrent une accumulation de BPAG et de BPSG dans le compartiment fœtal et indiquent que les concentrations de BPSG/BPAG dans le sang du cordon présentent peu de fluctuation et constituent donc des marqueurs pertinents de l'exposition du fœtus aux BPA/BPS durant toute la grossesse.

L'exposition fœtale à d'autres bisphénols émergents tels que le BPF et le BPAF a également été démontrée sur des modèles rongeurs. Après une exposition gestationnelle au BPAF chez le rat, le BPAF aglycone est transféré au fœtus et le passage de BPAF conjugué semble faible [147]. Après une administration orale de BPF radioactif à des rattes gravides, environ 1% de la dose a été retrouvée dans le compartiment fœtal, ce qui montre le passage placentaire du BPF [73].

En conclusion, le BPA, le BPAF et le BPS sont fortement absorbés par voie orale et principalement excrétés sous forme glucuronoconjuguée, ce qui indique que leur clairance est principalement déterminée par la glucuronidation hépatique. Ils subissent un important effet de premier passage hépatique qui est beaucoup plus élevé pour le BPA et le BPAF que pour le BPS. Pour ces substances avec des structures chimiques analogues, les différences TK majeures entre le BPA et le BPS (biodisponibilité 100 fois plus faible associée à une clairance 3 fois plus élevée) conduisent à une exposition systémique au bisphénol actif 250 fois plus élevée pour le BPS que pour le BPA après administration orale. Ces données TK indiquent que le remplacement du BPA par le BPS entraîne une exposition accrue à une substance à activité hormonale.

Le passage placentaire de différents bisphénols (BPA, BPS, BPAF et BPF) a été démontré sur différents modèles. Les formes glucuronidées (hydrosolubles) franchissent peu ou pas la barrière placentaire. Malgré les similarités structurales de ces bisphénols, il existe certaines différences entre les mécanismes déterminants l'exposition materno-fœtale (passage placentaire, métabolisme maternel ou fœtal...), avec par exemple un passage materno-fœtal 10 fois plus faible pour le BPS par rapport au BPA.

En terme d'évaluation du risque lié à l'exposition à cette famille de substances, il est crucial de déterminer les mécanismes d'exposition materno-fœtale. Cependant, compte tenu du

nombre croissant de bisphénols émergents utilisés comme alternatives au bisphénol A [148], et dans un souci de limiter les expérimentations animales, il serait intéressant de développer des outils prédictifs des paramètres TK. Les modèles QSAR permettent de relier quantitativement la structure des molécules à leurs activités/propriétés TK et pourraient ainsi être utilisés pour cette famille de substances afin de prédire le potentiel d'exposition des bisphénols émergents.

Partie 4 : Etudes quantitative des relations structure – activité (QSAR)

1. Principe et historique

Les études QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) sont basées sur le principe que des structures similaires ont des activités similaires. Ces études ont pour objectifs d'établir une corrélation mathématique entre les descripteurs structuraux des molécules et leur activité ou leur propriété (QSAR/QSPR) afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués et de prédire l'activité de nouvelles molécules (figure 10).

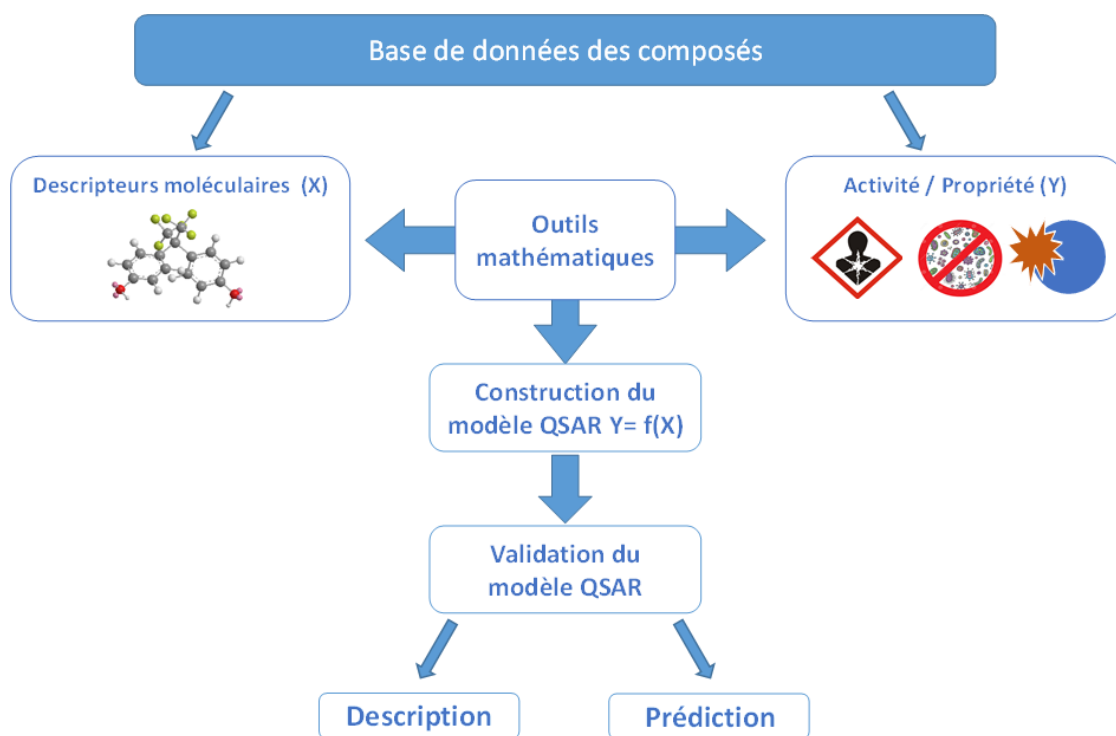


Figure 10 : Principe et étapes du développement d'un modèle QSAR.

Le concept QSAR apparaît au milieu du XIX^e siècle avec le postulat de Crum Brown et Fraser (1868-1869) : « *Il est évident qu'il doit exister une relation entre la constitution chimique et l'action physiologique d'une substance.* » [149] qui souhaitent comprendre les raisons de l'effet bénéfique ou toxique d'une substance sur l'organisme [149], [150]. Un siècle plus tard, Hansch et ses collaborateurs développent des modèles permettant de corréler l'activité biologique de composés de même famille avec leurs structures avec l'équation de Hansch : $\log(1/C) = aX_1 + bX_2 + cX_3 + k$, où X_1 décrit l'hydrophobicité, X_2 et X_3 sont respectivement des paramètres électrostatiques et stériques et k une constante, et C représente la concentration qui produit un effet [151]. Ainsi, ce modèle mathématique a été appliqué pour évaluer l'activité toxique, antibactérienne, hormonale, anesthésique,

cancérigène des substituants de composés phényles sur des modèles d'insectes, de rongeurs et *in vitro* [151], [152].

Par la suite, d'autres modèles non paramétriques ont été développés, par Free et Wilson [153] et Fujita et Ban [154] permettant d'évaluer la contribution de l'ajout de substituant à un composé sur son activité biologique. C'est à partir des années 80 que l'équation de Hansch a été adaptée pour inclure les interactions entre la molécule et le solvant dans des méthodes de type Linear Solvation Free-Energy Relationships (LSERs). L'hydrophobicité est généralement représentée par le volume de van der Waals, la polarisabilité (interaction dipolaire entre le soluté et le solvant) est utilisée pour remplacer le paramètre stérique et la capacité à former des liaisons hydrogènes (H-Bonding) avec le solvant est caractérisé généralement par deux termes : la capacité à accepter et à donner des liaisons hydrogènes [155], [156].

Avec l'essor des techniques informatiques et des outils numériques, de nombreux paramètres moléculaires se sont progressivement ajoutés à ceux initialement développés permettant de créer de larges bases de données moléculaires. Ces bases de données, associées à une plus grande accessibilité aux données expérimentales, ont favorisé le développement des applications QSAR et par conséquent, le nombre de publications qui a été multiplié par 6 entre la période 1971-2000 et 2001-2021 (figure 11).

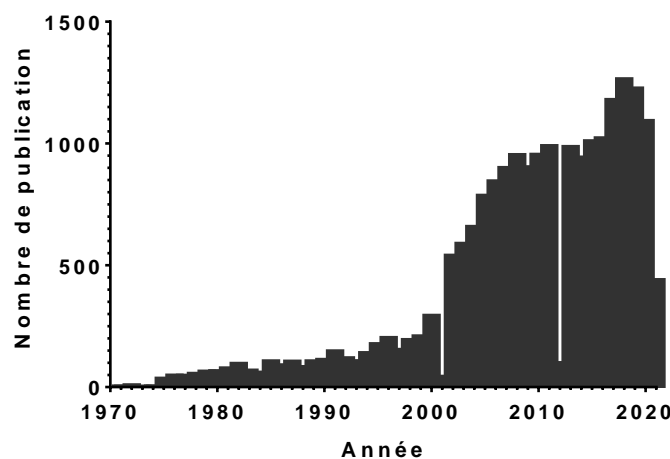


Figure 11 : Nombre de publications par années mentionnant le mot clé « QSAR » entre 1970 et 2021 dans la base de données bibliographique « PubMed.gov » (National Library of Medicine, MD, USA).

Les études QSAR reposent essentiellement sur la construction de la base de données qui va comprendre la sélection des données d'entrée, i.e. les descripteurs moléculaires, et la production des données de sortie, i.e. l'activité de la molécule. La relation entre la structure et l'activité des composés peut être établie selon différentes méthodes mathématiques, chacune générant plusieurs modèles avec des descripteurs différents. Ces modèles sont

ensuite sélectionnés et soumis à différentes étapes de validation afin d'évaluer leurs robustesses et leurs capacités prédictives (figure 10) [155], [157].

2. Descripteurs moléculaires

Les descripteurs moléculaires sont des données permettant de représenter la structure d'une molécule par des chiffres, c'est la représentation mathématique de la molécule. Todeschini et Consonni définissent les descripteurs moléculaires comme : « *le résultat final d'une procédure logique et mathématique qui transforme l'information chimique encodée dans une représentation symbolique d'une molécule en un nombre utile ou en un résultat d'une expérience normalisée* » [158]. En effet, les molécules peuvent être représentées par leur formule brute, leur formule topologique ou leur structure tridimensionnelle (figure 12). De la même manière, les descripteurs moléculaires peuvent être classés dans différentes catégories : 1) les descripteurs à 1 dimension (1D) dont la détermination s'appuie uniquement sur la formule brute de la molécule, 2) ceux à 2 dimensions (2D) qui prennent en compte la connectivité entre les atomes et les liaisons chimiques impliquées, et 3) les descripteurs à 3 dimensions (3D) qui représentent la géométrie de la molécule dans l'espace. A ces descripteurs s'ajoutent les propriétés physico-chimiques, thermodynamiques et électroniques des molécules qui peuvent être obtenues expérimentalement, par calculs quantiques ou *in silico* [159]–[161]. La liste des descripteurs d'une molécule n'étant pas exhaustive, seuls les descripteurs moléculaires usuellement utilisés dans les modèles QSAR et dans nos travaux de modélisation QSAR sont décrits dans ce chapitre.

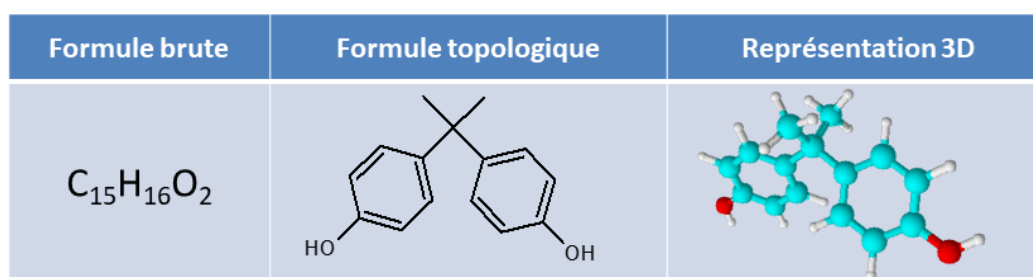


Figure 12 : Représentation du BPA avec sa formule brute, sa formule topologique et sa représentation dans l'espace (Chem 3D Ultra software (V17.1, Perkin Elmer informatics)).

2.1. Descripteurs 1D

Les descripteurs à une dimension sont liés à la formule chimique de la molécule. Ils correspondent au poids moléculaire, au nombre d'atomes appartenant à un certain groupe (halogènes, hétéroatomes...) et leurs propriétés, au nombre de donneurs ou d'accepteurs de liaison hydrogène que possède la molécule, à l'électronégativité. Ces paramètres ne dépendent pas de la structure en elle-même de la molécule. Certains descripteurs 1D peuvent également dépendre des substituants ou des groupes de substituant du composé,

comme le nombre de liaisons ou le nombre de cycles [162], [163]. Cependant, ces descripteurs sont peu discriminants car de nombreuses molécules présentant la même formule brute. C'est le cas du BPM et du BPP qui ont exactement la même formule brute ($C_{24}H_{26}O_2$) et ne diffèrent que par la position para et méta des groupements phénols sur le noyau phényle (Tableau 1).

2.2. Descripteurs 2D

Les descripteurs à deux dimensions considèrent la connectivité et l'arrangement des atomes entre eux ainsi que la nature des liaisons, ils sont également appelés descripteurs topologiques [155], [162]. Ils peuvent tenir compte des paramètres structuraux tels que la taille, la forme, la symétrie de la molécule mais également du type de liaison.

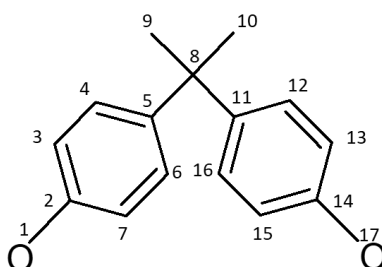


Figure 13 : Représentation du graphe $G=(V,E)$ de la molécule du BPA avec la numérotation des atomes.
Note : Le graphe ne prend pas en compte les atomes d'hydrogène pour le calcul des descripteurs topologiques.

Pour calculer ces paramètres, la structure de la molécule est représentée sous sa forme topologique (figure 12), celle-ci est ensuite transformée en termes mathématiques par le graphe $G=(V,E)$ avec V correspondant aux sommets (les atomes) et E , la relation entre 2 sommets (la liaison covalente). A titre d'exemple, le graphe moléculaire du BPA présenté en figure 13 servira à illustrer le calcul des descripteurs topologiques issus de matrices dérivées de ce graphe.

Ainsi, la matrice adjacente (A) renseigne la connectivité entre les atomes et la matrice distance (D) informe de la distance topologique entre chaque paire d'atomes [155]. La matrice adjacente est de taille $A \times A$ avec A le nombre d'atome hors hydrogène dans la molécule et $[A]_{ij} = 1$ si (i, j) sont adjacents sinon 0, un exemple de matrice adjacente est présenté pour le BPA (tableau 7). Le degré de chaque sommet (atome) peut être calculé selon la formule $\delta_i = \sum_{j=1}^A a_{ij}$, ce descripteur correspond au nombre d'atomes voisins que possède l'atome i .

Etude bibliographique - Partie 4

Tableau 7 : Matrice adjacente de la molécule de BPA avec $[A]_{ij} = 1$ si (i, j) sont adjacents sinon $[A]_{ij} = 0$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	δ_i
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
4	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
5	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
7	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
8	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	4
9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

La matrice distance, à l'instar de la matrice adjacente est de taille $A \times A$, elle s'écrit sous la forme $[D]_{ij}$ avec chaque d_{ij} correspondant au nombre de liaisons entre l'atome i et l'atome j en passant par le chemin le plus court. Par exemple, sur la figure 13, le chemin le plus court entre l'atome n°1 et l'atome n° 4 est de 3 liaisons. La matrice distance du BPA est représentée dans le tableau 8.

Tableau 8 : Matrice distance de la molécule de BPA avec dans chaque case la valeur d_{ij} le nombre de liaisons du chemin le plus court entre l'atome i et l'atome j.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	σ_i	η_i
1	0	1	2	3	4	3	2	5	6	6	6	7	8	9	8	7	10	87	10
2	1	0	1	2	3	2	1	4	5	5	5	6	7	8	7	6	9	72	9
3	2	1	0	1	2	3	2	3	4	4	4	5	6	7	6	5	8	63	8
4	3	2	1	0	1	2	3	2	3	3	3	4	5	6	5	4	7	54	7
5	4	3	2	1	0	1	2	1	2	2	2	3	4	5	4	3	6	45	6
6	3	2	3	2	1	0	1	2	3	3	3	4	5	6	5	4	7	54	7
7	2	1	2	3	2	1	0	3	4	4	4	5	6	7	6	5	8	63	8
8	5	4	3	2	1	2	3	0	1	1	1	2	3	4	3	2	5	42	5
9	6	5	4	3	2	3	4	1	0	2	2	3	4	5	4	3	6	57	6
10	6	5	4	3	2	3	4	1	2	0	2	3	4	5	4	3	6	57	6
11	6	5	4	3	2	3	4	1	2	2	0	1	2	3	2	1	4	45	6
12	7	6	5	4	3	4	5	2	3	3	1	0	1	2	3	2	3	54	7
13	8	7	6	5	4	5	6	3	4	4	2	1	0	1	2	3	2	63	8
14	9	8	7	6	5	6	7	4	5	5	3	2	1	0	1	2	1	72	9
15	8	7	6	5	4	5	6	3	4	4	2	3	2	1	0	1	2	63	8
16	7	6	5	4	3	4	5	2	3	3	1	2	3	2	1	0	3	54	7
17	10	9	8	7	6	7	8	5	6	6	4	3	2	1	2	3	0	87	10

A partir de cette matrice, l'indice de Wiener (W) est calculé par la formule $W = \frac{1}{2} * \sum_{i=1}^A \sigma_i$, avec σ_i correspondant à la somme des distances pour chaque ligne [164]. La distance maximale de chaque ligne, η_i , permet de déterminer le rayon topologique qui correspond au minimum des η_i et le diamètre topologique qui est le maximum des η_i . Ainsi pour le BPA, l'indice de Wiener est de 516, le rayon et le diamètre topologique sont respectivement de 5 et 10. Ces paramètres informent de la taille, l'étendue de la molécule et

de ses ramifications. Ils sont complétés par l'indice de forme, qui correspond au rapport entre la différence de diamètre et du rayon topologique sur le diamètre topologique et l'attribut de forme qui mesure les ramifications de la molécule.

La connectivité caractérise l'accessibilité des liaisons, elle est déterminée par le nombre d'électrons portés par chaque atome qui sont impliqués dans une liaison avec un atome qui n'est pas un hydrogène. La connectivité est proportionnelle à l'accessibilité [165]. L'indice de Balaban renseigne le volume de la molécule en prenant compte de l'aromaticité de celle-ci [166].

L'aire de la surface polaire (PSA) est également un descripteur 2D important dans le développement des QSAR, notamment pour la prédiction du transport des médicaments à travers les différentes barrières biologiques. Elle définit la somme des surfaces des atomes d'azote et d'oxygène et de leurs atomes d'hydrogène constituant la molécule [167].

Ces descripteurs topologiques permettent de décrire la structure et la connectivité de la molécule. Cependant, ils sont peu discriminants pour les molécules de structures proches qui ne diffèrent que par leurs types de substituants. Ainsi malgré leur différence de noyau (R dans la figure 1), le BPA et le BPS présentent les mêmes indices de Wiener, de Balaban, de connectivité et de forme mais sont discriminés par l'aire de la surface polaire.

2.3. Descripteurs 3D

Les descripteurs 3D représentent la géométrie de la molécule dans l'espace et donnent une information sur la conformation de celle-ci. Pour cela, la géométrie de la molécule est optimisée par des méthodes de calculs afin d'obtenir la configuration la plus stable par minimisation énergétique puis les coordonnées cartésiennes (x, y, z) de chaque atome sont déterminées. La forme et la taille des molécules sont déterminantes pour leur activité biologique. En effet, pour maximiser les interactions, la forme du composé et de la cible doivent être complémentaires. La taille et la forme des molécules sont caractérisées à travers plusieurs paramètres :

- Les descripteurs calculés à partir de la matrice géométrique, qui tiennent compte de la position des atomes les uns par rapport aux autres, de la longueur des liaisons, de l'angle entre les liaisons et de la torsion des angles [158].
- Des descripteurs de surface et de volume :

La surface de van der Waals qui correspond à la surface qui enveloppe la molécule représentée par des sphères à la position de chaque atome et dont le rayon est le rayon de van der Waals (distance entre deux atomes pour que les forces répulsives et attractives soient à l'équilibre) et avec la distance entre le centre de deux sphères

égale à la longueur de la liaison entre les 2 atomes (surface représentée en pointillée sur la figure 14 illustrant la structure géométrique du BPA).

La surface de la molécule accessible au solvant, correspond à la surface définie par le centre d'une sphère de solvant lorsqu'elle roule autour de la molécule [168] (ligne pleine blanche dans la figure 14). A la différence de la surface de van der Waals, le calcul de cette surface ne prend pas en compte les cavités inaccessibles à l'intérieur de la molécule. En revanche, la surface de solvant exclu (Connolly surface) est la surface délimitée lorsqu'une sphère roule sur la surface de van der Waals, une partie de cette surface est représentée en rouge dans la figure 14. Plusieurs paramètres dérivent de cette surface comme le volume de solvant exclu, qui est le volume à l'intérieur de la surface de Connolly [169].

L'index d'ovalité mesure l'écart de la forme d'une molécule par rapport à la forme sphérique, représentant le volume minimal [158]. Il est calculé avec le rapport entre la surface moléculaire et la surface minimale déterminée avec le volume de Van der Waals.

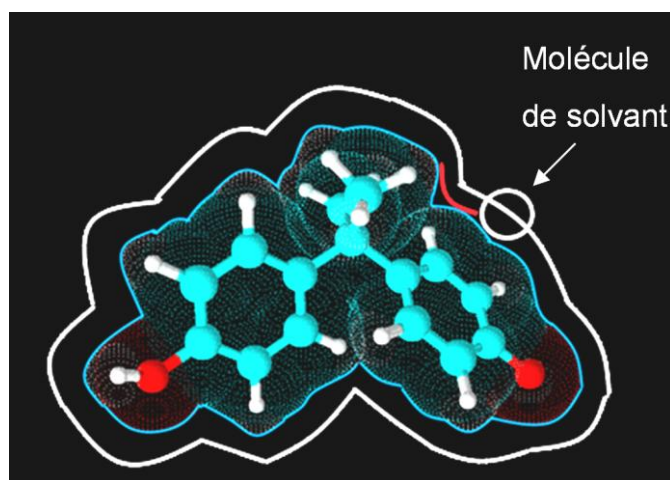


Figure 14 : Surface de la molécule accessible par le solvant (ligne continue blanche), de la surface de van der Waals (sphères en pointillés, ligne bleue) et de la surface de Connolly (ligne rouge) pour le BPA [170].

Ces descripteurs ont l'avantage d'être plus discriminants que les descripteurs topologiques notamment pour les isomères dont, par exemple, les molécules qui diffèrent seulement par leur configuration (ex : R, S). Cependant, ils nécessitent une grande capacité de calcul avec des méthodes d'optimisation de la géométrie des molécules influençant fortement les valeurs calculées. De plus, les calculs de ses descripteurs sont réalisés à partir d'une conformation rigide de la molécule, malgré la rotation libre de certaines liaisons [156], [163].

2.4. Descripteurs de chimie quantique

Les descripteurs électrostatiques et thermodynamiques sont calculés grâce à la chimie computationnelle.

Les descripteurs électroniques représentent la distribution des électrons autour de la molécule. Les plus couramment utilisés sont les énergies des orbitales moléculaires qui donnent une information sur la réactivité (électrophile ou nucléophile). L'énergie LUMO et HOMO sont le niveau énergétique le plus faible sans électron (électrophile) et le niveau énergétique le plus élevé contenant des électrons (nucléophile). La différence entre l'énergie LUMO et HOMO informe sur la stabilité de la molécule [171]. Le moment dipolaire et la polarisabilité sont également des descripteurs électrostatiques souvent utilisés [172], [173].

Les descripteurs thermodynamiques fréquemment inclus dans les études QSAR sont l'enthalpie standard de formation ΔH , l'énergie libre de Gibbs ΔG et l'énergie totale. Ces paramètres correspondent respectivement aux énergies nécessaires pour former une mole de molécule à partir de chaque atome la constituant à l'état standard ($T=298^\circ\text{K}$ et $P=1\text{ atm}$), l'énergie non dissipée sous forme de chaleur à pression et température constante ($\Delta G=\Delta H-T\Delta S$) et à la somme des énergies électronique, vibrationnelle et rotationnelle de molécule lorsque sa conformation 3D est la plus stable [174], [175]. Les valeurs critiques (température critique, pression critique...) sont également introduites dans les modèles QSAR. Ces valeurs correspondent aux conditions de volume, de pression et de température au-dessus desquelles les phases liquides et gazeuses ne sont plus séparées [176].

2.5. Descripteurs physico-chimiques

Les descripteurs physico-chimiques les plus populaires sont la lipophilie ($\log P$), la solubilité ($\log S$) et l'acidité (pKa), leur implication est fondamentale dans la caractérisation et la compréhension des mécanismes ADME. Les descripteurs physico-chimiques ont la particularité de pouvoir être déterminés expérimentalement mais ils sont aussi estimés par des prédictions de type QSAR [177]–[179]. Dans ce cas, ces descripteurs sont utilisés comme données de sortie dans la base de données des composés (figure 10).

3. Données de sortie

Les données de sorties correspondent aux activités biologiques et/ou aux propriétés de molécules pouvant être décrites et prédites en fonction de leurs structures chimiques. Ainsi, les domaines d'application de ces études sont très variés, ils concernent essentiellement l'industrie chimique, pharmaceutique et agroalimentaire mais sont également développées pour des études environnementales et par des agences réglementaires [155], [156]. Dans l'industrie chimique, les études QSAR sont de plus en plus utilisées pour identifier les « Lead » et prioriser le développement des molécules présentant les meilleures activités pharmaceutiques, biocides et pesticides. Ainsi, de nombreux médicaments tels que le Boceprevir (traitement contre l'hépatite C), le Donepezil (contre la maladie Alzheimer), le Raltegravir (contre le SIDA) ont été développés avec la contribution de ces méthodes *in*

silico [180]. En effet, ces méthodes, présentent une alternative aux études en laboratoire, elles permettent de réduire les coûts liés au développement de nouvelles molécules et les expérimentations animales [155], [181], [182]. De par ces nombreux avantages ces modèles ont suscité l'intérêt de nombreux scientifiques.

3.1. QSAR et perturbateurs endocriniens

Dans ce contexte, de nombreuses agences réglementaires souhaitent développer l'utilisation de modèle QSAR pour évaluer les risques chimiques, l'exposition et l'identification de perturbateurs endocriniens mais les résultats restent encore incomplets [181], [183]. Des lignes directrices ont ainsi été proposées par l'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) pour développer et valider ces modèles [184].

Certains ont été développés afin de prédire les possibles activités toxiques des substances sur la reproduction et le développement. Ils permettent de classer les composés en fonction de leurs toxicités ou de prédire leurs interactions avec certains récepteurs [185]–[187]. Le tableau 9 présente une partie de ces modèles disponibles commercialement avec les données de sortie associées au caractère perturbateur endocrinien.

Des études QSAR se sont également intéressées à l'activité des bisphénols, notamment, pour prédire leur activité anti-androgénique et décrire leurs interactions avec les récepteurs œstrogènes [188]–[190].

Tableau 9 : Modèles permettant de prédire le potentiel perturbateur endocrinien des substances.

Logiciel	Données de sortie
ADMET Predictor	<ul style="list-style-type: none"> - Liaisons aux récepteurs œstrogènes et androgènes - Toxicité sur la reproduction
ACD ToxSuite	<ul style="list-style-type: none"> - Liaisons aux récepteurs œstrogènes
CAESAR	<ul style="list-style-type: none"> - Classification toxique / non toxique pour le développement
Endocrine Disruptor Knowledge Base (EDKB) database (US FDA)	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison aux récepteurs œstrogènes et androgènes
Leadscope	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité sur la reproduction et le développement <i>in vivo</i> sur des rongeurs
Multicase	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité sur le développement et la reproduction des rongeurs
QSAR ToolBox	<ul style="list-style-type: none"> - Liaisons aux récepteurs œstrogènes
TOPKAT	<ul style="list-style-type: none"> - Dose maximale tolérée, LOEL chronique chez le rat
ToxBoxes	<ul style="list-style-type: none"> - Classification en fonction de la capacité de liaisons aux récepteurs œstrogènes
VirtualToxLab	<ul style="list-style-type: none"> - Estimation de la liaison aux récepteurs PPAR γ, thyroïdiens et androgènes

3.2. QSAR et ADME

Les QSAR aident également dans la sélection de composés présentant des propriétés pharmacocinétiques optimales [155], [180]. Ainsi, Lipinski et ses collaborateurs, dès la fin des années 90, établissent des règles structurales pour évincer de potentiel candidat présentant des propriétés d'absorption trop faibles [191]. Plusieurs modèles ont été développés pour prédire les paramètres déterminant l'exposition à des substances afin d'aider à la découverte de nouveaux candidats médicaments [192], [193]. Les paramètres généralement étudiés sont présentés dans le tableau 10, avec quelques exemples d'études QSAR décrites pour prédire ces paramètres.

Tableau 10 : Propriétés ADME prédites par des modèles QSAR.

Propriétés	Famille de composé (Références)
Biodisponibilité	Médicaments ou candidats [194]–[196]
Liaison à l'albumine humaine	Composés hétérogènes [197]–[200]
Passage de la barrière hémato-encéphalique	Composés hétérogènes [201], terpénoïdes [202]
Absorption intestinale humaine	Composés hétérogènes [203], [204], petites molécules [205]
Perméabilité transcutanée	Composés hétérogènes [206], [207], terpénoïdes [202]
Clairance	Céphalosporines [208], xénobiotiques [209], médicaments basiques [210], médicaments [211], composés hétérogènes [212], opioïdes [213]
Volume de distribution	Céphalosporines [208], médicaments [214], composés hétérogènes [212], [215], opioïdes [213]
Liaison aux transporteurs actifs	Alcaloïdes [216], 1-hexyl-3-phenylthioureas [217]
Passage de la barrière placentaire	Composés hétérogènes, antiviraux, Tocolytiques [218], Composés hétérogènes [219], [220], Polychlorobiphényle, pesticides organochlorés, diphényle éther polybromés [221]
Métabolisme	Médicaments [222], Composés hétérogènes [223]
Perméabilité intestinale (sur des modèle de Caco-2)	Médicaments ou candidats [224], Composés hétérogènes [225]

Des logiciels commerciaux sont également disponibles pour prédire des propriétés ADME des substances notamment au travers de la prédiction du métabolisme, du volume de distribution ou des liaisons aux protéines plasmatiques [226], [227]. Les données de sortie utilisées pour le développement des modèles sont souvent issues de la littérature. Ainsi, les modèles développés utilisent généralement une base de données de composés hétérogènes ou de médicaments mais peu de composés de la même famille chimique. Les données prédites peuvent être issues de données *in vivo* comme la biodisponibilité ou la clairance ou de données obtenues *in vitro* comme la perméabilité intestinale ou cutanée, les liaisons aux protéines plasmatiques ou aux transporteurs actifs.

3.3. QSAR et chromatographie

3.3.1. Les paramètres de rétention en données de sortie

Le concept QSRR (quantitative structure-retention relationship) apparaît dès la fin des années 80 [228]. Basé sur le principe fondamental de la chromatographie liquide, qui repose sur l'interaction entre le soluté, la phase mobile et la phase stationnaire, la rétention des

solutés sur phase stationnaire, dans des conditions d'élution données, ne dépend alors que de leurs structures moléculaires. Les études QSRR établissent des relations mathématiques entre la structure des composés et leurs rétentions chromatographiques, avec pour objectif de prédire la rétention de nouveaux composés et de comprendre les mécanismes de séparation moléculaire [229]. Des modèles empiriques ont ainsi été développés en prenant en compte l'interaction entre le soluté, la phase mobile et stationnaire du système par l'équation :

$$\text{Log } k = \text{Cte} + rR_2 + s\pi^H_2 + a\sum \alpha^H_2 + b\sum \beta_2 + vV_x,$$

Avec R_2 , π^H_2 , α^H_2 , β_2 , V_x qui représente la réfraction molaire du soluté, la polarisabilité du soluté, les liaisons hydrogènes acides et basiques et le volume molaire du soluté, respectivement. Les coefficients r , s , a , b et v sont dépendant de la phase mobile et de la phase stationnaire [230], [231].

L'apport de la chimie computationnelle associé à la modélisation moléculaire a permis le développement de modèles QSRR prédictifs de la rétention à partir de données non empiriques [232] et d'étendre leurs applications à différentes techniques chromatographiques telles que : la chromatographie liquide en phase inverse et normale, la chromatographie gazeuse, la chromatographie chirale, la chromatographie ionique, la chromatographie micellaire ou encore la chromatographie sur couche mince et d'affinité [232], [233]. En appréhendant les mécanismes de rétention, et de par leurs capacités de prédictions, ces modèles facilitent les développements analytiques et les transferts méthodologiques ainsi que l'identification d'impuretés ou de métabolites [234], [235].

3.3.2. Les paramètres de rétention comme descripteurs

Les paramètres de rétention peuvent également être utilisés comme données d'entrée dans un modèle afin de les lier à une activité ou une interaction biologique [236]. La rétention sur des phases stationnaires d'affinité (par exemple l'albumine sérique) ou de chromatographie de membranes artificielles immobilisées (IAM) ont été utilisées pour prédire le volume de distribution ou la fraction libre des molécules [237]. D'autres modèles ont été développés pour prédire l'activité anti-tumorale d'imidazoacridinones en utilisant les données de rétention sur des colonnes IAM, d'affinité et C18 [238]. Des modèles prédictifs de données pharmacocinétiques ont également été développés. Par exemple, l'absorption intestinale a été prédite en combinant des descripteurs classiques moléculaires et des données de rétention chromatographique sur des phases stationnaires IAM, des phases inverses et micellaires [204]. La relation entre des paramètres pharmacocinétiques et la rétention en chromatographie liquide de biopartition en microémulsion, utilisée dans certaines conditions

pour mimer le passage de membranes, a également été étudiée [213], [239]. De même, la chromatographie liquide sur couche mince est utilisée en tant que descripteur dans des modèles QSAR prédictifs des propriétés ADME de certaines familles de composés [240]–[242].

En conclusion, la rétention chromatographique est largement utilisée dans les QSAR, d'une part dans les études QSRR pour comprendre les mécanismes de rétention, classer les phases stationnaires et aider aux développements analytiques, d'autre part en tant qu'outils pour prédire des activités ou des données pharmacocinétiques.

4. Construction du modèle QSAR

4.1. Sélection des descripteurs

Face à la multiplicité des descripteurs moléculaires et expérimentaux, la sélection des descripteurs les plus pertinents est une étape essentielle dans la construction des modèles QSAR. Un nombre trop élevé de descripteurs améliore la qualité de l'ajustement du modèle mais il réduit considérablement l'efficacité prédictive de celui-ci. Il est donc nécessaire de trouver l'équilibre entre le nombre de descripteurs à inclure dans le modèle et le nombre de composés utilisés lors de sa construction. Différentes méthodologies de sélection de descripteurs ont été décrites et comparées pour générer des modèles QSAR [243].

4.1.1. Les méthodes classiques

Les méthodes les plus simples consistent soit à éliminer les descripteurs ayant un coefficient de corrélation avec la réponse étudiée (données de sortie) inférieur à un seuil choisi arbitrairement, soit déterminer les corrélations entre les descripteurs eux-mêmes et éliminer les multi-colinéarités, en ne sélectionnant qu'un descripteur lorsque plusieurs descripteurs sont corrélés [157], [244].

L'approche la plus couramment utilisée est la sélection de descripteurs dite « pas à pas ». Les descripteurs sont ajoutés un à un dans la régression, leur significativité et l'amélioration de l'ajustement de la régression est évaluée à chaque étape. Si le descripteur perd sa significativité dans la régression, il est retiré de la sélection. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que tous les descripteurs de la régression soient significatifs avec le meilleur ajustement [243].

Ces méthodes de sélection sont assez simples à mettre en place mais ne peuvent être appliquées que lorsque l'activité dépend linéairement du descripteur et sur un jeu de descripteur limité [243].

4.1.2. Recours à l'intelligence artificiel

Le recours à l'intelligence artificielle, tels que l'algorithme génétique, fondé sur le principe de l'évolution des espèces, ou les réseaux de neurones artificiels, permet de s'affranchir de ces problèmes de linéarité et de travailler sur des jeux de données plus conséquents [243]. Ces méthodes sont souvent utilisées à la fois pour sélectionner les descripteurs ayant une influence significative sur la réponse mais aussi pour construire le modèle à partir des données d'apprentissage [245].

4.2. Outils de modélisation

Les outils de modélisation permettent d'établir le lien entre les descripteurs et l'activité étudiée. Plusieurs catégories de méthodes peuvent être utilisées, les méthodes de régression, de classification et les méthodes d'apprentissage automatique (machine learning).

4.2.1. Méthodes de régression

Les régressions multilinéaires sont souvent utilisées dans les modèles QSAR, en déterminant les coefficients de l'équation :

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i * X_i$$

Avec Y la réponse (dans les QSAR, l'activité) ; X_i les descripteurs et a_n les coefficients de régression et a_0 la constante. Pour ne pas sur-ajuster le modèle, les coefficients de régression a_i doivent être significatifs et les descripteurs ne doivent pas être corrélés entre eux. Le principal avantage de la régression multilinéaire est qu'il est facile à mettre en œuvre et à interpréter. En effet, le signe du coefficient (positif ou négatif) est directement relié à la contribution du descripteur sur la réponse. Il est toutefois important de respecter l'équilibre entre le nombre de variables descriptives et le nombre d'observations qui ne doit en général pas excéder un rapport 1/5 [180], [244].

La régression des moindres carrés partiels (PLS : Partial Least Squares) permet de limiter le nombre de variables en générant des variables latentes orthogonales (i.e. Combinaisons linéaires des variables initiales) qui permettent d'extraire le maximum de la variance afin d'être le plus liées à la variance de la réponse. Ainsi, les résultats sont faciles à interpréter et permettent de prédire la valeur Y de nouveaux composés [157], [246], [247].

4.2.2. Méthodes de classification

Les molécules peuvent également être classées par catégories si la réponse n'est pas continue mais catégorielle. L'analyse discriminante linéaire (LDA) suit le même principe que

la régression multilinéaire et permet de séparer la réponse en différentes classes, avec la fonction :

$$L = \sum_{i=1}^n w_i * x_i$$

Avec x_i , les descripteurs et w_i les poids correspondants.

Le groupe auquel appartient un composé inconnu est déterminé grâce à la valeur de sa fonction discriminante L et à l'aide d'une valeur seuil (figure 15 A) [246], [247].

A l'inverse de l'analyse discriminante linéaire, l'analyse de cluster permet de classer les molécules sans avoir d'a priori sur la réponse. Basé sur le principe même des QSAR, l'analyse de cluster a pour but de maximiser la similarité des composés dans un même groupe et de maximiser les différences entre les groupes. Un dendrogramme est construit et il est possible d'identifier la position de substances actives dans les différents groupes (figure 15 B) [157], [246].

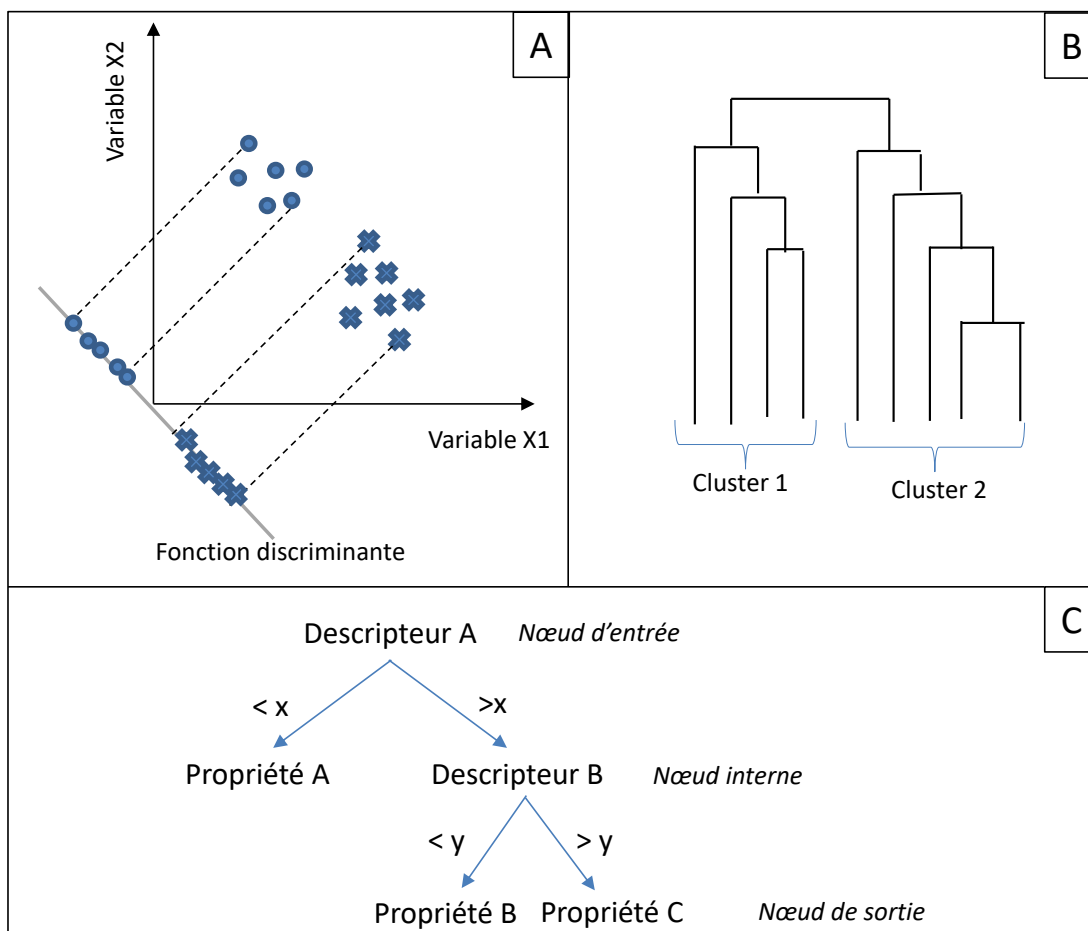


Figure 15 : Représentation schématique de l'analyse discriminante linéaire (A), de l'analyse de cluster représentée sous forme d'un dendrogramme (B) et de l'arbre de classification (C) avec x et y des conditions.

Les modèles d'arbre de classification peuvent être utilisés pour établir des études QSAR, ils sont construits en fonction du nombre de composés étudiés et de leurs caractéristiques avec une succession de nœuds et de règles (branches). Le premier nœud représente un descripteur moléculaire, il n'a pas de règles d'entrée, les nœuds internes pourvus de règles d'entrée, qui correspondent à un test de condition appliqué aux descripteurs, sont liés à d'autres nœuds par de nouvelles règles. Les nœuds de sortie correspondent à l'activité et possèdent également des règles d'entrée (figure 15 C). Ces arbres présentent l'avantage d'être intuitifs et faciles à comprendre. Cependant, il est difficile d'estimer de façon quantitative la réponse et les risques de sur-ajustement ne sont pas négligeables s'il y a des données manquantes ou si des erreurs se présentent lors de la construction du modèle [155], [247].

4.2.3. Méthode d'apprentissage automatique

L'apprentissage automatique (machine learning) est une sous-catégorie de l'Intelligence Artificielle visant à développer et appliquer des algorithmes informatiques pour donner à des logiciels la capacité d'« apprendre » à partir de données brutes, sans programmation explicite, afin d'effectuer ultérieurement une tâche spécifique. Les principales tâches exécutées par ces algorithmes sont la classification, la régression, le regroupement ou la reconnaissance des formes dans un grand ensemble de données [248].

La méthode des séparateurs marge (support vector machine) permet de classer les composés en séparant les groupes de données de sorte que la distance entre eux soit maximale. Le risque de sur-ajustement avec cette méthode est faible mais l'interprétation des déterminants moléculaires sur une activité est impossible [156], [157], [247].

La méthode de Random Forest est basée sur le principe d'arbre de décision (ou de classification) associé à un entraînement grâce à la séparation aléatoire à la fois des observations et des variables. Un jeu de données permet de construire les arbres (plusieurs centaines) et un jeu permet d'évaluer et d'entraîner les arbres. La réponse d'un composé inconnu est prédite à partir des réponses les plus données par les arbres, dans le cas de réponses qualitatives, ou par la moyenne des réponses dans le cas de réponses quantitatives. La méthode de Random Forest présente l'avantage d'être moins affectée par le bruit des données mais ses performances peuvent être réduites avec une petite taille d'échantillon ou un déséquilibre dans les données [156], [247].

Les réseaux artificiels de neurones, en plus d'être utilisés pour la sélection des descripteurs, sont utilisés pour la genèse du modèle QSAR. Des neurones d'entrée (assignées aux

descripteurs moléculaires) sont liés à une ou plusieurs couches de neurones cachées avec une fonction de transfert et associés à des poids. Les neurones de la couche cachée sont eux-mêmes liés aux neurones de sortie qui correspondent à la réponse prédite (figure 16). L'algorithme utilisé pour l'apprentissage est généralement un algorithme de rétro-propagation qui minimise l'erreur entre la valeur prédite et observée grâce à la dérivé de la fonction d'erreur. Les réseaux artificiels de neurones ont l'avantage d'être performants sur des données complexes mais il est difficile d'interpréter les mécanismes définissant une activité [156].

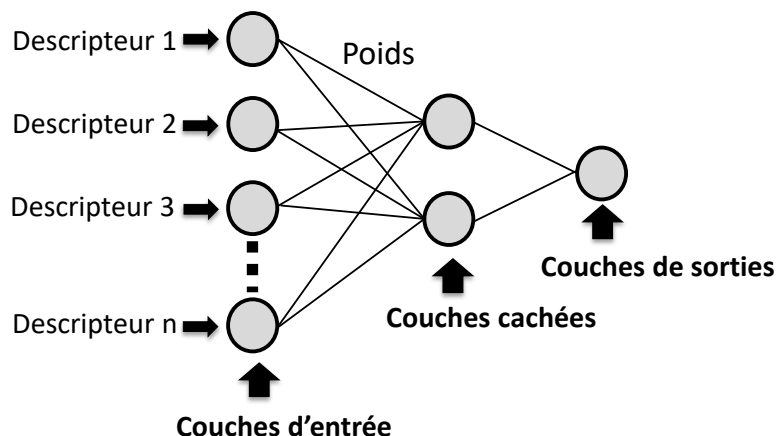


Figure 16 : Représentation schématique des réseaux artificiels de neurones.

En conclusion, l'ensemble de ces méthodes permettent de construire des modèles QSAR et présentent chacune des avantages et des inconvénients. Le choix de ces outils dépend principalement du jeu de données analysé et de la finalité de l'étude (description et/ou prédiction).

5. Validation des modèles QSAR

Une fois ces modèles construits à partir de la base de données, des étapes de validation sont nécessaires pour évaluer leurs performances et leurs capacités prédictives. Ainsi l'OECD préconise cinq principes pour faciliter la prise en compte des modèles QSAR dans les analyses réglementaires :

- 1) Déterminer de façon bien définie le paramètre de sortie (i.e. l'activité, la propriété...), surtout lorsque ce paramètre est obtenu avec différents protocoles expérimentaux et dans des conditions expérimentales différentes.
- 2) Utiliser un algorithme sans ambiguïté afin d'assurer la transparence de l'algorithme qui génère les données prédites en fonction de la structure et des propriétés physico-chimiques des composés.

- 3) Définir un domaine d'applicabilité du modèle pour connaître les limites prédictives du modèle en terme de structure, de propriétés physico-chimiques et de mécanismes d'action.
- 4) Détailler et utiliser des approches appropriées pour évaluer la qualité de l'ajustement, la robustesse et les performances prédictives du modèle.
- 5) Si possible, proposer une interprétation des mécanismes descriptifs interagissant sur l'activité ou la propriété d'intérêt [249].

De façon plus détaillée, le quatrième principe qui cible directement l'étape de validation distingue deux types de validation : 1) la validation interne qui évalue la qualité de l'ajustement et la robustesse du modèle et 2) la validation externe pour déterminer les capacités prédictives du modèle. Ces deux étapes se distinguent par leur jeu de données : la validation interne est évaluée à partir du jeu de données utilisé dans la construction du modèle alors que la validation externe évalue la qualité des valeurs prédites d'un jeu de données non utilisé dans le modèle mais qui appartient au domaine d'applicabilité. Généralement, l'ensemble du jeu de données est séparé en deux groupes : le groupe d'apprentissage (ou d'entraînement) et le groupe test qui contient environ 20 à 30 % des composés de l'ensemble des données (figure 17) [250].

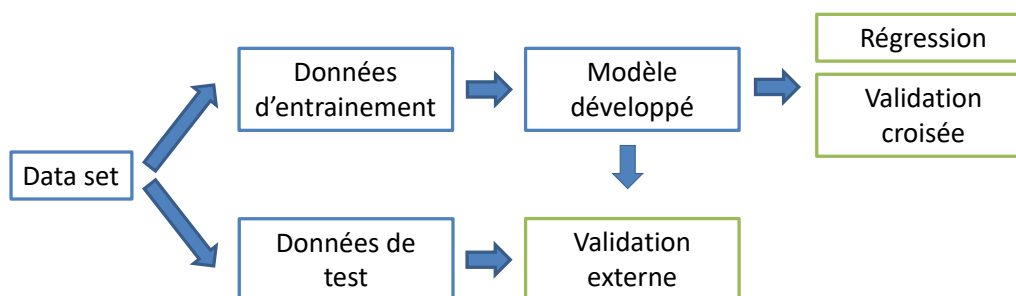


Figure 17 : Méthode de construction et de validation des QSAR.

5.1. Validation interne

Dans un premier temps, la qualité de l'ajustement est évaluée à partir de l'ensemble des données d'apprentissage. Les paramètres statistiques pour évaluer le modèle dépendent de l'outil de modélisation utilisé. Dans ce paragraphe, ne seront abordés que les paramètres de validation utilisés pour les régressions.

5.1.1. Qualité de l'ajustement

Les paramètres de validation de la régression sont déterminés en comparant les valeurs observées et les valeurs prédites par le modèle pour chaque composé appartenant aux données d'entraînement. La qualité de l'ajustement est évaluée numériquement en déterminant le coefficient de corrélation R^2 et la racine de l'erreur quadratique moyenne de la

calibration (RMSEC) (Tableau 11). Les valeurs du R^2 et le RMSEC donnent une information quantitative sur le modèle. Il n'existe pas de valeur seuil sur le R^2 établissant que la régression est considérée comme valide, c'est à l'utilisateur d'estimer la valeur satisfaisante pour l'application du modèle. De même pour le RMSEC, qui correspond à l'écart-type autour de la prédiction, il est difficile de déterminer une valeur seuil : il doit simplement être le plus petit possible. De façon générale, l'ajustement est considéré de bonne qualité lorsque la valeur du R^2 est supérieure à 0,65 [251]. Cependant, il est nécessaire de prendre en compte le nombre de descripteurs utilisés dans le modèle. En effet, augmenter le nombre de descripteurs dans la régression améliore la qualité de l'ajustement au risque d'entraîner un sur-ajustement. Pour éviter ce problème, il est préférable d'utiliser le R^2 ajusté (R^2_{adj}) qui prend en compte, dans son calcul, le nombre de variables utilisées dans le modèle [184].

Tableau 11 : Paramètres de validation des modèles QSAR avec le formule de calcul et leur critère de validation.

Paramètre	Formule	Critère de validation
R^2	$1 - \frac{\sum_{i=1}^I (y(i) - \hat{y}_c(i))^2}{\sum_{i=1}^I (y(i) - \bar{y})^2}$	>0.65
R^2_{adj}	$1 - \frac{\sum_{i=1}^I \frac{(y(i) - \hat{y}_c(i))^2}{I - A - 1}}{\frac{\sum_{i=1}^I (y(i) - \bar{y})^2}{I - 1}}$	>0.65
RMSEC	$\sqrt{\sum_{i=1}^I \frac{(y(i) - \hat{y}_c(i))^2}{I - A - 1}}$	Le plus petit possible
RMSECV	$\sqrt{\sum_{i=1}^I \frac{(y(i) - \hat{y}_v(i))^2}{I}}$	> RMSEC et le plus petit possible
RMSEP	$\sqrt{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} \frac{(y_e(i) - \hat{y}_e(i))^2}{n_{EXT}}}$	Le plus petit possible et proche du RMSECV
Q^2_{Loo}	$1 - \frac{\sum_{i=1}^I (y(i) - \hat{y}_v(i))^2}{\sum_{i=1}^I (y(i) - \bar{y})^2}$	>0.65
Q^2_{Ext}	$1 - \frac{[\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_e(i) - \hat{y}_e(i))^2] / n_{EXT}}{[\sum_{i=1}^{n_{TR}} (y(i) - \bar{y})^2] / n_{TR}}$	>0.5
CCC	$\frac{2 \sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_e(i) - \bar{y}_e)(\hat{y}_e(i) - \bar{\hat{y}}_e)}{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_e(i) - \bar{y}_e)^2 + \sum_{i=1}^{n_{EXT}} (\hat{y}_e(i) - \bar{\hat{y}}_e)^2 + n_{EXT} (\bar{y}_e - \bar{\hat{y}}_e)^2}$	>0.85

Avec : $y(i)$: données expérimentale du jeu de données d'entraînement; $\hat{y}_c(i)$: Valeurs prédites par le modèle; \bar{y} : moyenne des données expérimentale du jeu de données d'entraînement ; $\hat{y}_v(i)$: valeurs prédites par la validation croisée ; $y_e(i)$: valeur expérimentale du jeu de données de test; $\hat{y}_e(i)$: valeurs de prédiction externe ; \bar{y}_e : moyenne expérimentale des valeurs du jeu de données de test; $\bar{\hat{y}}_e$: Moyenne des valeurs prédites externes ; I : nombre d'échantillon dans le jeu de données d'entraînement ; A : nombre de descripteur, n_{TR} : nombre d'observation dans le jeu de données d'entraînement, n_{EXT} : nombre d'observation dans le jeu de données de test.

5.1.2. Robustesse – Validation croisée

La robustesse du modèle correspond à la stabilité des coefficients utilisés dans le modèle et par conséquent, à la stabilité de ses capacités prédictives en cas de perturbation du jeu de données d'apprentissage. Ainsi, la validation croisée ou *leave-one-out* (LOO) est la méthode la plus couramment utilisée pour évaluer cette robustesse dans les études QSAR. Cette validation consiste à retirer un composé du jeu de données et ré-évaluer les paramètres initiaux du modèle avec ce nouveau jeu de données. La réponse (\hat{y}_v) du composé exclu est déterminée en utilisant les nouveaux paramètres du modèle. Ce cycle est répété pour chaque composé du jeu de données d'entraînement [155], [157], [246], [251]. La robustesse du modèle, évaluée avec, la racine de l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée (RMSECV, tableau 11), doit être légèrement supérieur au RMSEC et avec le coefficient de corrélation Q^2_{LOO} dont la valeur seuil est généralement supérieure à 0,65 [251]. Cette technique permet de calculer la capacité prédictive du modèle pour un jeu de données initialement engagé dans la construction du modèle. Les résultats de la validation croisée doivent être utilisés avec précaution, en particulier si le nombre de composés utilisés dans la construction du modèle est très élevé car le retrait d'un seul composé dans un très grand ensemble de données perturbe peu les paramètres de la régression. Pour une meilleure évaluation des qualités prédictives du modèle, le même processus peut être réalisé en retirant plusieurs composés en même temps dans le jeu de données d'apprentissage : c'est la méthode de *leave-many-out* (LMO).

5.2. Validation externe

La validation externe permet d'évaluer les capacités prédictives du modèle, c'est-à-dire la capacité du modèle à prédire une activité biologique ou une propriété de composés non inclus dans la construction du modèle. Les composés dans le jeu de données test sont sélectionnés en amont de la construction du modèle (figure 17). Cette étape est complémentaire à la validation interne, car même si le modèle présente de bonne qualité de robustesse avec la validation croisée, i.e. un Q^2_{LOO} proche de 1, ce résultat ne préjuge en rien de la puissance prédictive du modèle [252]. Ainsi, les valeurs des composés du jeu de données test prédites par le modèle (\hat{y}_e) sont comparées avec les valeurs observées par inspection visuelle du graphe représentant les valeurs prédites en fonction des valeurs observées [253] et numériquement avec la racine de l'erreur quadratique moyenne de la prédiction (RMSEP, tableau 11) et le coefficient de corrélation externe Q^2_{Ext} [250], [251]. L'inspection visuelle permet d'identifier qualitativement les biais du modèles (sur ou sous-estimation du modèle). La valeur du RMSEP doit être la plus basse possible et proche du RMSECV. La valeur du Q^2_{Ext} doit généralement être supérieure à 0,5 [251]. Le coefficient de corrélation de concordance (CCC, tableau 11) ajoute une dimension supplémentaire au Q^2_{Ext}

car il mesure à la fois la précision (la distance entre les observations et la ligne d'ajustement) et l'exactitude (l'écart entre la ligne de régression et la ligne de pente 1 passant par l'origine, qui correspond à la ligne de concordance) [254]. Afin de garantir de bonne capacité prédictive du modèle, ce coefficient doit être supérieur à 0,85 [253]. Par ailleurs, quelle que soit la taille, le nombre et la composition des données, il est préférable, pour une validation externe, d'évaluer plusieurs critères de validation pour l'acceptation d'un modèle et de toujours visualiser graphiquement les données correspondantes [253].

En pratique, pour certains jeux de données, en raison du coût, du temps nécessaire et de l'éthique, il est difficile de réaliser des expériences supplémentaires sur de nouveaux composés pour réaliser la validation externe. Ce fait est également vrai lorsque les jeux de données à modéliser sont de petites tailles et ne peuvent pas être divisés [155], [157], [184], [255] et lorsque les réponses étudiées nécessitent des protocoles ayant recours à des expérimentations *in vivo* telles que les études ADME.

Objectifs et stratégie de la thèse

La synthèse bibliographique a permis de montrer une exposition croissante de la population à des bisphénols émergents. Ils sont utilisés dans les produits du quotidien, comme alternatives au bisphénol A dont l'utilisation est réglementée. Cependant, les profils toxicologiques de ces analogues structuraux du BPA indiquent que leur potentiel perturbateur endocrinien est comparable à celui du BPA [47], [256]. Le fœtus en développement est particulièrement sensible aux perturbations endocriniennes. Ainsi, la période de la gestation constitue une période à risque vis-à-vis de l'exposition aux bisphénols.

L'extrapolation des données toxicologiques obtenues *in vitro* ou sur des modèles animaux, à l'Homme, nécessite de prendre en compte des propriétés toxicocinétiques (TK) des analogues. Ces propriétés ont été étudiées pour le BPA et le BPS [76], en revanche, elles sont peu connues ou manquantes pour les bisphénols émergents. Cependant, le risque lié à l'exposition à ces analogues pourrait être exacerbé si leurs propriétés TK conduisent à augmenter leur exposition interne. L'évaluation TK de ces analogues est donc indispensable pour éviter que le remplacement du BPA devienne un cas de « substitutions regrettables ».

C'est dans ce contexte que s'insèrent ces travaux de thèse qui ont pour objectifs :

- 1- D'évaluer l'exposition fœtale humaine au BPA et à ses deux principaux substituts (le BPS et le BPF) à travers la quantification de biomarqueurs dans le sang de cordon ombilical ;
- 2- De déterminer les mécanismes TK d'exposition fœtale et maternelle à des analogues de BPA par des approches *ex vivo* et *in vivo* ;
- 3- De développer, à partir de ces paramètres TK, un modèle QSAR à l'aide des données moléculaires et chromatographiques des bisphénols, pour prédire le transfert placentaire des analogues structuraux du BPA.

Les bisphénols sont majoritairement métabolisés en acide glucuronide. Les études antérieures sur la disposition du BPA et du BPS et des formes glucuronides dans l'unité materno-fœtale ont montré que ces métabolites étaient des marqueurs pertinents de l'exposition fœtale durant toute la gestation [141], [144]. C'est la raison pour laquelle nous avons développé une méthode de dosage en chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) permettant la quantification du BPAG, BPSG et BPSG à l'état de trace dans le sang de cordon ombilical (Gély *et al.* 2021).

Objectifs et stratégie de la thèse

La présence de plusieurs bisphénols, comme le BPA, le BPS et le BPF dans le compartiment fœtal, indique que ces bisphénols passent la barrière placentaire. Ainsi, l'évaluation du risque lié à l'exposition prénatale nécessite d'estimer les paramètres déterminants l'exposition fœtale aux bisphénols et notamment leur transfert placentaire materno-fœtal. Pour cela, le passage placentaire de quinze bisphénols (BPA, BPS, BPFL, BPZ, 3-3BPA, BPC, BP4-4, BPF, BPM, BPP, BPAF, BPAP, BPB, BPE et BPBP) a été étudié en mélange sur un modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le département d'obstétrique et de gynécologie de l'hôpital Paul de Viguié au centre hospitalier universitaire de Toulouse. Nous avons montré que les 15 analogues de bisphénols présentaient une large gamme d'indices de clairance placentaire, avec un premier groupe dont le passage placentaire met en jeu essentiellement un mécanisme de diffusion passive et le second groupe dont le transfert placentaire est plus limité (Gély *et al.* 2021).

L'exposition fœtale aux bisphénols est déterminée par leur passage placentaire mais aussi par la disposition de ces molécules dans le compartiment maternel. C'est la raison pour laquelle, nous avons évalué le devenir de ces différents analogues structuraux dans l'organisme, en déterminant leurs paramètres toxicocinétiques, notamment la clairance et la biodisponibilité associée à la principale voie d'exposition : la voie orale. Une approche cocktail a été utilisée pour évaluer les paramètres TK des 12 BPs sur un modèle porcin, pertinent vis-à-vis de l'Homme en termes de physiologie digestive [257], [258]. L'approche en mélange des 12 BPs a été validée en comparant les paramètres TK du BPA et du BPS avec ceux précédemment obtenus pour ces deux BPs en administration unique. Les paramètres TK varient en fonction des analogues structuraux. En particulier, le BPB et le BPA ont les biodisponibilités les plus faibles (inférieures à 2%) alors que le BPS a la biodisponibilité la plus élevée (environ 50%), ce qui indique que leur potentiel d'exposition est très différent (article en cours de rédaction).

Ainsi, en dépit de leurs analogies structurales, les mécanismes déterminant leur disposition, comme le passage placentaire ou les paramètres TK, diffèrent en fonction des bisphénols. Pour éviter la substitution du BPA par d'autres bisphénols présentant un potentiel d'exposition élevé, il est nécessaire de développer des méthodes capables de prédire les mécanismes d'exposition pour tous les analogues structuraux de cette famille. Pour répondre à cet objectif, un modèle de type relations structure-activité (QSAR) prédictif du passage placentaire des bisphénols émergents a été développé. Notre hypothèse était que les données chromatographiques pourraient constituer des descripteurs pertinents et plus informatifs que les descripteurs moléculaires, pour caractériser le comportement des bisphénols dans les biophases. Nous avons ainsi développé un modèle QSAR construit de

Objectifs et stratégie de la thèse

façon classique avec des descripteurs moléculaires, et nous l'avons comparé à des modèles QSAR, prenant en compte à la fois des descripteurs chromatographiques et des descripteurs moléculaires ou des descripteurs chromatographiques seuls (article en cours de rédaction).

Chapitre 2 :

Études expérimentales

Chapitre 2 : Etudes expérimentales

1. Développement d'une méthode analytique pour les études de biosurveillance : le dosage de bisphénols glucuronides (BPAG, BPSG et BPSG) à l'état de trace dans le sang de cordon ombilical

1.1. Contexte et objectifs

En raison des restrictions de l'utilisation de BPA dans les contenants alimentaires et les papiers thermiques, les industriels ont progressivement remplacé ce contaminant par des molécules de structures analogues telles que le BPS et le BPF. Ainsi, la population est de plus en plus exposée à ces bisphénols émergents. En effet, des études de biosurveillance montrent une augmentation de la détection de ces analogues dans les urines ces dernières années [83]–[85]. De plus, des études *in vitro* ont montré que ces analogues ont un potentiel perturbateur endocrinien similaire à celui du BPA [16], [27]–[34]. Or le fœtus en développement est particulièrement sensible à la perturbation endocrinienne. Il est donc primordial d'évaluer l'exposition prénatale à ces bisphénols afin d'évaluer le risque lié à l'exposition à ces contaminants.

Pour cela, il est nécessaire de disposer de méthodes analytiques fiables permettant la quantification des bisphénols ou de leurs métabolites dans ces fluides biologiques. Les concentrations plasmatiques de bisphénol mesurées dans la littérature sont comprises entre 0,01 et 20ng/mL [87], [259]. Cependant et notamment pour le BPA, ces concentrations élevées sont controversées, car elles ne sont pas compatibles avec les données TK et les estimations de l'exposition alimentaire [259]. Elles pourraient être expliquées par des contaminations pouvant se produire lors des processus de collecte, de préparation et d'analyse des échantillons [259]. L'alimentation est la principale voie d'exposition aux bisphénols, dans l'organisme, les bisphénols (A et S notamment) sont rapidement éliminés. Il en résulte des fluctuations importantes des concentrations plasmatiques en bisphénol aglycone au cours du temps, notamment en fonction de la prise alimentaire. Des études *ex vivo* et *in vitro* ont montré un passage placentaire très limité du BPAG et du BPSG. Cela signifie que les formes glucuronidées du BPA et du BPS, détectées dans le compartiment fœtal proviennent essentiellement de la glucuroconjugaison des bisphénols par le fœtus [141], [144]. En outre, ces métabolites s'accumulent dans le compartiment fœtal en raison de leur incapacité à franchir la barrière placentaire. En effet, leur élimination du compartiment fœtal est lente et nécessite leur hydrolyse préalable en BPA/BPS. Ainsi, les concentrations fœtales en BPA/BPS sous formes glucuronidées subissent peu de fluctuations et représentent l'exposition du fœtus tout au long de la gestation [141], [144]. L'ensemble de

ces considérations indiquent que le dosage direct des métabolites glucuroconjugés constitue une stratégie pertinente pour évaluer l'exposition humaine liée aux bisphénols, tout en s'affranchissant des contaminations environnementales.

Les enjeux analytiques que constituent le dosage de ces métabolites polaires et l'analyse de traces, ont nécessité le développement d'une méthode de dosage en UHPLC-MS/MS associée à une optimisation de la préparation d'échantillons à l'aide de plans d'expériences (Gély *et al.* 2021). La méthode optimisée et validée a été présentée lors d'une communication orale, d'un flash poster et a été publiée dans la revue *Environnement International*.

1.2. Article 1

Les données supplémentaires associées à cet article sont présentées en annexe 1.



A new LC/MS method for specific determination of human systemic exposure to bisphenol A, F and S through their metabolites: Application to cord blood samples

C.A. Gély^{a,b}, A. Huesca^a, N. Picard-Hagen^b, P.L. Toutain^c, A. Berrebi^d, G. Gauderat^b, V. Gayraud^b, M.Z. Lacroix^{a,*}

^a INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

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

^c The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

^d Hôpital Paule de Viguier, Service de Gynécologie Obstétrique, CHU Toulouse, F-31059 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Handling Editor: Lesa Aylward

Keywords:
Bisphenol analogs
Bisphenol glucuronides
Dansyl chloride
Cord plasma
LC/MS

ABSTRACT

Due to restriction of the use of BPA, several structural analogues such as BPS and BPF have been proposed for its replacement in many consumer products. This has increased the prevalence of BPS and BPF in urine from tested cohorts. However, these substitutes have similar endocrine disrupting properties to BPA, particularly on reproductive and metabolic functions, which suggests that fetal exposure to these analogues could be of concern for human health. Bisphenols (BPs) are mainly metabolized to glucuronides (BP-Gs), which are considered as inactive but provide a relevant marker of fetal exposure during pregnancy. In most instances, these metabolites are indirectly quantified after hydrolysis and measurement of the corresponding native BPs, which may lead to bias due to spurious BPs contamination during blood collection and/or analyses. We have developed a new method for direct quantification of BP-Gs, which has the advantage of not being affected by errors related to the presence of BPs. First, BP-Gs were extracted from plasma by anion exchange solid phase extraction. They were then labelled with dansyl chloride, using experimentally-optimized incubation conditions, after which the dansyl derivatives were injected into an on-line SPE-UHPLC/MS/MS system. The performance of the method, in terms of sensitivity, precision and accuracy, was evaluated in plasma over a concentration range of 0.05–5 ng/mL. The intra- and inter-day CV% precision were lower than 20% with accuracies ranging from 93% to 115%. The limit of quantification was set at 0.05 ng/mL. The method was then applied to measure BP-Gs in forty-four cord plasma samples. Although no BPF-G was found, BPA-G and BPS-G was determined in almost half of the cord plasma samples with concentration ranges nd-0.089 ng/mL and nd-0.586 ng/mL, respectively.

1. Introduction

Due to restrictions of its use, bisphenol A (BPA) has gradually been replaced by structural analogues such as bisphenol S (BPS) and bisphenol F (BPF) in many consumer products. The extent of this substitution has been revealed by the high prevalence of BPS and BPF in urine from cohorts of pregnant women (Derakhshan et al., 2019; Hu et al., 2019; Jiang et al., 2020), thus raising the question of the risk of fetal exposure to these endocrine-active compounds. Indeed, *in vitro* studies have shown that the potencies of the estrogenic activities

displayed by BPS and BPF are of the same order of magnitude as those of BPA (Pelch et al., 2019; Rochester and Bolden, 2015). Animal studies of the developmental effects of exposure to these bisphenols (BPs) on functions sensitive to BPA disruption, such as reproduction and metabolism, suggest that fetal exposure to these analogues could be of concern for human health (see Pelch et al. 2019 for review). BPs are mainly metabolized to glucuronides (see Gramacik Skledar et Peterlin Masić 2016 for review). Although BPs glucuronides (BP-Gs) are considered as inactive metabolites, *in vitro* studies have suggested that BPA-G can exert biological activities (Boucher et al., 2015; Viñas et al.,

* Corresponding author at: Marlene LACROIX, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles - BP 87614, 31076 Toulouse cedex3, France.

E-mail addresses: clemence.gely@inrae.fr (C.A. Gély), alicia.huesca@inrae.fr (A. Huesca), nicole.hagen@envt.fr (N. Picard-Hagen), pltoutain@wanadoo.fr (P.L. Toutain), aberrebi@orange.fr (A. Berrebi), glenn.gauderat@gmail.com (G. Gauderat), veronique.gayraud@envt.fr (V. Gayraud), marlene.lacroix@envt.fr, marlene.lacroix@envt.fr (M.Z. Lacroix).

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106429>

Received 29 September 2020; Received in revised form 20 January 2021; Accepted 27 January 2021

Available online 23 February 2021

0160-4120/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

2013). Since some of the related effects may result from possible deconjugation of BPA-G (Gayraud et al., 2015), these observations highlight the added value of quantifying both the plasma concentrations of parent BPs and their metabolites during human biomonitoring studies.

Previous toxicokinetic (TK) studies undertaken in pregnant ewes have shown that BPA, BPS and BPF can cross the placenta (Corbel et al., 2013; Grandin et al. 2018; Gingrich et al. 2019). Although the maternal-to-fetal transfer of BPS in ewes (0.4% of the dose, Grandin et al. 2018), was lower than that of BPA (6%, Corbel et al., 2013; Gauderat et al., 2016), the predicted fetal plasma concentrations of unconjugated BPS were similar to those of BPA due to the slow elimination of BPS from the fetal compartment (Grandin et al. 2018). The *ex vivo* model of human perfused placenta showed that the human maternal-to-fetal placental clearance of BPS was of the same order of magnitude as that estimated in sheep experiments and that BPS-G cannot cross the placenta (Grandin et al. 2019). These various results indicate that BPS-G in fetal blood is mainly of fetoplacental origin and, like BPA-G, may represent a relevant marker of fetal exposure to BPs (Gauderat et al., 2017, 2016). While a large number of studies have assessed BPA concentrations in cord blood, currently, only three assessments of BPA analogues in human cord blood have been carried out one from direct measurement of unconjugated BPS and BPF (Pan et al., 2020) and the other two from indirect measurement of total BPS (unconjugated and conjugated) using enzymatic hydrolysis (Liu et al., 2017b; Zhang et al., 2020). However, there is concern that evaluations of BPs concentration could be biased due to external contamination of the samples during blood collection and/or analyses (Ye et al., 2013). In contrast, direct measurement of BP-Gs has the advantage of not being affected by this kind of bias due to the absence of BP-Gs in the environment.

Direct analysis of BP-Gs presents a challenge because the glucuronide moieties make these compounds difficult to extract from biological matrices, retained in liquid chromatography and efficiently ionize in mass spectrometry. All of the few methods developed to assay BP-Gs in biological matrices have simultaneously quantified BPA and its metabolites (Andra et al., 2016; Gerona et al., 2016; Ho et al., 2017; Lacroix et al., 2011; Provencher et al., 2014; Völkel et al., 2005) and those of BPS and BPS-G (Grandin et al. 2017). Some of these methods, intended for application in toxicokinetic studies, are not sensitive enough to assess the levels of residual human exposure to BPs (Grandin et al., 2017; Lacroix et al., 2011; Völkel et al., 2005). To increase the sensitivity of BPs detection by mass spectrometry, several methods involved derivatization with dansyl chloride or its analogues (Li and Franke, 2015; Regueiro et al., 2015; Vitku et al., 2015). These reagents have been shown to improve selectivity and the level of detection by switching negative electrospray ionization (ESI-) to positive electrospray ionization (ESI+) and increasing the m/z ratio. In a previous study, these derivatization methods were already described for human biomonitoring BPA-G and BPS-G in urine (Rancié et al., 2019) but they have never been applied to assay BP-Gs in human plasma, which required higher sensitivity.

In this context, the objective of the present study was to develop a reliable method for quantifying the glucuronidated metabolites of BPA and its major substitutes, BPS and BPF (BPA-G, BPS-G and BPF-G) in human plasma according to the European Medicines Agency guidelines on bioanalytical method validation (European Medicines Agency, 2009). To achieve this, the derivatization reactions with chloride dansyl and the on-line solid phase extraction (SPE) procedures were first optimized using experimental designs. The performance of the method was assessed by measuring BP-Gs concentrations in human cord plasma samples.

2. Material and method

2.1. Chemicals

Acetonitrile (AcN) and methanol (MeOH) were LC/MS quality and purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Formic acid 98% (HCOOH) was purchased from Fluka Analytical (St Louis, Missouri, USA), sodium bicarbonate was purchased from Fisher BioReagents (Gell, Belgium) and water was obtained from an ultrapure water system (PureLab Classic, Veolia Water). Dansyl chloride (DnCl), 1-methylimidazole-2-sulfonyl chloride (ISCl), pyridine-3-sulfonyl chloride (PsCl), ammonium acetate > 99.9%, ammonium hydroxide > 99.99% and sodium carbonate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Bisphenol A mono β -D-glucuronide (BPA-G), bisphenol F mono β -D-glucuronide (BPF-G) and bisphenol S mono β -D-glucuronide sodium salt (BPS-G), used as analytical standards, and bisphenol S mono β -D-glucuronide d8 sodium salt (BPS-Gd₈) and bisphenol A ¹³C₁₂ (mono β -D-glucuronide) (BPA-G ¹³C₁₂) used as internal standards (IS) were provided by Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto, Canada).

2.2. Instruments and analytical conditions

2.2.1. Instruments

BPA-G, BPS-G and BPF-G were identified and quantified using a 2D Acquity ultra performance liquid chromatography system (2D-UPLC®) coupled to a Xevo® triple quadrupole mass spectrometer (Waters®, Milford, MA, USA). The two UHPLC pump were connected with the autosampler and the mass spectrometer by two 6-port valves integrated in the column heater (Fig. 1). The first of the two UHPLC pumps in the chromatographic system was used for extraction with on-line SPE and the second pump for analysis. BPA-G, BPS-G and BPF-G were first loaded on the XBridge® C8 Direct Connect HP cartridge (2.1x30mm, 10 μ m) then separated on an Acquity UPLC® CSH™ Phenyl-Hexyl column (2.1x100mm, 1.7 μ m), with both columns set at 40 °C. Samples were ionized in ESI positive ion mode. The capillary voltage and source temperature were set at 3.5 kV and 150 °C, respectively. The desolvation temperature and nitrogen flow rate were set at 600 °C and 800 L/Hr,

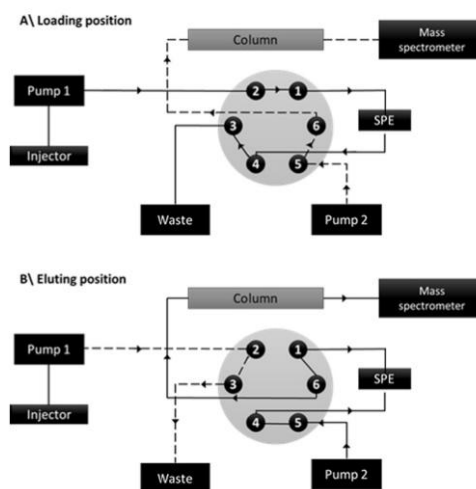


Fig. 1. Configuration of the on-line SPE UHPLC/MS/MS system. A/ Loading position: the pump 1 eluted the SPE cartridge at 1 mL/min. The pump 2 equilibrated the analytical column. B/ Eluting position: the pump 2 eluted both the SPE cartridge and the analytical column.

respectively. Argon was used as the collision gas.

2.2.2. UHPLC-MS-MS analysis

The solvent used for the on-line SPE and the analytical pump were H₂O acidified with 0.1% HCOOH (%A) and AcN acidified with 0.1% HCOOH (%B). The BPA-G, BPS-G and BPF-G were pre-concentrated on the C8 Cartridge under the following conditions: t(0 → 0.5 min) 80%A, 1 mL/min flow rate; t(0.5 → 0.6 min) 0%A, 0.1 mL/min; t(0.6 → 8 min) 0%A, 1 mL/min; t(8 → 9 min) 80%A, 1.0 mL/min; t(9 → 10 min) 80%A, 1.0 mL/min. The BP-Gs were eluted on a Phenyl-Hexyl column at 0.35 mL/min using a linear gradient: t(0 → 0.5 min) 70%A; t(0.5 → 9 min) 70% A → 5 %A; t(9.0 → 9.1 min) 70%A. The valves switched from loading to eluting position at t = 0.5 min and went back to their initial position at t = 5 min (Fig. 1). The BPA-G, BPS-G and BPF-G and IS were detected in ESI⁺ by multiple reaction monitoring (MRM) mode. MRM transitions of analytes and IS with cone voltages and collision energies are given in Table 1. Chromatographic data were monitored by Masslynx 4.1® software (Waters®, Milford, MA, USA).

2.3. Preparation of solution

Stock solution were prepared for each BP-G by dissolving 1 mg of powder in 1 mL AcN/H₂O (50/50). Working solutions were prepared by serial dilution of BPA-G, BPS-G and BPF-G in AcN/H₂O (50/50) to obtain final concentrations of 100 µg/mL, 1000, 100 and 20 ng/mL of each analyte. Standard and quality control (QC) solutions were obtained by diluting working solutions in BPS-free human plasma to obtain concentrations ranging from 0.05 to 5.0 ng/mL for the standard curve calibrator and at 0.15 to 0.375 and 3.75 ng/mL for QC samples. The solution of internal standard (IS, BPS-Gd₈, BPA-G¹³C₁₂) was prepared in H₂O/MeOH: 50/50 at 50 ng/mL and stored at 4 °C.

2.4. Sample preparation

2.4.1. Extraction procedure

BP-Gs were extracted from the matrices with HR-XAW cartridges (Macherey Nagel, Düren, Germany). The samples (200 µL) and 50 µL of IS (BPS-Gd₈, BPA-G¹³C₁₂ 50 ng/mL) were loaded on the SPE cartridges previously conditioned with 1 mL MeOH and 1 mL ultrapure water. The sorbent was rinsed with 1 mL of 25 mM ammonium acetate (AcONH₄) and 1 mL MeOH. The cartridges were dried for 5 min and the analytes were eluted with 1 mL MeOH, 1% NH₃. The elution solutions were evaporated to dryness at 45 °C under nitrogen flow.

2.4.2. Derivatization

The extracts were reconstituted in 100 µL HCO₃ buffer (pH 7.5, 250 mM) and derivatized after addition of 100 µL dansyl chloride (1 mg/mL in AcN) at 38 °C, 500 rpm and for 45 min. The solution was centrifuged at 4 °C and 20000g for 10 min and acidified with 0.2 µL of HCOOH. One hundred microliters of supernatant were collected in 300-µL LC/MS

Table 1
MRM transitions of BP-Gs derivatized with DnCl with their respective cone voltages, collision energies and retention times (RT).

	Dn-BPA-G	Dn-BPF-G	Dn-BPA-G ¹³ C ₁₂	Dn-BPS-G	Dn-BPS-Gd ₈
m/z Precursor ion	638	610	650	660	668
Cone voltage (V)	26	30	26	32	32
Product ion 1 ^a	462	434	474	484	492
Ecoll (eV)	24	24	24	24	26
Product ion 2	171	171	171	171	171
Ecoll (eV)	46	48	46	48	48
RT (min)	5.5	5.0	5.5	4.6	4.6

^a MRM transition with product ion 1 was used for quantification.

quality glass inserts adapted for 2 mL-vials screwed with teflon caps (Macherey Nagel).

2.5. Optimization

2.5.1. Derivatization process

2.5.1.1. General set up. Three reagents were tested for derivatization: Dansyl chloride (DnCl), 1-methylimidazole-2-sulfonyl chloride (ISCl), and pyridine-3-sulfonyl chloride (PSCl). Dansyl chloride was retained for the subsequent phase of optimization. BP-Gs were diluted to 20 ng/mL in H₂O/AcN (50/50) in order to ensure sufficient detection sensitivity for each condition of the experimental design. BP-Gs (100 µL) were derivatized with DnCl (1 mg/mL in AcN) in 1.5 mL microtubes by adding 100 µL/200 µL of HCO₃ buffer (pH 7.5–11) and 200 µL/100 µL of DnCl. The volume of the buffer was adjusted in order to keep the same final volume for the different tests on the ratios of the volume between DnCl and the sample (V_{DnCl}/V_{sample}). The microtubes were heated from 25 °C to 60 °C and stirred at 500 rpm (Mixing Block MB-102 BIOER) for 5 to 90 min. The resulting mixture was centrifuged at 4 °C and 20,000 g for 10 min (Centrifuge 5417R Eppendorf). Twenty microliters of each derivatized solution were injected into the on-line SPE-UHPLC/MS/MS system.

2.5.1.2. Experimental design. The response to be optimized was the peak area, using the factors of incubation temperature, reaction time, buffer pH and ratio of the volume between DnCl and the sample (V_{DnCl}/V_{sample}). Firstly, the effect of each factor and their interactions were studied with a Hadamard matrix built with two levels and four factors, which lead to carry out sixteen experiments. The first experiment was repeated five times to estimate the experimental variability in order to assess the statistical significance of the effect of each factor and their interactions through an Analysis of Variance model (ANOVA, $p < 0.1$). Then, a Doehlert design was performed to model the evolution of BPS-G, BPA-G and BPF-G peak area as a function of buffer pH and incubation temperature (Supplemental data S1).

2.5.1.3. Reaction kinetics. The derivatization reaction was monitored for 90 min under the optimized conditions (i.e. pH 7.5 and T = 38 °C) with a solution of BPA-G, BPF-G and BPS-G at 20 ng/mL to determine the optimal reaction time. The solutions were collected every 5 min and analyzed by UHPLC/MS/MS.

2.5.2. On-line SPE pre-concentration

Three commercially available cartridges were tested: C8 (XBridge® C8 Direct connect HP 2,1 × 30 mm, 10 µm, Waters), C18 (XBridge® C18 Direct connect HP 2,1 × 30 mm, 10 µm, Waters) and HRX (Chromabond 15 µm, Macherey Nagel, Düren, Germany). Charge time and H₂O initial percent value were optimized using the Doehlert experiment design for each cartridge (Supplemental data S3).

2.6. Performance of the method

The performance of the method was checked in terms of linearity, inter- and intra-day precision and accuracy, and sensitivity (European Medicines Agency, 2009). Limit of blank (LOB) was evaluated by measuring 8 replicates of a blank sample and calculating the mean peak area (without IS) and the standard deviation (SD) with the following equation $LOB = \text{mean blank} + 1.645 \cdot SD(\text{blank})$. The LOD (limit of detection) was calculated according to the following equation $LOD = 3.3 \cdot SD(LLOQ)/S$. SD(LLOQ) was the standard deviation of the response at the lower limit of quantification (LLOQ). S was the slope of a line drawn between the origin and the mean response of the eight replicates at LLOQ, the response being the peak area ratio of the analyte to IS. The LLOQ was evaluated with eight replicates of plasma samples spiked at

0.05 ng/mL and was set as the lowest concentration level of the calibration curve that could be quantified with acceptable repeatability and accuracy. Seven calibration points containing the three BP-Gs at concentrations ranging from 0.05 to 5.0 ng/mL were extracted and assayed over three days. Both linear ($Y = aX + b$) and quadratic ($Y = aX^2 + bX + c$) models were tested with 1, $1/X$ and $1/X^2$ ($X =$ nominal concentration) weightings with these resulting calibration curves. Three approaches were tested to select the best calibration model: 1) inspection of the residual distribution plot against nominal concentrations, 2) a lack-of-fit test to check the goodness-of-fit of the model and 3) calculation of the relative concentration residuals (RCR%) between the nominal concentration and the concentration obtained with the model, which should be lower than $\pm 15\%$. Intra-day and Inter-day precisions and accuracies were calculated on three different days and with five replicates of QC samples at three concentration levels (Low = 0.15 ng/mL, Medium 0.375 ng/mL and High = 3.75 ng/mL) covering the range of the calibration curve concentrations (0.05–5 ng/mL). Intra and inter-day precisions were expressed with a coefficient of variation percent ($CV\% = 100 \times \text{Standard Deviation (SD)}/\text{mean}$). The intra- and inter-day standard deviations were calculated using a one-way ANOVA (Eqs. (1) and (2)).

$$\text{Intra-daySD} = \sqrt{WMS} \quad (1)$$

$$\text{Intra-daySD} = \sqrt{\frac{BMS - WMS}{n} + WMS} \quad (2)$$

with: WMS = within group mean square
BMS = Between group mean square
n = number of observation

The stability of the BP-Gs derivatives in the autosampler was assessed by reanalyzing the QC samples stored at 15 °C and in darkness over time. A first set of three QC samples at low and high concentrations were injected at t0, 10 and 12 h, a second set at t2, 4 and 6 h and a third set were injected at t0 and 24 h. Each concentration was compared to its nominal value and a paired *t*-test was performed on each set and between time to check the stability of QC concentration over time. Matrix effects and SPE recovery were evaluated in triplicate by comparing the MRM responses of extracted blank plasma spiked with 5 ng/mL of BP-Gs and IS after SPE extraction to solvent spiked with 5 ng/mL of BP-Gs and IS and extracted plasma spiked with 5 ng/mL before SPE. Carry-over was assessed by injecting three solvent samples after the high QC level and comparing the resulting BP-Gs area to the BP-Gs area obtained at the LLOQ.

2.7. Routine analysis and validation

Each week, the first analytical run consisted of the blank sample (processed matrix sample without analyte and without IS) and a zero sample (processed matrix with IS), the seven calibration standards and 3 levels of QC samples (low, medium and high). The calibration curve was validated if at least 75% of the calibration standards had back calculated concentrations within $\pm 15\%$ of the nominal value, except for the LLOQ for which it could be within $\pm 20\%$. Each day, an initial set of QC samples was assayed to validate the weekly calibration curve, after which approximately 80 samples per day were extracted and labelled. The results as a whole were validated with the second set of QC added at the end of the daily analysis and according to the dansylation stability. The daily analysis was validated if at least 67% of the QC samples and at least 50% at each concentration level were within $\pm 20\%$ of their nominal values (European Medicines Agency, 2009).

2.8. Blood sampling

Forty-four pregnant women were recruited at the gynaecology-obstetric unit of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Toulouse (France) between June 2014 and October 2015, according to the

standard guidelines set by the ethical committee of the CHU. The study received institutional approval (DC-2013-1950) and participants provided informed consent for data collection. The cord blood was collected with heparinized vacutainer tubes in Polyethylene Terephthalate (BD vacutainer 367869). Samples were centrifuged for 10 min at 3000 g. The resulting plasma was stored at -20 °C in polypropylene tubes until assay.

3. Results and discussion

3.1. Derivatization

In general, BPs are poorly ionizable in ESI under the pH ranges necessary for robust chromatographic retention and chemical derivatization is often used to enhance ionization efficiency. Indeed, the first derivatization procedure described for the quantification of BPs in biological fluids involved DnCl; the sulfonyl group of DnCl readily reacts with the phenolic functions of BP and leads to a dansyl derivative that is highly ionizable in positive mode (Chang et al., 2010). For this reason, other analogues of DnCl such as ISCl and PSCL were also tested to enhance BPs ionization and improved sensitivity by a factor of 9 to 50 (Li and Franke, 2015; Regueiro et al., 2015; Vitku et al., 2015). However, these derivatizing agents have never been compared on glucuronide metabolites, to our knowledge, so we tested them on the three BP-Gs. Since only one phenolic function is available on BP-G, only one derivatizing agent can react on BP-G, unlike BP which can be derivatized twice (Fig. 2) (Li and Franke, 2015; Wang et al. 2018; Regueiro et al., 2015; Vitku et al. 2015).

In mass spectrometry, the amine function present on the derivative portion enabled all the analytes to produce the $[M + H]^+$ parent ions. The three BP-Gs were derivatized with the three derivatizing agent in the conditions reported for BPs in the literature, i.e. 15 min of incubation at 60 °C and pH 9 (Chang et al., 2010, Li and Franke, 2015; Regueiro et al., 2015; Vitku et al., 2015). By comparing the three derivatizing agents with each other, DnCl derivatization was shown to produce a signal 5 and 10 times higher than ISCl and PSCL, respectively. Moreover, the best chromatographic results, i.e. the higher peak area with a good peak shape, were obtained with DnCl on the phenyl-hexyl column and under acidic conditions (Fig. 3). Therefore, the method for quantification of BP-Gs was optimized using DnCl as derivatizing agent. The MRM transition corresponding to the neutral loss of glucuronic acid had both the highest intensity and best selectivity for all the three analytes and was thus chosen as quantifier ion. The second MRM transition, which corresponded to the R- fragment of the dansyl chloride was used for confirmation (Supplemental data S2).

3.2. Optimization of the condition of dansylation by experimental design

Experimental designs are often used in biological, environmental, and pharmaceutical applications to optimize conditions in the shortest time both by reducing the number of experiments and taking interactive effects into account (Hanrahan and Lu, 2006). Thus, a full factorial design and a Doehlert design was used to optimize the dansylation of BP-Gs.

3.2.0.1. Full factorial design

A two-level full factorial design was first carried out to determine the main factors influencing dansylation and their interactions. The pH bounds (9 and 11), the ratio of the volume between DnCl and sample (V_{DnCl}/V_{sample} : 1/1 and 2/1), the incubation time (5 min and 30 min) and the temperature (50 °C and 60 °C) were selected from those frequently described for BPs dansylation (Wang et al., 2018). The most influential parameters were V_{DnCl}/V_{sample} , pH and temperature and their interactions but no single combination gave the best response for all three BP-Gs. Thus, a Doehlert experimental design was performed to refine the parameters of each BP-G in order to determine the parameters

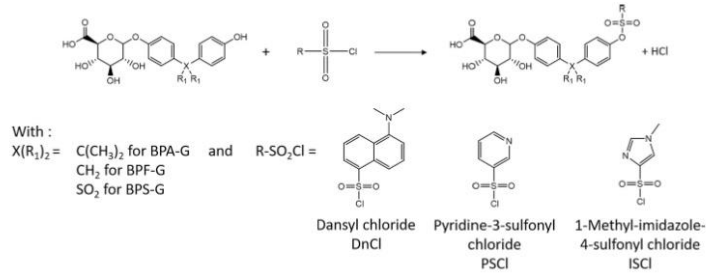


Fig. 2. Derivatization of the three BP-Gs with Dansyl chloride (DnCl), Pyridine-3-sulfonyl chloride (PSCI) and 1-Methyl-imidazole-4-sulfonyl chloride (ISCI).

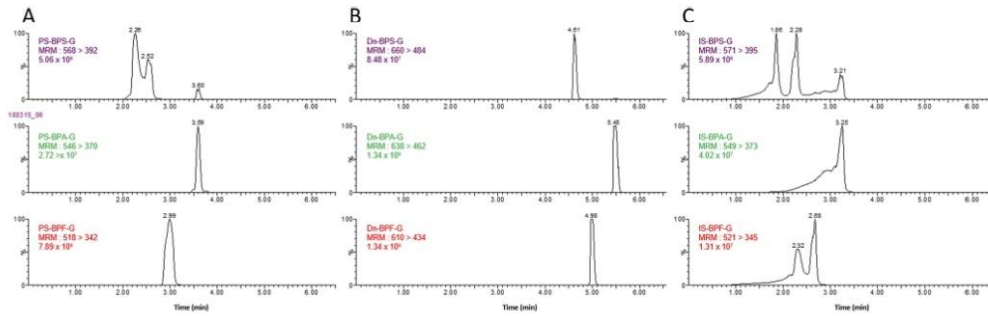


Fig. 3. MRM chromatograms of the three BP-Gs derivatized with A) Pyridine-3-sulfonyl chloride (PSCI), B) Dansyl chloride (DnCl) and C) 1-Methyl-imidazole-4-sulfonyl chloride (ISCI).

common to the three BP-Gs.

3.2.0.2. Doehlert experimental design

An initial Doehlert design was built by setting the V_{DnCl}/V_{sample} ratio at 1/1 and using the central point previously determined with the full

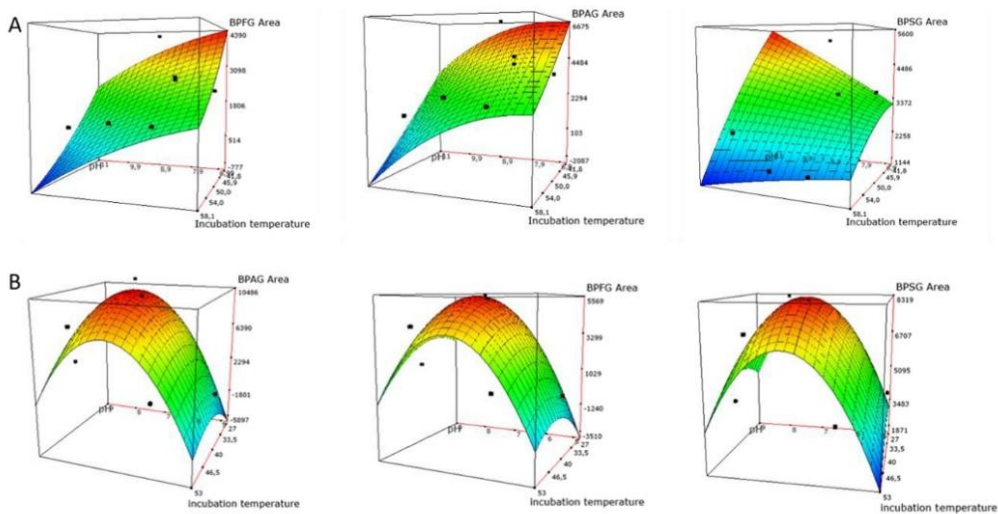


Fig. 4. MRM response of Dn-BPA-G, Dn-BPF-G and Dn-BPS-G as function of the incubation temperature and pH obtained with an initial Doehlert design centred at pH9 and T50°C (A) and with a second Doehlert design shifted to pH7 and T40°C (B).

factorial design (pH9, t30 min and T50°C). However, the maximum responses were systematically observed at the end of the experimental region, which meant that the bounds were not correctly defined for either temperature or pH (Fig. 4A). The center of the Doehlert design was therefore shifted to a lower temperature (40 °C; bound 27–53 °C) and a lower pH (7; bound pH6-9).

As shown in Fig. 4B, the dansylation of BP-Gs is mainly dependent on pH. The optimal conditions for Dn-BP-Gs are milder than for Dn-BPs (pH 9 and T°C = 60 °C). One explanation for these results could be possible glucuronide hydrolysis, which can occur in this mixture of solvents and at high temperatures (Jr et al., 2007). To ensure that no hydrolysis occurred during incubation, MRM transitions of BPs were monitored after BP-Gs dansylation both under the optimized conditions (pH7.5, 38 °C) and the harshest conditions described for BPs (pH 11 and 60 °C). No hydrolysis of BP-Gs was observed under either of the dansylation conditions. Subsequently, the time of incubation was evaluated by monitoring the response of Dn-BP-Gs formation every 5 min for 90 min. The formation of Dn-BPS-G was faster and more stable than that of Dn-BPA-G and Dn-BPF-G. Indeed, Dn-BPS-G was completely synthesized within 15 min while complete dansylation of BPA-G and BPF-G occurred after 40 min of reaction. The optimal incubation time obtained under these conditions was longer than under the usual conditions adopted for BPs (5–10 min). However, these incubation conditions made the derivatives more stable and their MS responses started to decline after 75–85 min of incubation whereas they decreased after 20–30 min under the conditions used for BPs (Wang et al., 2018).

3.3. Solid phase extraction

3.3.1. On-line SPE

After derivatization with DnCl, samples were loaded on the on-line solid phase extraction system coupled to the UHPLC/MS/MS in order to increase the BPs-G response. Three cartridges were tested and the SPE conditions (load time and solvent percentage) were optimized for each cartridge. The best results, i.e. the best signal-to-noise ratio and the highest peak area, were obtained with a C8 cartridge by loading sample for 0.5 min with 80% H₂O acidified with 0.1% formic acid (Supplementary data S.3.2). Despite improvement of the signal-to-noise ratio, the use of on-line SPE alone was not sufficient enough to obtain a good response of BP-Gs at low concentrations: a more specific SPE step was therefore added to improve method sensitivity.

3.3.2. SPE extraction of BP-Gs before dansylation

Two strategies, involving extraction of BP-Gs either after or before dansylation, were considered. Indeed, as Dn-BP-Gs compounds are larger and less polar than BP-Gs, they should be easier to extract on the usual SPE cartridges (C8, C18...). However, these dansylated compounds might be degraded during the different extraction steps of the SPE. Inversely, BP-Gs extraction before dansylation might prove more difficult, due to the polarity of the glucuronides, even though anionic exchange SPE have been developed for these kinds of molecules (Provencher et al., 2014). Such SPE facilitate hydrophobic interactions with the aromatic rings of BP and also promote exchanges with the glucuronic acid function. In addition, the reaction with DnCl might be more effective if the BP-Gs were first extracted from the matrices, i.e. before dansylation, as this would reduce competitive reactions with any interferences. Firstly, BP-Gs extractions were developed on HR-XAW cartridges before dansylation using plasma spiked at 100 ng/mL. Retention of the BP-Gs on the cartridges was determined by direct assay of the wash solution (25 mM AcONH₄) and the two elution steps (MeOH and MeOH, 1% NH₃) were directly assayed on UHPLC/MS/MS without labelling. Neither BPA-G nor BPF-G were detected during the washing step or during the first elution and were entirely eluted during the second elution step. BPS-G behaved slightly differently: a small quantity (<10%) was detected during the washing step but not in the first elution and it was mainly eluted with MeOH, 1% NH₃. An additional elution

(MeOH, 1% NH₃) was tested but did not improve BP-Gs extraction. Blank plasma spiked with IS was subjected to the same SPE protocol, spiked with 5 ng/mL BP-Gs either before or after SPE, and then dansylated. The SPE recovery, i.e. the ratio of IS-normalized peak areas of plasma spiked with BP-Gs before and after SPE, was around 60% for all three BP-Gs. Since stable isotope-labeled BPF-G is not available as analytical standard, and because the physicochemical properties and the SPE recovery of BPA-G and BPF-G are similar, BPA-G-¹³C₁₂ was used as the internal standard for both molecules. Matrix factor, i.e. the ratio of the MRM responses of extracted blank plasma to solvent, both spiked with 5 ng/mL of Dn-BP-Gs and IS after SPE extraction was normalized by the MRM responses of the IS (Table 2). IS-normalized matrix factor were close to 100%, for all three Dn-BP-Gs (Table 2).

In conclusion, the total IS-normalized recovery, i.e. the ratio of the Analyte/IS MRM responses of plasma spiked with BPs-G before SPE to the MRM responses in the solvent and at the same concentration levels in solvent, is quite low (55%). This is mainly due to the relatively low SPE recovery, but allows significant increase of the signal-to-noise ratio and improvement of method sensitivity.

3.4. Performance of the method

3.4.1. Calibration curves

Seven calibration points containing the three BP-Gs at concentrations ranging from 0.05 to 5.0 ng/mL were extracted over three days with BPS-G₃ and BPA-G-¹³C₁₂ as internal standards. The best calibration fit was obtained with a linear model weighted by 1/X² for all three BP-Gs with RCR% lower than 12% for all concentrations and the linear model was confirmed by the lack-of-fit test which was not significant (P > 0.05). Then, three plasmatic calibration curves were compared with three aqueous calibration curves at the same concentration range. The Analyte/IS area ratios between plasmatic and aqueous calibration standards varied from 0.9 to 1.26 for BPA-G and BPS-G. For BPF-G, at low concentration levels (0.05 and 0.1 ng/mL), the response in plasmatic calibration curve could be nearly twice higher than in aqueous calibration curve (Supplemental data S4). These results confirmed the need to prepare the calibration standards in the same matrix as the unknown samples in order to avoid bias in the concentration results. Three additional concentrations (10, 20 and 50 ng/mL) were investigated to ensure the efficiency of the derivatization in both plasma and aqueous matrices. On the one hand, the responses were proportional to the concentrations regardless of the matrix for the three Dn-BP-Gs and on the other hand, the response between the two matrices were not different (Supplemental data S4). Thus, since DnCl was added in excess (1 mg/mL), the derivatization was considered to be total in the concentration range of the study.

3.4.2. Limit of detection and limit of quantification

Limit of detection was estimated at 0.02 ng/mL for BPA-G and BPF-G and at 0.03 ng/mL for BPS-G by using the slope between zero and LOQ and the SD at LOQ. The higher estimation the LOD of BPS-G was due to the high responses of BPS-G observed in the blank plasma. Therefore, the limit of blank (LOB) values were determined for each of the three BP-Gs and are provided in Table 3 (Armbruster and Pry, 2008). These results were helpful to set the first concentration of the calibration curve, which was also considered as the LOQ. Contrary to most studies in which the LOQ is determined from the signal-to-noise ratio, our LOQ was

Table 2

IS-normalized matrix factor, SPE and total IS-normalized recovery of BP-Gs obtained in human plasma.

Extraction parameters	Dn-BPA-G	Dn-BPS-G	Dn-BPF-G
IS-normalized-matrix factor (n = 3)	102%	100%	99%
SPE Recovery % (n = 3)	58%	58%	60%
Total IS-normalized Recovery % (n = 3)	55%	54%	55%

Table 3
Performance of the method for quantifying Dn-BPA-G, Dn-BPS-G and Dn-BPF-G in human plasma.

Nominal concentration (ng/mL)	Dn-BPA-G				Dn-BPF-G				Dn-BPS-G				
	Mean (ng/mL)	Mean accuracy (range) %	Precision (CV%)		Mean (ng/mL)	Mean accuracy (range) %	Precision (CV%)		Mean (ng/mL)	Mean accuracy (range) %	Precision (CV%)		
			Intra-day (n = 15)	Inter-day (n = 3)			Intra-day (n = 15)	Inter-day (n = 3)			Intra-day (n = 15)	Inter-day (n = 3)	
LOB (n = 8)	0.016				0.005				0.041				
LOD ^a (n = 8)	0.025				0.023				0.038				
LOQ (n = 8)	0.05	0.046	92%	30%	0.051	101%	26%		0.052	103%	22%		
QC (n = 5 × 3)													
Low	0.15	0.163	109% (104–115%)	18%	18%	0.139	93% (80–101%)	17%	20%	0.167	111% (108–116%)	13%	13%
Mid	0.375	0.430	115% (104–121%)	8%	11%	0.377	100% (97–104%)	5%	6%	0.393	105% (104–111%)	8%	9%
High	3.75	3.988	106% (102–110%)	3%	4%	3.945	105% (100–109%)	2%	5%	3.847	103% (99–105%)	3%	4%
Stability ^b													
Low QC (n = 3)													
10H	0.15	0.189	126%	13%	0.129	86%	20%		0.192	128%	11%		
12H	0.15	0.163	109%	27%	0.115	77%	4%		0.150	100%	12%		
24H	0.15	0.131	87%	6%	0.076	51%	42%		0.162	108%	17%		
High QC (n = 3)													
10H	3.75	3.842	102%	1%	3.582	96%	1%		3.728	99%	2%		
12H	3.75	3.763	100%	4%	3.586	96%	9%		3.818	102%	3%		
24H	3.75	3.991	106%	4%	3.675	98%	4%		3.988	106%	3%		

^a LOD evaluated with the slope between zero and LOQ and the SD at LOQ: $LOD = 3.3 \cdot SD(LOQ) / Slope$.

^b Autosampler stability evaluated in the darkness and at 15 °C.

considered as the lowest concentration that could be quantified with acceptable accuracy and precision (European Medicines Agency, 2009). Eight replicates at 0.05 ng/mL (0.1 nM) were assayed over one day to determine LOQ performance for the three BP-Gs. Accuracy ranged between 92% and 103% and the intra-day precision was lower than 30% (Table 3). On the one hand, these LOQs are consistent with those reported for the direct measurement of BPs in plasma (BPS: 0.04 nM; BPA: 0.8 nM, estimated with the signal-to-noise approach, Zhang et al., 2020; and BPA: 0.16 nM measured from standard deviation low concentration samples, Yamamoto et al., 2016). On the other hand, they are also consistent with those obtained with dansylation of native BPs (BPA: 0.04 ng/mL, i.e. 0.16 nM, Vitku et al., 2015).

3.4.3. Precision and accuracy

Intra-day and inter-day precision were systematically below 18% and 20%, respectively. Accuracy ranged from 106% to 115% for BPA-G, from 103% to 111% for BPS-G and from 93% to 105% for BPF-G with intra- and inter-day CV precision lower than 20%, indicating a good repeatability of our method (Table 3).

3.4.4. Stability and Carry-over

Stability during the residence time in the autosampler at 15 °C was assessed by assaying the labelled BP-Gs in low and high QC samples at 0, 2, 4, 6, 10, 12 and 24 h after extraction and dansylation. The resulting high QC concentrations were close to their nominal values for all the three BP-Gs at least 24 h. At low concentrations, Dn-BPS-G were stable over 24 h whereas Dn-BPA-G concentrations tended to decline at 24 h ($P = 0.07$) and Dn-BPF-G was significantly different from its initial value (t_0) ($P < 0.05$, Table 3). These results underlines the need to assess the autosampler stability at two concentration levels. Indeed, the extracted matrix evolved over time and the low concentrations inexorably depended on these changes. By cautious, samples were assayed within 10 h after dansylation. Carry-over was assessed by injecting three solvent samples after a high QC concentration level (3.75 ng/mL). No carry over was observed in the first solvent sample.

3.5. Application of the method to the determination of fetal exposure

The suitability of the method was assessed by applying it to 44 umbilical cord samples from a French cohort. BPF-G was not detected in any of the samples. These cord plasma results are consistent with those of Pan et al 2020, who did not detect any BPF in 60 cord plasma samples (Table 4). However BPA-G and BPS-G were frequently detected in cord plasma (41% and 45%) with median values of 0.022 ng/mL (0.05 nM) and 0.101 ng/mL (0.23 nM), respectively (Table 4). The results recently obtained in birth cohort studies confirm the predominance of the conjugated forms of BPA-G and BPS-G in fetal plasma. Indeed, the concentration levels of total BPA measured after enzymatic hydrolysis in cord plasma were of the same order of magnitude as our BPA-G values: 0.051 ng/mL (0.22 nM) (Minatoya et al., 2017) and 0.057 ng/mL (0.25 nM, Yamamoto et al., 2016), whereas unconjugated BPA was not detected or represented <10% of total BPA, respectively. Likewise, the total BPS concentrations measured in recent birth cohorts varied between 0.03 and 0.12 ng/mL (0.12–0.48 nM, Liu et al., 2017a, 2017b) with a geometric mean of 0.030 ng/mL (0.12 nM, Zhang et al. 2020) whereas no native BPS was detected in cord serum samples (Liu et al., 2017a).

4. Conclusion

The present study describes a novel method for simultaneous quantification of the glucurono-conjugated metabolites of BPA and its major substitutes, BPS and BPF, in plasma. To the best of our knowledge, this is

Table 4
Concentrations of BPA-G, BPF-G and BPS-G in cord plasma.

	Cord plasma (n = 44)		
	BPA-G	BPS-G	BPF-G
Nb values higher than LOD	18 (41%)	20 (45%)	0
Nb values higher than LOQ	7 (16%)	17 (39%)	0
Concentration range ng/mL	nd-0.089	nd-0.586	nd

nd: not detected.

the first time that dansyl chloride has been applied to bisphenol-glucuronides to increase the method sensitivity required for their direct quantification in human plasma. The experimental designs revealed optimal derivatization conditions that were milder than the conditions usually adopted for native bisphenols quantification. The proposed derivatization procedure associated with anionic exchange SPE considerably improved the sensitivity and selectivity of the method. The low detection limit allowed BPA-G and BPS-G concentrations to be determined in almost half of the 44 cord plasma samples, indicating widespread gestational exposure both to BPA and BPS. Maternal exposure at different stages of pregnancy now needs to be studied in order to understand the factors determining fetal exposure.

CRedit authorship contribution statement

C.A. Gély: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. A. Huesca: Investigation, Validation, Writing - review & editing. N. Picard-Hagen: Investigation, Writing - review & editing. P.L. Toutain: Writing - review & editing. A. Berrebi: Investigation, Writing - review & editing. G. Gauderat: Investigation, Writing - review & editing. V. Gayrard: Investigation, Writing - original draft, Funding acquisition, Writing - review & editing. M.Z. Lacroix: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank all the staff at the Gynecology-Obstetric Unit of Paul de Viguier Hospital, Toulouse, France. The authors would like to thank Sylvie Puel for her technical support.

Funding Source

This work was supported by the French Region Midi-Pyrénées (31000642), the French National Research Agency (ANR-13-CESA0007).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106429>.

References

- Andra, S.S., Austin, C., Yang, J., Patel, D., Arora, M., 2016. Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: exposure biomarker perspectives. *Sci. Total Environ.* 572, 770–781. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.062>.
- Armbruster, D.A., Fry, T., 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 29, 549–552.
- Boucher, J.G., Boudreau, A., Ahmed, S., Atlas, E., 2015. In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environ. Health Perspect.* 123, 1287–1293. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409143>.
- Chang, H., Wan, Y., Nalle, J., Zhang, X., Wiseman, S., Hecker, M., Lam, M.H.W., Giesy, J.P., Jones, P.D., 2010. Simultaneous quantification of multiple classes of phenolic compounds in blood plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.076>.
- Corbel, T., Gayrard, V., Vigié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure. *Biol. Reprod.* 89, 11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106369>.
- Derakhshan, A., Shu, H., Peeters, R.P., Kortenkamp, A., Lindh, C.H., Demeneix, B., Bornehag, C.-G., Korevaar, T.I.M., 2019. Association of urinary bisphenols and

- triclosan with thyroid function during early pregnancy. *Environ. Int.* 133, 105123. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105123>.
- European Medicines Agency, 2009. guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline-Bioanal.-Method-Validation_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/Bioanal.-Method-Validation_en.pdf).
- Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P.-L., Corbel, T., Vigié, 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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.006>.
- Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P.-L., Servien, R., Vigié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Corbel, T., Bousquet-Melou, A., Gayrard, V., 2017. Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A and bisphenol A glucuronide from an ovine semi-physiological toxicokinetic model. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15646-5>.
- Gayrard, V., Gauderat, G., Lacroix, M.Z., Vigié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2015. Comment on "In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes". *Environ. Health Perspect.* 123, A289. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510315>.
- Gerona, R.R., Pan, J., Zota, A.R., Schwartz, J.M., Friesen, M., Taylor, J.A., Hunt, P.A., Woodruff, T.J., 2016. Direct measurement of Bisphenol A (BPA), BPA glucuronide and BPA sulfate in a diverse and low-income population of pregnant women reveals high exposure, with potential implications for previous exposure estimates: a cross-sectional study. *Environ. Health Perspect.* 124, 1186–1194. <https://doi.org/10.1289/ehp.124-1186>.
- Gingrich, J., Pu, Y., Ehrhardt, R., Karthikraj, R., Kannan, K., Veiga-Lopez, A., 2019. Toxicokinetics of bisphenol A, bisphenol S, and bisphenol F in a pregnancy sheep model. *Chemosphere* 220, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.109>.
- Gramec Skledar, D., Peterlin Masić, L., 2016. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 47, 182–199. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.014>.
- Grandin, F., Picard-Hagen, N., Gayrard, V., Puel, S., Vigié, C., Toutain, P.-L., Debrauwer, L., Lacroix, M.Z., 2017. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: Applicability to toxicokinetic investigations. *J. Chromatogr. A* 1526, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020>.
- Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Gauderat, G., Mila, H., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2018. Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. *Environ. Int.* 120, 584–592. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019>.
- Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Vigié, C., Mila, H., de Place, A., Vaysière, C., Morin, M., Corbett, J., Gayrard, C., Gély, C.A., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure? Placental transfer across the perfused human placenta. *Chemosphere* 221, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.065>.
- Hanrahan, G., Lu, K., 2006. Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36, 141–151. <https://doi.org/10.1080/10408340600969478>.
- Ho, K.-L., Yuen, K.-K., Yau, M.-S., Murphy, M.B., Wan, Y., Fong, B.-M.-W., Tam, S., Giesy, J.P., Leung, K.-S.-Y., Lam, M.-H.-W., 2017. Glucuronide and Sulfate Conjugates of Bisphenol A: Chemical Synthesis and Correlation Between Their Urinary Levels and Plasma Bisphenol A Content in Voluntary Human Donors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 410–420. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0438-1>.
- Hu, J., Zhao, H., Braun, J.M., Zheng, T., Zhang, B., Xia, W., Zhang, W., Li, J., Zhou, Y., Li, H., Li, J., Zhou, A., Zhang, Y., Bulka, S.L., Liu, S., Peng, Y., Wu, C., Jiang, M., Huo, W., Zhu, Y., Shi, K., Li, Y., Cai, Z., Xu, S., 2019. Associations of Trimester-Specific Exposure to Bisphenols with Size at Birth: A Chinese Prenatal Cohort Study. *Environ. Health Perspect.* 127, 107001. <https://doi.org/10.1289/EHP4664>.
- Jiang, Y., Li, J., Xu, S., Zhou, Y., Zhao, H., Li, Y., Xiong, C., Sun, X., Liu, H., Liu, W., Peng, Y., Hu, C., Cai, Z., Xia, W., 2020. Prenatal exposure to bisphenol A and its alternatives and child neurodevelopment at 2 years. *J. Hazard. Mater.* 388, 121774. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121774>.
- Jr, J.W., Thornton, C., Markham, D., Domoradzki, J., 2007. Factors Affecting the Accuracy of Bisphenol A and Bisphenol A-Monoglucuronide Estimates in Mammalian Tissues and Urine Samples. *Toxicol. Mech. Methods* 17, 13–24. <https://doi.org/10.1080/15376510600803581>.
- Lacroix, M.Z., Puel, S., Collet, S.H., Corbel, T., Picard-Hagen, N., Toutain, P.L., Vigié, 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. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.040>.
- Li, X., Franke, A.A., 2015. Improvement of bisphenol A quantitation from urine by LCMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 3869–3874. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9563-z>.
- Liu, B., Lehmler, H.-J., Sun, Y., Xu, G., Liu, Y., Zong, G., Sun, Q., Hu, F.B., Wallace, R.B., Bao, W., 2017a. Bisphenol A substitutes and obesity in US adults: analysis of a population-based, cross-sectional study. *Lancet Planet. Health* 1, e114–e122. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30049-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30049-9).
- Liu, J., Li, J., Wu, Y., Zhao, Y., Luo, F., Li, S., Yang, L., Moez, E.K., Dinu, I., Martin, J.W., 2017b. Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2456–2463. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05718>.
- Pan, Y., Deng, M., Li, J., Du, B., Lan, S., Liang, X., Zeng, L., 2020. Occurrence and Maternal Transfer of Multiple Bisphenols, Including an Emerging Derivative with Unexpectedly High Concentrations, in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environ. Sci. Technol.* 54, 3476–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02006>.

- Pelch, K., Wignall, J.A., Goldstone, A.E., Ross, P.K., Blain, R.B., Shapiro, A.J., Holmgren, S.D., Hsieh, J.-H., Svoboda, D., Auerbach, S.S., Parham, F.M., Masten, S. A., Walker, V., Rooney, A., Thayer, K.A., 2019. A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology* 424, 152235. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.06.006>.
- Provancher, G., Bérubé, R., Dumas, P., Bienvenu, J.-F., Gaudreau, É., Bélanger, P., Ayotte, P., 2014. Determination of bisphenol A, triclosan and their metabolites in human urine using isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1348, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.072>.
- Rancière, F., Botton, J., Slama, R., Lacroix, M.Z., Debrauwer, L., Charles, M.A., Roussel, R., Balkau, B., Magliano, D.J., the D.E.S.I.R. Study Group, 2019. Exposure to Bisphenol A and Bisphenol S and Incident Type 2 Diabetes: A Case–Cohort Study in the French Cohort D.E.S.I.R. *Environ. Health Perspect.* 127, 107013. <https://doi.org/10.1289/EHP5159>.
- Regueiro, J., Breidbach, A., Wenzl, T., 2015. Derivatization of bisphenol A and its analogues with pyridine-3-sulfonyl chloride: multivariate optimization and fragmentation patterns by liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29, 1473–1484. <https://doi.org/10.1002/rcm.7242>.
- Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* 123, 643–650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>.
- Viñas, R., Goldblum, R.M., Watson, C.S., 2013. Rapid estrogenic signaling activities of the modified (chlorinated, sulfonated, and glucuronidated) endocrine disruptor bisphenol A. *Endocr. Disruptors* 1, e25411. <https://doi.org/10.4161/endo.25411>.
- Vitku, J., Chlupacova, T., Sosvorova, L., Hampl, R., Hill, M., Heracek, J., Bicikova, M., Starka, L., 2015. Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Talanta* 140, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.013>.
- Völkel, W., Bittner, N., Dekant, W., 2005. Quantitation of Bisphenol A and Bisphenol a Glucuronide in Biological Samples by High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* 33, 1748–1757. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005454>.
- Wang, Z., Yu, J., Yao, J., Wu, L., Xiao, H., Wang, J., Gao, R., 2018. Simultaneous identification and quantification of bisphenol A and 12 bisphenol analogues in environmental samples using precolumn derivatization and ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 41, 2269–2278. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701067>.
- Yamamoto, J., Minatoya, M., Sasaki, S., Araki, A., Miyashita, C., Matsumura, T., Kishi, R., 2016. Quantifying bisphenol A in maternal and cord whole blood using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry and maternal characteristics associated with bisphenol A. *Chemosphere* 164, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.001>.
- Ye, X., Zhou, X., Hennings, R., Kramer, J., Calafat, A.M., 2013. 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. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206093>.
- Zhang, B., He, Y., Zhu, H., Huang, X., Bai, X., Kannan, K., Zhang, T., 2020. Concentrations of bisphenol A and its alternatives in paired maternal-fetal urine, serum and amniotic fluid from an e-waste dismantling area in China. *Environ. Int.* 136, 105407. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105407>.

1.3. Conclusion

Une méthode analytique de quantification du BPA, du BPS et du BPF sous leur forme glucuronide a été développée. Pour optimiser la sensibilité, une extraction sur phase solide suivie d'un marquage au chlorure de dansyle a été réalisée avant l'analyse en SPE (solid phase extraction) en ligne UHPLC-MS/MS.

La méthode a ainsi pu être validée en termes de sensibilité, répétabilité, répétabilité intermédiaire et d'exactitude. Elle permet une quantification du BPAG, du BPSG et du BPFPG dans le plasma humain pour des concentrations comprises entre 0,05 et 5 ng/mL avec une capacité d'analyse d'environ 80 échantillons par jour.

L'application de cette méthode à l'analyse de sang de cordon ombilical a permis la détection du BPAG et du BPSG chez 41 % et 45 % des nouveau-nés, respectivement. Le BPFPG n'a quant à lui pas été détecté. Ces résultats démontrent la réalité de l'exposition fœtale au BPS, le principal substitut du BPA.

La méthode développée a également été appliquée au dosage de BPAG, BPFPG et BPSG dans les urines humaines. Notre laboratoire a en effet participé à une étude inter-laboratoire de dosage de plusieurs échantillons urinaires humains (Programme HBM4EU). Cette méthode, de par son originalité et ses performances, a ainsi été certifiée en 2019 par le consortium européen pour évaluer les concentrations du BPS et du BPA dans les urines humaines.

La méthode a également été appliquée à une étude de biosurveillance plus large dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) FIVPHENOL, dont les objectifs étaient de corréler l'exposition des 3 bisphénols à la fonction ovarienne d'une cohorte de femmes sous assistance médicale à la procréation.

Cette méthode a aussi été adaptée et appliquée au dosage du BPS et BPSG deutérés dans des échantillons plasmatiques et urinaires humains, dans le cadre d'une étude toxicocinétique du BPS chez l'Homme [77].

L'ensemble de ces études montre l'intérêt et la robustesse de notre méthode de dosage, qui a été utilisée dans le cadre de plusieurs projets collaboratifs.

Dans cette première étude expérimentale, une méthode de dosage adaptée à l'analyse de traces de biomarqueur du BPA, BPS et BPF a été développée et validée dans le plasma et les urines humaines. Le dosage de ces biomarqueurs dans le sang de cordon ombilical a permis de démontrer l'exposition fœtale à ces contaminants et par conséquent leur passage à travers le placenta.

Pour comprendre les mécanismes déterminant l'exposition fœtale à cette famille de bisphénols émergents, une étude a été conduite sur un modèle de placenta humain perfusé. Ce modèle de référence a ainsi été utilisé pour étudier le passage placentaire de 15 bisphénols par une approche cocktail.

2. Etude du transfert placentaire de 14 bisphénols analogues du BPA sur un modèle de placenta humain perfusé

2.1. Contexte et objectifs

Plusieurs études de biosurveillance ont mis en évidence la présence de nombreux bisphénols tels que le BPS, le BPF, le BPAF, le BPB, le BPZ, le BPAP, le BPP, le BPM et le BPE, présentant chacun une structure analogue à celle du BPA, dans les urines humaines [22], [26], [80], [92]. Parmi les bisphénols, le BPB, le BPF, le BPC, le BPAP, le BPAF, le 3-3BPA, le BPFL, le BPM, le BPP et le BPZ sont soumis à l'enregistrement dans le cadre de la réglementation REACH. Ces bisphénols émergents sont de plus en plus utilisés en remplacement du bisphénol A, dans la fabrication de polycarbonate et de résine époxy. Du fait de leur utilisation croissante dans les objets du quotidien, l'exposition humaine à ces bisphénols devient ubiquitaire.

Les études *in vitro*, *in silico* et *in vivo* ont montré que ces nouveaux contaminants présentent un potentiel perturbateur endocrinien similaire à celui du BPA [27], [188], [260]–[262]. Par ailleurs, pour certains bisphénols, en particulier le BPB et le BPS, des effets néfastes ont été mis en évidence sur des modèles rongeurs lors d'exposition gestationnelle [263].

Ainsi, pour évaluer le risque lié à l'exposition à ces substituts du BPA pendant la période critique de la gestation, il est essentiel de déterminer leurs mécanismes d'exposition prénatale. Le transfert placentaire du BPA et du BPS a été évalué sur le modèle de placenta humain perfusé et sur le modèle de brebis gravide instrumenté, pertinent pour l'Homme vis-à-vis de la physiologie fœtale. Ces études ont montré que, en dépit de leur similitude structurale, le BPS passait 10 fois moins la barrière placentaire que le BPA dans le sens materno-fœtal [99], [100], [141], [144]. L'évaluation du passage placentaire des substituts du BPA pourrait permettre de comprendre les caractéristiques moléculaires des bisphénols déterminant l'exposition fœtale et de contribuer ainsi à l'évaluation du risque lié à l'exposition aux bisphénols durant la gestation.

Dans ce contexte, nous avons évalué le passage placentaire materno-fœtal de quinze bisphénols (BPA, BPS, BPFL, BPZ, 3-3BPA, BPC, BP4-4, BPF, BPM, BPP, BPAF, BPAP, BPB, BPE et BPBP) sur le modèle *ex vivo* de référence, le placenta humain perfusé, en collaboration avec le département d'obstétrique et de gynécologie de l'hôpital Paul de Viguié au centre hospitalier universitaire de Toulouse. Pour contrôler l'intégrité du cotylédon isolé, l'antipyrine, un marqueur de diffusion passive a été utilisé comme molécule de référence. Notre approche a consisté à étudier le passage placentaire des 15 bisphénols en

mélange pour s'affranchir des différences de perméabilité inter-cotylédonnaire. Cette approche a été validée par la comparaison des indices de clairance placentaire du BPA et du BPS, perfusés en mélange avec ceux déterminés précédemment pour ces bisphénols perfusés individuellement [99], [100]. Une méthode de dosage simultanée des bisphénols dans le milieu de perfusion en UHPLC-MS/MS a également été développée et validée, afin de quantifier les bisphénols dans le liquide de perfusion.

Les résultats issus de cette étude expérimentale ont été valorisés au travers d'une communication orale et d'une publication dans la revue *Chemosphere* (Gély *et al.* 2021).

2.2. Article 2

Les données supplémentaires associées à cet article sont présentées en annexe 2.

Chemosphere 276 (2021) 130213



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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



Comparison of the materno-fetal transfer of fifteen structurally related bisphenol analogues using an *ex vivo* human placental perfusion model



Clémence A. Gély^{a, b}, Marlène Z. Lacroix^b, Mathieu Morin^c, Christophe Vayssière^{c, d}, Véronique Gayrard^a, Nicole Picard-Hagen^{a, *}

^a ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^b INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

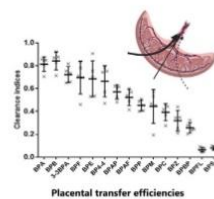
^c Department of Obstetrics and Gynecology, Paule de Viguier Hospital, CHU Toulouse, Toulouse, France

^d UMR 1027 INSERM, Team SPHERE, Université de Toulouse, France

HIGHLIGHTS

- The efficiency of placental transport differs greatly between bisphenols.
- BP4-4, BPAP, BPE, BPF, 3-3BPA, BPB, BPA cross placenta by simple diffusion.
- Materno-fetal transfer of BPFL and BPS is very limited.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 October 2020
Received in revised form
14 January 2021
Accepted 4 March 2021
Available online 15 March 2021

Handling Editor: Jianying Hu

Keywords:
Bisphenols
Human placental transfer
Mixture
Endocrine disruptor

ABSTRACT

Regulatory measures and public concerns regarding bisphenol A (BPA) have led to its replacement by a variety of alternatives in consumer products. Due to their structural similarity to BPA, these alternatives are under surveillance, however, for potential endocrine disruption. Understanding the materno-fetal transfer of these BPA-related alternatives across the placenta is therefore crucial to assess prenatal exposure risks. The objective of the study was to assess and compare the placental transfer of a set of 15 selected bisphenols (BPs) (BP 4-4, BPA, BPAF, BPAP, 3-3 BPA, BPB, BPBP, BPC, BPE, BPF, BPFL, BPM, BPP, BPS and BPZ) using the *ex vivo* human placental perfusion model. The UHPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of these BPs in perfusion media, within a concentration range of 0.003–5 μM, was able to measure placenta transfer rates as low as 0.6%–4%. Despite their structural similarities, these BPs differed greatly in placental transport efficiency. The placental transfer rates of BP4-4, BPAP, BPE, BPF, 3-3BPA, BPB, BPA were similar to that of antipyrine, indicating that their main transport mechanism was passive diffusion. By contrast, the placental transfer rates of BPFL and BPS were very limited, and intermediate for BPBP, BPZ, BPC, BPM, BPP and BPAF, suggesting weak diffusional permeability and/or that

Abbreviations: BPS, Bisphenol S; BPA, Bisphenol A; BPE, Bisphenol E; 3-3BPA, 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane (3-3BPA); BPB, Bisphenol B; BPC, Bis(4-hydroxyphenyl)-2,2-dichloroethylene; BPBP, Bisphenol BP; BPF, Bisphenol F; BPFL, Bisphenol FL; BPZ, Bisphenol Z; BP4-4, 4,4'-Dihydroxybiphenyl; BPAP, Bisphenol AP; BPAF, Bisphenol AF; BPP, Bisphenol P; BPM, Bisphenol M; LOQ, limit of quantification; BSA, Bovine Serum Albumin; ESI-, negative electrospray; IS, Internal Standard; MRM, Multiple Reaction Monitoring; OAT, Organic Anion Transporter; QC, Quality Control; RCR, Relative Concentration Residuals; UHPLC-MS/MS, Ultra-High-Performance Liquid Chromatography method coupled to tandem mass spectrometry.

* Corresponding author. UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076, Toulouse cedex 3, France.
E-mail addresses: clemence.gely@inrae.fr (C.A. Gély), marlene.lacroix@envt.fr (M.Z. Lacroix), morin.m@chu-toulouse.fr (M. Morin), vayssiere.c@chu-toulouse.fr (C. Vayssière), veronique.gayrard@envt.fr (V. Gayrard), nicole.hagen@envt.fr (N. Picard-Hagen).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130213>
0045-6535/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Serious concerns regarding widespread human exposure to Bisphenol A (BPA) and its adverse health effects have led to the ban or restriction of BPA production and use in many countries, prompting the development of structural analogues to replace BPA in a variety of industrial products (Chen et al., 2016; Liao and Kannan, 2013; Yang et al., 2014). The list of such BP alternatives is still growing and over 20 BPs, including bisphenols AF, AP, B, F, P, S and Z, are used as monomers in the manufacture of epoxy resin and polycarbonate for many consumer products, such as foodstuffs, personal care products, and paper products (Chen et al., 2016; González et al., 2020; Liao and Kannan, 2014). Given the environmental ubiquity of these BPs, humans are constantly being exposed via dietary intake and daily dermal contact with such products. The increased frequency of detection of BPA alternatives in urine indicates the reality of BPA substitution (Frederiksen et al., 2020; Gyllenhammar et al., 2017; Husøy et al., 2019; Lehmler et al., 2018; Lucarini et al., 2020; Phillips et al., 2018; Ye et al., 2015). In particular, a human biomonitoring study revealed the presence of 7 BPs (detection rate: BPA 93%, BPS 89%, BPF 12%, BPP 39%, BPZ 18%, BPAF 66% and BPAP 44%) in 283 urine samples collected from children in southern China (Chen et al., 2018).

However, little is known about the potential adverse effects of these emerging BPA substitutes and most of the toxicological information is limited to their endocrine disruption potential. Like BPA, these structurally similar phenolic compounds seem to affect hormonal systems (Chen et al., 2016; Kojima et al., 2019; Moreman et al., 2017; Pelch et al., 2019; Rochester and Bolden, 2015; Rosenmai et al., 2014; Siracusa et al., 2018; Usman and Ahmad, 2016; Zhang et al., 2018). The developmental effects of some BPs analogues in mammals, mainly rodents, have been documented in a recent literature review (Pelch et al., 2019). Most studies have only investigated a single BPA analogue, such as BPS, BPAF, BPF or BPE, thereby precluding direct comparisons between them. In addition, the endpoints evaluated in these studies were diverse and included altered hormonal signaling and reproduction (Shi et al., 2018), disruption of mammary gland development (Tucker et al., 2018), behavioral changes (Catanese and Vandenberg, 2016) and metabolic disorder (Mustieles et al., 2020). For example, a study of prenatal *in vivo* exposure to BPS and BPAF showed that such exposure affects the mammary gland of the developing fetus (Tucker et al., 2018). Altogether, these data highlight the vulnerability of the developmental period to exposure to these emerging BPs.

Data on human biomonitoring of BP analogues in maternal-cord blood samples remain limited, with most studies focused on only 2 or 3 analogues (Ihde et al., 2018; Liu et al., 2017; Pan et al., 2020; Zhang et al., 2020). Several alternative BPs, including BPS, BPAF, BPE, BPF and BPAP have frequently been detected in the human maternal-fetal-placental unit (Pan et al., 2020), indicating that such contaminants can cross the placental barrier. Given their structural diversity, the harmful consequences of BPA substitution for fetal health may be exacerbated if the physicochemical properties of these analogues promote their placental transfer, and thus increase fetal exposure. Understanding the materno-fetal transfer of these BPA alternatives across the placenta is therefore crucial for

assessing prenatal exposure risks.

To that end, the *ex vivo* perfused human placental cotyledon model, which allows reproduction of the conditions of the third trimester of pregnancy, is the method of choice for studying human placental transfer (Hutson et al., 2011). This model had already been used to quantify the transplacental transfer of BPA (Corbel et al., 2014) and BPS (Grandin et al., 2019) and was therefore used here to investigate the materno-fetal placental transfer of fifteen BPs. We focused on bisphenol 4-4, bisphenol A, bisphenol AF, bisphenol AP, 3-3 bisphenol A, bisphenol B, bisphenol BP, bisphenol C, bisphenol E, bisphenol F, bisphenol FL, bisphenol M, bisphenol P, bisphenol S, and bisphenol Z (Fig. 1), because of their occurrence in foodstuffs (Caballero-Casero et al., 2016; Liao and Kannan, 2013), their volume of production ("Search for Chemicals - ECHA"), their presence in human urine (Chen et al., 2018) and their structural diversity.

We chose a cocktail approach because the placenta perfusion method remains a time-consuming experimental method that required some logistic and technical challenges. We first developed and validated an ultra-high-performance liquid chromatography method coupled to tandem mass spectrometry to assay all fifteen BPs simultaneously. To check that the combination of 15 BPs did not interfere with the placental transfer mechanism, we compared the maternal-fetal placental indices of BPA and BPS evaluated with this cocktail approach to those previously determined for these compounds perfused individually using the same model (Corbel et al., 2014; Grandin et al., 2019). This approach, by allowing comparison of the values obtained for a key parameter, placental clearance, should provide new insights for understanding fetal BPs exposure and assessing the hazards of BPA substitution in vulnerable populations, such as the developing fetus.

2. Material and methods

The study was designed to evaluate the simultaneous placental transfer of fifteen BPs in the maternal-fetal direction.

2.1. Chemicals

Bisphenol S (BPS) (purity $\geq 98\%$), Bisphenol A (BPA) (purity $\geq 99\%$), Bisphenol E (BPE) (purity $\geq 98\%$), 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane (3-3BPA) (purity $\geq 97\%$), Bisphenol B (BPB) (purity $\geq 98\%$), Bis(4-hydroxyphenyl)-2,2-dichloroethylene (BPC) (purity $\geq 98\%$), Bisphenol BP (BPBP) (purity $\geq 98\%$), Bisphenol F (BPF) (purity $\geq 98\%$), Bisphenol FL (BPFL) (purity $\geq 97\%$), Bisphenol Z (BPZ) (purity $\geq 98\%$), 4,4'-Dihydroxybiphenyl (BP4-4) (purity $\geq 97\%$), Bisphenol AP (BPAP) (purity $\geq 99\%$), Bisphenol AF (BPAF) (purity $\geq 97\%$), Bisphenol P (BPP) (purity $\geq 98\%$), Bisphenol M (BPM) (purity $\geq 99\%$) (Fig. 1) and antipyrine (purity $\geq 98\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA).

Six isotopes-labeled standards, namely, BPAF-d4 (purity $\geq 98\%$), BPAP-d5 (purity $\geq 97.5\%$), BPP-d16 (purity $\geq 98\%$), BPS-d8 (purity $\geq 97\%$), and BPA¹³C₁₂ (purity $\geq 98\%$), used as internal standards, were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto Canada). Methanol and Acetonitrile were LC/MS quality and purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France) and acetone

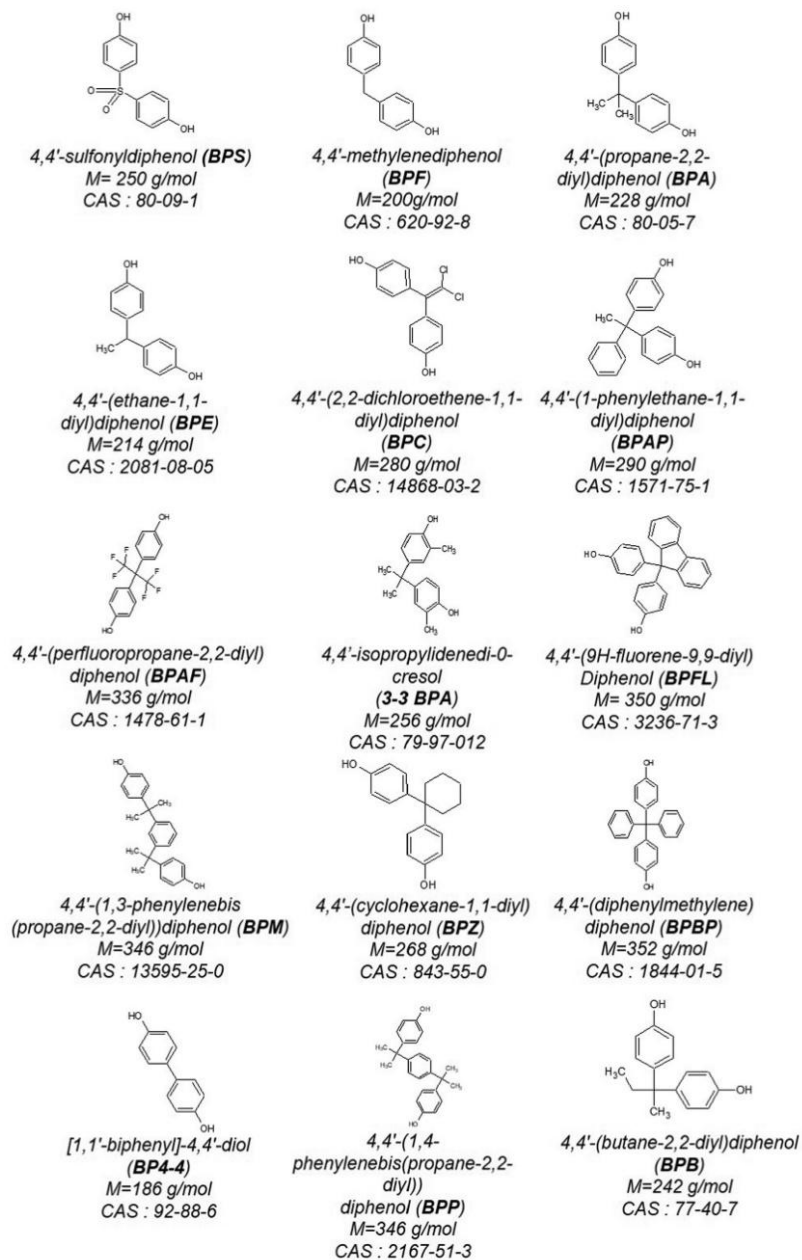


Fig. 1. Molecular structures of the fifteen BPs.

was LC quality purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA).

All BPs, except BPBP, were dissolved in ethanol at a concentration of 150 mM. BPBP was dissolved at 30 mM, due to its weak solubility. A solution containing all fifteen BPs was prepared at the same concentration of 7.5 mM for each BP, except BPBP (concentration of 1.5 mM). The solutions were stored at -20°C until use. Bovine serum albumin (BSA, Fraction V, purity 100%, Aviva Systems Biology, San Diego, USA) and Earle's Balanced Salt solution were purchased from United States Biological (Salem, MA 01970, United-States). The materials for placental perfusion, including the materials used to prepare solutions, sampling, processing and analysis, were in glass or BPA- and BPS-free plastic containers and the absence of leaching of BPs from the tubing was verified.

The absence of binding to the perfusion equipment was checked by comparing the BPs concentrations in the maternal reservoir and in the maternal perfusate circulating in the tubing without the cotyledon (mean ratios between 93 and 103% for the BPs).

2.2. Placental perfusion

Placentas (519 ± 113 g) were collected from HIV-seronegative women with normal pregnancies following vaginal ($n = 1$) or caesarean ($n = 4$) delivery in the CHU Paule de Viguier, Toulouse, France. The study received institutional approval (DC-2016-2694) and each patient gave written informed consent to participate in the study.

Collected placentas were perfused in an open double circuit as previously described (Corbel et al., 2014; Grandin et al., 2019). Perfusion experiments were started within 30 min after delivery. Briefly, after visual confirmation of the vascular integrity of both the maternal and fetal sides, a distal branch of a fetal artery and the associated vein supplying a peripheral cotyledon, were cannulated (Microtube Tygon S54HL, Saint Gobain, Courbevoie, France). The balance between arterial and venous fetal flows was evaluated and placentas with evidence of vascular leakage were discarded (Karttunen et al., 2015). On the maternal side, the perfused area progressively whitened, which allowed visualization of the chosen cotyledon. The cotyledon was placed in the perfusion chamber and maintained at 37°C , with the maternal side upward. Perfusion on the maternal side was subsequently initiated by inserting two catheters into the intervillous space. The fetal and maternal flows were 6 and 12 ml/min, respectively, and the perfusion length was 90 min. The pH was continuously adjusted throughout the perfusion to 7.41 ± 0.022 and 7.23 ± 0.025 for the maternal and fetal perfusion media, respectively. The balance between arterial and venous fetal flows and pressures (between 40 and 60 mm Hg) were monitored throughout the experiment to control the integrity and functionality of the perfusion. Earle medium supplemented with 25 g/L bovine serum albumin (BSA) at 37°C was used to reflect the physiological plasma protein concentrations at late pregnancy (Larsson et al., 2008). Indeed, some BPs (BPA, BPS, BPF, BPE, BPB, BPM and BPAF) have been shown to bind to plasma albumin (Grumetto, 2019; Luo et al., 2016; Wang et al., 2014; Yang et al., 2017). BSA was used because of its 76.5% sequence homology with human serum albumin. Antipyrine (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a reference substance for control of passive diffusion and barrier integrity (Karttunen et al., 2015), and the BPs mixture, were added to the maternal reservoir to study materno-fetal transfer. Because the placental transfer of BPS had been previously reported to be low (Grandin et al., 2019), all BPs (except the weakly soluble BPBP) were used at a final nominal concentration of 5 μM (1 μM for BPBP) to ensure their effective detection in the fetal compartment.

Control samples (1 mL) were collected from the fetal and maternal inflow reservoirs before the addition of antipyrine and

BPs and from the maternal reservoir after simultaneously adding BPs and antipyrine solutions (time 0) and at 30, 60 and 90 min. During the perfusion, fetal exudates were collected every 5 min and their volumes measured. Maternal exudates were collected immediately after adding the test molecules and every 30 min up to 90 min. At the end of the perfusion, the isolated cotyledon was rinsed with phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 15 min. This washing solution was collected. All samples were immediately chilled in ice and centrifuged for 10 min at 3000 g and 4°C to discard placental cells and the supernatant was collected and stored at -20°C until assayed.

2.3. Antipyrine assay

Antipyrine concentrations in the perfusion medium were determined by UHPLC coupled with UV detection. Briefly, antipyrine was extracted from the perfusion medium (100 μL of sample) by adding 200 μL of 5% trichloroacetic acid. After mixing and centrifuging (20000 g, 10 min and 4°C), samples were eluted on a C18 column at 0.3 mL/min and 40°C using $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$ gradient elution with UV detection set at 250 nm. The calibration curve ranged from 0.5 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data were fitted using a linear model with $1/X$ ($X = \text{concentration}$) as weighting factor. Blank samples were used to check the absence of contamination during the assays. Accuracy ranged from 87% to 103% and the intra- and inter-day coefficients of variation for three concentration levels (0.8, 8 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were below 11%. The limit of quantification (LOQ) was validated at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4. Simultaneous quantification of 15 bisphenols in placenta perfusion media

2.4.1. Analytical conditions

The materno-fetal transfer rates of BPA (Corbel et al., 2014) and BPS (Grandin et al., 2019) previously evaluated on the same perfused placenta model were on average 29 and 3.18%, respectively. Our objective was to develop a simultaneous assay, without dilution, of the fifteen BPs both in the maternal reservoir and in the fetal outflow perfusate, i.e. with a wide concentration range between 0.05 and 5 μM so as to be able to evaluate materno-fetal transfer rates of BPs ranging between 1% and 40–50%.

Samples were assayed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Acquity-2D UPLC® Xevo® TQ, Waters, Milford, MA, USA) using the methods previously described by Grandin et al. (2017) and Lacroix et al. (2011). Briefly, BPs were extracted from the perfusion medium (100 μL of sample) by adding 200 μL of acetone containing internal standards (100 ng/mL). Samples were mixed for 1 min at 10°C and 1400 rpm and centrifuged at 20000 g and 4°C for 10 min. Then, 200 μL of supernatant were evaporated to near dryness under nitrogen at 50°C and reconstituted with 200 μL of methanol/ H_2O : 50/50 (v/v). The BPs were separated on a Raptor Biphenyl column (100 \times 2.1 mm; 2.7 μm , Restek) at 0.3 mL/min and 40°C using $\text{H}_2\text{O}/\text{methanol}$ gradient elution.

Analytes were detected in negative electrospray (ESI^-) using multiple reaction monitoring (MRM) mode. The MRM transitions of BPs and IS with their respective cone voltages and collision energies are given in Supplementary Material Table S1.

2.4.2. Validation procedure

The performance of the method was evaluated according to the European Medicine Agency Guidelines (European Medicine Agency, 2011) for bioanalytical method validation in terms of linearity, intra-day and inter-day repeatability, and sensitivity. Selectivity was tested by comparing five blank perfused media

chromatograms with chromatograms at the limits of quantification (LOQ). The LOQs were defined as the lowest concentrations of the calibration curve that could be quantified with less than 20% coefficient of variation (CV%), precision and within an accuracy range of 80–120%.

For each BP calibration curve, both simple ($Y = aX + b$) and quadratic ($Y = aX^2 + bX + c$) models were tested after applying appropriate weighting: 1, 1/X and 1/X² (X = nominal concentration). Three approaches were adopted to assess the linearity of the calibration curve: (1) calculation of the relative concentration residuals (RCR%) between the nominal concentration and the concentration obtained with the model, which should be lower than $\pm 15\%$ (except at the LOQ, $\pm 20\%$), (2) visual inspection of the residual distribution which should be randomized around the mean and (3) application of a lack-of-fit test to check the goodness-of-fit of the model. Within-day and between-day precisions and accuracies for each BP were calculated on three different days and with six replicates of QC samples at four concentration levels (3, 30, 300 and 1500 ng/mL).

2.5. Placental transfer parameters

Perfusions in the materno-fetal direction were validated if the transfer rate of antipyrine was above the generally accepted threshold of 20% (Challier et al., 1983; Gavard et al., 2009; Schneider et al., 1972) and remained stable throughout the perfusion. Only the concentrations at steady state for antipyrine and all BPs were used to calculate the transfer rate and the clearance index.

As previously described (Corbel et al., 2014; Grandin et al., 2019), the transfer rate was calculated for each steady state time point as the ratio between concentrations in the fetal compartment to concentrations in the maternal compartment. To take the inter-placenta variability into account, the clearance index *i.e.* the ratio of the transfer rate of each bisphenol to that of antipyrine, was determined.

The mass balance for antipyrine and the 15 BPs was calculated as the ratio of the sum of the quantities of substrate in all the maternal and fetal exudate media and PBS washings to the measured amount of substrate in the maternal reservoir, as previously described (Corbel et al., 2014).

2.6. Statistical analysis

First, the materno-fetal placenta transfer rate of each bisphenol was compared with that of antipyrine using a Dunnett's multiple comparisons test, with a confidence level of 0.95. Two groups of bisphenols had been identified in a first test: one group containing bisphenols with a transfer rate non significantly different to that of antipyrine and a second group containing bisphenols with a significantly lower transfer rate than that of antipyrine. For each group of bisphenols, the placental clearance indices were compared using an ANOVA followed by a post-hoc Tukey test with a confidence level of 0.95. The statistical analyses were done using the R® software (R development core team, 2009).

3. Results

3.1. Performance of the method for the simultaneous quantification of 15 bisphenols

The selectivity of the method was evaluated by comparing the areas of the BPs on five blank samples to the areas at the LOQs. The areas in blank samples were below 20% of that of the LOQs for all BPs except BPAF (29%) and BPS (43%). Indeed, BPS was systematically detected in blank media but the areas were always at least

two-fold lower than that of their LOQ. However, the method remains suitable for the assessment of BPs placenta transfer since BPs contamination was monitored by injecting blank medium during the sample assays. The LOQs were validated at 1 ng/mL for BPAF and BPAP, 5 ng/mL for BP4-4, BPF, BPE, BPA, BPB, BPZ, BPM, BPFL, BPBP, 10 ng/mL for BPS and 50 ng/mL for 3-3BPA, BPC and BPP, with intra-day CVs below 21% and accuracies within 83–119%. Intra- and inter-day precisions were below 22% with accuracy ranging from 85% to 117% for all BPs (Table 1). The calibration curve ranges were established from the BP LOQs up to 2000 ng/mL to ensure placental transfer rate measurements between 1 and 50% without requiring sample dilutions. The method was therefore suitable for the simultaneous quantification of fifteen BPs in both the maternal reservoir and the fetal outflow perfusate.

3.2. Placental transfer of the mixture of 15 bisphenols

The overall mean antipyrine transfer rate, for all the validated perfusions ($n = 5$), was $31.7 \pm 12.6\%$ and conforms closely to values reported previously (Corbel et al., 2014; Grandin et al., 2019; Gavard et al., 2009). The wet weight of the perfused cotyledons was 27 ± 4 g ($n = 3$). The average flow rates were 12.5 ± 1.9 mL/min in the maternal circulation and 5.3 ± 0.7 mL/min in the fetal circulation and remained stable throughout the perfusion. No BPs and no antipyrine were detected at levels above the LOQs in control perfusion medium samples collected from the maternal and fetal exudates before adding the compounds. The mean recovery for all BPs was not significantly different from that of antipyrine ($89 \pm 6.2\%$, range 86–91%), except for BPE ($77 \pm 6\%$, range:70–84%, $p = 0.03$, Dunnett test). This incomplete recovery of BPE could be explained by BPE placental metabolism. But the absence of signal corresponding to the MRM transitions of the 15 bisphenol mono-glucuronides confirms the very limited *in vitro* placental metabolism in this open non-recirculating perfusion model.

Table 2 summarizes the materno-fetal placental transfer rate and clearance indices of the perfused mixture of fifteen BPs (at the concentration of 5 μ M, except for BPBP, 1 μ M) and antipyrine (at the concentration of 20 μ M).

Despite their similar phenolic structures, these BPs showed a considerable range of placental transfer rates. The transfer rates of BP4-4 ($21.13 \pm 9.27\%$), BPAP ($18.10 \pm 7.15\%$), BPE ($21.52 \pm 8.86\%$), BPF ($22.52 \pm 11.10\%$), 3-3BPA ($22.86 \pm 8.75\%$), BPB ($26.45 \pm 9.11\%$) and BPA ($25.70 \pm 9.85\%$) were not significantly different to that of freely diffusible antipyrine ($31.68 \pm 12.64\%$). By contrast, the placental transfer rates of the others were significantly lower than that of antipyrine ($p < 0.05$, Dunnett's multiple comparisons test) and ranged from 7 to 16% for BPBP ($7.99 \pm 2.66\%$), BPZ ($9.87 \pm 3.94\%$), BPC ($12.25 \pm 4.55\%$), BPM ($14.48 \pm 7.34\%$), BPP ($14.68 \pm 6.68\%$) and BPAF ($16.38 \pm 5.95\%$). In addition, the BPFL and BPS placental transfer rates were 13 and 10-fold lower than that of BPA, *i.e.*, $1.98 \pm 0.70\%$ and $2.45 \pm 0.77\%$, respectively.

Fig. 2 depicts the individual values and mean \pm SD of the BP clearance indices. The clearance indices for BPs ranged from 0.065 to 0.842. In group 1, the clearance indices were very close and only BPA and BPB had a significantly higher clearance index than BPAP (Tukey test). In group 2, the clearance indices gradually decreased from 0.522 (BPAF) to 0.257 (BPBP), whereas the clearance indices of BPFL (0.065) and BPS (0.079) were significantly lower than those of all BPs in Group 2. The BPBP clearance index was significantly lower than those of BPM, BPP and BPAF and the BPAF clearance index was significantly higher than that of BPZ.

Table 1
Validation results for the simultaneous quantification of 15 bisphenols in placenta medium.

Compound	BP4-4	BPS	BPB	BPE	BPA	BPAF	BPB	3-3BPA	BPZ	BPC	BPAP	BPP	BPM	BPFL	BPBP
Internal Standard	BP4-4	BPS	BPB	BPE	BPA	BPAF	BPB	3-3BPA	BPZ	BPC	BPAP	BPP	BPM	BPFL	BPBP
Model	BP4-4	BPS	BPB	BPE	BPA	BPAF	BPB	3-3BPA	BPZ	BPC	BPAP	BPP	BPM	BPFL	BPBP
LOQ (ng/mL)	5	10	5	5	5	1	5	50	5	50	1	50	5	5	5
CV intra-day %	14	4	16	13	18	7	10	9	9	7	12	13	15	9	15
QC = 30 ng/mL	12	3	13	11	11	3	7	4	4	4	5	9	11	8	5
QC = 300 ng/mL	14	2	10	11	9	6	11	4	4	4	3	15	11	14	13
QC = 1500 ng/mL	14	1	10	11	9	6	11	4	4	4	3	15	11	14	13
CV inter-day %	14	4	15	13	22	3	16	11	11	8	14	16	18	21	15
QC = 30 ng/mL	15	6	14	7	15	4	12	14	4	17	4	16	15	10	9
QC = 300 ng/mL	15	6	14	7	15	4	12	14	4	17	4	16	15	10	9
QC = 1500 ng/mL	14	4	14	16	14	6	12	16	4	18	3	12	18	14	14
Accuracy %	97	100	98	95	89	105	109	99	99	109	100	102	117	106	112
QC = 30 ng/mL	105	102	106	106	96	108	112	103	104	104	101	102	108	113	113
QC = 300 ng/mL	114	94	109	97	92	109	97	103	103	85	99	102	90	102	92
QC = 1500 ng/mL	12	7	15	7	15	11	11	9	13	17	21	15	11	1	5
CV intra-day %	114	105	113	99	106	109	100	119	116	94	111	108	83	94	103
Accuracy %	114	105	113	99	106	109	100	119	116	94	111	108	83	94	103

4. Discussion

Prenatal exposure to BPs may result in adverse effects on sensitive developmental processes. The scarcity of data concerning exposure of the human fetus to BPs analogues highlights the urgent need for a better understanding of the maternal-fetal-placental exchanges of these emerging structurally-related BPs.

In the present study, the *ex vivo* perfusion model of the human term placenta was used to examine the placental passage of 15 structurally related BPs. A method for the simultaneous quantification of 15 BPs analogues in the perfusion media was developed in UHPLC-MS/MS with performance fulfilling the acceptability criteria recommended in the EMA guidelines, in terms of sensitivity, precision and accuracy (European Medicines Agency, 2011). This method is suitable for quantifying low materno-fetal placental transfer rates within 0.6–4% depending on the BPs.

Antipyrine, a free passive diffusion reference which is not bound to plasma proteins, was used as a reference substance to assess the transfer rates of lipid-soluble xenobiotics (Ala-Kokko et al., 2000). The antipyrine clearances observed in this study (1.06–2.34 mL/min) were close to values reported previously, 2.24 ± 0.68 mL/min and 1.83 ± 0.619 mL/min, respectively (Corbel et al., 2014; Grandin et al., 2019). The clearance of each BP was expressed as a fraction of the antipyrine clearance (clearance index) to overcome inter-placental variability (Challier, 1985), and allow comparisons between different BPs and different experiments.

The BPA and BPS clearance indices (0.813 ± 0.063 and 0.079 ± 0.017) evaluated here with a combination of fifteen BPs, did not differ from those determined previously with the same compounds perfused separately (0.813 ± 0.13 and 0.0852 ± 0.0515 , respectively, (Corbel et al., 2014; Grandin et al., 2019), suggesting that the combination of 15 BPs did not interfere with the placental transfer mechanism and thus validated our cocktail approach.

Despite the structural similarities of these 15 BPs, the clearance indices for the current data set ranged from 0.065 for BPFL to 0.842 for BPB, indicating considerable differences in the efficiency of BP transport between BPs. The placental transfer rates of BP4-4, BPAP, BPE, BPF, 3-3BPA, BPB, BPA were similar to that of antipyrine, suggesting that exchange of these bisphenols across the placenta mainly involves passive diffusion and is solely limited by the placental blood flow. By contrast, the placental transfer rates for BPFL and BPS were very limited, and intermediate for BPBP, BPZ, BPC, BPM, BPP and BPAF suggesting that the placental transfer of these BPs does not rely solely on weak diffusional permeability but might involve differentially active transport. However, considering the high doses of BPs used, a saturation of the placental transfer cannot be ruled out.

In agreement with these findings, previous comparative toxicokinetic results in a pregnant sheep model showed that the materno-fetal transfer of BPS was ten-fold lower than that of BPA (Gauderat et al., 2017; Grandin et al., 2018) and that the fetomaternal total concentrations ratio of BPS was lower than those of BPF and BPA after a single subcutaneous administration of BPS or a mixture of BPA, BPS and BPF (Gingrich et al., 2019). Moreover, in a recent prospective birth cohort (Zhang et al., 2020), the ratio between umbilical cord and maternal total plasma concentrations of BPS was lower (1.11 in 11 pairs) than the ratios for BPA (1.94, n = 73) and BPAF (3.26, n = 22), which is consistent with a lower placental passage of this BP analogue. However, the human isolated cotyledon model, unlike the *in vivo* model, does not incorporate those nonplacental toxicokinetic factors that determine fetal exposure, such as maternal and fetal metabolism. Thus, it was shown in the pregnant sheep model that despite the low materno-fetal placental transfer of BPS, the accumulation of BPS in the fetal compartment after repeated maternal exposure led to chronic fetal exposure to

Table 2
Materno-fetal parameters (clearance, transfer rate and clearance index) of 15 bisphenols perfused as a cocktail.

	n = 5	Antipyrine	BPA	BPS	BPF	BPAF	BPB	BPE	BPC	BP4-4	3-3BPA	BPAP	BPBP	BPP	BPM	BPZ	BPFL
Transfer rate ^a (%)	Mean	31.68	25.70	2.45	22.52	16.38	26.45	21.52	12.25	21.13	22.86	18.10	7.99	14.68	14.48	9.87	1.98
	SD	12.64	9.85	0.77	11.10	5.95	9.11	8.86	4.55	9.27	8.75	7.15	2.66	6.68	7.34	3.94	0.70
Placental clearance ^b (mL/min)	Mean	1.671	1.345	0.129	1.164	0.857	1.387	1.115	0.640	1.105	1.196	0.946	0.420	0.770	0.763	0.518	0.105
	SD	0.614	0.467	0.039	0.518	0.284	0.436	0.401	0.222	0.455	0.414	0.341	0.135	0.326	0.367	0.195	0.039
Clearance index ^c	Mean	—	0.813	0.079	0.696	0.522	0.842	0.685	0.392	0.663	0.722	0.570	0.257	0.451	0.444	0.318	0.065
	SD	—	0.063	0.017	0.144	0.072	0.079	0.158	0.074	0.136	0.070	0.062	0.046	0.047	0.148	0.090	0.020

^a The ratio of the concentration in the receiving compartment to the concentration in the entrance compartment expressed as a percentage.

^b The concentration in the receiving compartment multiplied by its flow rate to the concentration in the entrance compartment.

^c The ratio of the transfer rate of each bisphenol to that of antipyrine.

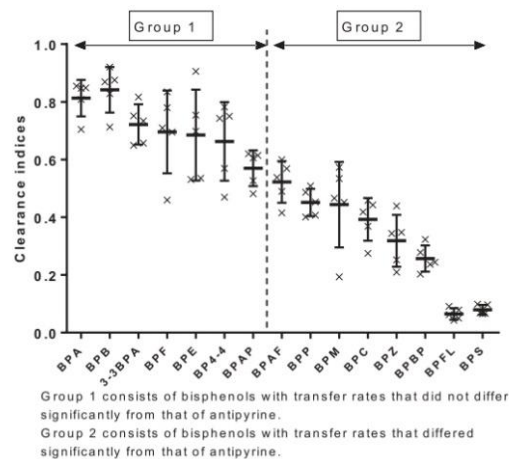


Fig. 2. Clearance indices of the 15 BPs (individual values (x) and mean \pm SD), corresponding to the ratio of BP-studied placental transfer rate divided by the antipyrine transfer rate.

BPS in a range of concentrations similar to those obtained for BPA (Grandin et al., 2018). Another limitation imposed by this model is that the present results refer to placenta at term and cannot necessarily be extrapolated to earlier stages of gestation. However, due to the placental thickness, the maximal uterine flow and the decrease of certain efflux transporters such as P-glycoprotein at term (Ceckova-Novotna et al., 2006; Joshi et al., 2016), the materno-fetal placental transfer rate at term may be considered as higher than at earlier gestational ages (Syme et al., 2004).

The placental transfer process may depend on the physicochemical and molecular properties of BPs, such as molecular size, lipophilicity (LogP), degree of ionization (pKa) and hydrogen-bonding capacity (Syme et al., 2004; Gedeon and Koren, 2006; Giaginis et al., 2009). In general, neutral compounds with a molecular weight below 600 Da, high lipid solubility (LogP > 1) and few hydrogen bonding sites have a high potential to freely diffuse across the placenta (Audus, 1999; Pacifici and Nottoli, 1995). Thus, the physicochemical properties of these 15 BPs (LogP within 2–7, pKa close to 8.5–9 and MW below 600 Da) would imply that their potential passive diffusion across the placenta would be high (Table 3). However, this is only true for seven BPs (BPAP, BP4-4, BPE, BPF, 3-3BPA, BPA and BPB). By contrast, the restricted transplacental permeability of BPBP, BPZ, BPC, BPM, BPP, BPAF, and, notably of BPS and BPFL, cannot be predicted solely from their physicochemical properties (Table 3).

The maternal plasma protein binding mechanism limits the rate of transfer across the placenta because only the free fraction of a molecule can diffuse across a cell membrane. A recent study to determine the affinities for human serum albumin of bisphenol A and several of its analogues, both by *in vitro* biomimetic LC and *in silico* prediction, showed that the interaction was largely non-specific and mainly lipophilicity-driven (Grumetto, 2019). The predicted limited unbound fractions of BPM and BPAF (0.98 and 1.10%, respectively) compared to those of highly diffusible BPs (BPE: 5.82%, BPF: 7.58%, BPA: 4.09% and BPB: 3.21%) are consistent with their differences in placental transfer rate. By contrast, the materno-fetal transfer of BPS is very limited even though its predicted free fraction in serum is relatively high (13.23%).

Alternatively, the materno-fetal transfer of BPS and BPFL might be restricted by the activity of an efflux transporter. Indeed, several ATP-dependent transporters including multi-drug resistant proteins and organic anion transporter (OAT) proteins, predominantly expressed in the syncytiotrophoblast, are involved in the efflux transport of a wide variety of xenobiotics and thereby in protection of the fetus (Syme et al., 2004). They are known to transport BPs compounds (Jin and Audus, 2005; Mørck et al., 2010) and their levels could be altered by bisphenols (Sieppi et al., 2016; Speidel et al., 2018). However, previous data showed that P-glycoprotein is not involved in limiting the materno-fetal placental transfer of BPS (Grandin et al., 2019). Further investigation is required to see if small structural changes in these analogues could influence the binding sites to transporters and thus the mechanism of transplacental transfer.

5. Conclusion

In conclusion, this is the first study to compare the materno-fetal placental transport of fifteen BPs perfused simultaneously through the term placenta, using the human placental perfusion model. These newly-introduced bisphenols present a wide range of placental transfer rates despite their similar molecular structures. Passive diffusion was the main transport mechanism for seven BPs, BP4-4, BPAP, BPE, BPF, 3-3BPA, BPB, BPA. By contrast, the placenta transfer rates for BPFL and BPS were very limited, and intermediate for BPBP, BPZ, BPC, BPM, BPP and BPAF suggesting that their passage across the placenta does not rely solely on weak diffusional permeability but might involve active transport. However, the placental transfer efficiency of these structurally related bisphenols, determined *ex vivo*, cannot be explained by their physicochemical properties alone. The data obtained for these fifteen bisphenols will be particularly useful for further development of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) models to evaluate the relative contributions of physicochemical, molecular and structural properties in the placental transfer of bisphenols in placental process (Giaginis et al., 2009), and predict the placental transport of this important class of emerging contaminants. This

Table 3
Chemical properties of bisphenols and relationship with the clearance index.

	Molecular weight (Da) ^a	pKa ^b acidity constant	log P ^b partition coefficient	percent unbound to plasma proteins (Grumetto, 2019)	Clearance indices ^c (mean ± SD)
BPFL	350.13	9.14	5.59		0.065 ± 0.020
BPS	250.03	8.44	2.15	13.23	0.079 ± 0.017
BPBP	352.15	9.21	6.02		0.257 ± 0.046
BPZ	268.15	9.45	5.00		0.318 ± 0.090
BPC	280.01	9.23	3.95		0.392 ± 0.074
BPM	346.19	9.47	7.04	0.98	0.444 ± 0.148
BPP	346.19	9.49	7.04		0.451 ± 0.047
BPAF	336.06	8.90	5.02	1.10	0.522 ± 0.072
BPAP	290.13	9.36	5.00		0.570 ± 0.062
BP4-4	186.07	9.45	2.52		0.663 ± 0.136
BPE	214.10	9.59	3.18	5.82	0.685 ± 0.158
BPF	200.08	9.66	2.91	7.58	0.696 ± 0.144
3-3BPA	256.15	9.74	4.81		0.722 ± 0.070
BPA	228.12	9.52	3.32	4.09	0.813 ± 0.063
BPB	242.13	9.49	4.44	3.21	0.842 ± 0.079

^a ChemDraw17.1 (Molecular Networks).^b ChemDraw17.1 (ChemPropPro).^c The BP-studied placental transfer rate divided by the antipyrine transfer rate.

could lead to rapid screening and subsequent discarding of endocrine-active BPA substitutes with a high fetal exposure potential.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank N. Deschamps for her assistance and involvement in placenta perfusion.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130213>.

Credit author statement

Clémence A. Gély: Conceptualization, analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft writing Marlène Z. Lacroix: Conceptualization, analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft review, Mathieu Morin: Investigation, Christophe Vayssière: Investigation, Véronique Gayraud: Conceptualization, analysis, Investigation, Validation, Writing – review & editing, Nicole Picard-Hagen: Conceptualization, Funding acquisition; analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft Writing – review & editing.

References

- Ala-Kokko, T.I., Myllynen, P., Vähäkangas, K., 2000. Ex vivo perfusion of the human placental cotyledon: implications for anesthetic pharmacology. *Int. J. Obstet. Anesth.* 9, 26–38. <https://doi.org/10.1054/ijoa.1999.0312>.
- Audus, K.L., 1999. Controlling drug delivery across the placenta. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 8, 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00031-7).
- Caballero-Casero, N., Lunar, L., Rubio, S., 2016. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Anal. Chim. Acta* 908, 22–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.034>.
- Catanese, M.C., Vandenberg, L.N., 2016. Bisphenol S (BPS) alters maternal behavior and brain in mice exposed during pregnancy/lactation and their daughters. *Endocrinology* 158 (3), 516–530. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1723>.
- Ceckova-Novotna, M., Pavek, P., Staud, F., 2006. P-glycoprotein in the placenta:

expression, localization, regulation and function. *Reprod. Toxicol.* 22, 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.01.007>.

- Challier, J.-C., 1985. Criteria for evaluating perfusion experiments and presentation of results. In: Schneider, H., Dancis, J. (Eds.), *Contributions to Gynecology and Obstetrics*. S. Karger AG, pp. 32–39. <https://doi.org/10.1159/000410667>.
- Challier, J.C., D'Atthis, Ph., Guerre-Millo, M., Nandakumar, M., 1983. Flow-dependent transfer of antipyrine in the human placenta in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 23, 41–50. <https://doi.org/10.1051/rnd:19830104>.
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.-L., Wu, Y., Widelka, M., 2016. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5438–5453. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387>.
- Chen, Y., Fang, J., Ren, L., Fan, R., Zhang, J., Liu, G., Zhou, L., Chen, D., Yu, Y., Lu, S., 2018. Urinary bisphenol analogues and triclosan in children from south China and implications for human exposure. *Environ. Pollut.* 238, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.031>.
- Corbel, T., Gayraud, V., Puel, S., Lacroix, M.Z., Berrebi, A., Gil, S., Vigié, C., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2014. Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reprod. Toxicol.* 47, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.001>.
- European Medicines Agency, 2011. *Guideline on Bioanalytical Method Validation*. Frederiksen, H., Nielsen, O., Koch, H.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., Jørgensen, N., Andersson, A.-M., 2020. Changes in urinary excretion of phthalates, phthalate substitutes, bisphenols and other polychlorinated and phenolic substances in young Danish men: 2009–2017. *Int. J. Hyg Environ. Health* 223, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.002>.
- Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P.-L., Servien, R., Vigié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Corbel, T., Bousquet-Melou, A., Gayraud, V., 2017. Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A and bisphenol A glucuronide from an ovine semi-physiological toxicokinetic model. *Sci. Rep.* 7 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15646-5>.
- Gavard, L., Beghin, D., Forestier, F., Cayre, Y., Peytavin, G., Mandelbrot, L., Farinotti, R., Gil, S., 2009. Contribution and limit of the model of perfused cotyledon to the study of placental transfer of drugs. Example of a protease inhibitor of HIV: Nelfinavir. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 147, 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.08.007>.
- Gedeon, C., Koren, G., 2006. Designing pregnancy centered medications: drugs which do not cross the human Placenta. *Placenta* 27, 861–868. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.09.001>.
- Giaginis, C., Zira, A., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A., 2009. Application of quantitative structure–activity relationships for modeling drug and chemical transport across the human placenta barrier: a multivariate data analysis approach. *J. Appl. Toxicol.* 29, 724–733. <https://doi.org/10.1002/jat.1466>.
- Gingrich, J., Pu, Y., Ehrhardt, R., Karthikraj, R., Kannan, K., Veiga-Lopez, A., 2019. Toxicokinetics of bisphenol A, bisphenol S, and bisphenol F in a pregnancy sheep model. *Chemosphere* 220, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.109>.
- González, N., Cunha, S.C., Ferreira, R., Fernandes, J.O., Marquês, M., Nadal, M., Domingo, J.L., 2020. Concentrations of nine bisphenol analogues in food purchased from Catalonia (Spain): comparison of canned and non-canned food-stuffs. *Food Chem. Toxicol.* 136, 110992. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110992>.
- Grandin, F., Picard-Hagen, N., Gayraud, V., Puel, S., Vigié, C., Toutain, P.-L., Debrauwer, L., Lacroix, M.Z., 2017. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S

- glucuronide: applicability to toxicokinetic investigations. *J. Chromatogr. A* 1526, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020>.
- Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayraud, V., Gauderat, G., Mila, H., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2018. Bisphenol S instead of Bisphenol A: toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. *Environ. Int.* 120, 584–592. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019>.
- Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayraud, V., Vigié, C., Mila, H., de Place, A., Vayssière, C., Morin, M., Corbett, J., Gayraud, C., Gély, C.A., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure? Placental transfer across the perfused human placenta. *Chemosphere* 221, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.065>.
- Grumetto, L., 2019. Scrutinizing the interactions between bisphenol analogues and plasma proteins. Insights from biomimetic liquid chromatography, molecular docking simulations and in silico predictions. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7.
- Gyllenhammar, I., Glynn, A., Jönsson, B.A.G., Lindh, C.H., Darnerud, P.O., Svensson, K., Lignell, S., 2017. Diverging temporal trends of human exposure to bisphenols and plasticizers, such as phthalates, caused by substitution of legacy EDCs? *Environ. Res.* 153, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.11.012>.
- Husøy, T., Andreassen, M., Hjertholm, H., Carlsen, M.H., Norberg, N., Sprong, C., Papadopoulou, E., Sakhi, A.K., Sabaredzovic, A., Dirven, H.A.A.M., 2019. The Norwegian biomonitoring study from the EU project EuroMix: levels of phenols and phthalates in 24-hour urine samples and exposure sources from food and personal care products. *Environ. Int.* 132, 105103. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105103>.
- Hutson, J.R., Garcia-Bournissen, F., Davis, A., Koren, G., 2011. The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 90, 67–76. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.66>.
- Ihde, E.S., Zamudio, S., Loh, J.M., Zhu, Y., Woytanowski, J., Rosen, L., Liu, M., Buckley, B., 2018. Application of a novel mass spectrometric (MS) method to examine exposure to Bisphenol-A and common substitutes in a maternal fetal cohort. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 24, 331–346. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1381831>.
- Jin, H., Audus, K.L., 2005. Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. *Placenta* 26, S96–S103. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.01.016>.
- Joshi, A.A., Vaidya, S.S., St-Pierre, M.V., Mikheev, A.M., Desino, K.E., Nyandede, A.N., Audus, K.L., Unadkat, J.D., Gerk, P.M., 2016. Placental ABC transporters: biological impact and pharmaceutical significance. *Pharm. Res. (N.Y.)* 33, 2847–2878. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2028-8>.
- Karttunen, V., Sahlan, H., Repo, J.K., Woo, C.S.J., Myöhänen, K., Myllynen, P., Vähäkangas, K.H., 2015. Criteria and challenges of the human placental perfusion – data from a large series of perfusions. *Toxicol. Vitro* 29, 1482–1491. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.001>.
- Kojima, H., Takeuchi, S., Sanoh, S., Okuda, K., Kitamura, S., Uramaru, N., Sugihara, K., Yoshinari, K., 2019. Profiling of Bisphenol A and Eight Its Analogues on Transcriptional Activity T via Human Nuclear Receptors 8.
- Lacroix, M.Z., Puel, S., Collet, S.H., Corbel, T., Picard-Hagen, N., Toutain, P., Vigié, C., Gayraud, 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. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.040>.
- Larsson, A., Palm, M., Hansson, L.-O., Axelsson, O., 2008. Reference values for clinical chemistry tests during normal pregnancy. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 115, 874–881. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01709.x>.
- Lehmter, H.-J., Liu, B., Gadogbe, M., Bao, W., 2018. Exposure to bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol S in U.S. Adults and children: the national health and nutrition examination survey 2013–2014. *ACS Omega* 3, 6523–6532. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00824>.
- Liao, C., Kannan, K., 2014. A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 50–59. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0016-8>.
- Liao, C., Kannan, K., 2013. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4655–4662. <https://doi.org/10.1021/jf400445n>.
- Liu, J., Li, J., Wu, Y., Zhao, Y., Luo, F., Li, S., Yang, L., Moez, E.K., Dinu, I., Martin, J.W., 2017. Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2456–2463. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05718>.
- Lucarini, F., Krasniqi, T., Bailat Rosset, G., Roth, N., Hopf, N.B., Broillet, M.-C., Staedler, D., 2020. Exposure to new emerging bisphenols among young children in Switzerland. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 17, 4793. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134793>.
- Luo, H., Li, C., Fang, H., Wang, X., 2016. Comparative study of the interactions between bisphenol analogues and serum albumins by electrospray mass spectrometry and fluorescence spectroscopy: interactions between bisphenol analogues and serum albumins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30, 162–167. <https://doi.org/10.1002/rcm.7633>.
- Mørck, T.J., Sorda, G., Bechi, N., Rasmussen, B.S., Nielsen, J.B., Ietta, F., Rytting, E., Mathiesen, L., Paulesu, L., Knudsen, L.E., 2010. Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 30, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.02.007>.
- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2017. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12796–12805. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>.
- Mustieles, V., D' Cruz, S.C., Couderq, S., Rodríguez-Carrillo, A., Fini, J.-B., Hofer, T., Steffensen, I.-L., Dirven, H., Barouki, R., Olea, N., Fernández, M.F., David, A., 2020. Bisphenol A and its analogues: a comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring. *Environ. Int.* 144, 105811. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105811>.
- Pacifici, G.M., Nottoli, R., 1995. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin. Pharmacokinet.* 28, 235–269. <https://doi.org/10.2165/00003088-199528030-00005>.
- Pan, Y., Deng, M., Li, J., Du, B., Lan, S., Liang, X., Zeng, L., 2020. Occurrence and maternal transfer of multiple bisphenols, including an emerging derivative with unexpectedly high concentrations, in the human maternal–fetal–placental unit. *Environ. Sci. Technol.* 54, 3476–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00206>.
- Pelch, K., Wignall, J.A., Goldstone, A.E., Ross, P.K., Blain, R.B., Shapiro, A.J., Holmgren, S.D., Hsieh, J.-H., Svoboda, D., Auerbach, S.S., Parham, F.M., Masten, S.A., Walker, V., Rooney, A., Thayer, K.A., 2019. A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology* 424, 152235. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.06.006>.
- Philips, E.M., Kahn, L.G., Jaddoe, V.W.V., Shao, Y., Asimakopoulos, A.G., Kannan, K., Steegers, E.A.P., Trasande, L., 2018. First trimester urinary bisphenol and phthalate concentrations and time to pregnancy: a population-based cohort analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103, 3540–3547. <https://doi.org/10.1210/je.2018-00855>.
- Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environ. Health Perspect.* 123 (7), 643–650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>.
- Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B.M., Wedeby, E.B., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? *Toxicol. Sci.* 139, 35–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/ky030>.
- Schneider, H., Panigel, M., Dancis, J., 1972. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium, and leucine. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 114, 822–828. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(72\)90909-X](https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90909-X).
- Search for Chemicals (accessed 10.13.20). https://echa.europa.eu/fr/search-for-chemicals?p_id=dissimplesearch_WAR_dissearhportlet&p_p_lifecycle=0&_dissimplesearch_WAR_dissearhportlet_searchOccured=true&_dissimplesearch_WAR_dissearhportlet_sessionCriteriaId=dissSimpleSearchSessionParam101401602581767544.
- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Hayashi, K., 2018. Prenatal exposure to bisphenol A analogues on male reproductive functions in mice. *Toxicol. Sci.* 163, 620–631. <https://doi.org/10.1093/toxsci/ky061>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.034>.
- Siracusa, J.S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., Yu, X., 2018. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: a mini review. *Reprod. Toxicol.* 79, 96–123. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005>.
- Speidel, J.T., Xu, M., Abdel-Rahman, S.Z., 2018. Bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) alter the promoter activity of the ABCB1 gene encoding P-glycoprotein in the human placenta in a haplotype-dependent manner. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 359, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.022>.
- Syme, M.R., Paxton, J.W., Keelan, J.A., 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin. Pharmacokinet.* 43, 487–514. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443080-00001>.
- Tucker, D.K., Hayes Bouknight, S., Brar, S.S., Kissling, G.E., Fenton, S.E., 2018. Evaluation of prenatal exposure to bisphenol analogues on development and long-term health of the mammary gland in female mice. *Environ. Health Perspect.* 126, 087003. <https://doi.org/10.1289/EHP3189>.
- Usman, A., Ahmad, M., 2016. From BPA to its analogues: is it a safe journey? *Chemosphere* 158, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.070>.
- Wang, Y.-Q., Zhang, H.-M., Cao, J., Tang, B.-P., 2014. Binding of a new bisphenol analogue, bisphenol S to bovine serum albumin and calf thymus DNA. *J. Photochem. Photobiol., B* 138, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.06.002>.
- Yang, H., Huang, Y., Liu, J., Tang, P., Sun, Q., Xiong, X., Tang, B., He, J., Li, H., 2017. Binding modes of environmental endocrine disruptors to human serum

C.A. Gély, M.Z. Lacroix, M. Morin et al.

Chemosphere 276 (2021) 130213

- albumin: insights from STD-NMR, ITC, spectroscopic and molecular docking studies. *Sci. Rep.* 7, 11126. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11604-3>.
- Yang, Yunjia, Lu, L., Zhang, J., Yang, Yi, Wu, Y., Shao, B., 2014. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1328, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.074>.
- Ye, X., Wong, L.-Y., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T., Calafat, A.M., 2015. Urinary concentrations of bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of U.S. Adults during 2000–2014. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11834–11839. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02135>.
- Zhang, B., He, Y., Zhu, H., Huang, X., Bai, X., Kannan, K., Zhang, T., 2020. Concentrations of bisphenol A and its alternatives in paired maternal–fetal urine, serum and amniotic fluid from an e-waste dismantling area in China. *Environ. Int.* 136, 105407. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105407>.
- Zhang, Y.-F., Ren, X.-M., Li, Y.-Y., Yao, X.-F., Li, C.-H., Qin, Z.-F., Guo, L.-H., 2018. Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo. *Environ. Pollut.* 237, 1072–1079. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.027>.

2.3. Conclusion

Le modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé a permis de déterminer pour ces 15 bisphénols perfusés en cocktail, le taux de transfert placentaire, la clairance placentaire et l'indice de clairance dans la direction materno-foétale. Cette étude a nécessité le développement d'une méthode de dosage simultané des 15 bisphénols, elle a été validée en termes de sélectivité, de justesse et de fidélité intra- et inter-jour. Les performances de la méthode, avec des LOQ comprises entre 1 et 50 ng/mL, sont adaptées aux conditions de perfusion car elles permettent de mesurer un taux de transfert placentaire minimal entre 0,6 et 4 % selon le bisphénol.

Les indices de clairance du BPA et du BPS, perfusés en cocktail dans la présente étude, ne sont pas significativement différents de ceux obtenus lorsque le BPA et le BPS ont été perfusés isolément sur le même modèle [99], [100], ce qui nous a permis de valider notre approche en cocktail. Les 15 analogues de bisphénols décrivent une large gamme de taux de transfert, entre 1,98 et 26,45 %, et d'indices de clairance compris entre 0,065 et 0,842. Deux groupes de bisphénols ont été identifiés, en prenant comme référence l'antipyrine, un marqueur de diffusion passive : un groupe de 7 bisphénols ayant un taux de transfert similaire à celui de l'antipyrine, ce qui indique que leur passage placentaire met en jeu un mécanisme de diffusion passive et un groupe de 8 bisphénols dont le passage placentaire est plus limité et qui pourrait impliquer des transporteurs actifs. Parmi eux, le BPS et le BPFL sont les bisphénols dont les taux de transfert placentaires sont les plus faibles, 2,45 et 1,98 %, respectivement.

En définitive, cette étude montre que malgré l'analogie structurale de ces bisphénols, leurs mécanismes de passage placentaire sont différents. Ces différences pourraient être liées à leurs propriétés physico-chimiques et à leur liaison aux protéines plasmatiques. Ainsi, le développement de modèles QSAR prédictifs du passage placentaire pourrait permettre d'évaluer le potentiel d'exposition foétale de cette famille de bisphénols émergents et donc de cribler les substituts du bisphénol A, afin d'éviter des substitutions regrettables.

L'extrapolation des données toxicologiques relatives aux bisphénols émergents obtenues *in vitro* ou *in vivo*, sur des modèles animaux, principalement rongeurs ou poissons, à l'Homme, nécessite d'évaluer les mécanismes d'exposition interne. Or, malgré leur analogie structurale, le comportement toxicocinétique de ces bisphénols peut être très différent, comme cela a été démontré pour le BPS et le BPA [76] et comme nous l'avons décrit dans la partie précédente pour le transfert placentaire de 15 bisphénols [264].

La troisième étude a donc pour objectif d'évaluer les paramètres TK déterminant l'exposition à 12 bisphénols après une exposition par voie orale, qui constitue la principale voie d'exposition aux bisphénols. Cette étude a été réalisée sur un modèle porcin, pertinent vis-à-vis de l'Homme en termes de physiologie digestive.

3. Etude de la disposition de douze bisphénols suite à leur ingestion sur un modèle porcin

3.1. Contexte et objectifs

Des bisphénols émergents ont progressivement remplacé le bisphénol A dans les emballages alimentaires. Par conséquent, l'alimentation constitue la principale source d'exposition aux bisphénols. Plusieurs études TK, sur différentes espèces (Homme, singe, brebis, porc et rongeurs) ont évalué la disposition du BPA ou de son principal substitut, le BPS, après une administration par voie orale. Une étude comparative de la disposition du BPA et du BPS après une administration par voie orale chez le porc, a montré des différences toxicocinétiques majeures entre ces deux analogues (biodisponibilité orale du BPS 100 fois plus élevée que celle du BPA, associée à une clairance 3 fois plus faible), qui conduisent à une exposition interne au BPS actif 250 fois plus élevée qu'au BPA [76]. Chez les rongeurs, le BPAF présente un profil TK proche de celui du BPA [126]. Cependant, à ce jour, les données TK relatives aux autres bisphénols émergents sont éparpillées (cf : Chapitre 1 : Etude bibliographique, partie 3).

Afin de caractériser le risque lié à l'exposition de ces nouveaux substituants du BPA, notre étude a pour objectif d'évaluer les paramètres TK qui déterminent l'exposition interne de 12 bisphénols, BPA, BPS, BPFL, BPZ, 3-3BPA, BP4-4, BPF, BPM, BPP, BPAF, BPAP et BPB. Ces bisphénols ont été choisis en raison de leur utilisation croissante (production >1 tonne, selon l'ECHA, [17]) et de l'exposition humaine observée dans des études de biosurveillance [22], [26], [80], [92].

L'étude TK a été réalisée sur un modèle porcin, pertinent vis-à-vis de l'Homme en termes de physiologie gastro-intestinale [257], [258]. Les 12 bisphénols ont été administrés en cocktail, par voie orale et par voie intraveineuse. Cette étude a nécessité le développement de plusieurs méthodes de dosage simultané des 12 bisphénols dans le plasma et les urines. Le dosage des urines a été effectué en UHPLC-UV et les concentrations urinaires en bisphénol total (aglycone et métabolite) ont été mesurées après une hydrolyse enzymatique. Une méthode de dosage en UHPLC-MS/MS des 12 bisphénols aglycones dans le plasma a été développée. Les profils temporels des concentrations plasmatiques de chacun des bisphénols ont ensuite été analysés, avec le logiciel Phoenix (Phoenix NLME version 8.3, Certara) pour déterminer les paramètres TK.

Les résultats de cette étude feront prochainement l'objet d'un article qui sera soumis dans une revue de toxicologie.

3.2. Article 3

Les données supplémentaires associées à cet article sont présentées en annexe 3.

Comparison of toxicokinetic properties of eleven analogues of BPA in pig after intravenous and oral administrations.

Clémence A. Gély^{1,2}, Marlène Z. Lacroix², Béatrice B. Roques², Pierre-Louis Toutain^{2,3}, Véronique Gayraud¹, Nicole Picard-Hagen¹

¹ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

²INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

³The Royal Veterinary College, University of London, London

Abstract

Due to the restrictions of its use, Bisphenol A (BPA) has been replaced by many structurally related bisphenols (BPs) in consumer products. However, endocrine disrupting potential similar to that of BPA has been described for several bisphenols. There is an urgent need of toxicokinetics (TK) data for these emerging BPs to evaluate if their internal exposure potential could increase the risk of endocrine disruption.

Therefore, the aim of this study was to estimate the TK properties of eleven BPA substitutes (BPS, BPAF, BPB, BPF, BPM, BPZ, 3-3BPA, BP4-4, BPAP, BPP and BPFL). For this purpose, a cocktail of bisphenols was administered to piglets to evaluate the disposition of these bisphenols after intravenous and oral administrations. A nonlinear mixed-effects model was used to estimate the key TK parameters of eleven substitutes in comparison with those of BPA and to validate our cocktail approach.

The urine excretion data indicated that most of these bisphenols are rather well absorbed, but BPM, BPP, BPFL and BPAP are poorly excreted in urine. Despite their structural similarities, these BPs differed greatly in their oral systemic exposure, due to a considerable range of oral bioavailability (from 0.9% for BPA to 60 % for BPS). Mean BPS plasma clearance was about 2 to 4 times lower than that of all BPs. Therefore, the BPS oral systemic exposure was much higher than that of the other BPs, on average about 150 times higher than for BPA, between 20-75 times higher than for BP4-4, 3-3 BPA, BPAF, BPZ, BPB, BPAP and 8-15 times higher than for BPFL, BPP, BPF, BPM, for an equal oral dose of the compounds.

Given the similar digestive tract of pigs and humans, our data suggests that replacing BPA with some alternative of BPA, particularly BPS, will likely lead to increase internal exposure to potential endocrine compounds.

Introduction

Due to restrictions of the use of BPA in food contact plastics, manufacturers have replaced BPA with structurally related molecules. Some of them, like BPS, BPF, BPAF, BPAP, BPB, BPP and BPZ were detected in food (González et al., 2020; Karsauliya et al., 2021; Liao and Kannan, 2014a, 2013; Morgan and Clifton, 2021), personal care products (Liao and Kannan, 2014b; Lu et al., 2018) and indoor dust (Liao et al., 2012; Wang et al., 2015; H. Zhang et al., 2020). Human exposure to bisphenols (BPs) is therefore ubiquitous. Biomonitoring studies showed that the distribution of BPs detected in human urine has changed in recent years, with a decrease of BPA concentrations from the late 2000s to the late 2010s, and at the same time, an increase of the detection rate and urine concentrations of BPS and BPF (Frederiksen et al., 2020; Gyllenhammar et al., 2017; Gys et al., 2021; Ye et al., 2015). Thus, BPA, BPS and BPF are currently the most frequently detected BPs in human urines, but other BPs became increasingly detected such as BPAF, BPB, BPP, BPZ and BPAP (Chen et al., 2018; Gys et al., 2021; Lucarini et al., 2020; H. Zhang et al., 2020). The pregnancy is considered as a critical period, because the developing foetus is particularly vulnerable to endocrine disruption. These bisphenols are also detected in the urines of pregnant women (Philips et al., 2018; B. Zhang et al., 2020) and can cross the placental barrier (Gély et al., 2021). Furthermore, these substitutes of bisphenols showed endocrine disrupting potential similar to that of BPA. It was shown *in vitro* that BPA, BPB, BPZ and BPAP could exert a thyroid disrupting effect due to their binding affinity to thyroid hormone receptor alpha and thyroxine-binding globulin (Beg and Sheikh, 2020). Moreover, a recent study showed that BPA, BPAF, BPAP, BPB, BPE, BPF, BPS, BPP and BPZ have estrogen agonist and antagonist and androgen antagonist activities (Kojima et al., 2019). Furthermore, *in vivo* studies showed that prenatal exposure to BPA, BPE and BPS induced male and female reproductive dysfunctions (Shi et al., 2019, 2018). Altogether these data suggest that these structurally related bisphenols could induce endocrine disrupting effects (Moreman et al., 2017; Pelch et al., 2019; Rochester and Bolden, 2015; Rosenmai et al., 2014; Siracusa et al., 2018; Usman and Ahmad, 2016). Thus, the substitution of BPA with structurally related bisphenols may be of concern for human health. However, to assess the risk of exposure to endocrine disruptors in human, it is necessary to investigate the toxicokinetic (TK) mechanisms determining the exposure to these compounds in order to be able to extrapolate toxicological data from *in vitro* or from animal model to human and to compare internal exposure producing deleterious effects to those observed in biomonitoring studies.

Moreover, the risk of endocrine disruption could be exacerbated if the TK properties of some BPA substitutes increased systemic exposure to the hormonally active substance. Indeed, the concentrations at the site of action depend on plasma concentrations, these latter being related to oral dose through a key TK parameter, namely plasma clearance in addition to oral bioavailability.

The toxicokinetics of BPA and its main substitute BPS were widely studied on several species (Collet et al., 2015; Gayrard et al., 2020; Grandin et al., 2017, 2018; Sasso et al., 2020; Sonker et al., 2021; Waidyanatha et al., 2018). The human plasma clearance of BPA and BPS has been previously estimated from allometric scaling (Collet et al., 2015; Gayrard et al., 2020). A nearly total presystemic metabolism of BPA mainly in the liver is predicted by its high clearance value (1.5 L/kg.h) when BPA is absorbed at the level of the intestine while the about two times lower clearance of BPS (0.79 L/kg.h), may result in a much more than proportional increase in the bioavailability of BPS compared to BPA. Thus, a previous TK study carried out in piglets have shown that the oral bioavailability of BPS is about 100 times higher than that of BPA (Gayrard et al., 2019). This result is comforted by the previous estimate of a high oral BPS bioavailability in humans (62%, (Khmiri et al., 2020)). Limited studies have evaluated the TK of bisphenol F (BPF) and bisphenol AF (BPAF). In rat, BPF appears to be mostly metabolized in sulfate conjugate after oral administration (Cabaton et al., 2006) and BPAF, like BPA, is extensively metabolized into BPAF-glucuronide with a low oral bioavailability around 1% (Waidyanatha et al., 2021, 2019). However, these toxicokinetic data, crucial for evaluating the risk of BPs exposure, are lacking for most of these emerging bisphenols. In this context, the objective of our study was to evaluate and compare the toxicokinetic properties determining the exposure of twelve bisphenols, BPA, BPS, BPAF, BPB, BPF, BPM, BPZ, 3-3BPA, BP4-4, BPAP, BPP and BPFL. These twelve analogs were selected because of their industrial use (Caballero-Casero et al., 2016; Liao and Kannan, 2013; "Search for Chemicals - ECHA," n.d.) and their detection in recent biomonitoring studies (Chen et al., 2018; Gys et al., 2021; Lucarini et al., 2020; H. Zhang et al., 2020). A mixture of these twelve BPs was administrated intravenously and by gavage to piglets, a relevant species towards human in terms of digestive function (Gonzalez et al., 2015; vom Saal and Welshons, 2006). Our cocktail approach was validated for BPA and BPS by comparing the TK parameters obtained in this study with those previously determined when they were administered alone (Gayrard et al., 2019). Key TK parameters were estimated using a nonlinear mixed effect model (NLME) and compared between the twelve studied bisphenols.

1. Materials and methods

1.1. Animals

The experimental protocol was authorized by the French Ministry of Research under the number #22452_2019101609073159. The experiment was carried out on nine female piglets of Large White breed from a French farm (GAEC Calvignac, St Vincent d'Autejac, France). They were aged from 28 (weaning ages) to 51 days (study end) and they weighed between 8.75 kg at arrival and 21.3 kg at the end of the study, respectively, 11.2 ± 1.4 , 13.7 ± 1.8 and 17.0 ± 2.2 kg in the first, second and third period. The piglets were fed with a flour-based growth food (PS2, Solieval, Villefranche de Rouergue, France) given ad libitum except the days of the administration. Water was given ad libitum. The piglets were housed at room temperature (24°C) with a 12h light/dark cycle.

1.2. Experimental design

The experiment was design as a cross-over in three periods separated by 72 h. At each period, three piglets received a mix of BPs containing BPA, BPAF, BPB, BPF, BPM, BPZ and 3-3BPA at a nominal dose of 6 $\mu\text{mol/kg}$ bodyweight (BW) by intravenous route (IV), three other piglets received a mix of BPs containing BPS, BP4-4, BPAP, BPP, BPFL at a nominal dose of 6 $\mu\text{mol/kg}$ BW by IV and the three other piglets received a mix of all 12 BPs at a nominal dose 200 $\mu\text{mol/kg}$ BW by oral route. For the IV route, only 5 to 7 BPs were administered in mixture because of the poor solubility of BPs in DMSO and in pig blood. The IV administrations were carried out via an indwelling catheter inserted into the auricular vein just before the administrations (0.1 mL of solution by kg BW) and oral administration were carried out by gastric intubation (2 mL of solution by kg BW). The IV and oral doses were selected based on the previous TK study (Gayrard et al., 2019) allowing to monitor plasma concentrations for approximately 4-8 h and to observe the terminal phase of elimination considering the performance of the assay.

1.3. Samples collection

Blood samples (2mL) were obtained by serial jugular venous blood sampling before and after administration. They were drawn before and at 2, 5, 15, 30, 60 min, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 24, 34, 48 and 72h in heparinized polypropylene tubes, immediately chilled on ice and centrifuged for 10 min at $3000 \times g$ at 4°C. Plasma was stored in polypropylene tubes at -20°C until assay. Total urine was collected over 24h with collection times at 0, 3, 6, 8, 11 and 24h after BPs administration. Urines were filtered through a nylon mesh (250 μm), collected in glass containers and chilled on ice. The volume of each urine sample and the sampling time were

recorded. One urine sample was immediately chilled on ice and centrifuged for 10 min at 3000 x g at 4°C and stored at -20°C until assay

1.4. Test materials and treatments

All materials for the preparation of solutions, including the materials used for sampling, processing and analysis, were made of glass or BPA and BPS-free plastic (polypropylene). Bisphenol S (BPS, purity \geq 98%), Bisphenol A (BPA, purity \geq 99%), 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane (3-3BPA, purity \geq 97%), Bisphenol FL (BPFL, purity \geq 97%), Bisphenol Z (BPZ, purity \geq 98%), 4,4'-Dihydroxybiphenyl (BP4-4, purity \geq 97%), Bisphenol AP (BPAP, purity \geq 99%), Bisphenol AF (BPAF, purity \geq 97%), Bisphenol M (BPM, purity \geq 99%), and Bisphenol BP (BPBP, purity \geq 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Bisphenol B (BPB, purity \geq 98%), Bisphenol F (BPF, purity \geq 96%), Bisphenol P (BPP, purity \geq 98%) and six isotopes-labeled standards, namely, BPAF-d4 (purity \geq 98%), BPAP-d5 (purity \geq 97.5%), BPP-d16 (purity \geq 98%), BPS-d8 (purity \geq 97%), and BPA¹³C₁₂ (purity \geq 98%), used as internal standards (IS), were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) (Figure 1).

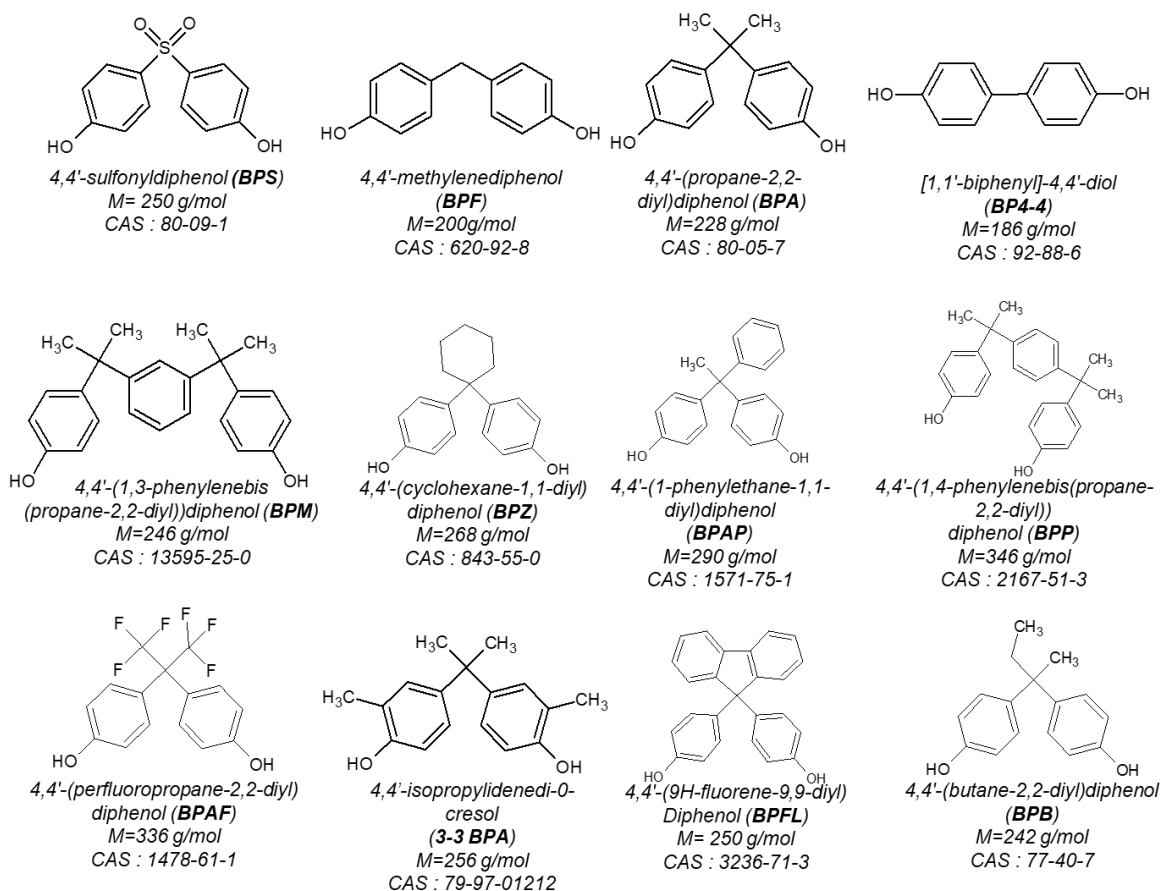


Figure 1: Chemical structure of studied bisphenol, with their CAS number and their molar weight.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) and corn oil were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Methanol was LC/MS quality and purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). For IV administrations, BPs were dissolved in DMSO at 60 mM. For oral administration, BPs were dissolved in a DMSO/corn oil mix (50:50/v:v) at 100 mM and mixed before administration to obtain an emulsion. The concentrations of dosing solutions were determined by Acquity ultra performance liquid chromatography I Class coupled to PhotoDiode Array detector (UPLC-UV, Waters, Milford, MA, USA) and exact doses were used in NCA and NLME modeling (Table S1).

1.5. Samples analysis

1.5.1 Quantification of urinary concentrations

For BPA, BPS, BPAF, BPB, BPF, BPM, BPZ, 3-3BPA, BP4-4, BPAP, BPP, BPFL, the unconjugated and total bisphenol were quantified in urine by ultra-high performance liquid chromatography coupled with UV detection (UHPLC-UV). Briefly, the unconjugated bisphenols were extracted from 400 μ L of urine and 100 μ L of IS (BPBP at 5 μ g/mL) with Solid Phase Extraction (SPE) on HR-XAW cartridge (Macherey Nagel, Düren, Germany) under vacuum with a protocol adapted from Gély et al. (C.A. Gély et al., 2021). After elution with MeOH, samples were evaporated to dryness, reconstituted with 200 μ L of 50:50 (v:v) H₂O/MeOH and analytes were separated on a Acquity BEH Phenyl column (2.1*100 mm, 1.7 μ m) with a H₂O/MeOH gradient [0.3 mL/min, 40 °C] and detected by UV. The wavelengths for each compound were reported in table S2. Chromatographic data were monitored by Empower[®] software (Water, Milford, MA, USA). The method was validated in urine according to the European Medicine Agency Guidelines with two calibration curves: high concentrations, from 0.5 to 20 μ g/mL, and low concentrations from 0.01 μ g/mL to 2 μ g/mL were quantified at several wavelengths (Table S2). Blank samples were used to check the absence of contamination during assay. The accuracy ranges of three QCs (0.03, 0.15 and 1.5 μ g/mL) were 89%-114%, with intra- and inter-day precision lower than 16% for all BPs for low calibration. The accuracy ranges of three other QCs (1.5, 7.5 and 15 μ g/mL) were 98%-120%, with intra- and inter-day precision lower than 16% for all BPs for high calibration. The accuracy ranges were 81%-121% with a CV % inter-day (n=6) lower than 19% at LOQ (limit of quantification, 0.01-1 μ g/mL, according to BPs). LOQ, model linearity, accuracy and inter and intra-day CV results for each BP were reported in table S3a and b.

Total bisphenols were simultaneously quantified in urine by UHPLC-UV, after an enzymatic hydrolysis. Conjugated bisphenols were hydrolyzed by adding 100 μ L of sodium acetate buffer containing β -glucuronidase diluted by 100 (β -glucuronidase type HP-2: ref G7017 aldrich: 100,000 units/mL) and BPBP at 10 μ g/mL as IS to 100 μ L of sample. Samples were

incubated during 2 hours at 37 °C and 500 rpm. After the incubation, 200 µL MeOH were added and shaken at 10°C for 1 minute at 1400 rpm and centrifuged at 20000 × g at 4°C. Twenty µL of supernatant were eluted under the conditions previously described for unconjugated BPs. Blank samples were used to check the absence of contamination during assay. The total hydrolysis was verified by serial dilution and hydrolysis of BPA-G, BPF-G, BPS-G and BPAF-G and the method was validated in pig urine according to the European Medicine Agency Guidelines from 0.2-100 µg/mL. The accuracy ranges of five QCs (0.6, 3, 7.5, 30 and 75 µg/mL) were 90%-121%, with intra-and inter-day precision lower than 20 % for all BPs. The accuracy ranges were 80%-122%, with intra-and inter-day precision lower than 12 % for all BPs at LOQ (between 0.2-1µg/mL according to BPs). LOQ, model linearity, accuracy and inter and intra-day CV results were reported in table S4.

1.5.2 Quantification of plasma concentrations

Unconjugated bisphenols in plasma were quantified after protein precipitation by Acquity ultra performance liquid chromatography coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (UHPLC-MS/MS, Waters, Milford, MA, USA). BPs were extracted from plasma by protein precipitation of 100 µL of sample with 200µL of MeOH containing internal standard (BPA₁₃C¹², BPSd8, BPAFd4, BPPd16, BPAPd5) at 25 ng/mL. The mixture was shaken at 10°C for 10 minutes at 1400 rpm and centrifuged at 20000 g at 4°C during 10 min. The supernatant was eluted on BEH Phenyl column with a H₂O/MeOH gradient [0.3 mL/min, 40°C] and detected in negative electrospray ionization using the multiple reaction monitoring mode. Chromatographic data were monitored by Targetlynx[®] software (Water, Milford, MA, USA), MRM transition were detailed in table S5. Two injection volumes were used, 20 µL for concentrations lower than 10 ng/mL and 10 µL for concentrations higher than 50 ng/mL. For the intermediate concentrations, a double injection was performed. Blank samples were used to check the absence of contamination during assay and the method was validated according to the European Medicine Agency Guidelines in piglet plasma over the calibration range 2.5 to 5000 ng/mL. The upper-LOQ and lower-LOQ were evaluated for each BP and the performances of the method were reported in table S6. In summary, the accuracy ranges of five QCs (2.5, 7.5, 25, 250 and 2500 ng/mL) were 72%-122%, with intra- and inter-day precisions lower than 25% for all BPs, except for BPB, BPM and BPZ for which the accuracy was between 52 and 117% and intra- and inter-day precisions were lower than 50 %. At LOQ, the accuracy ranges were 91%-123% with a CV % inter-day (n=6) lower than 26 % (2.5-5 ng/mL, according to BPs).

During each sample run, blank, calibration samples, QC at the beginning, middle and end of sequence were analyzed, LOQs were adjusted if low QCs did not satisfy specification (Table S7).

1.6. Toxicokinetic analysis

Toxicokinetic analysis were performed using Phoenix® software, (Phoenix NLME version 8.3, Certara, St. Louis, MO, United States), first by a Non-Compartmental Analysis (NCA) then by a Nonlinear Mixed Effects (NLME) modeling. The cumulated amount of urinary excreted BPs were calculated by multiplying the urine mass concentration by the excreted urine volume at each sampling time. The actual administered doses were obtained by correcting the nominal doses by the actual concentration of the administered solution as determined by UHPLC-UV (Table S1).

1.6.1. Non-compartmental analysis

First, plasma concentration-time profiles of the twelve BPs were analyzed by a NCA using model 200-202 and the “linear UP log down” calculation method. Area Under the plasma concentration time Curve (AUC) were obtained with and without extrapolation to infinity. The extrapolated AUC was determined by the ratio of the last observed quantifiable plasma concentration and the slope of the terminal phase (λ_z) estimated by linear regression using the best-fit option of Phoenix. Plasma clearance (Cl), steady-state volume of distribution (Vss) and Mean Residence Time (MRT) were computed using classical equation with extrapolation to infinity (Rowland and Tozer, 1995). The oral bioavailability (F) was estimated by the ratio of AUC_{0-inf} after oral administration and after IV administration, normalized by the respective IV and oral dosing. When the extrapolated AUC was greater than 20%, AUC computed without extrapolation was considered.

1.6.2. Nonlinear mixed effects (NLME) modeling

In a second step, we used Nonlinear Mixed-Effects Model (also known as population model) to first compare the TK parameters of BPA and BPS administered in the present study as a cocktail of 12 BPs to those previously obtained after separate BPA (BPS) administrations in the same piglet model (Gayrard et al., 2019). The objective was to check the lack of significant drug-drug interactions and validate our cocktail approach. Then, we simultaneously analyzed the data obtained by IV and oral route for each BPs studied.

To assess the possible cocktail effect, we included in the model a categorical covariate with two levels (0 for control, 1 for cocktail) for two selected parameters, i.e. Cl and F, and we estimated their significance or not by considering the confidence interval of their estimate as

obtained using a bootstrap method. The model was a two compartmental model for both BPA and BPS. The Between-Subject Variability (BSV), which is the variance of a parameter across individuals, was modeled using an exponential model with the following equation (Equation 1):

$$\theta_{parameter_i} = \theta_{tv_parameter_i} \times Exp(\eta_i) \quad \text{Equation 1}$$

With $\theta_{parameter_i}$ is the value of theta in the i^{th} animal, $\theta_{tv_parameter_i}$ is the typical population value of this theta (Cl or F) and η_i , the deviation associated to the i^{th} animal from the corresponding theta population value. The distribution of η_i was assumed to be normal with a mean of 0 and a variance ω^2 .

To express the Between Subject Variability (BSV), the following equation 2 was used to convert the variance terms of the log-transformed parameters (here for clearance) into a coefficient of variation (CV %) in the original scale:

$$CV_{clearance}(\%) = 100 \times \sqrt{\exp(\omega_{clearance}^2) - 1} \quad \text{Equation 2}$$

The shrinkage of random effects toward the means was calculated for the ETAs (Savic and Karlsson, 2009) with equation 3:

$$shrinkage = 1 - \frac{SD(EBE_{\eta})}{\omega} \quad \text{Equation 3}$$

Where ω is the estimated variability for the population and SD is the standard deviation of the individual values of the empirical Bayesian estimates (EBE) of η .

The residual model was an additive plus a multiplicative (proportional) model of the form:

$$C(t) = f(\theta, Time) \times (1 + \varepsilon_1) + \varepsilon_2 \quad \text{Equation 4}$$

With ε_1 and ε_2 , the multiplicative and additive error terms having a mean of 0 and a variance noted σ_1 or σ_2 , respectively. The additive sigma is reported as its standard deviation with the same units as plasma concentration (ng/mL) and the multiplicative sigma as the corresponding its coefficient of variation.

Parameter estimation with their associated precisions (Standard Error, SE) were estimated by minimizing an objective function value (OFV) expressed as minus twice the log of the likelihood estimation (-2LL) using the Laplacian engine and a bootstrap approach.

The analysis of each bisphenol was carried out with the same general methodology. For the oral route, visual inspection of the plasma concentration profiles suggested some discontinuous absorptions with rebounds of plasma concentrations and the oral data were

empirically modeled by sequentially including in the model different absorption rate constants (from 1 to 3). The typical TK parameters of the BPA, BPAF, BPB, BPF, BPM, BPZ, 3-3BPA, BP4-4, BPAP, BPP, BPFL were estimated using a two-compartment model and one (BP4-4, BPM, BPP), two (3-3BPA, BPA, BPAF, BPB, BPF, BPFL, BPS, BPZ) or three (BPAP) rate constant of absorption constant. Model was represented schematically in the figure 2. The inclusion of one or more rate constants of absorption was based on the improvement of the Akaike Information Criterion (AIC), the inspection of different diagnostic plots and of the better fitting of plasma concentrations obtained after IV and oral administration. The primary parameter of the model, namely the volume of distribution of the central compartment (V_c), the first-order rate constants (K_{10} , K_{12} , K_{21} and K_{abs} or K_{a1} , K_{a2} , K_{a3} , according to the BP) and the bioavailability (F) and their associated precisions (Standard Error, SE) were estimated as previously described for BPA and BPS. Oral bioavailability was estimated by applying an ilogit transformation to preclude a value greater than 1.

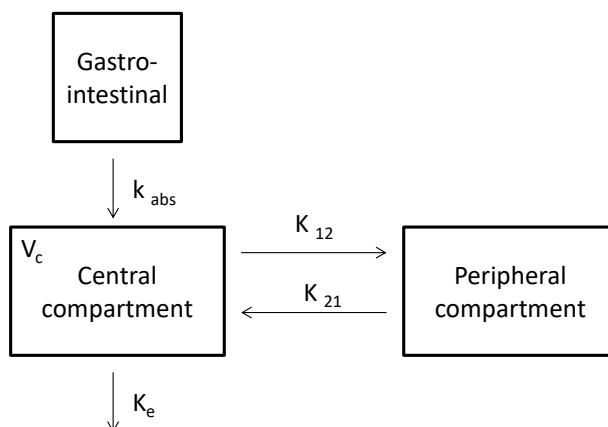


Figure 2: Schematic representation of two compartmental model after an oral administration; k_{abs} is rate constant of absorption from gastrointestinal track to central compartment; k_{12} is rate constant from central to peripheral compartment ; k_{21} is rate constant from peripheral to central compartment ; k_e is constant elimination rate from plasma.

To evaluate the overall performance of the final model, a Visual Predictive Check (VPC) was plotted to compare actual observations with simulated replicates from the model (200 replicates per investigated pigs). The 80% prediction intervals were constructed and plotted together with the observed data allowing for a visual assessment of the agreement between simulation and observation (figure S1-3). Diagnostic plots, the distribution of errors, and the precision of the parameter estimates were used as tools to evaluate the goodness of fit and to compare models.

From estimated typical values of primary parameters (V_c , k_e , K_{12} , K_{21} , ilogit of F), secondary parameters were computed as follow:

$$Cl = V_c * K_e , \text{ Equation 5}$$

$$V_{ss} = V_c * \left(1 + \frac{K_{12}}{K_{21}}\right), \text{ Equation 6}$$

$$F = \frac{e^f}{1+e^f} * 100, \text{ Equation 7}$$

$$MRT = V_{ss}/Cl, \text{ Equation 8}$$

The terminal half-life time was calculated by the equation:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{0.5*(Ke+K_{12}+K_{21}) - \sqrt{(Ke+K_{12}+K_{21})^2 - 4*k_{21}*ke}}, \text{ Equation 9}$$

2. Results

BPs were not detected in any plasma of the 26 blank sample except in two samples for BPS and one for BPM, this contamination being attributed to analytical method carry over. Aglycone BPs were not detected in the 22 blank sample urines, except for BP4-4, BPB and BPM detected in only one blank sample at a concentration close to LOQ. Total BP4-4, BPA, BPAF, BPAP, BPFL, BPM, BPP and BPP were detected in 1 to 3 blank urine samples, at concentrations around the LOQ or at 72h, just before the second period. These data indicate that there was little-to-no sample contamination during sample collection and processing.

2.1. Validation of the cocktail approach

The figure S4 shows the concentration-time profiles of BPA and BPS after respective BPA and BPS IV and oral dosing, after both a single BPA/BPS administration evaluated in a previous study (Gayraud et al., 2019) or a simultaneous administration of 5 to 7 (IV) or 12 (oral) BPs. The visual comparison of these profiles does not show any major difference between the two administration modalities (single vs cocktail) for both BPS and BPA and for the two routes of administration, IV and oral. The influence of the cocktail approach on two TK parameters, plasma clearance and bioavailability by the oral route, was tested by a NLME modeling by adding a categorical covariate corresponding to the modality of administration. Plasma clearance and oral bioavailability evaluated by the cocktail approach were slightly increased compared to a single BP administration, by 28 and 11 % respectively for BPS and by 29 and 26% respectively, for BPA. These differences were not significant, indicating that the mode of administration in cocktail did not modify the disposition of BPA and BPS.

2.2. Urinary excretion of BPs

Figure 3 depicts the cumulative urinary excretions of total BP that were recovered at fixed intervals over 24h, for the twelve studied BPs. By 24h, the mean fractions (\pm SD) of the BP dose recovered in urine as total BP ranged from 3 ± 1 % (BPFL) to 76 ± 12 % (BPS) after IV dosing and from 1 ± 0.3 % (BPFL) to 59 ± 13 % (BPS) after oral dosing. Less than 10 % of

the administrated dose of BPM, BPP and BPFL was recovered in urines 24h after oral and IV administration. About half of the urinary BPs amount was excreted in the 3h after IV dosing. While, after oral administration, 6 to 8h were necessary to reach 50% of the urinary excretion. By 24h, unconjugated BPs in urine represented less than 0.2 % of the corresponding BP dose except for BPS (0.6 ± 0.5 % of the IV dose and 0.5 ± 0.4 % of the oral dose) and BPF (1.2 ± 1.2 % of the oral dose).

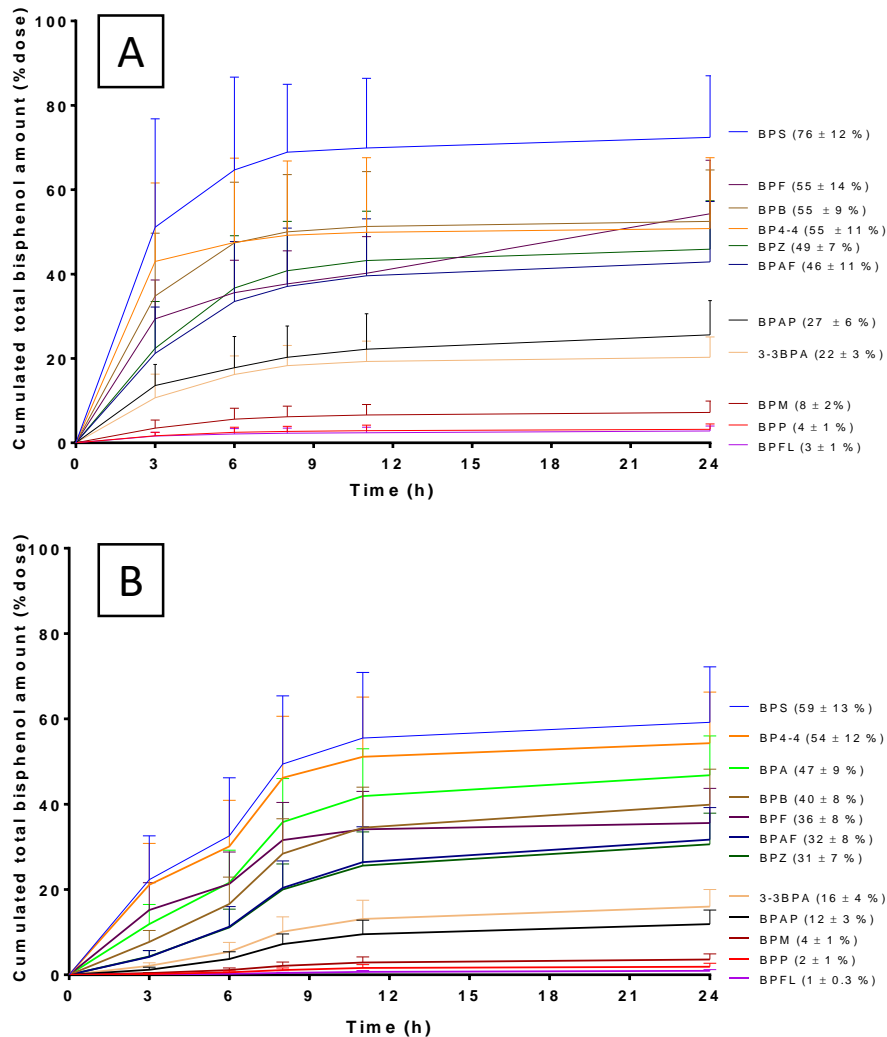


Figure 3: Cumulative urinary amounts relative to dose of total BPs (mean + SD) in piglets after a respective BP single IV administration at 6 µmol/kg (A) and an oral administration at 200 µmol/kg (B). The values indicated in the legend are the mean (± SD) fractions of the respective BP dose recovered in urine 24 hours after administration.

2.3. Internal exposure to BPs after IV and oral dosing

Figure 4 and 5 depict the time course of mean plasma concentrations of the twelve BPs after an oral and an intravenous administration to piglets. After IV administration to piglets, plasma BPs concentrations decreased rapidly to reach values below the LOQ of the assay (2.5 to 25

ng/mL depending on the BP) beyond about 2-4h after administration for 10 BPs, 8h for BPP and as early as 30 min for BP4-4.

After oral administration, the plasma concentrations increased to maximal values about 1 to 2 h 30 after dosing for BPS, BP4-4, BPB, BPF, 3-3 BPA and BPAF or after 3 to 4h30 for BPAP, BPP, BPFL, BPM and BPZ (Table S8). The average maximal plasma concentrations of BPS (29 ± 9 nmol/mL) were more than 100 times higher than the maximal values of BPB, BPAF, BPA, 3-3BPA and BPZ ranging from about 0.17 to 0.27 nmol/mL and about 20 times higher than BP4-4, BPM, BPFL, BPP, BPAP and BPF ranging from about 0.5-2.4 nmol/L. Dose scaled area under the plasma concentration-time curve after oral administration of BPS were between 8 and 20 times higher than that of BPP, BPFL, BPF, BP4-4, BPM and BPAP, between 45 and 75 times higher than that of BPAF, BPZ, BPB and 3-3BPA and 150 times higher than that of BPA.

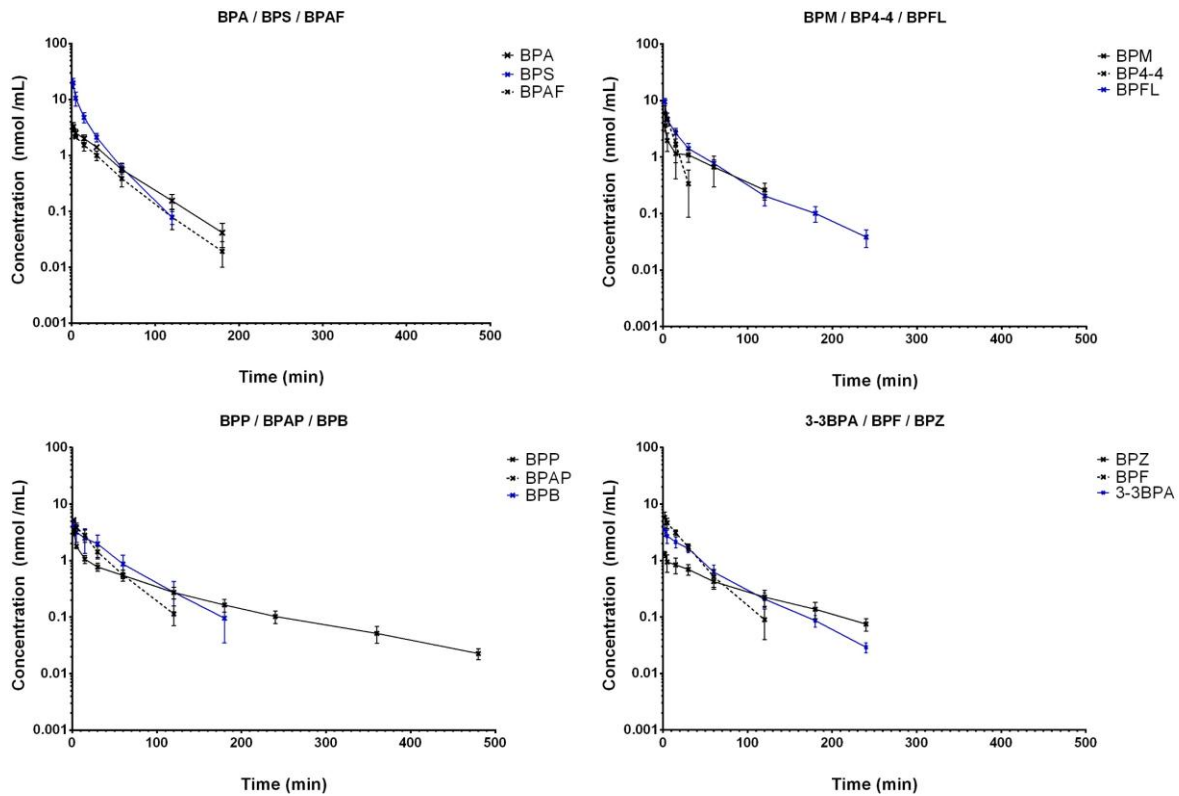


Figure 4: Semi-logarithmic plots of mean plasma concentrations (nmol/mL) versus time (min) of each BP after IV administration of a mix of bisphenols including either BPA, BPAF, BPB, BPF, BPM, BPZ or 3-3BPA or BPS, BP4-4, BPAP, BPP, BPFL, at a nominal dose of $6 \mu\text{mol/kg BW}$ for 8 piglets. Mean values were calculated at the time periods for which plasma concentrations were above the LOQ in at least 6 of piglets.

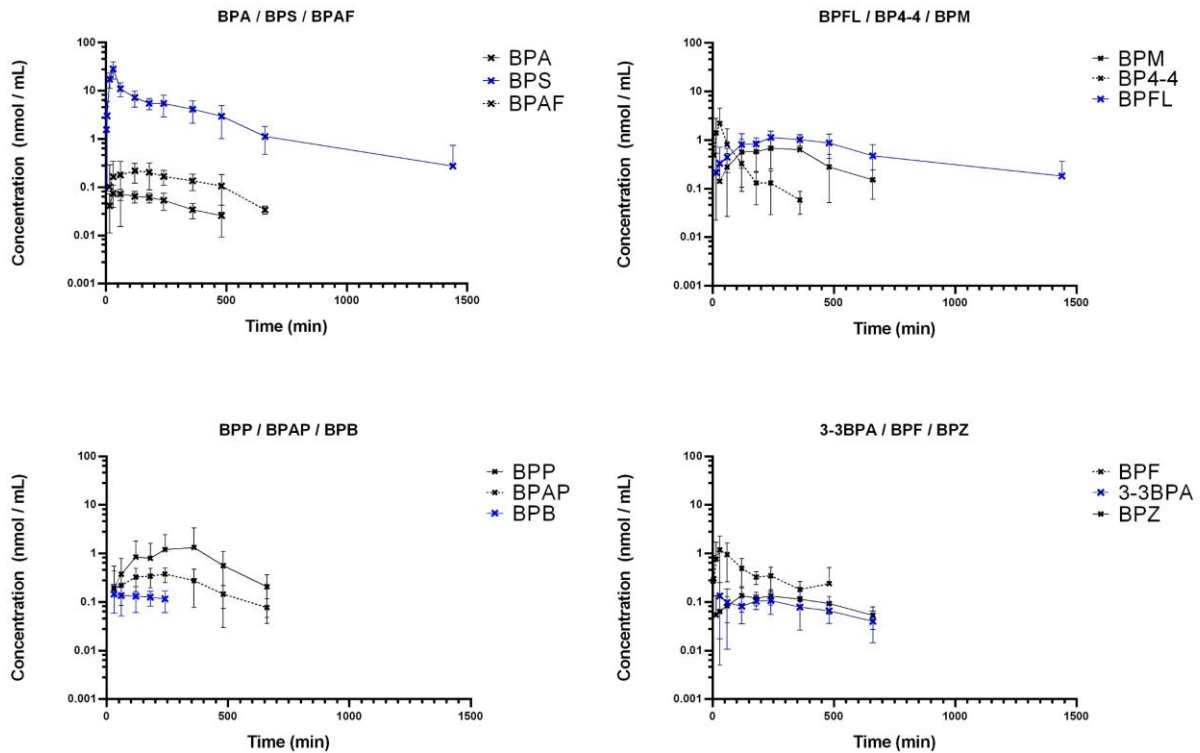


Figure 5: Semi-logarithmic plot of mean plasma concentrations (nmol/mL) versus time (min) of each BPs after oral administration of the mix of 12 bisphenols at the nominal dose of 200 $\mu\text{mol/kg}$ BW. Mean values were calculated at the time periods for which plasma concentrations were above the LOQ in at least 6 piglets ($n=8$, except for the oral administration of BPA $n=7$).

Toxicokinetics parameters of BPs were estimated by NCA analysis (Table S8) and NLME modeling (Table 1). Mean plasma clearance of bisphenols were close and ranged from 40 to 60 mL/min/kg for 3-3BPA, BPP, BPFL, BPA, BPB, BPF, BPAP and BPM. Mean plasma clearances of BP4-4, BPAF and BPZ were two times higher and reached about 80 mL/min/kg. Mean BPS plasma clearance (21 mL/min/kg) was about 2 to 4 times lower than that of all BPs. Mean distribution volumes at steady state (V_{ss}) ranged between 668 (BPS) and 7709 (BPZ) mL/kg, with a mean V_{ss} of about 2 L/kg for 3-3BPA, BPAP, BPFL, BPA, BPAF, BPB and BPF and higher than 4 L/kg for BP4-4, BPP, BPM and BPZ. Mean BPS V_{ss} was about 3 to 10 times lower than that of the others BPs. The mean elimination half-life ($t_{1/2}$) ranged from 23.87 min (BPAF) to 213.1 min (BP4-4), indicating that these bisphenols are rapidly eliminated.

The BPs showed a considerable range of oral bioavailability, with low values below 5% for 3-3BPA, BPA, BPAF, BPB and BPZ, intermediate values ranging from 5.7 and 12.9 % for BP4-4, BPAP, BPF and BPM and close to 20 % for BPP and BPFL. BPS showed a much higher oral bioavailability (59.5 ± 18.1 %) in comparison with that of the others BPs (figure 6). These key parameters determine the systemic exposure to the active bisphenol after an oral

exposure (AUC_{oral} normalized by the dose, Table 1), which describes a wide range a value, BPS systemic exposure being 8 to 150-fold higher than those of the other bisphenols.

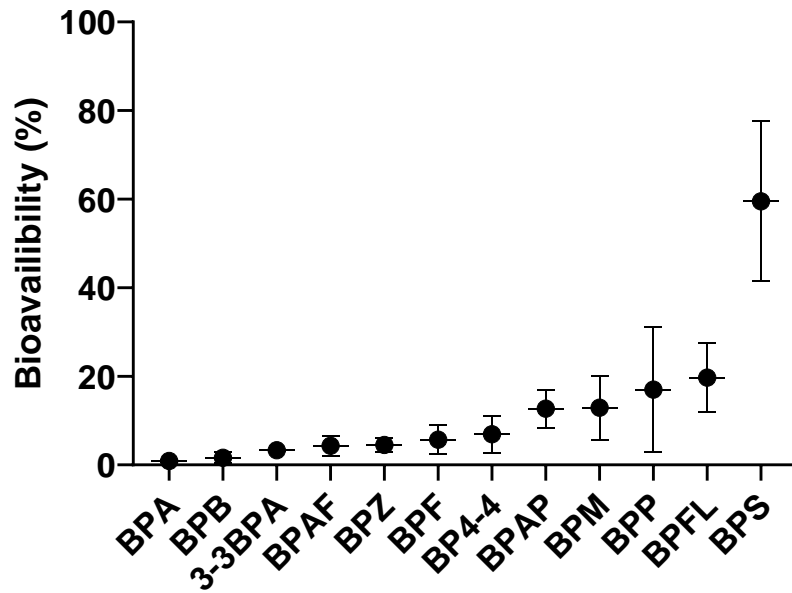


Figure 6: Mean \pm SD bioavailability of bisphenols.

Table 1: Toxicokinetic parameters of 3-3BPA, BPS, BP4-4, BPAP, BPP, BPFL, BPA, BPAF, BPB, BPF, BPM and BPZ estimated by nonlinear mixed effects modeling from plasma concentration-time profiles following an IV (6 µmol/kg BW) and an oral (200 µmol/kg BW) administration in piglets.

NLME			3-3BPA	BPS	BP4-4	BPAP	BPP	BPFL	BPA	BPAF	BPB	BPF	BPM	BPZ
			n=8	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
Clearance	mL/min/kg	mean	55.08	21.36	75.33	54.23	55.53	41.45	59.94	75.43	43.95	47.64	59.41	82.44
		SD	6.46	0.25	20.85	4.40	1.10	0.52	5.20	9.50	13.59	1.04	7.09	16.00
		CV (%)	12%	1%	27%	8%	2%	1%	9%	12%	30%	2%	12%	19%
Vss	mL/kg	mean	2654	668	4733	1779	6132	1970	2376	2597	2072	2488	4789	7709
		SD	311	41	663	0	118	223	0	2	374	339	1384	1586
		CV (%)	12%	6%	14%	0%	2%	12%	0%	0%	18%	13%	28%	20%
HL_lambda	min	mean	43.50	146.07	213.06	33.87	85.49	49.76	31.70	23.87	40.82	171.64	61.45	68.70
		SD	0.00	20.10	7.46	1.30	2.72	7.44	1.98	2.98	3.81	45.63	15.82	2.51
		CV (%)	0%	14%	3%	4%	3%	16%	6%	12%	9%	26%	25%	4%
MRT	min	mean	48.18	31.26	62.83	32.80	110.43	47.54	39.63	34.43	47.15	52.23	80.61	93.51
		SD	0.00	1.76	12.17	2.51	3.65	5.51	3.27	4.30	6.36	6.12	19.76	3.25
		CV (%)	0%	6%	19%	8%	3%	12%	8%	12%	13%	12%	24%	3%
Oral administration														
F	%	mean	3.3%	59.5%	6.9%	12.7%	17.0%	19.7%	0.9%	4.3%	1.6%	5.7%	12.9%	4.5%
		SD	0.1%	18.1%	4.2%	4.3%	14.2%	7.8%	0.3%	2.2%	1.2%	3.3%	7.2%	1.5%
		CV (%)	2%	36%	55%	33%	74%	38%	34%	46%	65%	52%	53%	32%
Oral administration														
AUC/Dose	(nmol*min/mL) / (mmol/kg)	mean	245	18515	1006	835	2105	2431	123	414	271	1225	1251	292
		SD	49	5924	634	422	2259	1443	37	195	111	635	714	77
		CV (%)	20%	32%	63%	51%	107%	59%	30%	47%	41%	52%	57%	26%

Vss: Volume of distribution at steady state

HL_lambda: Elimination half-life corresponding to the last elimination slope

MRT: Mean residence time

F: Bioavailability by the oral route

AUC/Dose: Dose scaled area under the plasma concentration-time curve from dosing time to the time of the last measurable plasma concentration after oral administration.

3. Discussion

The purpose of our study was to compare the oral TK of 12 bisphenols and to quantify the key TK parameters determining internal exposure. We used a cocktail approach in piglets, considered as a relevant species for translational research because of their similarities with humans with regards to gastrointestinal function. We used data sets corresponding to plasma and urinary concentrations of the twelve BPs after IV and oral administration of a cocktail of BPs to estimate, using a NLME model, the TK parameters controlling BPs plasma concentrations following oral exposure.

First, we validated our cocktail approach thanks to previous data obtained by our laboratory on the same piglets model administered either with BPA or with BPS (Gayrard et al., 2019). The NLME model developed including the administration modality as a covariable showed no significant effect of the cocktail approach on the clearance and oral bioavailability of BPA and BPS. This result is important both to validate our TK parameters and to promote methods to strongly reduce animals number, needed for experimentation, while ensuring valid and useful TK information, in particular for pig, a fast growing species.

The BPs urinary excretion of total BPs was measured over 24 h after dosing and showed great difference depending on BPs. Overall, the urinary excretion of BPs (fraction of the dose) were relatively close for the two routes of administration, indicating a rather high absorption after gavage. Furthermore, BPs eliminated in the urine were mainly conjugated (less than 1% of administered dose was recovered as aglycone BPs), suggesting that the 12 BPs are mainly metabolized by the intestine or liver. Contrary to what had been expected (Gayrard et al., 2019; Grandin et al., 2017), some BPs, BPAP, 3-3BPA, BPP, BPFL and BPM, were poorly eliminated in the urine, both after an oral or an IV administration. This lower recovery rate may be explained in part (1) by the short duration of the urine collection, especially after oral administration, (2) by an underestimation of total urinary BPs because of the presence of others metabolites, which was not hydrolyzed by β -glucuronidase (3) or because of fecal excretion. Indeed, for organic anions such as glucuronoconjugates the threshold of molecular weight beyond which biliary elimination becomes significant is of the order of 200-300 g/mol in rats and 500-600 g/mol in humans (Clark et al., 1969; Hughes et al., 1973; Roberts et al., 2002). Thus, for BPAF (MW = 336 g/mol), BPFL (MW = 350 g/mol), BPP and BPM (MW = 346 g/mol), the addition of a glucuronic acid (176 g/mol) leads to molar weight greater than 500 g/mol. Moreover, in rodents, BPAF was well absorbed following gavage administration and highly metabolized and excreted mostly in the feces (Waidyanatha et al., 2015). These observations can explain the extremely low recovery rate of BPFL, BPP and BPM in pig urine. Moreover, these data suggest that the urinary

concentrations of these BPs measured in biomonitoring studies are not relevant biomarkers of human exposure and should be interpreted with caution. Additional investigation of fecal excretion is needed to better understand the routes of elimination of these BPs.

An efficient metabolism of bisphenol by glucuronidation has been previously described both *in vitro* and *in vivo*, for BPA and BPS in several species (Gayrard et al., 2020; Khmiri et al., 2020; Oh et al., 2018; Song et al., 2018; Thayer et al., 2015). BPAF was also extensively metabolized by UDP-glucuronosyltransferases (UGT) in mice and rats (Waidyanatha et al., 2021, 2019). By contrast, in rat, the major urinary metabolite (more than 50% of total BPF excreted in urine) is a sulfate conjugate of BPF (Cabaton et al., 2006).

Mean plasma clearance (Cl) of most of bisphenols were close and ranged from about 20 (for BPS) to 80 (for BPZ) mL/min/kg. These plasma Cl are rather high and close to the hepatic blood flow in pig (40 mL/min/kg (Björkman and Redke, 2010; Boxenbaum, 1980)), suggesting that as shown for BPA, BPS and BPF (Cabaton et al., 2006; Gayrard et al., 2019), the clearance of BPs is mainly hepatic. Following a single intravenous administration, BPS was less efficiently eliminated than all the others BPs. This result is consistent with previous data showing 2- to 4-fold lower plasma clearance of BPS than BPA in several species (rat, sheep, pig and human for a clearance estimated by an allometric approach) (Collet et al., 2015; Gayrard et al., 2020, 2019; Grandin et al., 2017). In piglet, BPAF clearance is close to that of BPA and about 3.5 higher than that of BPS. By contrast, BPAF intrinsic clearance determined *in vitro* in hepatocytes from rat, mouse, and human is 1.5-4-fold, 6-18-fold and 4-9-fold lower than that of BPA, respectively (Waidyanatha et al., 2015) and is close to that of BPS (Waidyanatha et al., 2018). Both *in vitro* (Waidyanatha et al., 2018) and *in vivo* (Waidyanatha et al., 2020, 2019) studies, indicate some interspecies differences in the metabolism of these BPs.

Oral bioavailability of BPs shows a great range of variation, from 0.9% to 60% for BPS. The high oral bioavailability of BPS was also estimated in human (62%, (Khmiri et al., 2020)). In mice, BPAF oral bioavailability (5.64% and 3.13%, in male and female mice, respectively) was close to those in piglets, ($4.3 \pm 2.2\%$) (Waidyanatha et al., 2019). The oral bioavailability could be influenced by the physicochemical properties of bisphenols, including the number of hydrogen donor and acceptor, the lipophilicity (LogP) and the rigidity of molecule (Gomez-Orellana, 2005; Varma et al., 2010; Veber et al., 2002). All BPs studied have two hydrogen donors and two hydrogen acceptors, except BPS (4 hydrogen acceptors) and BPAF (8 hydrogen acceptors). However, this factor does not seem to greatly determine oral bioavailability because BPS bioavailability is high (60%) while that of BPAF is low (4.3%). The visual inspection of the chart graph (Figure 7A) displaying the oral bioavailability and the

LogP for the twelve bisphenols does not evidence a clear correlation between LogP and the oral bioavailability, in particular for BPS. Moreover, the rigidity of the compound could positively influence the bioavailability, but if this chemical property may explain the high bioavailability of BPFL, this is not the case for BPS.

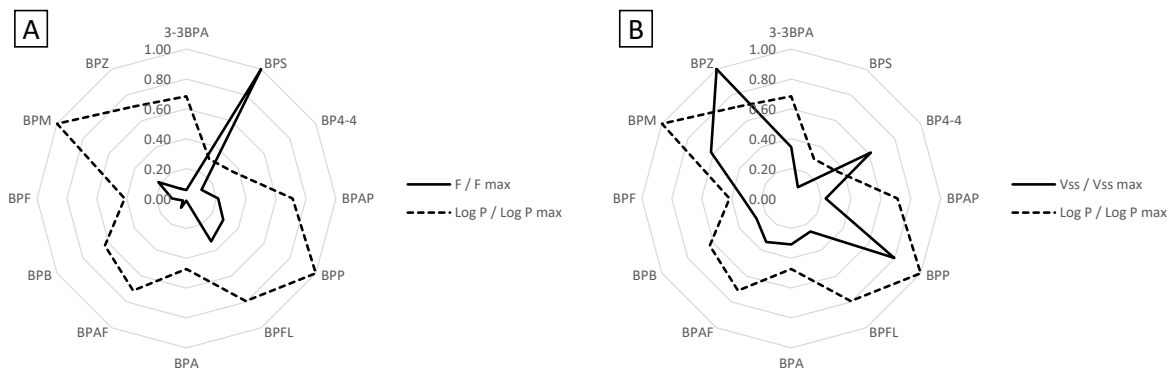


Figure 7: Kiviat plots describing for the 12 bisphenols, two key TK parameters determined in piglets, the oral bioavailability (A) and the volume of distribution at steady state (B) and their potential correlation with the LogP determined with ChemDraw17.1 (ChemPropPro)). Each value is normalized by the corresponding maximal value.

The volumes of distribution at steady state were higher than the pig plasma volume of around 50 mL/kg (Hannon et al., 1985), indicating that these bisphenols are widely distributed in tissues. These data are consistent with previous TK parameters obtained for BPAF, BPA, and BPS in rats and mice (Collet et al., 2015; Gayrard et al., 2020; Sonker et al., 2021; Waidyanatha et al., 2020, 2019). In piglets, the V_{ss} described a wide range of values, with the V_{ss} of BPS about 3 to 12-fold lower than that of the others BPs. V_{ss} is influenced by physico-chemical properties of the molecule, including, the lipophilicity (Log P, (Smith et al., 2015)) and the state of ionization (pKa), and also by their binding to plasma proteins (Gleeson, 2008; Smith et al., 2015). The pKa of the studied BPs are between 8.4 for BPS, and 9.74 for 3-3BPA (Gély et al., 2021), indicating that at physiological pH, most of bisphenols are mainly non-ionized. The visual inspection of the figure 7B does not evidence any correlation between LogP and the V_{ss} . Indeed, even if for three bisphenols, BPM, BPZ and BPP, this relationship between LogP and V_{ss} is observed, this is not the case for BPFL, BPAF and 3-3BPA. In addition, BP4-4 has a high volume of distribution but a low LogP close to that of BPS. The evaluation of binding to plasma proteins could be further investigated to understand the mechanisms of distribution of bisphenol in the extra- and intra-cellular space (Øie and Tozer, 1979; Smith et al., 2015). These TK results showed that all BPs are rapidly eliminated with a $T_{1/2}$ shorter than 3h30 (BP4-4).

Finally, all these TK properties of the BPs lead to very different systemic exposure to the active form of bisphenol after an oral administration. Indeed, the systemic exposure to active

BPS is 8 (for BPFL and BPP) to 150-fold higher than that of BPA. These TK considerations must be taken into account to evaluate the risk of human exposure to these emerging BPs with an endocrine disrupting potential similar to that of BPA.

4. Conclusion

In conclusion, this study provides key TK parameters of ten bisphenols on a piglet model and so bridges important gap relative to the mechanism of exposure to these emerging bisphenols. The cocktail approach was validated which means that this method could be applied to minimize the number of animals used per experiment. Some bisphenols, as BPM, BPP or BPFL, are poorly recovered in urine, indicating that their urinary concentrations are poor indicators of human exposure. It means that biomonitoring studies based on urine concentrations of these BPs must be interpreted with caution.

Despite the structural similarities of this family of bisphenols, their disposition after oral exposure is very different. Thus, the high oral bioavailability of BPS, the major alternative to BPA, leads to a much higher systemic exposure to the active substance after an oral administration than other studied bisphenols. Furthermore, their TK behavior cannot be easily predicted from their classical physicochemical properties such as pKa and LogP . Therefore, to avoid regrettable substitutions of BPA with BPs with high exposure potential, there is an urgent need to develop QSAR model to predict the TK properties of bisphenols.

References

- Beg, M.A., Sheikh, I.A., 2020. Endocrine disruption: Molecular interactions of environmental bisphenol contaminants with thyroid hormone receptor and thyroxine-binding globulin. *Toxicol. Ind. Health* 36, 322–335. <https://doi.org/10.1177/0748233720928165>
- Björkman, S., Redke, F., 2010. Clearance of Fentanyl, Alfentanil, Methohexitone, Thiopentone and Ketamine in Relation to Estimated Hepatic Blood Flow in Several Animal Species: Application to Prediction of Clearance in Man. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 1065–1074. <https://doi.org/10.1211/0022357001774985>
- Boxenbaum, H., 1980. Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: Extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 8, 165–176. <https://doi.org/10.1007/BF01065191>
- Caballero-Casero, N., Lunar, L., Rubio, S., 2016. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Anal. Chim. Acta* 908, 22–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.034>
- Cabaton, N., Chagnon, M.-C., Lhuguenot, J.-C., Cravedi, J.-P., Zalko, D., 2006. Disposition and Metabolic Profiling of Bisphenol F in Pregnant and Nonpregnant Rats. *J. Agric. Food Chem.* 54, 10307–10314. <https://doi.org/10.1021/jf062250q>
- Chen, Y., Fang, J., Ren, L., Fan, R., Zhang, J., Liu, G., Zhou, L., Chen, D., Yu, Y., Lu, S., 2018. Urinary bisphenol analogues and triclosan in children from south China and implications for human exposure. *Environ. Pollut.* 238, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.031>
- Clark, A.G., Hirom, P.C., Millburn, P., Smith, R.L., Williams, R.T., 1969. Reabsorption from the biliary system as a factor influencing the biliary excretion of organic anions. *Biochem. J.* 115, 62P–62P. <https://doi.org/10.1042/bj1150062Pa>

- 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.* 284, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.024>
- Frederiksen, H., Nielsen, O., Koch, H.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., Jørgensen, N., Andersson, A.-M., 2020. Changes in urinary excretion of phthalates, phthalate substitutes, bisphenols and other polychlorinated and phenolic substances in young Danish men; 2009–2017. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 223, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.002>
- Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Gély, C.A., Grandin, F.C., Léandri, R., Bouchard, M., Roques, B., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2020. Toxicokinetics of bisphenol S in rats for predicting human bisphenol S clearance from allometric scaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 386, 114845. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114845>
- Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Grandin, F.C., Collet, S.H., Mila, H., Viguié, C., Gély, C.A., Rabozzi, B., Bouchard, M., Léandri, R., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs. *Environ. Health Perspect.* 127, 077005. <https://doi.org/10.1289/EHP4599>
- Gély, C.A., Huesca, A., Picard-Hagen, N., Toutain, P.L., Berrebi, A., Gauderat, G., Gayrard, V., Lacroix, M.Z., 2021. A new LC/MS method for specific determination of human systemic exposure to bisphenol A, F and S through their metabolites: Application to cord blood samples. *Environ. Int.* 151, 106429. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106429>
- Gély, Clémence A., Lacroix, M.Z., Morin, M., Vayssière, C., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., 2021. Comparison of the materno-fetal transfer of fifteen structurally related bisphenol analogues using an ex vivo human placental perfusion model. *Chemosphere* 276, 130213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130213>
- Gleeson, M.P., 2008. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J. Med. Chem.* 51, 817–834. <https://doi.org/10.1021/jm701122q>
- Gomez-Orellana, I., 2005. Strategies to improve oral drug bioavailability. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 419–433. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.3.419>
- Gonzalez, L.M., Moeser, A.J., Blikslager, A.T., 2015. Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research. *Transl. Res.* 166, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.01.004>
- González, N., Cunha, S.C., Ferreira, R., Fernandes, J.O., Marquès, M., Nadal, M., Domingo, J.L., 2020. Concentrations of nine bisphenol analogues in food purchased from Catalonia (Spain): Comparison of canned and non-canned foodstuffs. *Food Chem. Toxicol.* 136, 110992. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110992>
- Grandin, F., Picard-Hagen, N., Gayrard, V., Puel, S., Viguié, C., Toutain, P.-L., Debrauwer, L., Lacroix, M.Z., 2017. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: Applicability to toxicokinetic investigations. *J. Chromatogr. A* 1526, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020>
- Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Gauderat, G., Mila, H., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2018. Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. *Environ. Int.* 120, 584–592. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019>
- Gyllenhammar, I., Glynn, A., Jönsson, B.A.G., Lindh, C.H., Darnerud, P.O., Svensson, K., Lignell, S., 2017. Diverging temporal trends of human exposure to bisphenols and plastizisers, such as phthalates, caused by substitution of legacy EDCs? *Environ. Res.* 153, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.11.012>
- Gys, C., Bastiaensen, M., Bruckers, L., Colles, A., Govarts, E., Martin, L.R., Verheyen, V., Koppen, G., Morrens, B., Den Hond, E., De Decker, A., Schoeters, G., Covaci, A., 2021. Determinants of exposure levels of bisphenols in flemish adolescents. *Environ. Res.* 193, 110567. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110567>
- Hannon, J.P., Bossone, C.A., Rodkey, W.G., 1985. Splenic red cell sequestration and blood volume measurements in conscious pigs. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 248, R293–R301. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1985.248.3.R293>
- Hughes, R.D., Millburn, P., Williams, R.T., 1973. Molecular weight as a factor in the excretion of monoquaternary ammonium cations in the bile of the rat, rabbit and guinea pig. *Biochem. J.* 136, 967–978. <https://doi.org/10.1042/bj1360967>
- Karsauliya, K., Bhatia, M., Sonker, A., Singh, S.P., 2021. Determination of Bisphenol Analogues in Infant Formula Products from India and Evaluating the Health Risk in Infants Associated with Their Exposure. *J. Agric. Food Chem.* 69, 3932–3941. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00129>

- Khmiri, I., Côté, J., Mantha, M., Khemiri, R., Lacroix, M., Gely, C., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., Gayraud, V., Bouchard, M., 2020. Toxicokinetics of bisphenol-S and its glucuronide in plasma and urine following oral and dermal exposure in volunteers for the interpretation of biomonitoring data. *Environ. Int.* 138, 105644. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105644>
- Kojima, H., Takeuchi, S., Sanoh, S., Okuda, K., Kitamura, S., Uramaru, N., Sugihara, K., Yoshinari, K., 2019. Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity T via human nuclear receptors 8.
- Liao, C., Kannan, K., 2014a. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China 31, 319–329. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.868611>
- Liao, C., Kannan, K., 2014b. A Survey of Alkylphenols, Bisphenols, and Triclosan in Personal Care Products from China and the United States. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 50–59. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0016-8>
- Liao, C., Kannan, K., 2013. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4655–4662. <https://doi.org/10.1021/jf400445n>
- Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H.-B., Nakata, H., Wu, Q., Kannan, K., 2012. Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9138–9145. <https://doi.org/10.1021/es302004w>
- Lu, S., Yu, Yuling, Ren, L., Zhang, X., Liu, G., Yu, Yingxin, 2018. Estimation of intake and uptake of bisphenols and triclosan from personal care products by dermal contact. *Sci. Total Environ.* 621, 1389–1396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.088>
- Lucarini, F., Krasniqi, T., Bailat Rosset, G., Roth, N., Hopf, N.B., Broillet, M.-C., Staedler, D., 2020. Exposure to New Emerging Bisphenols Among Young Children in Switzerland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 4793. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134793>
- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2017. Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12796–12805. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>
- Morgan, M.K., Clifton, M.S., 2021. Exposure to Triclosan and Bisphenol Analogues B, F, P, S and Z in Repeated Duplicate-Diet Solid Food Samples of Adults. *Toxics* 9, 47. <https://doi.org/10.3390/toxics9030047>
- Oh, J., Choi, J.W., Ahn, Y.-A., Kim, S., 2018. Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration. *Environ. Int.* 112, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.020>
- Øie, S., Tozer, T.N., 1979. Effect of Altered Plasma Protein Binding on Apparent Volume of Distribution. *J. Pharm. Sci.* 68, 1203–1205. <https://doi.org/10.1002/jps.2600680948>
- Pelch, K., Wignall, J.A., Goldstone, A.E., Ross, P.K., Blain, R.B., Shapiro, A.J., Holmgren, S.D., Hsieh, J.-H., Svoboda, D., Auerbach, S.S., Parham, F.M., Masten, S.A., Walker, V., Rooney, A., Thayer, K.A., 2019. A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology* 424, 152235. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.06.006>
- Philips, E.M., Kahn, L.G., Jaddoe, V.W.V., Shao, Y., Asimakopoulos, A.G., Kannan, K., Steegers, E.A.P., Trasande, L., 2018. First Trimester Urinary Bisphenol and Phthalate Concentrations and Time to Pregnancy: A Population-Based Cohort Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103, 3540–3547. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00855>
- Roberts, M.S., Magnusson, B.M., Burczynski, F.J., Weiss, M., 2002. Enterohepatic Circulation: Physiological, Pharmacokinetic and Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 751–790. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241100-00005>
- Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>
- Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B.M., Wedeby, E.B., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., 2014. Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives? *Toxicol. Sci.* 139, 35–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu030>
- Rowland, M., Tozer, T.N., 1995. *Clinical Pharmacokinetics Concepts and Application*, 3rd ed. Williams & Wilkins.
- Sasso, A.F., Pirow, R., Andra, S.S., Church, R., Nachman, R.M., Linke, S., Kapraun, D.F., Schurman, S.H., Arora, M., Thayer, K.A., Bucher, J.R., Birnbaum, L.S., 2020. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following dermal administration. *Environ. Int.* 144, 106031. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106031>

- Savic, R.M., Karlsson, M.O., 2009. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J.* 11, 558–569. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9133-0>
- Search for Chemicals - ECHA [WWW Document], n.d. URL https://echa.europa.eu/fr/search-for-chemicals?p_p_id=disssimplesearch_WAR_dissearchportlet&p_p_lifecycle=0&disssimplesearch_WAR_dissearchportlet_searchOccurred=true&disssimplesearch_WAR_dissearchportlet_sessionCriteriaId=disSimpleSearchSessionParam101401602581767544 (accessed 10.13.20).
- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Hayashi, K., 2018. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicol. Sci.* 163, 620–631. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy061>
- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Whorton, A., Hayashi, K., 2019. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Female Reproductive Functions in Mice. *Toxicol. Sci.* 168, 561–571. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz014>
- Siracusa, J.S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., Yu, X., 2018. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reprod. Toxicol.* 79, 96–123. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005>
- Smith, D.A., Beaumont, K., Maurer, T.S., Di, L., 2015. Volume of Distribution in Drug Design: Miniperspective. *J. Med. Chem.* 58, 5691–5698. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00201>
- Song, Y., Xie, P., Cai, Z., 2018. Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32, 495–502. <https://doi.org/10.1002/rcm.8051>
- Sonker, A.K., Bhateria, M., Karsauliya, K., Singh, S.P., 2021. Investigating the glucuronidation and sulfation pathways contribution and disposition kinetics of Bisphenol S and its metabolites using LC-MS/MS-based nonenzymatic hydrolysis method. *Chemosphere* 273, 129624. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129624>
- Thayer, K.A., Doerge, D.R., Hunt, D., Schurman, S.H., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Garantzotis, S., Kissling, G.E., Easterling, M.R., Bucher, J.R., Birnbaum, L.S., 2015. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ. Int.* 83, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.008>
- Usman, A., Ahmad, M., 2016. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere* 158, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.070>
- Varma, M.V.S., Obach, R.S., Rotter, C., Miller, H.R., Chang, G., Steyn, S.J., El-Kattan, A., Troutman, M.D., 2010. Physicochemical Space for Optimum Oral Bioavailability: Contribution of Human Intestinal Absorption and First-Pass Elimination. *J. Med. Chem.* 53, 1098–1108. <https://doi.org/10.1021/jm901371v>
- Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.-Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D., 2002. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* 45, 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
- vom Saal, F.S., Welshons, W.V., 2006. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ. Res.* 100, 50–76. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.09.001>
- Waidyanatha, S., Black, S.R., Aillon, K., Collins, B., Patel, P.R., Riordan, F., Sutherland, V., Robinson, V.G., Fernando, R., Fennell, T.R., 2019. Toxicokinetics and bioavailability of bisphenol AF following oral administration in rodents: A dose, species, and sex comparison. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 373, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.04.015>
- Waidyanatha, S., Black, S.R., Croutch, C.R., Collins, B.J., Silinski, M.A.R., Kerns, S., Sutherland, V., Robinson, V.G., Aillon, K., Fernando, R.A., Mutlu, E., Fennell, T.R., 2021. Comparative toxicokinetics of bisphenol S and bisphenol AF in male rats and mice following repeated exposure via feed. *Xenobiotica* 51, 210–221. <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1829171>
- Waidyanatha, S., Black, S.R., Silinski, M., Sutherland, V., Fletcher, B.L., Fernando, R.A., Fennell, T.R., 2020. Comparative toxicokinetics of bisphenol S in rats and mice following gavage administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 406, 115207. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115207>
- Waidyanatha, S., Black, S.R., Snyder, R.W., Yueh, Y.L., Sutherland, V., Patel, P.R., Watson, S.L., Fennell, T.R., 2018. Disposition and metabolism of the bisphenol analogue, bisphenol S, in Harlan Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice and in vitro in hepatocytes from rats, mice, and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 351, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.008>
- Waidyanatha, S., Mathews, J.M., Patel, P.R., Black, S.R., Snyder, R.W., Fennell, T.R., 2015. Disposition of bisphenol AF, a bisphenol A analogue, in hepatocytes *in vitro* and in male and

- female Harlan Sprague-Dawley rats and B6C3F1/N mice following oral and intravenous administration. *Xenobiotica* 45, 811–819. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1021732>
- Wang, W., Abualnaja, K.O., Asimakopoulos, A.G., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., Kumosani, T.A., Malarvannan, G., Minh, T.B., Moon, H.-B., Nakata, H., Sinha, R.K., Kannan, K., 2015. A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries. *Environ. Int.* 83, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.015>
- Ye, X., Wong, L.-Y., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T., Calafat, A.M., 2015. Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000–2014. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11834–11839. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02135>
- Zhang, B., He, Y., Zhu, H., Huang, X., Bai, X., Kannan, K., Zhang, T., 2020. Concentrations of bisphenol A and its alternatives in paired maternal–fetal urine, serum and amniotic fluid from an e-waste dismantling area in China. *Environ. Int.* 136, 105407. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105407>
- Zhang, H., Quan, Q., Zhang, M., Zhang, N., Zhang, W., Zhan, M., Xu, W., Lu, L., Fan, J., Wang, Q., 2020. Occurrence of bisphenol A and its alternatives in paired urine and indoor dust from Chinese university students: Implications for human exposure. *Chemosphere* 247, 125987. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125987>

3.3. Conclusion

Cette étude TK a nécessité le développement de trois méthodes analytiques pour quantifier simultanément les 12 bisphénols dans les urines et le plasma porcin. Les concentrations élevées en bisphénols présentes dans les urines ont permis le développement d'un dosage en UHPLC-UV que ce soit pour le dosage des bisphénols aglycones ou pour la quantification des bisphénols totaux, réalisée après hydrolyse enzymatique. La quantification des bisphénols dans le plasma a été effectuée en UHPLC-MS/MS, les performances de cette méthode, notamment sa sensibilité, a permis de suivre les BPs sur plusieurs heures, de façon à évaluer la pente terminale d'élimination. Ces méthodes adaptées aux exigences des études de TK, ont permis de déterminer les paramètres TK clés déterminants l'exposition aux bisphénols.

L'approche en mélange a été validée par comparaison des paramètres TK issus de nos expérimentations avec ceux précédemment obtenus pour le BPA et le BPS, en administration unique [76]. Les données urinaires montrent que certains bisphénols sont très peu éliminés dans les urines, ces résultats sont à prendre en considération pour interpréter les études de biosurveillance fondées sur les concentrations urinaires de ces BPs émergents. De plus, cette étude TK montre des potentiels d'exposition très différents pour cette famille de bisphénols présentant des structures analogues. Le BPB et le BPA ont les biodisponibilités orales les plus faibles (inférieures à 2%), alors que le BPS a la biodisponibilité la plus élevée (environ 60%).

Ces données sont essentielles pour extrapoler à l'Homme, les données toxicologiques obtenues sur des modèles *in vitro* ou sur des modèles animaux. Ces données pourront servir de base pour développer des modèles QSAR prédictifs du potentiel d'exposition à cette famille de contaminants alimentaires. Ces modèles permettraient d'aider les industriels et les agences d'évaluation à cribler les nouveaux bisphénols substitués potentiels du BPA, de façon à écarter les bisphénols présentant un potentiel d'exposition à la substance active très élevé.

Les deux études TK précédentes ont permis d'évaluer et de comparer le potentiel d'exposition humaine et fœtale de bisphénols émergents. Malgré des structures proches, le comportement toxicocinétique de ces bisphénols après une administration orale, ainsi que leur passage placentaire sont différents. Ces différences ne peuvent pas être expliquées de manière évidente par leurs seules propriétés physico-chimiques. Ainsi, pour éviter des substitutions regrettables, il est essentiel de développer des modèles QSAR permettant de prédire le potentiel d'exposition de ces bisphénols émergents. En outre, ces modèles répondent aux enjeux réglementaires actuels qui visent à limiter le recours à l'expérimentation animale, dans le contexte des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

L'objectif de notre étude est donc de développer, à partir du jeu de données obtenu sur 15 bisphénols, un modèle prédictif du passage placentaire des bisphénols en établissant la relation entre la structure des composés et leur indice de clairance placentaire.

4. Développement d'un outil prédictif du passage placentaire des bisphénols avec une étude de type relation-structure-activité

4.1. Contexte et objectifs

En raison de la simplicité de synthèse du BPA et des mesures de restriction de son utilisation, les industriels ont développé de nombreux variants structurels de ce bisphénol, notamment par modification du pont carbonate liant les deux phénols ou par l'ajout de substituants sur le phénol. Ainsi, plusieurs dizaines de bisphénols sont aujourd'hui utilisés en remplacement du BPA.

Nous avons montré précédemment (*Gély et al, 2021* [264]) que le passage placentaire de 15 bisphénols étudiés décrit une large gamme d'indice de clairance et que les paramètres physico-chimiques classiques tels que l'hydrophobicité et la fraction non ionisée (pKa), ne permettent pas à eux seuls d'expliquer les différences de mécanismes de passage placentaire. Il est donc impératif de développer des méthodes prédictives du potentiel d'exposition fœtale de cette famille de bisphénols, fondé non seulement sur leurs propriétés physico-chimiques, mais également sur leur comportement dans les biophases. Ainsi, dans cette dernière étude, nous avons développé une méthode de prédiction de type QSAR afin de modéliser le passage placentaire des bisphénols. Le jeu de données d'indices de clairance placentaire déterminés pour 15 bisphénols [264] a servi de base pour développer ce modèle QSAR.

Les modèles QSAR sont construits habituellement avec des données moléculaires (énergie, logP...) or l'utilisation de ces données présente des limites : (1) le manque d'information pour certaines molécules, (2) les calculs sont effectués à partir de structures moléculaires rigides, (3) les molécules sont modélisées sans environnement or les propriétés TK dépendent d'interactions entre la molécule et les milieux biologiques. En revanche, les données chromatographiques des molécules peuvent être déterminées pour toutes les molécules, mettent en jeu des interactions (solvant-molécule ; molécule-phase stationnaire) et dépendent de la structure de celles-ci. L'objectif de cette étude expérimentale était d'évaluer l'apport de descripteurs chromatographiques dans les modèles QSAR. Pour cela, des descripteurs moléculaires et chromatographiques ont été générés et utilisés seuls ou en combinaison pour la construction d'un modèle prédictif de l'indice de clairance placentaire.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire des IMRCP.

Les résultats de cette étude ont été valorisés au travers d'une communication orale et ils feront l'objet d'une publication qui sera soumise dans la revue *Chemosphere*.

4.2. Article 4

Les données supplémentaires associées à cet article sont présentées en annexe 4.

Contribution of reliable chromatographic data in QSAR for modeling bisphenols transport across the human placenta barrier

Clémence A. Gély^{1,2}, Nicole Picard-Hagen¹, Malika Chassan², Jean-Christophe Garrigues³,
Véronique Gayrard¹, Marlène Z. Lacroix²

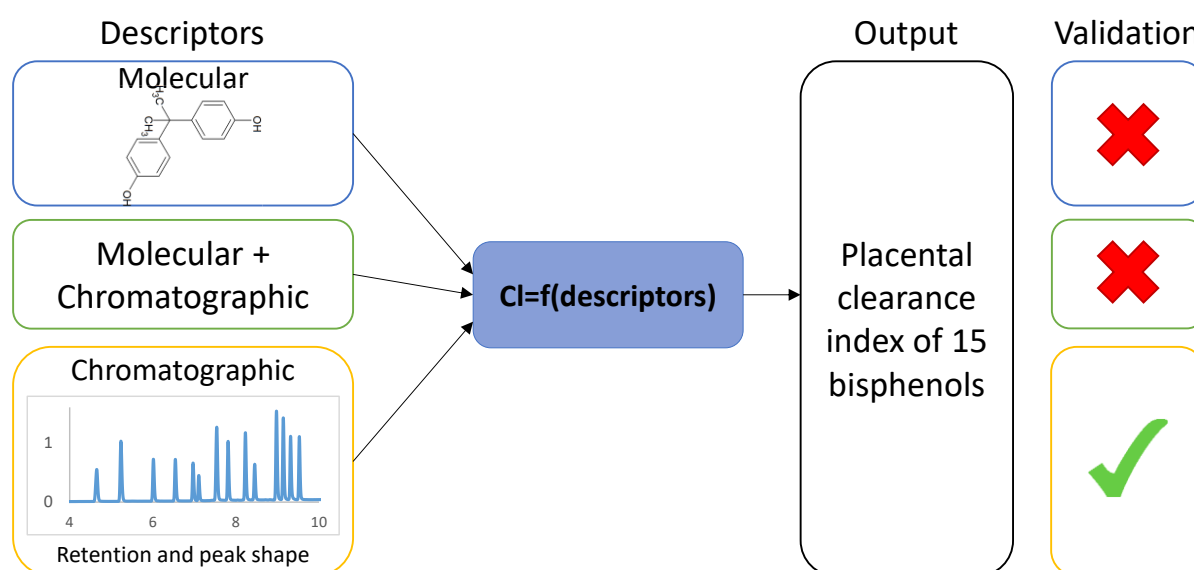
¹ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

²INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

³Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, UMR 5623, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France.

Competing financial interests: The authors declare that they have no actual or potential competing financial interests

Graphical abstract



Abbreviations

BPS: Bisphenol S; BPA: Bisphenol A; BPE: Bisphenol E; 3-3BPA: 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane; BPB: Bisphenol B; BPC: Bis(4-hydroxyphenyl)-2,2-dichloroethylene; BPBP: Bisphenol BP; BPF: Bisphenol F; BPFL: Bisphenol FL; BPZ: Bisphenol Z; BP4-4': 4,4'-Dihydroxybiphenyl; BPAP: Bisphenol AP; BPAF: Bisphenol AF; BPP: Bisphenol P; BPM: Bisphenol M; CI: Clearance Indices, QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship.

Abstract

Regulatory measures and public concerns regarding bisphenol A (BPA) have led to its replacement by structural analogues, such as BPAF, BPAP, BPB, BPF, BPP, BPS and BPZ. However, these alternatives are under surveillance for potential endocrine disruption, particularly during the critical period of fetal development. Despite their structural analogies, these BPs differed greatly in placental transport efficiency. For predicting the fetal exposure of this important class of emerging contaminants, quantitative structure-activity relationship studies (QSAR) were developed to model and predict the placental clearance indices (CI). The most usual input parameters were molecular descriptors obtained by modeling, but for bisphenols (BPs) containing structural similarities or heteroatoms such as sulfur, the descriptors are not very contrasting. This study evaluated and compared the capacity of QSAR models based either on molecular or on chromatographic descriptors or a combination of both to predict placental passage of BPs. These chromatographic descriptors include both the retention mechanism and the peak shape on columns that reflect specific molecular interactions between solute, stationary and mobile phases, and are characteristic of the molecular structure of BPs. Chromatographic peak shape such as asymmetry and tailing factors had more influence to predict the placental passage than the usual retention parameters. Furthermore, the QSAR model having the best prediction capacity was obtained with the chromatographic descriptors alone and met the criteria of internal and cross validation. These QSAR models are crucial for predicting the fetal exposure of this important class of emerging contaminants.

Keywords: bisphenols, QSAR, human placental transfer, endocrine disruptor, chromatographic descriptors

1. Introduction

Bisphenol A (BPA), which was widely used in daily products, has been prohibited in food packaging in several countries because of its endocrine disrupting properties. As a result, structurally similar phenolic compounds such as BPAF, BPAP, BPB, BPF, BPP, BPS and BPZ (Figure 1) have gradually replaced BPA in the polymer industry. Because of the wide use of these analogues in food packaging and personal care products (Chen et al., 2016; González et al., 2020; Liao and Kannan, 2014), the human exposure is ubiquitous, as demonstrated by their detection in human urine (Chen et al., 2016; Karrer et al., 2020; Zhang et al., 2020). These analogues may display endocrine disrupting properties similar to those of

BPA (Rosenmai et al. 2014, Moreman et al. 2017; Siracusa et al. 2018; Le Fol et al. 2017; Pelch et al. 2019) particularly during the critical period of pregnancy (Shi et al., 2018; Tucker et al., 2018). *In vivo* studies performed in pregnant sheep showed that, BPS and BPF, as BPA, can cross the placenta (Grandin et al. 2018; Gingrich et al. 2019; Corbel et al. 2015). Recently, *ex vivo* human placental perfusion carried out for assessing the placental transfer of 15 bisphenols (BPs) have shown that, despite their structural similarities, the efficiency of placental transport differs greatly among BPs, as reflected by the large range of their clearance indices, from 0.065 to 0.842 (Gély et al., 2021). Indeed, while BP4-4, BPAP, BPE, BPF, 3-3BPA, BPB, BPA cross placenta by passive diffusion (Corbel et al., 2014), the materno-fetal placental transfer of BPS and BPFL is very limited and may involve membrane efflux transporters (Gély et al., 2021; Grandin et al., 2019).

The physicochemical properties of the molecules such as molecular weight, degree of ionization (pKa) and lipophilicity (LogP), are considered as the possible factors determining the extent of placental passage and the mechanism of transfer (Pacifici and Nottoli, 1995). In this context, several studies have predicted the maternal-fetal transfer rates of many drugs or organic compounds through Quantitative-Structure Activity Relationship (QSAR) modeling (Eguchi et al., 2018; Giaginis et al., 2009; Hewitt et al., 2007; Zhang et al., 2015). These models are mostly based on molecular descriptors in order to establish a relationship between the biological activities or the toxicological responses of molecules and their molecular, physicochemical and structural properties (Danishuddin and Khan, 2016). However, these numerical descriptors are calculated from the two- and/or three-dimensional structures of molecules and do not take into account the dynamic interactions with their biological targets (Kaliszan, 2007). For BP analogues, the physicochemical parameters generally involved in placental transfer (pKa within 8.5-9, LogP within 2-7 and MW below 600 Da), would imply that their potential passive diffusion across the placenta would be high (Eguchi et al., 2018; Gély et al., 2021; Giaginis et al., 2009; Hewitt et al., 2007). It is therefore anticipated that the placental transfer efficiency of these structurally related BPs will be hardly predicted by descriptors based on molecular structure alone. In many cases, experimental descriptors such as chromatographic retention have been added to molecular ones to improve the QSAR models (Apostolov et al., 2019; Deconinck et al., 2007). Indeed, the chromatographic retention depends on the interaction of the compound of interest, *i.e.* its structure, with the stationary phase and the mobile phase. Thus, chromatographic retention of a molecule depends strongly on both its physicochemical properties and its environment. To our knowledge, few studies have investigated the use of chromatographic descriptors alone in QSAR modelling and all of them have only considered retention parameters (Lidija R Jevrić et al., 2014; Koba et al., 2012; Perisic-Janjic et al., 2011).

The aim of the present study was to evaluate the reliability of QSAR model based on chromatographic descriptors compared to classical molecular descriptors, to predict the placental clearance of BPs, using as biological output the placental clearance indices determined in a previous study (Gély et al., 2021). To that end, the set of 15 selected BPs was eluted on thirteen chromatographic columns using two elution solvents. We built then QSAR modelling based either on classical molecular descriptors of the fifteen bisphenols or on chromatographic descriptors, such as retention and peak shape parameters, or on both molecular and chromatographic descriptors. Their performances for predicting BPs placental transport efficiency were verified by cross validation procedures. This QSAR approach, by allowing prediction of a key parameter, placental clearance, should provide new insight for screening this important class of emerging BPs and assessing the hazards of BPA substitution in vulnerable developing fetus.

2. Material and methods

2.1. Data set

2.1.1. Compounds

Bisphenol S (BPS)(purity \geq 98%), Bisphenol A (BPA) (purity \geq 99%), Bisphenol E (BPE) (purity \geq 98%), 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane (3-3BPA) (purity \geq 97%), Bisphenol B (BPB) (purity \geq 98%), Bis(4-hydroxyphenyl)-2,2-dichloroethylene (BPC) (purity \geq 98%), Bisphenol BP (BPBP)(purity \geq 98%), Bisphenol F (BPF) (purity \geq 98%), Bisphenol FL (BPFL) (purity \geq 97%), Bisphenol Z (BPZ) (purity \geq 98%), 4,4'-Dihydroxybiphenyl (BP4-4) (purity \geq 97%), Bisphenol AP (BPAP) (purity \geq 99%), Bisphenol AF (BPAF) (purity \geq 97%), Bisphenol P (BPP) (purity \geq 98%), Bisphenol M (BPM) (purity \geq 99%) (Figure 1).

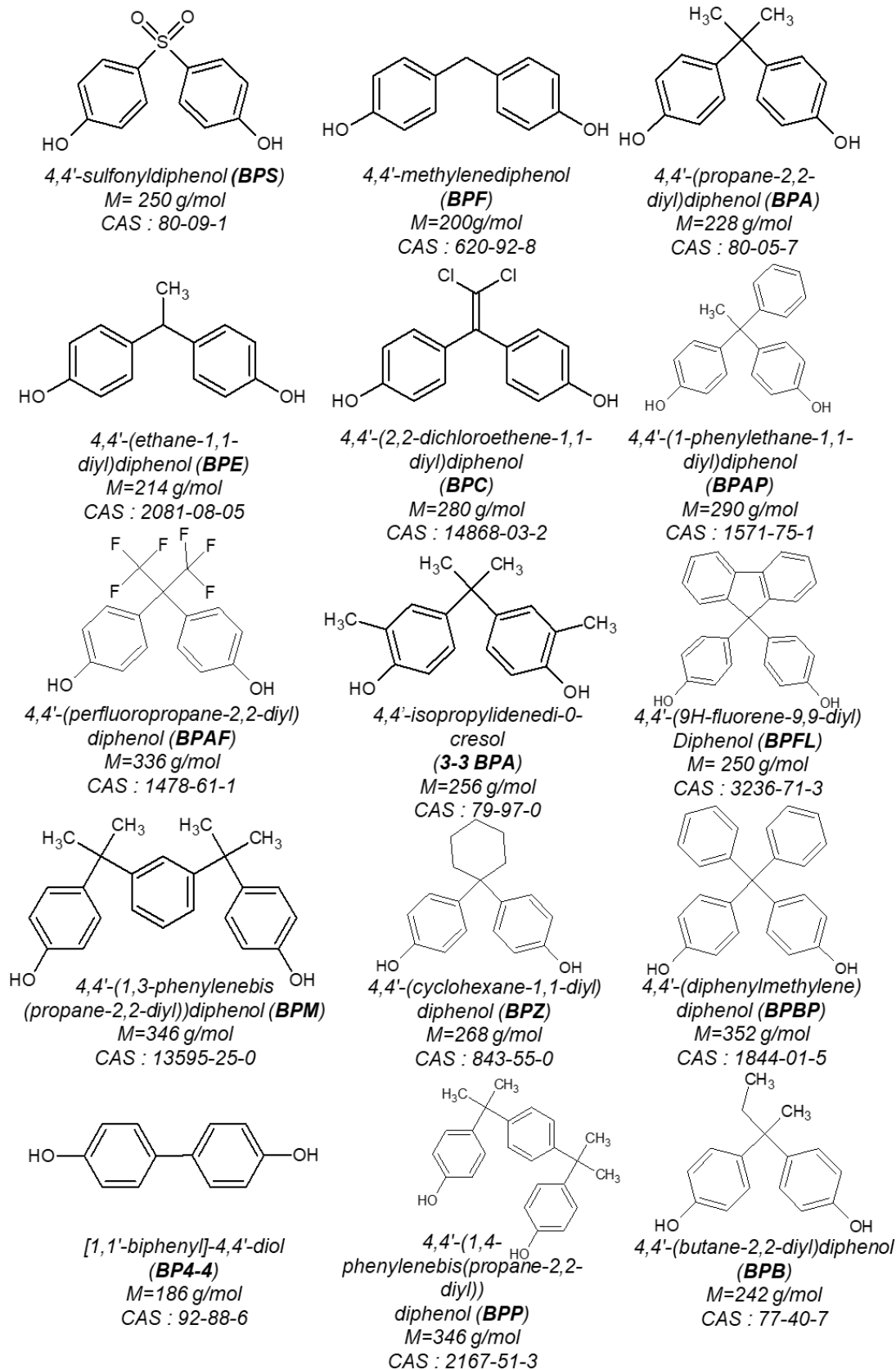


Figure 1: Molecular structure of the fifteen bisphenols with their respective name, abbreviation, molecular weight and CAS number (Gély et al., 2021)

2.1.2. Molecular descriptors

The 3D structures of these bisphenols were minimized by MMF94 using a semi-empirical molecular orbital package, MOPAC application, in Chem 3D Ultra software (V17.1, Perkin Elmer informatics). An RMS gradient of 0.10 was used to minimize energy with a maximum of 1000 iterations. Electrostatic (like dipole moment, HOMO and LUMO energy etc.), thermodynamic (like dipole heat of formation, Gibbs free energy etc.), steric (like ovality, Connolly accessible area, etc.), topologic (like polar surface area, shape attribute, etc.) and physico-chemical (like molecular weight, pKa, Log P etc.) descriptors were calculated. The set of molecular descriptors calculated for each studied BP is detailed in the supplementary data table S1.

2.1.3. Chromatographic descriptors

In most of BP chromatographic studies, BPs are eluted on a C18 column with H₂O/AcN gradient (Rocha et al., 2016; Zhou et al., 2014). Therefore, the separation of the 15 BPs was optimized using the conventional U-HPLC BEH C18 stationary phase with acetonitrile as organic modifier (Figure 2A). Then, the same solvent percentage, flow rate and time were applied to thirteen chromatographic columns (Table 1) either with AcN or with MeOH in order to compare the retention and peak shape of 15 BPs in all these chromatographic conditions. The chromatographic descriptors were calculated from the chromatographic parameters determined by the analysis of the chromatogram of each BP, injected alone, in aqueous gradient mode on 13 analytical stationary phases listed in table 1, using two solvents as organic modifier: methanol and acetonitrile.

Table 1: Analytical columns used for determining the chromatographic descriptors with their abbreviation, dimension and selectivity (Restek, 2013; Waters, 2015).

Column	Dimension – Granulometry – Supplier	Selectivity
Raptor Biphenyl (RB)	100 x 2.1 mm ; 2.7 µm, Restek	Polarizability, aromatic and dipolar selectivity
Raptor Biphenyl Core-Shell (RCB)	100 x 2.1 mm ; 1.8 µm, Restek	Polarizability, aromatic and dipolar selectivity
Force Biphenyl (FB)	100 x 2.1 mm ; 1.8 µm, Restek	Polarizability, aromatic and dipolar selectivity
Cortecs C18 (CC18)	100 x 2.1 mm; 1.6 µm, Waters	Hydrophobicity selectivity
BEH C18 (C18)	100 x 2.1 mm; 1.7 µm, Waters	Hydrophobicity selectivity (reference)
BEH RP 18 Shield (RP18)	100 x 2.1 mm; 1.7 µm, Waters	Basic compound selectivity
BEH C8 (C8)	100 x 2.1 mm; 1.7 µm, Waters	Hydrophobicity selectivity
BEH Phenyl (P)	100 x 2.1 mm; 1.7 µm, Waters	Pi-Pi selectivity
CSH Phenyl-Hexyl (PH)	100 x 2.1 mm; 1.7 µm, Waters	Pi-Pi selectivity
CSH Fluoro-Phenyl (FP)	100 x 2.1 mm; 1.7 µm, Waters	Halogenated and polar compound selectivity.
HSS T3 (T3)	100 x 2.1 mm; 1.8 µm, Waters	Polar and hydrophobic molecules selectivity
HSS PFP (PFP)	100 x 2.1 mm; 1.8 µm, Waters	Pi-Pi, H-bonding, dipolar and hydrophobicity selectivity
HSS CN (CN)	100 x 2.1 mm; 1.8 µm, Waters	Alternative to hydrophobicity selectivity

Each BP solution was prepared in (H₂O/MeOH: 50/50) at a concentration of 0.01 mg/mL. Ten microliters of each solution were injected on an Acquity UPLC system with UV detection set at 210 nm (Waters, Milford, MA, USA). The column temperature was set at 40°C and BPs were eluted at 0.3 mL/min using linear gradient mode with two organic solvents (MeOH or AcN) and water: pump A (H₂O) /pump B (MeOH or AcN): t(0 → 10 min) 84% A → 5% A; t(10 → 15 min) 5% A. The retention time, peak asymmetry (4.4%), tailing factor and peak width (5%) were determined with Empower Suitability System software (Waters®). A specific retention factor $k'_{vs\ BPA}$ (equation 1) relative to BPA was calculated by equation 1 to normalize all retentions :

$$k'_{vs\ BPA} = \frac{tr_{BP} - tr_{BPA}}{tr_{BPA}} \quad \text{equation 1}$$

Descriptors corresponding to peak asymmetry, tailing factor, peak width and retention factor were identified as #7, #8, #2 and #5, respectively (Supplementary data table S2).

2.2. QSAR modelling

2.2.1. Variable selection and multi-linear regression

QSAR models were performed on RStudio software (Version 1.2.5001). The descriptors values were centered and scaled to unit standard deviation of each descriptor. An artificial neural network (ANN) was created using the R package neural net (version:

1.44.2) with a sigmoid activation function and a backpropagation learning algorithm (code in supplementary data). The ANNs were adjusted by assigning a weight to each descriptor to minimize error between predicted and experimental clearance indices using a sigmoid activation function and back-propagation learning algorithm (Günther and Fritsch, 2010; Stefan Fritsch [aut], et al., 2019). The ANN was structured with an input layer connected to each descriptor and an output layer linked to the Clearance Indices (CI) for each BP. The stepmax was set at 100000 and the threshold at 0.005. After learning cycles, descriptors with a weight (absolute value) greater than twice the median of all descriptor weights were considered significant. To avoid collinearities between descriptors, a correlation matrix was calculated with the significant descriptors. When a correlation (R^2 greater than 0.5) between two descriptors was observed, two new matrices were created, one containing the first descriptor and the other containing the other descriptor. This operation was carried out until a matrix containing uncorrelated descriptors was obtained, these descriptors were then used to build the final QSAR model. A multilinear regression (MLR) was performed then between the selected descriptors and CI for each QSAR model using Rstudio software. The regression was tested with three weightings: 1, $1/Y$ and $1/Y^2$ with Y = observed clearance index and residuals and leverages were plotted to evaluate by visual inspection the quality of the regression and to choose the weighting. The models with R-squared greater than 0.7 were selected for further development. For these models, if descriptors were not significant ($p < 0.05$), sub-models were built by subtracting the non-significant descriptors one by one and multilinear regressions were performed until all descriptors were significant. When too many descriptors were not significant to build the sub-models manually, the stepwise method was used to obtain the best model simplification by AIC (Brian Ripley, et al., 2021).

2.2.2. Data splitting

Clearance Indices for fifteen bisphenols were determined on five placentae, corresponding to a total of 75 values. This data set was divided into a training set (55 values, 11 bisphenols used for model development) and a test set of 20 values corresponding to 4 BPs randomly selected for model predictive assessment. Three prediction data sets were constructed to allow a balanced distribution of the different structures of the BPs. Each BP was allocated to one test set except BPs with high leverage in the multilinear regression model (Aravind Hebbali, 2020; Gramatica, 2007); *i.e.* BPS and BPFL for the model using molecular and chromatographic descriptors and BPAF for the model using only molecular descriptors, and BP44 for the model using only chromatographic descriptors. In consequence, data set 1 included BP44, BPB, 3-3BPA and BPZ in the test set for the validation of model based on molecular descriptors and data set 1 included BPAF, BPB, 3-

3BPA and BPZ for the models based on chromatographic descriptors or on the both types of descriptors. Data set 2 included BPP, BPM, BPAP and BPBP in the test set, and data set 3 included BPE, BPA, BPF and BPC in the test set. The training set was used for multilinear regression and the corresponding test set for predictive ability validation, for the three data sets separately.

2.2.3. Validation

Multilinear regression models were validated with the three data sets. For each data set, training set was used to configure regression and for cross-validation. CI of the four bisphenols included in test set was predicted by data set regression. Test set predictions were used for leave-many-out validation (LMO) according to criteria described for external validation (Alexander et al., 2015; Chirico and Gramatica, 2012; Ferreira, 2002; Gramatica and Sangion, 2016; Tropsha, 2010). Multilinear regression was estimated by R^2 (coefficient of regression determination, equation 2) and the root mean square error of calibration (RMSEC, equation 3). The robustness of the QSAR model was validated by the determination of Q^2 (cross-validated correlation coefficient, equation 4) and the root mean square error of cross validation (RMSECV, equation 5). The predictive quality of the model was estimated with Q^2_{LMO} (equation 6): the correlation coefficient of LMO validation, the root mean square error of prediction (RMSEP, equation 7), the correlation coefficient of concordance (CCC, equation 8) and the Pearson squared correlation coefficient between predicted and experimental values. Finally, the Spearman's correlation squared coefficient was determined to assess the model's ranking capability (Alexander et al., 2015). The accepted criteria are $R^2 > 0.65$; $Q^2 > 0.5$; $Q^2_{LMO} > 0.65$ (Chirico and Gramatica, 2011; Gramatica and Sangion, 2016) and $CCC > 0.85$ (Chirico and Gramatica, 2012). Additionally, RMSEC, RMSECV and RMSEP should be close and as low as possible (Gramatica and Sangion, 2016).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^I (y(i) - \hat{y}_c(i))^2}{\sum_{i=1}^I (y(i) - \bar{y})^2} \quad \text{Equation 2}$$

$$RMSEC = \sqrt{\sum_{i=1}^I \frac{(y(i) - \hat{y}_c(i))^2}{I - A - 1}} \quad \text{Equation 3}$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^I (y(i) - \hat{y}_v(i))^2}{\sum_{i=1}^I (y(i) - \bar{y})^2} \quad \text{Equation 4}$$

$$RMSECV = \sqrt{\sum_{i=1}^I \frac{(y(i) - \hat{y}_v(i))^2}{I}} \quad \text{Equation 5}$$

$$Q LMO^2 = 1 - \frac{[\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_e(i) - \hat{y}_e(i))^2] / n_{EXT}}{[\sum_{i=1}^{n_{TR}} (y(i) - \bar{y})^2] / n_{TR}} \quad \text{Equation 6}$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_e(i) - \hat{y}_e(i))^2}{n_{EXT}}} \quad \text{Equation 7}$$

$$CCC = \frac{2 \sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_e(i) - \bar{y}_e)(\hat{y}_e(i) - \bar{\hat{y}}_e)}{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_e(i) - \bar{y}_e)^2 + \sum_{i=1}^{n_{EXT}} (\hat{y}_e(i) - \bar{\hat{y}}_e)^2 + n_{EXT} (\bar{y}_e - \bar{\hat{y}}_e)^2} \quad \text{Equation 8}$$

With : $y(i)$: experimental data values of training set
 $\hat{y}_c(i)$: multilinear-regression predicted values
 \bar{y} : average of the experimental values of training set
 $\hat{y}_v(i)$: cross-validation predicted values
 $y_e(i)$: experimental data values of test set
 $\hat{y}_e(i)$: Test predicted values
 \bar{y}_e : average of the experimental values of test set
 $\bar{\hat{y}}_e$: average of the predicted values of LMO validation
 l : number of samples in training set
 A : number of descriptors
 n_{EXT} : number of descriptors in test set
 n_{TR} : number of descriptors in training set.

3. Results

3.1. Data collection

3.1.1. Clearance indices

Clearance indices (CI) of the 15 BPs perfused in cocktail were determined on five placentae using the *ex vivo* human perfused placenta model described in our previous study (Gély et al., 2021), Table 2. Clearance indices data were used as outcomes due to their ability to eliminate inter-placental variation by standardizing BP clearance to the reference compound antipyrine. These bisphenols were classified in two groups according to their mechanism of placental passage, by passive diffusion for 7 BPs (similar to antipyrine) or limited transport for 8 BPs (Gély et al., 2021). This data set obtained in the same experimental conditions, was relatively distributed in a wide range of placental clearance indices, and is thus well suited for the QSAR modelling of the ability of these newly-introduced BPs to cross the placenta (Hewitt et al., 2007). Moreover, the use of individual data of CI instead of the mean CI allows taking into account both experimental and biological variabilities and thus improve the predictive capacity of the model (Wenlock and Carlsson, 2015).

Table 2: Mean \pm Standard deviation (SD) of clearance indices of the 15 studied BPs (7 bisphenols with transfer rates that did not differ significantly from that of antipyrine, and 8 BPs with a significantly lower transfer rate than that of antipyrine), evaluated on five

placentae. Clearance indice corresponds to the ratio of BP-studied placental transfer rate divided by the antipyrine transfer rate (Gély et al., 2021).

Bisphenol	Mean CI \pm SD (n = 5)	Classification
BPFL	0.064 \pm 0.021	Significantly different from antipyrine transfer rate
BPS	0.082 \pm 0.016	
BPBP	0.256 \pm 0.046	
BPZ	0.318 \pm 0.090	
BPC	0.392 \pm 0.076	
BPM	0.442 \pm 0.149	
BPP	0.452 \pm 0.048	
BPAF	0.524 \pm 0.071	
BPAP	0.570 \pm 0.062	Not different from antipyrine transfer rate
BP44	0.662 \pm 0.135	
BPE	0.686 \pm 0.158	
BPF	0.696 \pm 0.142	
33BPA	0.722 \pm 0.070	
BPA	0.812 \pm 0.065	
BPB	0.842 \pm 0.080	

3.1.2. Molecular descriptors

In total, 50 molecular descriptors were calculated for each BP with different algorithms incremented in the ChemDraw Pro software. Among these 50 descriptors, 16 concern physicochemical properties (pKa, logP...), 14 are topological descriptors (Balaban index, polar surface...) and 20 involved thermodynamic and electronic properties.

3.1.3. Chromatographic descriptors

Figure 2 shows that the retention and the elution order of BPAF, BPAP, and 3-3BPA on the C18 column change according to elution solvent, AcN or MeOH (Figure 2) and BPS peak shape is larger with MeOH than with AcN. Peak asymmetry, tailing factor, peak width (5%) and k'vs BPA were determined with the two organic solvents and for the 13 columns, resulting to a total of 104 descriptors per BP (Supplementary data Table S2).

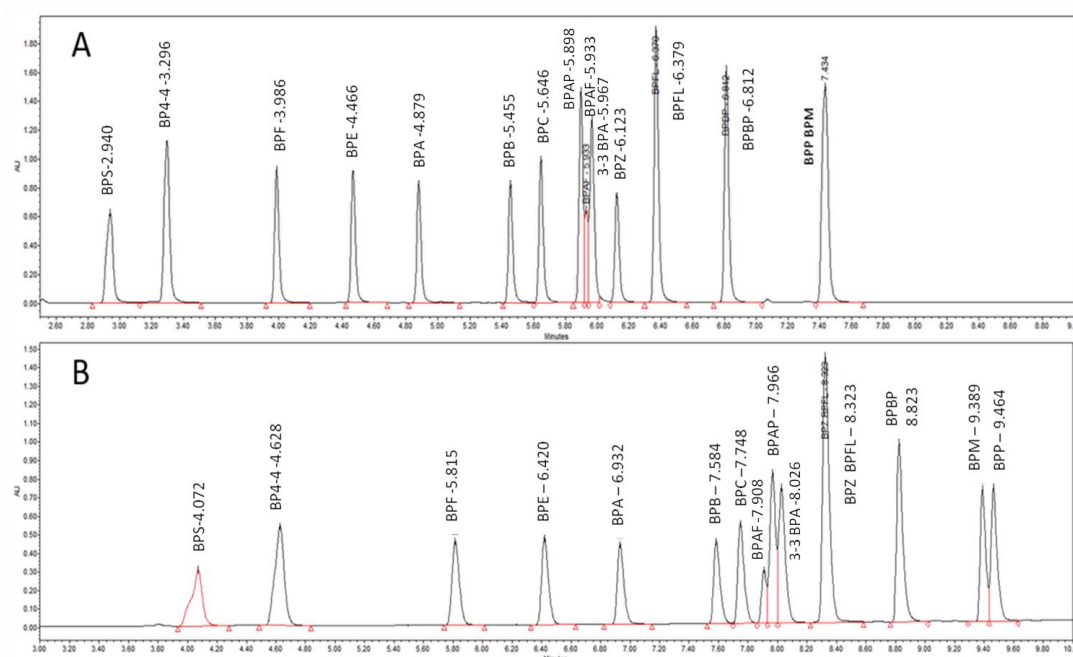


Figure 2: Chromatograms of 15 studied BPs eluted on BEH C18 column with AcN/H₂O gradient elution (A) and with MeOH/H₂O gradient elution (B).

3.2. QSAR modelling

First, it was investigated whether models with molecular descriptors obtained *in-silico* were able to predict BP clearance indices. Secondly, the chromatographic descriptors were added to the molecular descriptors to assess whether this combination could improve the prediction of the model. Finally, a model using only chromatographic descriptors was also developed and compared to those using molecular descriptors.

3.2.1. Molecular descriptors in QSAR model for predicting placental passage

Among the 50 normalized molecular descriptors (Supplementary data table S1), eleven descriptors gave a weight greater than twice the median of the weights using ANN learning and were selected as significant descriptors in the prediction of CI. Three of them are physicochemical descriptors (partition coefficients: LP2 and CD2, and a melting point CPP10), two are steric descriptors (Connolly Molecular Area CPS2, Connolly Solvent Excluded Volume CPS3) and two are topologic descriptors (Cluster count MT2 and Polar Surface Area MT5). The others 4 are involved in electrostatic and thermodynamic interactions (heat of formation DE1, total energy DE2, cosmo area DE5 and ionization potential DE7). Then, using these eleven descriptors, twenty-eight combinations were selected to build the model, considering low pair correlations among the variables (determination coefficient <0.5). Five of these combinations have a regression $R^2 > 0.7$ and

significant parameters in the multilinear regression. The final model, *i.e.* with significant and not correlated descriptors, was obtained with the following molecular descriptors: Log P (LP2), Polar Surface Area (MT5), the heat of formation (DE1) and the total energy (DE2) and using equation 9 with a weighting by 1/Y:

$$CI = 0.46 + 0.23 \cdot LP2 - 0.08 \cdot MT5 - 0.30 \cdot DE1 + 0.41 \cdot DE2 \text{ (Equation 9)}$$

Regression-adjusted CI and leverage were reported in supplementary data table S3. The criterion of the regression and of the cross validation are acceptable with mean R^2 of 0.77 and mean Q^2 higher than 0.70, respectively. However, the mean Q_{LMO}^2 and mean CCC for the three data sets were 0.57 and 0.64, respectively, which did not fulfill the recommended criteria for validating the predictive ability of this model (*i.e.* $Q_{LMO}^2 > 0.6$ and $CCC > 0.85$, Table 3).

Table 3: Statistical results of the QSAR cross-validation for the three selected models built with either molecular, chromatographic or combined descriptors.

	Regression		Cross-validation		Leave-many-out (LMO) validation			
	RMSEC*	R^2 *	RMSECV*	Q^2 *	Q_{LMO}^2 *	RMSEP**	CCC**	R_{spearman} **
Validation Criterion		>0.65		>0.5	>0.65		>0.85	
Molecular Descriptors	0.14	0.77	0.14	0.71	0.57	0.17	0.64	0.70
Chromatographic Descriptors	0.11	0.84	0.11	0.81	0.73	0.13	0.81	0.83
Both Descriptors	0.11	0.85	0.11	0.82	0.47	0.19	0.67	0.71

* mean of validation parameters for the prediction of BPs of the three test data sets

**parameters determined with observed and predicted CI calculated with test data set 1, 2 and 3.

Moreover, the slope of the LMO validation curve ($Y_{\text{pred}} = f(\text{mean}(Y_{\text{obs}}))$) is significantly different to 1 (figure 3A) and for most of bisphenols of the test sets, the predicted CI is underestimated by the model except for BPZ (figure 4A), for which its predicted CI was twice higher than its observed CI (figure 4A). The results suggest that these *in-silico* calculated descriptors alone are not robust enough for predicting clearance indice of a new BP.

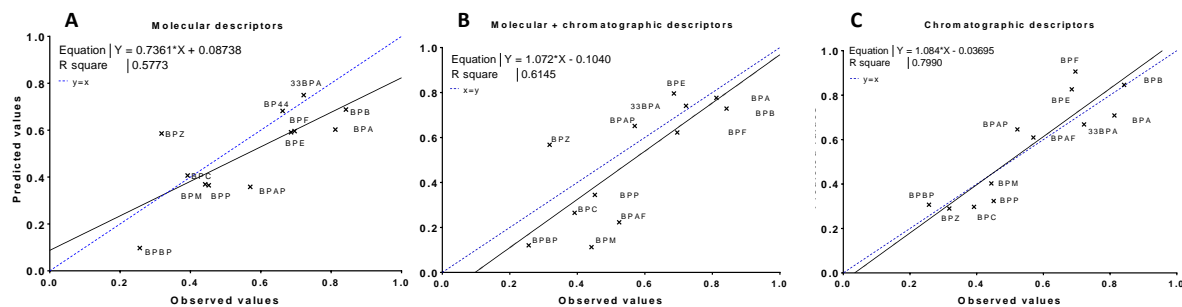


Figure 3: LMO validation curves of the mean observed placental clearance indices of BPs and predicted for the three test data sets by MLR regression based on molecular (A), both molecular and chromatographic (B), or chromatographic (C) descriptors. The dotted line represents a perfect fit with the equation $C_{\text{lobs}} = C_{\text{lpred}}$ and the straight line is the representation of $C_{\text{lpred}} = a \cdot C_{\text{lobs}} + b$ where a and b are the coefficient of the corresponding linear regression model.

3.2.2. Combining chromatographic descriptors and molecular descriptors in QSAR model for predicting placental passage

The 104 chromatographic descriptors were combined with the 50 molecular descriptors. Thirty-eight descriptors from these 154 descriptors were selected by ANN (Table 4) leading to 341 combinations of descriptors without correlation. Interestingly, only five molecular descriptors included in the previous molecular QSAR modeling (MT2, MT5, DE1, DE2 and DE5), were also significant in this present model, whereas the molecular descriptors related to LogP were not selected by ANN using molecular and chromatographic descriptors. The retention factors related to BPA were first selected by ANN (k' vs BPA, #5), but were progressively removed from the multilinear regression models because of their strong correlations with the molecular and peak shape descriptors. After the MLR assay, 50 models were chosen for their good fitting and the significance of their parameters. However, only few of them met the LMO validation criteria.

Table 4: Molecular and chromatographic descriptors selected to build QSAR for predicting placental CI, i.e. with weight in the artificial neural networks higher than twice the median of all descriptors weight.

Molecular descriptors			Chromatographic descriptors			
Id	Parameters		Id	Column - Solvent - Parameters	Id	Column - Solvent - Parameters
CPS3	Connolly	Solvent Excluded Volume	C18A2	C18 – AcN - Width (5%)	RCBA2	RCB - AcN - Width (5%)
			C18A7	C18 – AcN - Asymmetry	RCBA8	RCB - AcN - Tailing Factor
CD1	Mol Refractivity		C18A8	C18 – AcN - Tailing factor	CC18A2	CC18 - AcN - Width (5%)
MT2	Cluster Count		PHA5	PH - AcN – k' vs BPA	CC18A7	CC18 - AcN - Asymmetry
MT5	Polar Surface Area		FPA2	FP - AcN - Width (5%)	C18M5	C18 - MeOH - k' vs BPA
MT12	Total Connectivity		C8A2	C8 - AcN - Width (5%)	C18M7	C18 - MeOH - Asymmetry
DE1	Heat of formation		T3A2	T3 - AcN - Width (5%)	PHM5	PH - MeOH - k' vs BPA
DE2	Total Energy		T3A5	T3 - AcN - k' vs BPA	FPM7	FP - MeOH - Asymmetry
DE5	Cosmo Area		T3A7	T3 - AcN - Asymmetry	T3M5	T3 - MeOH - k' vs BPA
DE9	Lumo Energy		T3A8	T3 - AcN - Width (5%)	PFPM2	PFP - MeOH - Width (5%)
			RBA5	RB - AcN - k' vs BPA	PFPM7	PFP - MeOH - Asymmetry
			PFPA2	PFP - AcN - Width (5%)	RPM7	RP - MeOH - Asymmetry
			RPA2	RP - AcN - Width (5%)	CNM7	CN - MeOH - Asymmetry
			CNA5	CN - AcN - k' vs BPA	CC18M2	CC18 - MeOH - Width (5%)
			FBA7	FB - AcN - Asymmetry		

Furthermore, the influence of BPs (leverage) on the regression differed according to the type of descriptors used. Indeed, BPAF, which had a strong influence using molecular descriptors, was no longer leveraged but was replaced by BP44, resulting to a change in the arbitrary choice of BPs in the test set 1 for LMO validation (Golbraikh and Tropsha, 2000). The final model included the following parameters: Connolly Solvent Excluded Volume (CPS3), cluster count (MT2) and LUMO energy (DE9) as molecular descriptors and shape peak parameters (width #2, asymmetry #7 and tailing factor #8) on biphenyl and BEH C8 column with AcN elution (RCBA8 and C8A2) and on PFP column with MeOH as organic modifier (PFPM2 and PFPM7). The equation of the MLR assigning a weight 1/Y, was:

$$CI = 0.48 - 0.03 \cdot CPS3 - 0.23 \cdot MT2 + 0.33 \cdot DE9 - 0.25 \cdot C8A2 + 0.37 \cdot RCBA8 - 0.27 \cdot PFPM2 + 0.23 \cdot PFPM7 \quad (\text{Equation 10})$$

Regression-adjusted CI and leverage were reported in supplementary data table S3. The R^2 of the regression was 0.85 and the Q^2 of the cross validation was 0.82 but the Q_{LMO}^2 of the LMO validation was lower than 0.5 (Table 3).

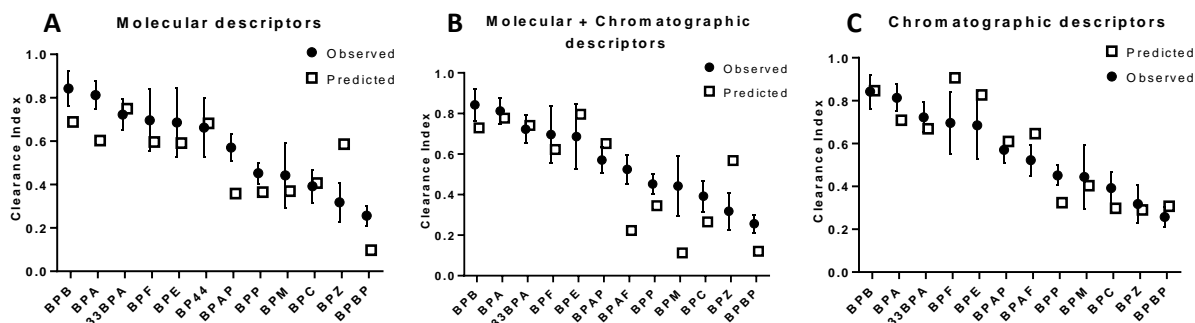


Figure 4: Mean \pm SD observed clearance indices determined for the BPs on 5 perfused human placentae compared to the clearance indices predicted by QSAR models based on molecular descriptors (A), on molecular combined with chromatographic descriptors (B) and on chromatographic descriptors (C). The placental CI of some BPs cannot be predicted because they are pivotal in building QSAR model (BPAF, BPFL, BPS in A, BP44, BPFL, BPS in B and C).

As shown on Figure 3B, the correlation curve (straight line) was systematically below the perfect curve (dot line) and the predicted CI for the BPs having low CI are misestimated (Figure 4B). The combination of chromatographic and molecular descriptors was not able to improve the prediction capacity of the QSAR model based on only molecular descriptors.

3.2.3. Chromatographic descriptors in QSAR model for predicting placental passage

Among the 104 descriptors experimentally obtained by liquid chromatography, the ANN selected 17 chromatographic descriptors with weights higher than twice the median of all descriptors weight (Table 5). Eight chromatographic descriptors were also significant in the QSAR model based on both molecular and chromatographic descriptors (Table 4). Twenty-four models based on uncorrelated descriptors were identified, resulting in the selection of eight models with significant descriptors for predicting CI.

Table 5: Chromatographic descriptors with weight in the artificial neural networks higher than twice the median of all descriptors weight and selected to build QSAR model for predicting placental passage.

Chromatographic descriptors			
Id	Column - Solvent - Parameters	Id	Column - Solvent - Parameters
T3A2	T3 - AcN - Width (5%)	FPM7	FP - MeOH - Asymmetry
RBA7	RB - AcN - Asymmetry	C8M7	C8 - MeOH - Asymmetry
PFFA7	PFP - AcN - Asymmetry	T3M5	T3 - MeOH - k' vs BPA
FBA5	FB - AcN - k' vs BPA	PFPM7	PFP - MeOH - Asymmetry
CC18A2	CC18 - AcN - Width (5%)	RPM8	RP - MeOH - Tailing factor
CC18A7	CC18 - AcN - Asymmetry	CNM8	CN - MeOH - Tailing factor
C18M2	C18 - MeOH - Width (5%)	FBM2	FB - MeOH - Width (5%)
C18M5	C18 - MeOH - k' vs BPA	FBM7	FB - MeOH - Asymmetry
C18M7	C18 - MeOH - Asymmetry		

The final model was obtained using six chromatographic descriptors with a weighting by $1/Y$ according to the following equation 11:

$$CI = 0.48 - 0.66 \cdot T3A2 - 0.05 \cdot PFFA7 + 0.07 \cdot CC18A7 - 0.50 \cdot C8M7 - 0.14 \cdot PFPM7 + 0.38 \cdot CNM8$$

(Equation 11)

Regression-adjusted CI and leverage of equation 11 were reported in supplementary data table S3. All these descriptors referred to peak shape parameters, half were eluted with AcN and half with MeOH, three on a hydrophobic phase (HSS T3, C18 and C8), two on a fluorophenyl phase (PFP) and one on a phase containing a polar group (CN). The asymmetry on the PFP column with MeOH elution (PFPM7) was the only descriptor in common with the multilinear regression based on this molecular and chromatographic descriptors (equation 10). The R^2 of the regression and the Q^2 of the cross-validation were 0.84 and 0.81, respectively. Moreover, the LMO validation values ($Q_{LMO}^2 = 0.73$ and $CCC = 0.81$) almost met the recommended criteria (Table 3), (Chirico and Gramatica, 2012). The Spearman's correlation coefficient (R^2 spearman) was higher than 0.8 (Table 3), attesting the ability of the model to classify CI according to the BPs. In addition, the mean square error of the calibration (RMSEC), cross-validation (RMSECV) and prediction (RMSEP) were low, between 0.11 and 0.13 (Table 3). The correlation curve (straight line, $Y_{pred} = f(\text{mean}(Y_{obs}))$) was close to the perfect line (dotted line, figure 3C) with an intercept not significantly different from 0 and a slope close to 1. The predicted CI of BPs were grossly well estimated with

predicted CI into standard deviation intervals, except for BPE, BPF and BPAF that were slightly overestimated and BPP slightly underestimated (figure 4C).

4. Discussion

This work aimed at developing a predictive model of placental transfer for newly emerging BPs. This approach was based on QSAR modeling of the clearance indices of 15 bisphenols previously evaluated using *ex vivo* human placental perfusion (Gély et al., 2021). Bisphenols were selected because of their occurrence in foodstuffs (Caballero-Casero et al., 2016; Liao and Kannan, 2013), their production volume (“ECHA (European Chemical Agency),” n.d.) and the diversity of their structures. In the present study, we have shown that a QSAR model based on chromatographic parameters provides more reliable predictions of BPs placental transfer than QSAR models based on molecular descriptors alone or in combination with chromatographic descriptors.

The classical QSAR model based on molecular descriptors (equation 9) showed that physicochemical, topological, thermodynamic and electronic parameters (Log P, total energy, Polar Surface Area and heat of formation) were able to influence the placental passage of this family of emerging bisphenols. Among physicochemical properties, the molecular weight and the lipophilicity are known to be key factors determining the passage across placenta (Audus, 1999; Evain-Brion et al., 2014; Syme et al., 2004). The molecular weight of all BPs were below 600 Da and would not impact their passage across the placenta. Moreover, in a QSAR methodology using multivariate data analysis to model the placental passage of structurally diverse drugs and chemicals, the polar surface area and lipophilicity proved to be the most important factors in the model (Giaginis et al., 2009). A QSAR model using multilinear analysis identified molecular weight, polarity and also the heat of formation as important parameters to predict the materno-fetal transport of organohalogen compounds (Eguchi et al., 2018). Whatever the importance of these factors, our results showed that a QSAR model based on molecular descriptors alone cannot provide a robust prediction of the placental transport for this class of emerging BPs, even if the ranking of their clearance indices can be determined with a relatively good confidence level. It means that the placental transfer efficiency of these structurally related bisphenols cannot be predicted solely from their physicochemical properties determined *in silico*.

Chromatographic techniques offer the possibility to take into account the interactions of the molecules with different columns in several conditions (pH, solvent) and then to better characterize the molecular interactions with biological system. That is the reason why chromatographic descriptors were combined to molecular ones in the QSAR models (Apostolov et al., 2019; Deconinck et al., 2007; Gao et al., 2017; Giaginis and Tsantili-

Kakoulidou, 2013; Lidija R. Jevrić et al., 2014; Koba et al., 2012; Perisic-Janjic et al., 2011; Quinones-Torrelo et al., 2002). The most commonly used chromatographic descriptors are the retention factors that can be determined on several orthogonal stationary phases with different pH and solvents (Apostolov et al., 2019; Lidija R. Jevrić et al., 2014; Perisic-Janjic et al., 2011). Indeed, many new reverse stationary phases were developed to extend the selectivity of chromatographic retention, involving many interactions with the column during elution (Lesellier and West, 2018). The use of these experimental tools might be of great interest for QSAR modeling because these chromatographic parameters integrate several physicochemical properties of the compound. In this study, we used 13 chromatographic columns containing different stationary phases and two elution solvents, MeOH and AcN, involving different interactions with the 3D structure of the chemical.

Indeed, the organic modifier used in gradient mode influences the fluidity of the alkyl chains of the stationary phases, and then the mechanisms of molecular interactions between the analytes and the stationary phases (Lafossas et al., 2019), leading to modification of chromatographic parameters. In our experiment, the use of MeOH as an organic modifier in gradient mode favors the H-bonding and π - π interactions while ion-dipole interactions are masked. Conversely, the use of AcN, due to the interactions of its cyano function with the stationary phase, limits the π - π interactions (Yang et al., 2005) and promotes dipole-dipole interactions (Le Mapihan et al., 2007). The chromatographic behavior of the chemical is described not only by the retention factors but also by the peak shape parameters such as asymmetry, tailing factors or width at 5% (Ravisankar et al., 2020; Waters Corporation, 2002) and can be linked to specific molecular descriptors (Lafossas et al., 2019).

Our modeling approach (equation 10) showed that, the Connolly Solvent Excluded Volume, which is the volume enclosed in the molecule, had a weak influence on the placental passage prediction. The topological descriptor, cluster count, which reflects the complexity of the molecule (Todeschini and Consonni, 2000), had a negative contribution on the CI of bisphenols. Inversely, the LUMO energy had a positive contribution. Our results are consistent with previous QSAR model (Eguchi et al., 2018) showing that electronic descriptors are important parameters that may predict the ability of the molecule to cross the placenta. Surprisingly, the contribution of the chromatographic descriptors does not improve the global predictive ability of our model based on the molecular descriptors. These results are not consistent with a previous study showing that the nonlinear QSAR model of prediction of gastrointestinal absorption was improved by adding the measured chromatographic descriptors to the molecular ones (Deconinck et al., 2007). This discrepancy could be attributed to the QSAR model used, linear in our study and nonlinear in Deconinck study and to differences in chromatographic parameters used in our QSAR

model, which includes not only the retention factors but also the peak shape parameters such as asymmetry, tailing factor and peak width. These chromatographic parameters evaluated in the same experimental conditions, reflect in part the mass transfer kinetics and thermodynamics of the analytes between the mobile and the stationary phase (Miyabe and Guiochon, 2003). The chromatographic stationary phase selected in our model mainly involved polarizability (RCB) and π - π interactions (PFP) of the analytes. Thus, the implementation of these chromatographic descriptors led to a combination of descriptors having a great influence in the prediction of placental passage and not correlated, quite different from those selected in the two QSAR model based either on molecular or chromatographic parameters. A great influence of the thermodynamic properties of the BPs to the detriment of the lipophilicity parameters is observed. In fact, the evaluation of the relationship between the molecular and the chromatographic descriptors selected in the two chromatography-based QSAR models through the ANN learning, showed that the selected chromatographic descriptors are a combination of molecular descriptors selected to describe CI. Nevertheless, the four chromatographic descriptors presented in the model based on molecular and chromatographic descriptors are not directly related to LogP, unlike the chromatographic descriptors selected by the chromatography-based QSAR (Supplementary data table S4).

When we developed a QSAR model based on chromatographic descriptors alone to predict the passage of BPs across the placenta, the main chromatographic descriptors selected by the artificial neural networks involved the peak shape such as asymmetry, width and tailing factor, as in the previous model. More specifically, the most important descriptors in validated model (equation 11) are the width peak on the HSS T3 column with AcN as eluent, followed by the asymmetry peak on the BEH C8 column with MeOH elution and the tailing factor on the HSS CN column with MeOH elution. Several studies have shown that residual silanols can increase the tailing factor of basic or polar compounds due to hydrogen bonding between oxygen and hydroxyl groups or ion exchange (Nawrocki, 1997). The HSS CN stationary phase is not endcapped, thus the silanols are accessible to the eluted compounds and the CN group favors the retention of polar compounds, thanks to dipole interactions. The importance of this descriptor could reflect the involvement of H bond interactions in the transplacental passage, which was highlighted in several QSAR studies (Giaginis et al., 2009; Hewitt et al., 2007; Zhang et al., 2015). Moreover, the predictive capacity of the model obtained with the multilinear regression, and based on these chromatographic descriptors alone, has been verified by an extensive internal validation procedure. Therefore, chromatographic descriptors appear to be more relevant than molecular descriptors alone or in combination with chromatographic descriptors for predicting

the passage of BPs across the placental barrier (Chirico and Gramatica, 2012, 2011; Gramatica and Sangion, 2016).

The main limitation of this study is the restricted number of BPs included in the models, which did not allow an external validation, i.e.: predicting the CI of bisphenols not included in the QSAR development process. Consequently, leave-many-out validation was performed with eleven bisphenols in the training set and four in the test set and this validation was repeated three times with three training and test sets. Moreover, unlike what usually be practiced in QSAR modeling, our training sets contained five repeatedly measured CI for each bisphenol, and it was previously shown that the incorporation of experimental errors improves the predictive ability of the QSAR model (Wenlock and Carlsson, 2015). Moreover, it important to consider that BPs with high leverage value (as BPS and BPFL) must be included in the training set to reinforce the model and their prediction should be considered unreliable (Golbraikh and Tropsha, 2000; Gramatica, 2007). Indeed, whatever the QSAR model, BPS and BPFL have a strong influence on the regression, which explains the poor prediction of their CI when one of them was not included in the training dataset. Interestingly, the placental CI of these two BPs was significantly lower than those of the other BPs (Gély et al., 2021), and they are structurally different in terms of lipophilicity for BPS and thermodynamic for BPFL. Regarding their chromatographic behavior, BPS and BPFL showed the inverse asymmetric parameters, especially on the HSS PFP column with MeOH elution reflecting the involvement of both H-bonds and π - π interactions. In the same way, BP44 having a great influence in the prediction of placental passage (high leverage) in the QSAR model based on chromatographic descriptors, was excluded for prediction even if its CI could be predicted with good accuracy using QSAR based only on molecular descriptors. Conversely, BPAF could not be included in the test set in the QSAR model based only on molecular descriptors because of a great difference in its thermodynamic properties, related to its fluorine atoms, whereas its CI could be predicted with the QSAR model based on chromatographic descriptors. Thus, the inclusion of new compounds containing more heteroatoms in the model would extend the range of values of molecular and chromatographic descriptors and thus improve the ability of QSAR model to predict BPs clearance indices (Tropsha, 2010).

Further investigations including Quantitative structure-retention relationship studies (QSRR) are required to link the molecular properties and the chromatographic behavior of these BPs (Kaliszan, 1993; Lafossas et al., 2019) and thus to better understand the interactions involved in placental passage of bisphenols.

Conclusion

In this study, three QSAR modeling based either on molecular or chromatographic descriptors alone, or on a combination of molecular and chromatographic descriptors, were developed and their ability to predict placental transfer of bisphenols were compared. The model based on chromatographic descriptors alone showed a better predictive ability. To our knowledge, this study is the first that implements new sets of chromatographic peak shape parameters in addition to the classical retention factors in QSAR modelling. These parameters allow a better prediction of placental transfer of BPs than molecular descriptors. This model may be a useful tool for a rapid screening and subsequent discarding of endocrine-active emerging BPs with a high fetal exposure potential. Further investigation by means of QSRR, are needed to establish a relationship between the chromatographic behaviors of bisphenols in diverse separation system to the chemical structure to better understand the interactions involved in placental passage of bisphenols. Moreover, this new concept deserves to be applied to other larger molecular families as well as to other physiological processes such as absorption or metabolism.

Acknowledgements

The authors thank A. Huesca and F. Ramon-Portugal for their assistance and involvement in model constructions.

References

- Alexander, D.L.J., Tropsha, A., Winkler, D.A., 2015. Beware of R^2 : Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 1316–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00206>
- Apostolov, S., Vastag, G., Mrdjan, G., Nakomčić, J., Stojiljković, I., 2019. Chromatographic descriptors in QSAR study of barbiturates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 42, 194–203. <https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1590207>
- Aravind Hebbali, 2020. Package 'olsrr' 0.5.3.
- Audus, K.L., 1999. Controlling drug delivery across the placenta. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 8, 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00031-7)
- Brian Ripley, Bill Venables, Douglas M. Bates, Kurt Hornik, Albrecht Gebhardt, David Firth, 2021. Package 'MASS.' 7.3-54.
- Caballero-Casero, N., Lunar, L., Rubio, S., 2016. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Analytica Chimica Acta* 908, 22–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.034>
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.-L., Wu, Y., Widelka, M., 2016. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology* 50, 5438–5453. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387>
- Chirico, N., Gramatica, P., 2012. Real External Predictivity of QSAR Models. Part 2. New Intercomparable Thresholds for Different Validation Criteria and the Need for Scatter Plot Inspection. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 2044–2058. <https://doi.org/10.1021/ci300084j>
- Chirico, N., Gramatica, P., 2011. Real External Predictivity of QSAR Models: How To Evaluate It? Comparison of Different Validation Criteria and Proposal of Using the Concordance Correlation Coefficient. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 2320–2335. <https://doi.org/10.1021/ci200211n>

- Corbel, T., Gayrard, V., Puel, S., Lacroix, M.Z., Berrebi, A., Gil, S., Viguié, C., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2014. Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reproductive Toxicology* 47, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.001>
- 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. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.061291>
- Danishuddin, Khan, A.U., 2016. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discovery Today* 21, 1291–1302. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.013>
- Deconinck, E., Ates, H., Callebaut, N., Van Gyseghem, E., Vander Heyden, Y., 2007. Evaluation of chromatographic descriptors for the prediction of gastro-intestinal absorption of drugs. *Journal of Chromatography A* 1138, 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.068>
- ECHA (European Chemical Agency) [WWW Document], n.d. URL <https://echa.europa.eu/>
- Eguchi, A., Hanazato, M., Suzuki, N., Matsuno, Y., Todaka, E., Mori, C., 2018. Maternal–fetal transfer rates of PCBs, OCPs, PBDEs, and dioxin-like compounds predicted through quantitative structure–activity relationship modeling. *Environ Sci Pollut Res* 25, 7212–7222. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5436-0>
- Evain-Brion, D., Berveiller, P., Gil, S., 2014. Le passage transplacentaire des médicaments. *Thérapies* 69, 3–11. <https://doi.org/10.2515/therapie/2014002>
- Ferreira, M.M.C., 2002. Multivariate QSAR. *J. Braz. Chem. Soc.* 13. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532002000600004>
- Gao, H., Huang, H., Zheng, A., Yu, N., Li, N., 2017. Determination of quantitative retention-activity relationships between pharmacokinetic parameters and biological effectiveness fingerprints of *Salvia miltiorrhiza* constituents using biopartitioning and microemulsion high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1067, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.018>
- Gély, C.A., Lacroix, M.Z., Morin, M., Vayssière, C., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., 2021. Comparison of the materno-fetal transfer of fifteen structurally related bisphenol analogues using an ex vivo human placental perfusion model. *Chemosphere* 276, 130213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130213>
- Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A., 2013. Quantitative Structure–Retention Relationships as Useful Tool to Characterize Chromatographic Systems and Their Potential to Simulate Biological Processes. *Chromatographia* 76, 211–226. <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2374-6>
- Giaginis, C., Zira, A., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A., 2009. Application of quantitative structure–activity relationships for modeling drug and chemical transport across the human placenta barrier: a multivariate data analysis approach. *J. Appl. Toxicol.* 29, 724–733. <https://doi.org/10.1002/jat.1466>
- Gingrich, J., Pu, Y., Ehrhardt, R., Karthikraj, R., Kannan, K., Veiga-Lopez, A., 2019. Toxicokinetics of bisphenol A, bisphenol S, and bisphenol F in a pregnancy sheep model. *Chemosphere* 220, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.109>
- Golbraikh, A., Tropsha, A., 2000. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection 13.
- González, N., Cunha, S.C., Ferreira, R., Fernandes, J.O., Marquès, M., Nadal, M., Domingo, J.L., 2020. Concentrations of nine bisphenol analogues in food purchased from Catalonia (Spain): Comparison of canned and non-canned foodstuffs. *Food and Chemical Toxicology* 136, 110992. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110992>
- Gramatica, P., 2007. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR Comb. Sci.* 26, 694–701. <https://doi.org/10.1002/qsar.200610151>
- Gramatica, P., Sangion, A., 2016. A Historical Excursus on the Statistical Validation Parameters for QSAR Models: A Clarification Concerning Metrics and Terminology. *J. Chem. Inf. Model.* 56, 1127–1131. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00088>
- Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Gauderat, G., Mila, H., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2018. Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. *Environment International* 120, 584–592. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019>
- Grandin, F.C., Lacroix, M.Z., Gayrard, V., Viguié, C., Mila, H., de Place, A., Vayssière, C., Morin, M., Corbett, J., Gayrard, C., Gely, C.A., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N., 2019. Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure? Placental transfer across

- the perfused human placenta. *Chemosphere* 221, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.065>
- Günther, F., Fritsch, S., 2010. neuralnet: Training of Neural Networks. *The R Journal* 2, 30. <https://doi.org/10.32614/RJ-2010-006>
- Hewitt, M., Madden, J.C., Rowe, P.H., Cronin, M.T.D., 2007. Structure-based modelling in reproductive toxicology: (Q)SARs for the placental barrier. *SAR and QSAR in Environmental Research* 18, 57–76. <https://doi.org/10.1080/10629360601053893>
- Jevrić, Lidija R., Podunavac-Kuzmanović, S.O., Švarc-Gajić, J.V., Kovačević, S.Z., Jovanović, B.Ž., 2014. RP-HPTLC Retention Data in Correlation with the In-silico ADME Properties of a Series of s-triazine Derivatives 10.
- Jevrić, Lidija R., Podunavac-Kuzmanović, S.O., Švarc-Gajić, J.V., Kovačević, S.Z., Jovanović, B.Ž., 2014. RP-HPTLC Retention Data in Correlation with the In-silico ADME Properties of a Series of s-triazine Derivatives. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 13, 1203.
- Kaliszan, R., 2007. QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships. *Chem. Rev.* 107, 3212–3246. <https://doi.org/10.1021/cr068412z>
- Kaliszan, R., 1993. Quantitative structure-retention relationships applied to reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 656, 417–435. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80812-M](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80812-M)
- Karrer, C., Andreassen, M., von Goetz, N., Sonnet, F., Sakhi, A.K., Hungerbühler, K., Dirven, H., Husøy, T., 2020. The EuroMix human biomonitoring study: Source-to-dose modeling of cumulative and aggregate exposure for the bisphenols BPA, BPS, and BPF and comparison with measured urinary levels. *Environment International* 136, 105397. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105397>
- Koba, M., Bączek, T., Marszał, M.P., 2012. Importance of retention data from affinity and reverse-phase high-performance liquid chromatography on antitumor activity prediction of imidazoacridinones using QSAR strategy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 64–65, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.010>
- Lafossas, C., Benoit-Marquié, F., Garrigues, J.C., 2019. Analysis of the retention of tetracyclines on reversed-phase columns: Chemometrics, design of experiments and quantitative structure-property relationship (QSPR) study for interpretation and optimization. *Talanta* 198, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.051>
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.-M., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Zalko, D., Brion, F., 2017. In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.009>
- Le Mapihan, K., Vial, J., Jardy, A., 2007. Reversed-phase liquid chromatography column testing and classification: Physicochemical interpretation based on a wide set of stationary phases. *Journal of Chromatography A* 1144, 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.034>
- Lesellier, E., West, C., 2018. Spider diagram: A universal and versatile approach for system comparison and classification. Part 2: Stationary phase properties. *Journal of Chromatography A* 1574, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.004>
- Liao, C., Kannan, K., 2014. A Survey of Alkylphenols, Bisphenols, and Triclosan in Personal Care Products from China and the United States. *Arch Environ Contam Toxicol* 67, 50–59. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0016-8>
- Liao, C., Kannan, K., 2013. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4655–4662. <https://doi.org/10.1021/jf400445n>
- Miyabe, K., Guiochon, G., 2003. Measurement of the parameters of the mass transfer kinetics in high performance liquid chromatography. *J. Sep. Science* 26, 155–173. <https://doi.org/10.1002/jssc.200390024>
- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2017. Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12796–12805. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>
- Nawrocki, J., 1997. The silanol group and its role in liquid chromatography. *J.Chromatogr. A* 779, 29–71.
- Pacifici, G.M., Nottoli, R., 1995. Placental Transfer of Drugs Administered to the Mother: Clinical Pharmacokinetics 28, 235–269. <https://doi.org/10.2165/00003088-199528030-00005>
- Pelch, K., Wignall, J.A., Goldstone, A.E., Ross, P.K., Blain, R.B., Shapiro, A.J., Holmgren, S.D., Hsieh, J.-H., Svoboda, D., Auerbach, S.S., Parham, F.M., Masten, S.A., Walker, V., Rooney, A.,

- Thayer, K.A., 2019. A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology* 424, 152235. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.06.006>
- Perisic-Janjic, N., Kaliszsan, R., Wiczling, P., Milosevic, N., Uscumlic, G., Banjac, N., 2011. Reversed-Phase TLC and HPLC Retention Data in Correlation Studies with in Silico Molecular Descriptors and Druglikeness Properties of Newly Synthesized Anticonvulsant Succinimide Derivatives. *Mol. Pharmaceutics* 8, 555–563. <https://doi.org/10.1021/mp100373d>
- Quinones-Torrel, C., Sagrado, S., Villanueva-Camanas, R.M., Medina-Hernandez, M.J., 2002. Opioid analgetics retention–pharmacologic activity models using biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr. B* 13.
- Ravisankar, P., Anusha, S., Supriya, K., Kumar, U.A., 2020. *Fundamental Chromatographic Parameters* 6.
- Restek, 2013. Colonne « core-shell » Raptor™ Biphenyl [WWW Document]. URL https://mz-at.de/fileadmin/user_upload/Brochures/restek-gnbr1891-unv.pdf (accessed 9.2.21).
- Rocha, B.A., da Costa, B.R.B., de Albuquerque, N.C.P., de Oliveira, A.R.M., Souza, J.M.O., Al-Tameemi, M., Campiglia, A.D., Barbosa Jr., F., 2016. A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 154, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.098>
- Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B.M., Wedebye, E.B., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., 2014. Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives? *Toxicological Sciences* 139, 35–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu030>
- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Hayashi, K., 2018. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicological Sciences* 163, 620–631. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy061>
- Siracusa, J.S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., Yu, X., 2018. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reproductive Toxicology* 79, 96–123. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005>
- Stefan Fritsch [aut], Frauke Guenther [aut], Marvin N. Wright [aut, cre], Marc Suling [ctb], Sebastian M. Mueller [ctb], 2019. Package 'neuralnet'.pdf.
- Syme, M.R., Paxton, J.W., Keelan, J.A., 2004. Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta: *Clinical Pharmacokinetics* 43, 487–514. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443080-00001>
- Todeschini, R., Consonni, V., 2000. *Handbook of Molecular Descriptors, 1st ed, Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527613106>
- Tropsha, A., 2010. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inf.* 29, 476–488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>
- Tucker, D.K., Hayes Bouknight, S., Brar, S.S., Kissling, G.E., Fenton, S.E., 2018. Evaluation of Prenatal Exposure to Bisphenol Analogues on Development and Long-Term Health of the Mammary Gland in Female Mice. *Environ Health Perspect* 126, 087003. <https://doi.org/10.1289/EHP3189>
- Waters, 2015. ACQUITY_UPLC_ 2012 720001140en [WWW Document]. URL <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001140en.pdf> (accessed 9.2.21).
- Waters Corporation, 2002. *Empower System Suitability Quick Reference Guide* 45.
- Wenlock, M.C., Carlsson, L.A., 2015. How Experimental Errors Influence Drug Metabolism and Pharmacokinetic QSAR/QSPR Models. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 125–134. <https://doi.org/10.1021/ci500535s>
- Yang, M., Fazio, S., Munch, D., Drumm, P., 2005. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column. *Journal of Chromatography A* 1097, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.028>
- Zhang, H., Quan, Q., Zhang, M., Zhang, N., Zhang, W., Zhan, M., Xu, W., Lu, L., Fan, J., Wang, Q., 2020. Occurrence of bisphenol A and its alternatives in paired urine and indoor dust from Chinese university students: Implications for human exposure. *Chemosphere* 247, 125987. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125987>
- Zhang, Y.-H., Xia, Z.-N., Yan, L., Liu, S.-S., 2015. Prediction of Placental Barrier Permeability: A Model Based on Partial Least Squares Variable Selection Procedure. *Molecules* 20, 8270–8286. <https://doi.org/10.3390/molecules20058270>
- Zhou, X., Kramer, J.P., Calafat, A.M., Ye, X., 2014. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine. *Journal of Chromatography B* 944, 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.009>

4.3. Conclusion

Les performances des modèles QSAR développés en utilisant les descripteurs moléculaires classiques associés ou non avec les descripteurs chromatographiques, ont été évaluées et comparées.

Pour caractériser le comportement chromatographique des bisphénols, les paramètres de rétention et de forme de pic ont été étudiés sur 13 colonnes analytiques présentant une diversité de phases stationnaires avec un gradient d'élution générique utilisé avec deux solvants organiques différents en tant que phase mobile. Ces paramètres ont permis de construire une base de données chromatographiques constituée de 104 descripteurs associés à 50 descripteurs moléculaires déterminés à partir du logiciel Chem 3D Ultra (V17.1, Perkin Elmer informatics) et de l'application MOPAC. Les indices de clairance ont été modélisés à partir de cette base de données en utilisant la régression multilinéaire. Chaque modèle obtenu a été soumis aux différentes étapes de validation : qualité de la régression, validation croisée de type LOO (leave-one-out) et LMO (leave-many-out). Pour cela, le jeu de données des 15 bisphénols étudiés a été utilisé dans sa totalité pour construire les différents modèles puis divisés des groupes de jeux de données (apprentissage et test) pour les étapes de validation LMO.

Le modèle utilisant seulement les données moléculaires permet une bonne classification des bisphénols en fonction de leur indice de clairance mais sa capacité à prédire le passage placentaire n'est pas suffisante pour être validée selon les critères d'évaluation requis. L'ajout des descripteurs chromatographiques aux descripteurs moléculaires ne permet pas d'améliorer les capacités prédictives du modèle. En revanche, l'usage des descripteurs chromatographiques seuls permet d'obtenir un modèle capable de prédire les indices de clairance et répondant aux critères de validation requis. Cependant, ces descripteurs chromatographiques résultants de plusieurs interactions rendent difficile l'interprétation des mécanismes biologiques impliqués dans ces différences de transfert placentaire. De plus, le nombre limité de bisphénols (15) utilisés dans le modèle ne permet pas la validation complète de celui-ci. Un jeu de données supplémentaire faisant intervenir de nouveaux bisphénols serait nécessaire pour réaliser la validation externe de ce modèle.

Cette étude expérimentale est une preuve de concept démontrant l'intérêt d'utiliser de nouveaux types de descripteurs, caractérisant le comportement des substances dans la biophase, dans le développement des modèles QSAR.

Discussion générale & perspectives

Le bisphénol A est un contaminant alimentaire qui, à la suite de nombreuses études et évaluations scientifiques, a été interdit dans certains produits de consommation (emballages alimentaires, notamment) et dans plusieurs pays en raison de ses effets perturbateurs endocriniens. Plusieurs bisphénols de structures analogues ont été développés comme alternatives à l'utilisation du BPA. Cependant, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que leur potentiel perturbateur endocrinien était similaire à celui du BPA [16], [27], [28], [30]–[32], [265]. Par conséquent, les agences réglementaires ont alerté sur l'usage de ces substituts et ont conclu que des études toxicologiques supplémentaires étaient nécessaires pour caractériser leurs effets mais également leur disposition dans l'organisme, et ainsi évaluer les risques liés à l'exposition à ces bisphénols émergents et éviter le risque de substitution regrettable [47], [256]. Cependant, à l'exception du BPS, il existe actuellement peu de données TK sur ces bisphénols émergents.

Les travaux exposés dans ce manuscrit avaient pour objectif d'évaluer l'exposition à plusieurs bisphénols analogues du BPA, notamment pendant la période prénatale en raison du danger que représentent les perturbateurs endocriniens pendant cette phase critique du développement. Le second objectif était de développer, en utilisant des approches QSAR, un outil permettant de prédire les paramètres TK clés déterminant l'exposition de ces analogues structuraux à partir de leurs propriétés moléculaires et chromatographiques.

- **Caractérisation de l'exposition foetale**

L'exposition prénatale aux bisphénols analogues du BPA a été caractérisée au travers : (1) de l'évaluation des concentrations de formes glucurono-conjuguées de BPA, BPS et BPF dans le sang de cordon ombilical grâce au développement d'une nouvelle méthode de dosage des métabolites de ces bisphénols et (2) de l'estimation *ex vivo* et *in vivo* des paramètres TK déterminant l'exposition humaine et prénatale.

Pour réaliser ces investigations, des méthodes bioanalytiques ont été développées et adaptées pour répondre, soit aux exigences de l'analyse de contaminants à l'état de traces, soit aux critères recommandés pour la caractérisation des paramètres TK. En effet, la quantification des concentrations plasmatiques dans des études de biosurveillance nécessite le développement de méthodes de dosage très sensibles, avec des limites de quantification inférieures au ng/mL (Chapitre 1, partie 2, études de biosurveillance). Par conséquent, pour évaluer l'exposition prénatale aux bisphénols, nous avons mis au point une méthode de quantification originale, en ciblant les métabolites glucuronoconjugués des bisphénols (BPAG, BPSG, BPFPG) dans le sang de cordon ombilical (article 1). En effet, les

Discussion générale & perspectives

études précédemment effectuées au laboratoire ont montré que les bisphénol-glucuronides sont des marqueurs pertinents de l'exposition foetale aux BPs pendant toute la durée de la gestation [144]. De plus, le dosage direct de ces métabolites permet de s'affranchir des contaminations éventuelles liées à l'utilisation de dispositifs en plastique et qui sont difficiles à contrôler lors de la collecte des échantillons, de leur préparation et de leurs analyses. Cependant, ces composés sont plus difficiles à extraire que leurs molécules parentes et ont nécessité des étapes d'extraction et de dérivatisation supplémentaires afin d'atteindre une limite de détection suffisamment basse pour évaluer l'exposition humaine aux bisphénols. Ainsi, notre méthode de dosage a permis de mettre en évidence une exposition foetale au BPA et BPS, au travers des concentrations en BPAG et BPSG, alors que le métabolite du BPF n'a pas été détecté dans les échantillons. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- 1) La méthode de dosage, malgré une limite de détection de 0,05 ng/mL, n'est pas assez sensible pour détecter le BPF dans le sang de cordon ombilical.
- 2) L'exposition externe et/ou interne au BPF de la mère est plus faible que celle du BPA et du BPS.
- 3) Le passage placentaire du BPF est plus faible que celui du BPA ou du BPS. Toutefois, cette hypothèse est peu probable car l'étude menée *ex vivo* sur le modèle de placenta humain perfusé a montré que le transfert materno-foetal du BPF était similaire à celui du BPA [264].
- 4) Le métabolite glucuronide ne constitue pas un biomarqueur d'exposition pertinent pour le BPF, en raison de différences de voies métaboliques. En effet, chez la souris, le BPF est majoritairement métabolisé en bisphénol sulfate [73]. Dans ce cas, la méthode de dosage pourrait être étendue aux métabolites sulfoconjugués des bisphénols, en particulier pour le BPF.

Les deux premières hypothèses restent cependant les plus probables. En effet, le taux de détection du BPF dans les urines ainsi que ses concentrations sont globalement plus faibles que ceux du BPA et du BPS (cf. étude bibliographique, tableau 3). Des données de concentrations maternelles en BPF sur une cohorte plus importante et l'évaluation du rapport entre les concentrations maternelles et celles du sang de cordon, sur les couples mères-enfant, sont nécessaires pour déterminer l'exposition humaine au BPF et les déterminants de l'exposition foetale.

La caractérisation des paramètres TK des bisphénols, nécessite des prélèvements sériés de plusieurs centaines d'échantillons biologiques. En effet, ces paramètres TK sont estimés à partir de la modélisation mathématique du décours temporel des concentrations

Discussion générale & perspectives

plasmatiques. Il est donc primordial de quantifier ces valeurs avec exactitude et de façon homogène au cours des analyses et du temps. Ces exigences méthodologiques sont différentes de celles requises pour l'analyse de traces. Les méthodes développées pour les études TK doivent être applicables sur une large gamme de concentrations (étendue de 2 à 4 log), être rapides et le plus simples possible en raison du grand nombre d'échantillons à doser (entre 500 et 1000 échantillons). La limite de quantification n'est pas nécessairement basse, elle dépend du choix de la dose administrée, mais doit permettre de suivre la pente terminale d'élimination. Ainsi, les études TK menées au laboratoire ont conduit à développer et valider quatre méthodes de dosage de 12 à 15 bisphénols dans le milieu de perfusion placentaire, le plasma et les urines de porcs en utilisant l'UHPLC couplée à la détection UV ou à la spectrométrie de masse en fonction des limites de quantification.

Chacune de ces méthodes a été décrite dans les articles où leur contribution était déterminante pour estimer le passage placentaire (article 2) et les paramètres TK (article 3) caractérisant l'exposition aux bisphénols.

Dans l'article 2, le passage placentaire de 15 bisphénols dans la direction materno-fœtale a été évalué grâce à un modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé. Ces résultats ont mis en évidence que pour 7 bisphénols le transfert placentaire se fait par diffusion passive. Le passage placentaire est plus limité pour 8 autres bisphénols et pourrait impliquer des transporteurs actifs. Ainsi, ces données ont montré que, malgré les analogies structurales, il n'est pas possible de prédire le passage placentaire d'un bisphénol en prenant en compte seulement ses propriétés physico-chimiques. En effet, le passage placentaire du BPS et du BPFL est très limité (taux de transfert inférieur à 3%) (figure 18), alors même que leurs propriétés physico-chimiques sont différentes (logP de 2,15 pour le BPS et de 5,59 pour le BPFL). Pour mieux comprendre les déterminants de l'exposition fœtale, ces résultats pourraient être complétés par :

- 1) L'identification des transporteurs d'efflux qui pourraient limiter le passage placentaire de certains bisphénols.
- 2) L'évaluation du passage foeto-maternel de ces bisphénols, et le transfert bidirectionnel de leurs métabolites.
- 3) L'évaluation des déterminants toxicocinétiques non placentaires, comme le métabolisme maternel et fœtal sur un modèle intégratif.
- 4) L'évaluation de la liaison aux protéines plasmatiques, qui peut limiter le passage placentaire.

Plusieurs transporteurs ATP-dépendant, dont les protéines multirésistantes et les protéines OAT (Organic Anion Transporter), principalement exprimés dans le syncytiotrophoblaste,

Discussion générale & perspectives

sont impliqués dans l'efflux d'une grande variété de xénobiotiques et donc dans la protection du fœtus [266]. Ainsi, le BPA est un substrat de la glycoprotéine P (P-gp), des Multidrug Resistance-associated Proteins 3 (MRP3) et des Breast Cancer Resistant Proteins (BCRP) présentes au niveau du syncytiotrophoblaste placentaire [266]–[269]. Des études sont nécessaires pour évaluer le rôle de ces transporteurs dans l'efflux des bisphénols présentant un faible passage placentaire et déterminer si les caractéristiques structurales de ces analogues pourraient expliquer leur liaison aux transporteurs et donc les différences de passage placentaire. Pour le BPS, dont le passage placentaire est très limité, des études antérieures sur le modèle de placenta humain perfusé, ont montré que la P-gp n'est pas impliquée dans son transfert materno-fœtal [99]. Toutefois, cette glycoprotéine est une protéine d'efflux des substances hydrophobes et cationiques [266], ce qui ne correspond pas aux propriétés physico-chimiques du BPS ($pK_a=8,4$) qui, au pH physiologique ($pH=7,4$), est à la fois présent sous sa forme neutre et anionique. Pour ce bisphénol, l'étude du rôle des polypeptides de transport d'anions organiques (OATP) serait plus pertinente.

Le modèle *ex vivo* de cotylédon perfusé présente l'avantage de pouvoir quantifier le transfert placentaire sur une durée suffisante pour atteindre l'équilibre. Cependant, ce modèle, contrairement à des modèles *in vivo*, n'intègre pas les facteurs toxicocinétiques non placentaires qui déterminent l'exposition du fœtus, tels que le métabolisme maternel et fœtal. En effet, sur le modèle de brebis gravide, des études réalisées au laboratoire, ont montré que malgré un transfert materno-fœtal du BPS dix fois plus faible que celui du BPA, la persistance du BPS dans le compartiment fœtal a conduit à une exposition foetale au BPS similaire à celle du BPA pour une exposition gestationnelle chronique (figure 9, [138], [141], [144]). L'accumulation du BPS dans le compartiment fœtal est liée à un métabolisme fœtal plus faible du BPS comparativement au BPA et au passage foeto-maternel du BPS plus limité. En outre, l'élimination du BPSG du compartiment fœtal nécessite comme pour le BPAG sa réactivation en molécule parente, en raison de son incapacité à franchir la barrière placentaire [141].

Le fœtus est exposé aux bisphénols via sa mère. Il est donc essentiel de documenter les paramètres TK (clairance, biodisponibilité, ...) déterminant l'exposition maternelle interne. Dans une étude comparative de la TK du BPA et du BPS, réalisée au laboratoire sur un modèle porcin, dont les fonctions gastro-intestinales sont similaires à celles de l'Homme, nous avons montré que la quantité de BPS ingérée qui atteint la circulation sanguine générale est environ 100 fois supérieure à celle du BPA. En outre, l'élimination du BPS est plus lente que celle du BPA (environ 3,5 fois inférieure), ce qui conduit à des concentrations de BPS dans le sang environ 250 fois supérieures à celles du BPA [32]. Ces résultats suggèrent que le remplacement du BPA par le BPS pourrait conduire à augmenter l'exposition de l'Homme à un perturbateur endocrinien potentiel. Ils démontrent l'intérêt de

Discussion générale & perspectives

prendre en compte les paramètres TK de chaque analogue de bisphénol dans le processus d'analyse du risque pour la santé humaine lié à la substitution du BPA. C'est la raison pour laquelle nous avons mené une étude *in vivo* sur le modèle porcin pour comparer les paramètres TK de 12 bisphénols administrés en mélange par voie orale et par voie intraveineuse (article 3). Les clairances plasmatiques sont relativement homogènes, entre 40 et 60 mL/min/kg pour l'ensemble des bisphénols, sauf pour le BPS ($Cl_{BPS}=20$ mL/min/kg), le BPAF, le BP44 et le BPZ (Cl de l'ordre de 80 mL/min/kg). Nous avons montré une forte variabilité de la biodisponibilité par voie orale des bisphénols, de 0,9% pour le BPA à 60% pour le BPS, ce qui signifie que, suivant les substituts, la quantité de bisphénol parent qui atteint la circulation générale peut varier d'un facteur d'environ 150 (figure 18). La liaison aux protéines plasmatiques est un facteur important qui influence le volume de distribution [270] et la clairance hépatique [271]. Une étude est actuellement en cours pour évaluer la liaison aux protéines plasmatiques des 15 bisphénols par une méthode de dialyse à l'équilibre et la relation entre le pourcentage de BP non lié aux protéines plasmatiques et les paramètres TK ou le taux de transfert placentaire.

L'ensemble de ces études ont utilisé une approche en mélange dite « cocktail ». Travailler sur des mélanges nécessite des étapes de validation afin de s'assurer que le mélange ne modifie pas les paramètres TK d'une molécule par rapport à une administration seule. Les études TK antérieures réalisées au laboratoire sur le BPA et le BPS, en administration unique, ont permis la validation de cette approche cocktail. Elle présente de nombreux avantages car elle permet de réduire les coûts en gagnant du temps sur la réalisation des protocoles expérimentaux relativement chronophages et difficiles à mettre en œuvre et répond en terme d'éthique animale à la règle des 3R (Réduire, Remplacer et Raffiner), en limitant le nombre d'animaux utilisés dans nos études *in vivo*.

Les données TK obtenues sur le modèle de porcelet (en considérant qu'elles sont proches de celles de l'Homme), associées au transfert placentaire materno-fœtal, permettent d'estimer la fraction de la dose de bisphénol qui entre dans le compartiment fœtal après une exposition maternelle par voie orale (figure 18). Ainsi, cette estimation indique que, par comparaison au BPA, pour une même dose d'exposition, la dose entrant dans le compartiment fœtal est supérieure à celle du BPA pour tous les bisphénols, excepté pour le BPZ, pour lequel la dose entrant dans le compartiment fœtal est équivalente à celle du BPA. Un faible taux d'entrée dans le compartiment fœtal est lié soit à une biodisponibilité par voie orale très faible comme pour le BPA (<1%) ou à un taux de transfert placentaire très faible (<2,5%), pour le BPFL et le BPS. La dose maternelle atteignant le compartiment fœtal est relativement faible (proche de celle du BPA, facteur de 0,9 à 2,3) pour le BPFL, le BPZ, le 3-3BPA, le BPB et le BPAF, alors qu'elle est plus importante pour d'autres bisphénols tels que

Discussion générale & perspectives

le BPS, BPP, BP4-4 et BPF (environ 7-14 fois plus important que le BPA). Toutefois, pour évaluer quels bisphénols pourraient être utilisés comme alternative au BPA, par rapport à leur potentiel d'exposition fœtale, il est nécessaire d'évaluer le métabolisme foeto-placentaire et le transfert placentaire bidirectionnel des BP et de leurs métabolites.

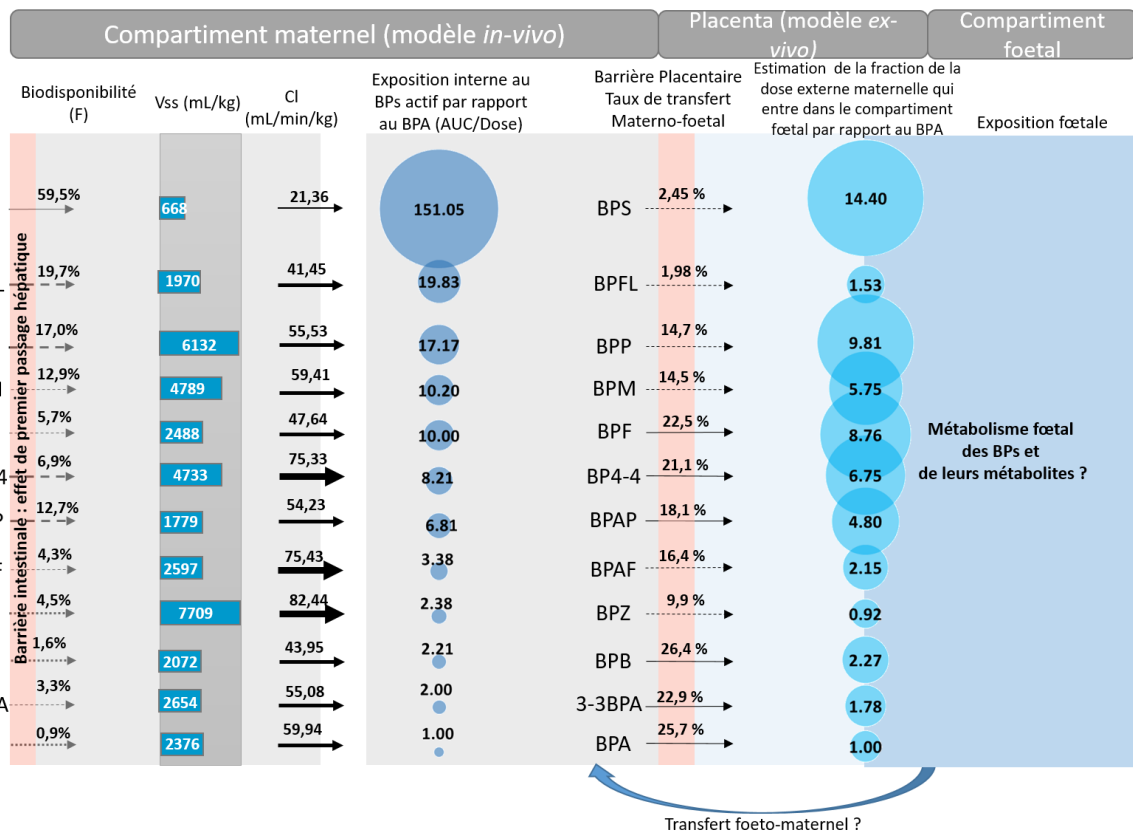


Figure 18 : Comparaison pour les 12 BP étudiés, des mécanismes TK déterminant l'exposition maternelle : biodisponibilité par voie orale, clairance plasmatique et volume de distribution, évalués sur un modèle porcine et du taux de transfert placentaire materno-foetal évalué sur un modèle de placenta humain perfusé. Ces données TK ont permis d'estimer la fraction de la dose externe maternelle qui entre dans le compartiment fœtal, exprimée par rapport à celui du BPA.

Note : A partir des profils TK, nous avons déterminé le rapport $AUC_{\text{voie orale}} / \text{Dose}$, qui est proportionnel à l'exposition interne maternelle au bisphénol parent après une administration par voie orale, et nous l'avons rapporté à celui du BPA pour comparer le potentiel d'exposition maternelle entre les bisphénols. La taille des cercles en bleu foncé est proportionnelle au rapport $(AUC_{\text{voie orale}} / \text{Dose})_{\text{BPs}} / (AUC_{\text{voie orale}} / \text{Dose})_{\text{BPA}}$. Nous avons ensuite estimé pour chaque bisphénol et pour une même dose administrée par voie orale, la fraction de la dose externe maternelle qui entre dans la circulation fœtale par rapport à celle du BPA. Cette dernière a été estimée par le produit entre le taux de transfert placentaire et le rapport $AUC_{\text{voie orale}} / \text{Dose}$ pour chaque bisphénol rapporté à celui du BPA, en considérant que les métabolites conjugués ne passent pas la barrière placentaire. La taille des cercles bleus clairs est proportionnelle à ce rapport. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'exposition fœtale car, différents mécanismes n'ont pas été évalués, comme le passage placentaire des principaux métabolites, le métabolisme foeto-placentaire des BPs parents et leur élimination du compartiment fœtal.

Par ailleurs, l'évaluation du risque lié aux perturbateurs endocriniens nécessite la prise en compte à la fois du potentiel d'exposition et des effets (danger). Nos données TK sont capitales pour construire des modèles PBPK (Physiologically based pharmacokinetic) [54], et extrapoler les effets des bisphénols observés dans des études toxicologiques *in vitro* ou *in vivo* [27], [31] à l'Homme, en prenant en considération l'exposition interne [54].

Discussion générale & perspectives

En conclusion, nous avons démontré que malgré les similitudes structurales des bisphénols, les propriétés TK déterminant l'exposition interne aux bisphénols ne pouvaient pas être prédites par leurs propriétés physico-chimiques, telles que la masse molaire, le pKa ou la lipophilie. Des études sur des modèles *ex vivo* et *in vivo*, bien qu'indispensables pour évaluer les mécanismes déterminant l'exposition foetale, sont coûteuses et chronophages et ne peuvent pas être réalisées pour cribler tous les substituts du bisphénol A utilisés dans les produits de consommation. En outre, dans le contexte sociétal et réglementaire actuel, de restriction du recours à l'expérimentation animale (3R, [272]), il est urgent de développer des modèles prédictifs du potentiel d'exposition à ces bisphénols émergents. Dans ce cadre, et à titre de démonstration de preuve de concept, nous avons développé une méthode permettant de prédire le passage placentaire des bisphénols en utilisant des approches QSAR.

- **Prédiction de l'exposition par une approche QSAR**

Les modèles QSAR sont utilisés classiquement pour établir une relation entre les propriétés moléculaires d'un ensemble de substances et leurs activités. Cependant, ces propriétés moléculaires présentent un certain nombre de limites : elles ne rendent pas compte des interactions de la molécule avec l'environnement et certains paramètres sont difficiles à prédire pour les molécules complexes ou comportant des hétéroatomes. Pour établir la preuve de concept selon laquelle les paramètres chromatographiques pourraient constituer de bons descripteurs pour prédire les propriétés TK des bisphénols, nous avons développé des modèles QSAR utilisant comme paramètres d'entrée soit des descripteurs moléculaires, soit des descripteurs chromatographiques soit la combinaison des deux pour prédire le passage placentaire au travers des indices de clairance placentaires déterminés dans l'article 2 et utilisés comme données de sortie. Une base de données constituée de descripteurs moléculaires et de plusieurs paramètres chromatographiques (rétention et forme de pic) a été construite pour les 15 bisphénols. Le jeu de données chromatographiques a été constitué à partir de l'élution des bisphénols sur plusieurs colonnes analytiques et avec deux gradients génériques. Le modèle QSAR original, fondé sur les paramètres chromatographiques présente de meilleures capacités prédictives que le modèle utilisant les descripteurs moléculaires. L'ajout des descripteurs chromatographiques aux descripteurs moléculaires n'a pas amélioré les capacités prédictives du modèle.

Lors de la construction du modèle fondé sur les descripteurs moléculaires, les paramètres thermodynamiques et de lipophilie ont eu le plus d'impact pour prédire le passage placentaire. Contrairement à nos attentes, les descripteurs chromatographiques qui ont le plus de poids dans le modèle sont des paramètres de forme de pic, caractérisant plutôt

Discussion générale & perspectives

l'aspect thermodynamique des interactions entre le soluté et les phases stationnaires et mobiles et non des paramètres de rétention qui dépendent majoritairement du caractère lipophile de la molécule d'intérêt. Ces résultats indiquent que les propriétés thermodynamiques des bisphénols sont des déterminants importants de leur transfert placentaire, comme cela a déjà observé pour d'autres substances, dans des études QSAR [221].

Le modèle QSAR ainsi développé est robuste, selon les critères de validations croisées LOO et LMO (leave-one-out et leave-many-out). Cependant, des validations supplémentaires incluant des bisphénols non utilisés pour construire le modèle sont indispensables pour garantir son caractère prédictif. Elles nécessitent l'évaluation du passage placentaire d'autres bisphénols.

La construction et la validation du modèle QSAR fondé sur les données chromatographiques constitue une preuve de concept de l'intérêt de l'utilisation des paramètres chromatographiques autres que la rétention pour prédire le passage placentaire. Cependant, ces descripteurs sont la résultante de mécanismes de rétention complexes, ce qui ne permet pas de comprendre la relation entre les caractéristiques moléculaires et le taux passage placentaire. Une étude de type relation structure-rétention (QSRR) permettrait de comprendre les interactions des 15 bisphénols mises en jeu pour chaque descripteur chromatographique et donc de mieux comprendre les interactions moléculaires déterminant le passage placentaire des bisphénols. Cette étude QSRR est actuellement en cours, en collaboration avec le laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et Réactivités Chimiques et Physico-chimiques, UMR5623 CNRS/UPS). Par ailleurs, pour approfondir la relation entre le comportement chromatographique des bisphénols et leur transfert placentaire, les paramètres de forme de pic (asymétrie, largeur à mi-hauteur, ...), caractérisés dans notre modèle avec le gradient d'élution, pourraient être optimisés en les déterminant avec une élution isocratique. En effet, lors de l'élution en gradient, la viscosité de la phase mobile est modifiée au cours du temps, ce qui entraîne des différences de transfert de masse et influence la largeur des pics chromatographiques [273]–[276]. En revanche, la détermination des paramètres de rétention avec une élution isocratique impliquerait une forte corrélation entre la forme des pics chromatographiques et le temps de rétention de l'analyte [277]. Idéalement, il serait pertinent d'évaluer la forme des pics avec une élution isocratique et les facteurs de rétention avec une élution en gradient. Une autre piste d'amélioration de notre modèle serait d'ajouter des paramètres de rétention déterminés avec des phases stationnaires mimant un système biologique comme des colonnes de membranes artificielles immobilisées ou d'affinité avec une phase stationnaire contenant des

Discussion générale & perspectives

protéines plasmatiques par exemple [278]. Ces outils ont déjà fait leurs preuves dans la prédiction de propriétés ADME [213], [236], [237], [239].

Dans la continuité de cette thèse, ces jeux de données chromatographiques pourraient être appliqués à la prédiction d'autres paramètres toxicocinétiques comme le volume de distribution, la clairance ou la liaison aux protéines plasmatiques des bisphénols. Ces modèles QSAR, fondés sur les descripteurs chromatographiques pourraient également être appliqués à d'autres familles de contaminants alimentaires comme les acides perfluorés, une famille comprenant de nombreuses substances, avec des comportements cinétiques très différents [279], [280].

En conclusion, l'ensemble de ces travaux de thèse ont permis d'évaluer les paramètres TK de 12 à 15 bisphénols et de mieux comprendre leurs mécanismes d'exposition. Pour cette famille de contaminants présentant des analogies structurales, nos travaux montrent la complexité des mécanismes d'exposition fœtale et la difficulté de prédire leur potentiel d'exposition à partir des seules propriétés moléculaires. Parmi tous les bisphénols étudiés, le BPS, principal remplaçant du BPA, présente le potentiel d'exposition interne humaine le plus élevé, 150 fois supérieur à celui du BPA. Il est essentiel de développer des modèles prédictifs de l'exposition humaine à cette famille de contaminants émergents. Ainsi, le modèle QSAR que nous avons développé et validé montre l'intérêt de l'utilisation des descripteurs chromatographiques pour prédire des mécanismes physiologiques complexes comme le passage placentaire des bisphénols. Ces données analytiques pourraient être utilisées afin d'affiner la construction d'autres modèles QSAR pour prédire le potentiel toxicologique d'autres familles de contaminants.

Pour les agences d'évaluation des contaminants chimiques, ces données sont essentielles pour interpréter les données toxicologiques obtenues sur des modèles *in vitro* ou *in vivo*, et les extrapoler à l'Homme et ainsi évaluer le risque lié à l'exposition humaine à cette famille de bisphénols émergents. Ils permettent également de cribler les substituts du BPA et de sélectionner ceux qui présentent le plus faible potentiel d'exposition.

Références

- [1] Nora Benachour, Emilie Clair, Robin Mesnage, et Gilles-Eric Séralini, « Endocrine Disruptors: New Discoveries and Possible Progress of Evaluation », in *Advances in medicine and biology*, vol. 29, Nova Science, 2011.
- [2] Anses, « Travaux et implication de l'Anses sur les perturbateurs endocriniens », avr. 15, 2021. <https://www.anses.fr/fr/content/travaux-et-implication-de-lanses-sur-les-perturbateurs-endocriniens> (consulté le août 30, 2021).
- [3] Guillette LJ et M. Gunderson, « Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants », *Reproduction*, p. 857-864, déc. 2001, doi: 10.1530/rep.0.1220857.
- [4] H. Patisaul, « Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior », *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 3, 2009, doi: 10.3389/neuro.08.010.2009.
- [5] Colborn, T., « Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection », vol. 21, 1992.
- [6] World Health Organization, United Nations Environment Programme, Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, Bergman, Åke, et Heindel, Jerrold J, *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: summary for decision-makers*. WHO: UNEP, 2013. Consulté le: août 30, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78102>
- [7] V. Turusov, V. Rakitsky, et L. Tomatis, « Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. », *Environmental Health Perspectives*, vol. 110, n° 2, p. 125-128, févr. 2002, doi: 10.1289/ehp.02110125.
- [8] A. Goodman, J. Schorge, et M. F. Greene, « The Long-Term Effects of In Utero Exposures — The DES Story », *N Engl J Med*, vol. 364, n° 22, p. 2083-2084, juin 2011, doi: 10.1056/NEJMp1104409.
- [9] D. Crews, E. Willingham, et J. K. Skipper, « Endocrine Disruptors: Present Issues, Future Directions », *The Quarterly Review of Biology*, vol. 75, n° 3, p. 243-260, sept. 2000, doi: 10.1086/393498.
- [10] LA COMMISSION EUROPÉENNE, « RÈGLEMENT (UE) 2018/605 DE LA COMMISSION du 19 avril 2018 modifiant l'annexe II du règlement (CE) no 1107/2009 en établissant des critères scientifiques pour la détermination des propriétés perturbant le système endocrinien », Bruxelles, avr. 19, 2018. Consulté le: août 30, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2013.3132>
- [11] ECHA, « Liste des substances extrêmement préoccupantes candidates en vue d'une autorisation ». <https://echa.europa.eu/fr/candidate-list-table/-/dislist/details/0b0236e180e22414> (consulté le août 30, 2021).
- [12] L. N. Vandenberg *et al.*, « Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses », *Endocrine Reviews*, vol. 33, n° 3, p. 378-455, juin 2012, doi: 10.1210/er.2011-1050.
- [13] S. C. Nagel, « Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. », *Environmental Health Perspectives*, vol. 105, n° 1, p. 7, 1997.
- [14] R. W. Tyl, « Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats », *Toxicological Sciences*, vol. 68, n° 1, p. 121-146, juill. 2002, doi: 10.1093/toxsci/68.1.121.
- [15] R. W. Tyl *et al.*, « Two-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD-1 (Swiss) Mice », *Toxicological Sciences*, vol. 104, n° 2, p. 362-384, août 2008, doi: 10.1093/toxsci/kfn084.
- [16] J. R. Rochester et A. L. Bolden, « Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes », *Environmental Health Perspectives*, mars 2015, doi: 10.1289/ehp.1408989.

- [17] « Search for Chemicals - ECHA ». https://echa.europa.eu/fr/search-for-chemicals?p_p_id=disssimplesearch_WAR_dissearchportlet&p_p_lifecycle=0&_disssimplesearch_WAR_dissearchportlet_searchOccurred=true&_disssimplesearch_WAR_dissearchportlet_sessionCriteriaId=disSimpleSearchSessionParam101401602581767544 (consulté le oct. 13, 2020).
- [18] C. Liao et K. Kannan, « Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, n° 19, p. 4655-4662, mai 2013, doi: 10.1021/jf400445n.
- [19] C. Liao et K. Kannan, « A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China », vol. 31, n° 2, p. 319-329, 2014, doi: 10.1080/19440049.2013.868611.
- [20] C. Liao et K. Kannan, « A Survey of Alkylphenols, Bisphenols, and Triclosan in Personal Care Products from China and the United States », *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 67, n° 1, p. 50-59, juill. 2014, doi: 10.1007/s00244-014-0016-8.
- [21] S. Lu, Y. Yu, L. Ren, X. Zhang, G. Liu, et Y. Yu, « Estimation of intake and uptake of bisphenols and triclosan from personal care products by dermal contact », *Science of The Total Environment*, vol. 621, p. 1389-1396, avr. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.088.
- [22] H. Zhang *et al.*, « Occurrence of bisphenol A and its alternatives in paired urine and indoor dust from Chinese university students: Implications for human exposure », *Chemosphere*, vol. 247, p. 125987, mai 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.125987.
- [23] C. Liao *et al.*, « Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, n° 16, p. 9138-9145, août 2012, doi: 10.1021/es302004w.
- [24] M. K. Björnsdotter, J. de Boer, et A. Ballesteros-Gómez, « Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review », *Chemosphere*, vol. 182, p. 691-706, sept. 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.070.
- [25] H. Wang, Z. Liu, J. Zhang, R.-P. Huang, H. Yin, et Z. Dang, « Human exposure of bisphenol A and its analogues: understandings from human urinary excretion data and wastewater-based epidemiology », *Environ Sci Pollut Res*, vol. 27, n° 3, p. 3247-3256, janv. 2020, doi: 10.1007/s11356-019-07111-9.
- [26] C. Gys *et al.*, « Determinants of exposure levels of bisphenols in flemish adolescents », *Environmental Research*, vol. 193, p. 110567, févr. 2021, doi: 10.1016/j.envres.2020.110567.
- [27] H. Kojima *et al.*, « Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity T via human nuclear receptors », p. 8, 2019.
- [28] M. A. Beg et I. A. Sheikh, « Endocrine disruption: Molecular interactions of environmental bisphenol contaminants with thyroid hormone receptor and thyroxine-binding globulin », *Toxicol Ind Health*, vol. 36, n° 5, p. 322-335, mai 2020, doi: 10.1177/0748233720928165.
- [29] M. Shi, N. Sekulovski, J. A. MacLean, et K. Hayashi, « Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice », *Toxicological Sciences*, vol. 163, n° 2, p. 620-631, juin 2018, doi: 10.1093/toxsci/kfy061.
- [30] J. Moreman, O. Lee, M. Trznadel, A. David, T. Kudoh, et C. R. Tyler, « Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 51, n° 21, p. 12796-12805, nov. 2017, doi: 10.1021/acs.est.7b03283.
- [31] K. Pelch *et al.*, « A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives », *Toxicology*, vol. 424, p. 152235, août 2019, doi: 10.1016/j.tox.2019.06.006.

- [32] A. K. Rosenmai *et al.*, « Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives? », *Toxicological Sciences*, vol. 139, n° 1, p. 35-47, mai 2014, doi: 10.1093/toxsci/kfu030.
- [33] J. S. Siracusa, L. Yin, E. Measel, S. Liang, et X. Yu, « Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review », *Reproductive Toxicology*, vol. 79, p. 96-123, août 2018, doi: 10.1016/j.reprotox.2018.06.005.
- [34] A. Usman et M. Ahmad, « From BPA to its analogues: Is it a safe journey? », *Chemosphere*, vol. 158, p. 131-142, sept. 2016, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.070.
- [35] S. A. Vogel, « The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A "Safety" », *Am J Public Health*, vol. 99, n° S3, p. S559-S566, nov. 2009, doi: 10.2105/AJPH.2008.159228.
- [36] A. Gouzy et J.-M. BRIGNON, « I N E R I S - Données technico- économiques sur les substances chimiques en France BISPHEENOL A », p. 77, 2010.
- [37] J. P. Myers *et al.*, « Why Public Health Agencies Cannot Depend on Good Laboratory Practices as a Criterion for Selecting Data: The Case of Bisphenol A », *Environmental Health Perspectives*, vol. 117, n° 3, p. 7, 2009.
- [38] F. S. vom Saal et C. Hughes, « An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment », *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, n° 8, p. 926-933, août 2005, doi: 10.1289/ehp.7713.
- [39] F. S. vom Saal et W. V. Welshons, « Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A », *Environmental Research*, vol. 100, n° 1, p. 50-76, janv. 2006, doi: 10.1016/j.envres.2005.09.001.
- [40] Dr. Michael D. Shelby, « NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A », n° NIH Publication No. 08 – 5994, sept. 2008.
- [41] « Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test », *EFSA Journal*, n° 2013;11(3):3132, doi: 10.2903/j.efsa.2013.3132.
- [42] « Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food », p. 89.
- [43] LE CONSEIL CONSTITUTIONNEL, « Décision n° 2015-480 QPC », juin 2015.
- [44] *RÈGLEMENT (UE) 2018/ 213 DE LA COMMISSION - du 12 février 2018 - relatif à l'utilisation du bisphénol A dans les vernis et les revêtements destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et modifiant le règlement (UE) no 10/ 2011 en ce qui concerne l'utilisation de cette substance dans les matériaux en matière plastique entrant en contact avec des denrées alimentaires.* p. 7.
- [45] *DIRECTIVE (UE) 2017/ 898 DE LA COMMISSION - du 24 mai 2017 - modifiant, aux fins de l'adoption de valeurs limites spécifiques pour les substances chimiques utilisées dans les jouets, l'annexe II, appendice C, de la directive 2009/ 48/ CE du Parlement européen et du Conseil relative à la sécurité des jouets en ce qui concerne le bisphénol A.* p. 3.
- [46] *RÈGLEMENT (UE) 2016/2235 DE LA COMMISSION du 12 décembre 2016 modifiant l'annexe XVII du règlement (CE) no 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne le bisphénol A.*
- [47] Anses, « Substances reprotoxiques et perturbateurs endocriniens Composés de la famille des bisphénols: bisphénols M, S, B, AP, AF, F et BADGE », Rapport d'expertise collective, mars 2013.
- [48] European Chemicals Agency., *Market survey: use of Bisphenol A and its alternatives in thermal paper in the EU 2014 17.* LU: Publications Office, 2018. Consulté le: mai 19, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://data.europa.eu/doi/10.2823/4071>
- [49] Ministère de la transition écologique, « La réglementation REACH », *ecologie.gouv.* https://www.ecologie.gouv.fr/reglementation-reach#scroll-nav__2

- [50] ECHA, « PROPOSAL FOR IDENTIFICATION OF A SUBSTANCE OF VERY HIGH CONCERN ON THE BASIS OF THE CRITERIA SET OUT IN REACH ARTICLE 57 », 2021.
- [51] H. Fiege *et al.*, « Phenol Derivatives », in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Éd. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000, p. a19_313. doi: 10.1002/14356007.a19_313.
- [52] D. Gramec Skledar et L. Peterlin Mašič, « Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 47, p. 182-199, oct. 2016, doi: 10.1016/j.etap.2016.09.014.
- [53] N. Bonvallot, « Interprétation de la mesure biologique de l'exposition pour la construction de « VTR internes » : le concept des équivalents de biomonitoring », p. 4, 2010.
- [54] C. Karrer, « Linking Probabilistic Exposure and Pharmacokinetic Modeling To Assess the Cumulative Risk from the Bisphenols BPA, BPS, BPF, and BPAF for Europeans », *Environ. Sci. Technol.*, p. 11, 2019.
- [55] Santé publique France, « Imprégnation de la population française par les bisphénols A, S et F. », p. 58, sept. 2019.
- [56] Y. Takao, H. C. Lee, S. Kohra, et K. Arizono, « Release of Bisphenol A from Food Can Lining upon Heating. », *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*, vol. 48, n° 4, p. 331-334, 2002, doi: 10.1248/jhs.48.331.
- [57] K. Karsauliya, M. Bhateria, A. Sonker, et S. P. Singh, « Determination of Bisphenol Analogues in Infant Formula Products from India and Evaluating the Health Risk in Infants Associated with Their Exposure », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 69, n° 13, p. 3932-3941, avr. 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.1c00129.
- [58] N. González *et al.*, « Concentrations of nine bisphenol analogues in food purchased from Catalonia (Spain): Comparison of canned and non-canned foodstuffs », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 136, p. 110992, févr. 2020, doi: 10.1016/j.fct.2019.110992.
- [59] M. K. Morgan et M. S. Clifton, « Exposure to Triclosan and Bisphenol Analogues B, F, P, S and Z in Repeated Duplicate-Diet Solid Food Samples of Adults », *Toxics*, vol. 9, n° 3, p. 47, mars 2021, doi: 10.3390/toxics9030047.
- [60] WHO Expert Meeting, « Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A », nov. 2010.
- [61] European Food Safety Authority, « Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs », *EFSA Journal*, n° 2015;13(1):3978, 2015, doi: 10.2903/j.efsa.2015.3978.
- [62] W. Wang *et al.*, « A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries », *Environment International*, vol. 83, p. 183-191, oct. 2015, doi: 10.1016/j.envint.2015.06.015.
- [63] K. A. Thayer *et al.*, « Bisphenol A, Bisphenol S, and 4-Hydroxyphenyl 4-Isopropoxyphenylsulfone (BPSIP) in Urine and Blood of Cashiers », *Environmental Health Perspectives*, vol. 124, n° 4, août 2015, doi: 10.1289/ehp.1409427.
- [64] S. Ndaw, A. Remy, D. Jargot, et A. Robert, « Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study », *Int Arch Occup Environ Health*, vol. 89, n° 6, p. 935-946, août 2016, doi: 10.1007/s00420-016-1132-8.
- [65] S. Ndaw, A. Remy, F. Denis, P. Marsan, D. Jargot, et A. Robert, « Occupational exposure of cashiers to bisphenol S via thermal paper », *Toxicology Letters*, vol. 298, p. 106-111, déc. 2018, doi: 10.1016/j.toxlet.2018.05.026.
- [66] M. Eckardt et T. J. Simat, « Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017 », *Chemosphere*, vol. 186, p. 1016-1025, nov. 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.037.
- [67] M. Eckardt, M. Kubicova, D. Tong, et T. J. Simat, « Determination of color developers replacing bisphenol A in thermal paper receipts using diode array and Corona charged aerosol detection—A German market analysis 2018/2019 », *Journal of Chromatography A*, vol. 1609, p. 460437, janv. 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460437.

- [68] K. Pivnenko, D. Laner, et T. F. Astrup, « Dynamics of bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) in the European paper cycle: Need for concern? », *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 133, p. 278-287, juin 2018, doi: 10.1016/j.resconrec.2018.01.021.
- [69] C. Liao et K. Kannan, « Widespread Occurrence of Bisphenol A in Paper and Paper Products: Implications for Human Exposure », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, n° 21, p. 9372-9379, nov. 2011, doi: 10.1021/es202507f.
- [70] W. Qu *et al.*, « Exploration of xenobiotic metabolism within cell lines used for Tox21 chemical screening », *Toxicology in Vitro*, vol. 73, p. 105109, juin 2021, doi: 10.1016/j.tiv.2021.105109.
- [71] N. Cabaton *et al.*, « Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions », *Toxicology in Vitro*, vol. 22, n° 7, p. 1697-1704, oct. 2008, doi: 10.1016/j.tiv.2008.07.004.
- [72] S. Waidyanatha *et al.*, « Disposition and metabolism of the bisphenol analogue, bisphenol S, in Harlan Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice and in vitro in hepatocytes from rats, mice, and humans », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 351, p. 32-45, juill. 2018, doi: 10.1016/j.taap.2018.05.008.
- [73] N. Cabaton, M.-C. Chagnon, J.-C. Lhuguenot, J.-P. Cravedi, et D. Zalko, « Disposition and Metabolic Profiling of Bisphenol F in Pregnant and Nonpregnant Rats », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, n° 26, p. 10307-10314, déc. 2006, doi: 10.1021/jf062250q.
- [74] D. R. Doerge, N. C. Twaddle, K. A. Woodling, et J. W. Fisher, « Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 248, n° 1, p. 1-11, oct. 2010, doi: 10.1016/j.taap.2010.07.009.
- [75] S. Waidyanatha *et al.*, « Toxicokinetics and bioavailability of bisphenol AF following oral administration in rodents: A dose, species, and sex comparison », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 373, p. 39-47, juin 2019, doi: 10.1016/j.taap.2019.04.015.
- [76] V. Gayrard *et al.*, « Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs », *Environ Health Perspect*, vol. 127, n° 7, p. 077005, juill. 2019, doi: 10.1289/EHP4599.
- [77] I. Khmiri *et al.*, « Toxicokinetics of bisphenol-S and its glucuronide in plasma and urine following oral and dermal exposure in volunteers for the interpretation of biomonitoring data », *Environment International*, vol. 138, p. 105644, mai 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.105644.
- [78] K. A. Thayer *et al.*, « Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration », *Environment International*, vol. 83, p. 107-115, oct. 2015, doi: 10.1016/j.envint.2015.06.008.
- [79] R. Huang, Z. Liu, S. Yuan, H. Yin, Z. Dang, et P. Wu, « Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis », *Environmental Pollution*, vol. 230, p. 143-152, nov. 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2017.06.026.
- [80] Y. Chen *et al.*, « Urinary bisphenol analogues and triclosan in children from south China and implications for human exposure », *Environmental Pollution*, vol. 238, p. 299-305, juill. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.03.031.
- [81] T. Pollock, S. Karthikeyan, M. Walker, K. Werry, et A. St-Amand, « Trends in environmental chemical concentrations in the Canadian population: Biomonitoring data from the Canadian Health Measures Survey 2007–2017 », *Environment International*, vol. 155, p. 106678, oct. 2021, doi: 10.1016/j.envint.2021.106678.
- [82] B. Zhang *et al.*, « Concentrations of bisphenol A and its alternatives in paired maternal–fetal urine, serum and amniotic fluid from an e-waste dismantling area in China », *Environment International*, vol. 136, p. 105407, mars 2020, doi: 10.1016/j.envint.2019.105407.
- [83] X. Ye, L.-Y. Wong, J. Kramer, X. Zhou, T. Jia, et A. M. Calafat, « Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000–2014 », *Environmental Science & Technology*, vol. 49, n° 19, p. 11834-11839, oct. 2015, doi: 10.1021/acs.est.5b02135.

- [84] I. Gyllenhammar *et al.*, « Diverging temporal trends of human exposure to bisphenols and plastizisers, such as phthalates, caused by substitution of legacy EDCs? », *Environmental Research*, vol. 153, p. 48-54, févr. 2017, doi: 10.1016/j.envres.2016.11.012.
- [85] H. Frederiksen *et al.*, « Changes in urinary excretion of phthalates, phthalate substitutes, bisphenols and other polychlorinated and phenolic substances in young Danish men; 2009–2017 », *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 223, n° 1, p. 93-105, janv. 2020, doi: 10.1016/j.ijheh.2019.10.002.
- [86] N. González, M. Marquès, S. C. Cunha, J. O. Fernandes, J. L. Domingo, et M. Nadal, « Biomonitoring of co-exposure to bisphenols by consumers of canned foodstuffs », *Environment International*, vol. 140, p. 105760, juill. 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.105760.
- [87] H. Jin, J. Zhu, Z. Chen, Y. Hong, et Z. Cai, « Occurrence and Partitioning of Bisphenol Analogues in Adults' Blood from China », *Environmental Science & Technology*, vol. 52, n° 2, p. 812-820, janv. 2018, doi: 10.1021/acs.est.7b03958.
- [88] Y. Pan *et al.*, « Occurrence and Maternal Transfer of Multiple Bisphenols, Including an Emerging Derivative with Unexpectedly High Concentrations, in the Human Maternal–Fetal–Placental Unit », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 54, n° 6, p. 3476-3486, mars 2020, doi: 10.1021/acs.est.0c00206.
- [89] Ž. Tkalec *et al.*, « Exposure of Slovenian children and adolescents to bisphenols, parabens and triclosan: Urinary levels, exposure patterns, determinants of exposure and susceptibility », *Environment International*, vol. 146, p. 106172, janv. 2021, doi: 10.1016/j.envint.2020.106172.
- [90] C. Fillol *et al.*, « Exposure of the French population to bisphenols, phthalates, parabens, glycol ethers, brominated flame retardants, and perfluorinated compounds in 2014–2016: Results from the Esteban study », *Environment International*, vol. 147, p. 106340, févr. 2021, doi: 10.1016/j.envint.2020.106340.
- [91] T. Husøy *et al.*, « The Norwegian biomonitoring study from the EU project EuroMix: Levels of phenols and phthalates in 24-hour urine samples and exposure sources from food and personal care products », *Environment International*, vol. 132, p. 105103, nov. 2019, doi: 10.1016/j.envint.2019.105103.
- [92] F. Lucarini *et al.*, « Exposure to New Emerging Bisphenols Among Young Children in Switzerland », *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, n° 13, Art. n° 13, janv. 2020, doi: 10.3390/ijerph17134793.
- [93] E. M. Philips *et al.*, « First Trimester Urinary Bisphenol and Phthalate Concentrations and Time to Pregnancy: A Population-Based Cohort Analysis », *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 103, n° 9, p. 3540-3547, sept. 2018, doi: 10.1210/jc.2018-00855.
- [94] M. Rolland *et al.*, « Exposure to phenols during pregnancy and the first year of life in a new type of couple-child cohort relying on repeated urine biospecimens », *Environment International*, vol. 139, p. 105678, juin 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.105678.
- [95] A. Derakhshan *et al.*, « Association of urinary bisphenols during pregnancy with maternal, cord blood and childhood thyroid function », *Environment International*, vol. 146, p. 106160, janv. 2021, doi: 10.1016/j.envint.2020.106160.
- [96] H.-J. Lehmler, B. Liu, M. Gadogbe, et W. Bao, « Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014 », *ACS Omega*, vol. 3, n° 6, p. 6523-6532, juin 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b00824.
- [97] D. Nakiwala *et al.*, « Use of personal care products during pregnancy in relation to urinary concentrations of select phenols: A longitudinal analysis from the SEPAGES feasibility study », *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 227, p. 113518, juin 2020, doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113518.

- [98] J. Hu *et al.*, « Associations of Trimester-Specific Exposure to Bisphenols with Size at Birth: A Chinese Prenatal Cohort Study », *Environ Health Perspect*, vol. 127, n° 10, p. 107001, oct. 2019, doi: 10.1289/EHP4664.
- [99] F. C. Grandin *et al.*, « Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure? Placental transfer across the perfused human placenta », *Chemosphere*, vol. 221, p. 471-478, avr. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.065.
- [100] T. Corbel *et al.*, « Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta », *Reproductive Toxicology*, vol. 47, p. 51-58, août 2014, doi: 10.1016/j.reprotox.2014.06.001.
- [101] J. Liu *et al.*, « Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 51, n° 4, p. 2456-2463, févr. 2017, doi: 10.1021/acs.est.6b05718.
- [102] E. S. Ihde *et al.*, « Application of a novel mass spectrometric (MS) method to examine exposure to Bisphenol-A and common substitutes in a maternal fetal cohort », *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, vol. 24, n° 2, p. 331-346, févr. 2018, doi: 10.1080/10807039.2017.1381831.
- [103] J. G. Teeguarden *et al.*, « 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A following ingestion in soup: Individual pharmacokinetic data and emographics », *Data in Brief*, vol. 4, p. 83-86, sept. 2015, doi: 10.1016/j.dib.2015.03.002.
- [104] W. Völkel, T. Colnot, G. A. Csanády, J. G. Filser, et W. Dekant, « Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration », *Chemical Research in Toxicology*, vol. 15, n° 10, p. 1281-1287, oct. 2002, doi: 10.1021/tx025548t.
- [105] J. Oh, J. W. Choi, Y.-A. Ahn, et S. Kim, « Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration », *Environment International*, vol. 112, p. 127-133, mars 2018, doi: 10.1016/j.envint.2017.11.020.
- [106] D. Zalko *et al.*, « Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. », *Environmental Health Perspectives*, vol. 111, n° 3, p. 309-319, mars 2003, doi: 10.1289/ehp.5603.
- [107] V. Ramírez, Y. Gálvez-Ontiveros, P. Porrás-Quesada, L. J. Martínez-González, A. Rivas, et M. J. Álvarez-Cubero, « Metabolic pathways, alterations in miRNAs expression and effects of genetic polymorphisms of bisphenol a analogues: A systematic review », *Environmental Research*, vol. 197, p. 111062, juin 2021, doi: 10.1016/j.envres.2021.111062.
- [108] O. Ousji et L. Sleno, « *In Vitro* Metabolism of Five Bisphenol A Analogs Studied by LC-HRMS/MS », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 32, n° 4, p. 847-859, avr. 2021, doi: 10.1021/jasms.0c00301.
- [109] S. Bruks, « Metabolism and estrogenicity of bisphenol A and its analogues », p. 36.
- [110] C. Gys, A. Kovačič, C. Huber, F. Y. Lai, E. Heath, et A. Covaci, « Suspect and untargeted screening of bisphenol S metabolites produced by *in vitro* human liver metabolism », *Toxicology Letters*, vol. 295, p. 115-123, oct. 2018, doi: 10.1016/j.toxlet.2018.05.034.
- [111] J. Schmidt, P. Kotnik, J. Trontelj, Ž. Knez, et L. P. Mašič, « Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes », *Toxicology in Vitro*, vol. 27, n° 4, p. 1267-1276, juin 2013, doi: 10.1016/j.tiv.2013.02.016.
- [112] D. Gramec Skledar, J. Troberg, J. Lavdas, L. Peterlin Mašič, et M. Finel, « Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10 », *Xenobiotica*, vol. 45, n° 6, p. 511-519, juin 2015, doi: 10.3109/00498254.2014.999140.

- [113] N. Hanioka, T. Naito, et S. Narimatsu, « Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation », *Chemosphere*, vol. 74, n° 1, p. 33-36, déc. 2008, doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.053.
- [114] H. Kurebayashi, K. Okudaira, et Y. Ohno, « Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans », *Toxicology Letters*, vol. 198, n° 2, p. 210-215, oct. 2010, doi: 10.1016/j.toxlet.2010.06.017.
- [115] M. Li *et al.*, « Biotransformation of Bisphenol AF to Its Major Glucuronide Metabolite Reduces Estrogenic Activity », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 12, p. e83170, déc. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0083170.
- [116] E. B. Yalcin, S. R. Kulkarni, A. L. Slitt, et R. King, « Bisphenol A sulfonation is impaired in metabolic and liver disease », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 292, p. 75-84, févr. 2016, doi: 10.1016/j.taap.2015.12.009.
- [117] H. Inoue, S. Kemanai, C. Sano, S. Kato, H. Yokota, et H. Iwano, « Bisphenol A glucuronide/sulfate diconjugate in perfused liver of rats », *The Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 78, n° 5, p. 733-737, 2016, doi: 10.1292/jvms.15-0573.
- [118] S. Waidyanatha, J. M. Mathews, P. R. Patel, S. R. Black, R. W. Snyder, et T. R. Fennell, « Disposition of bisphenol AF, a bisphenol A analogue, in hepatocytes *in vitro* and in male and female Harlan Sprague-Dawley rats and B6C3F1/N mice following oral and intravenous administration », *Xenobiotica*, vol. 45, n° 9, p. 811-819, sept. 2015, doi: 10.3109/00498254.2015.1021732.
- [119] J. G. Teeguarden *et al.*, « 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 288, n° 2, p. 131-142, oct. 2015, doi: 10.1016/j.taap.2015.01.009.
- [120] Y. Song, P. Xie, et Z. Cai, « Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration », *Rapid Commun Mass Spectrom*, vol. 32, n° 6, p. 495-502, mars 2018, doi: 10.1002/rcm.8051.
- [121] S. Waidyanatha *et al.*, « Comparative toxicokinetics of bisphenol S and bisphenol AF in male rats and mice following repeated exposure via feed », *Xenobiotica*, vol. 51, n° 2, p. 210-221, févr. 2021, doi: 10.1080/00498254.2020.1829171.
- [122] D. R. Doerge, N. C. Twaddle, M. Vanlandingham, et J. W. Fisher, « Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 247, n° 2, p. 158-165, sept. 2010, doi: 10.1016/j.taap.2010.06.008.
- [123] S. H. Collet *et al.*, « Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 284, n° 3, p. 323-329, mai 2015, doi: 10.1016/j.taap.2015.02.024.
- [124] V. Gayrard *et al.*, « Toxicokinetics of bisphenol S in rats for predicting human bisphenol S clearance from allometric scaling », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 386, p. 114845, janv. 2020, doi: 10.1016/j.taap.2019.114845.
- [125] F. Grandin *et al.*, « Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: Applicability to toxicokinetic investigations », *Journal of Chromatography A*, vol. 1526, p. 39-46, déc. 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.10.020.
- [126] S. Waidyanatha *et al.*, « Toxicokinetics and bioavailability of bisphenol AF following oral administration in rodents: A dose, species, and sex comparison », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 373, p. 39-47, juin 2019, doi: 10.1016/j.taap.2019.04.015.
- [127] S. Øie et T. N. Tozer, « Effect of Altered Plasma Protein Binding on Apparent Volume of Distribution », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 68, n° 9, p. 1203-1205, sept. 1979, doi: 10.1002/jps.2600680948.
- [128] H. Kurebayashi, « Disposition of a Low Dose of Bisphenol A in Male and Female Cynomolgus Monkeys », *Toxicological Sciences*, vol. 68, n° 1, p. 32-42, juill. 2002, doi: 10.1093/toxsci/68.1.32.

- [129] S. Collet, « Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A », p. 218, 2012.
- [130] T. A. Patterson, N. C. Twaddle, C. S. Roegge, R. J. Callicott, J. W. Fisher, et D. R. Doerge, « Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 267, n° 1, p. 41-48, févr. 2013, doi: 10.1016/j.taap.2012.12.006.
- [131] S. Waidyanatha *et al.*, « Comparative toxicokinetics of bisphenol S in rats and mice following gavage administration », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 406, p. 115207, nov. 2020, doi: 10.1016/j.taap.2020.115207.
- [132] A. K. Sonker, M. Bhateria, K. Karsauliya, et S. P. Singh, « Investigating the glucuronidation and sulfation pathways contribution and disposition kinetics of Bisphenol S and its metabolites using LC-MS/MS-based nonenzymatic hydrolysis method », *Chemosphere*, vol. 273, p. 129624, juin 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129624.
- [133] C. Karrer, T. Roiss, N. von Goetz, D. Gramec Skledar, L. Peterlin Mašič, et K. Hungerbühler, « Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of the Bisphenols BPA, BPS, BPF, and BPAF with New Experimental Metabolic Parameters: Comparing the Pharmacokinetic Behavior of BPA with Its Substitutes », *Environ Health Perspect*, vol. 126, n° 7, p. 077002, juill. 2018, doi: 10.1289/EHP2739.
- [134] J. Liu et J. W. Martin, « Comparison of Bisphenol A and Bisphenol S Percutaneous Absorption and Biotransformation », *Environ Health Perspect*, vol. 127, n° 6, p. 067008, juin 2019, doi: 10.1289/EHP5044.
- [135] C. Champmartin *et al.*, « Human in vitro percutaneous absorption of bisphenol S and bisphenol A: A comparative study », *Chemosphere*, vol. 252, p. 126525, août 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126525.
- [136] A. F. Sasso *et al.*, « Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following dermal administration », *Environment International*, vol. 144, p. 106031, nov. 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.106031.
- [137] J. G. Teeguarden, J. M. Waechter, H. J. Clewell, T. R. Covington, et H. A. Barton, « Evaluation of Oral and Intravenous Route Pharmacokinetics, Plasma Protein Binding, and Uterine Tissue Dose Metrics of Bisphenol A: A Physiologically Based Pharmacokinetic Approach », *Toxicological Sciences*, vol. 85, n° 2, p. 823-838, juin 2005, doi: 10.1093/toxsci/kfi135.
- [138] T. Corbel *et al.*, « Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure¹ », *Biology of Reproduction*, vol. 89, n° 1, juill. 2013, doi: 10.1095/biolreprod.112.106369.
- [139] C. G.A.Csanady, O.-F. H., S. B., B. C., S. K., et F. J., « Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein », *Archives of Toxicology*, vol. 76, n° 5-6, p. 299-305, juin 2002, doi: 10.1007/s00204-002-0339-5.
- [140] L. Grumetto, F. Barbato, et G. Russo, « Scrutinizing the interactions between bisphenol analogues and plasma proteins: Insights from biomimetic liquid chromatography, molecular docking simulations and in silico predictions », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 68, p. 148-154, mai 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.02.008.
- [141] F. C. Grandin *et al.*, « Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit », *Environment International*, vol. 120, p. 584-592, nov. 2018, doi: 10.1016/j.envint.2018.08.019.
- [142] V. Gayrard *et al.*, « High Bioavailability of Bisphenol A from Sublingual Exposure », *Environmental Health Perspectives*, juin 2013, doi: 10.1289/ehp.1206339.
- [143] J. S. Barry et R. V. Anthony, « The pregnant sheep as a model for human pregnancy », *Theriogenology*, vol. 69, n° 1, p. 55-67, janv. 2008, doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.021.

- [144] G. Gauderat *et al.*, « Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A and bisphenol A glucuronide from an ovine semi-physiological toxicokinetic model », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15646-5.
- [145] J. Gingrich, Y. Pu, R. Ehrhardt, R. Karthikraj, K. Kannan, et A. Veiga-Lopez, « Toxicokinetics of bisphenol A, bisphenol S, and bisphenol F in a pregnancy sheep model », *Chemosphere*, vol. 220, p. 185-194, avr. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.109.
- [146] J. Gingrich, D. Filipovic, R. Conolly, S. Bhattacharya, et A. Veiga-Lopez, « Pregnancy-specific physiologically-based toxicokinetic models for bisphenol A and bisphenol S », *Environment International*, vol. 147, p. 106301, févr. 2021, doi: 10.1016/j.envint.2020.106301.
- [147] S. Waidyanatha *et al.*, « An investigation of systemic exposure to bisphenol AF during critical periods of development in the rat », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 411, p. 115369, janv. 2021, doi: 10.1016/j.taap.2020.115369.
- [148] D. Chen *et al.*, « Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review », *Environmental Science & Technology*, vol. 50, n° 11, p. 5438-5453, juin 2016, doi: 10.1021/acs.est.5b05387.
- [149] Thomas R Fraser et Alexander Crum Brown, « On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action; with special reference to the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia », *J Anat Physiol.*, vol. 2, n° 2, p. 224-242, 1868.
- [150] J. C. Dearden, « The History and Development of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) », *International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships*, vol. 1, n° 1, 2016, doi: 10.4018/IJQSPR.2016010101.
- [151] C. Hansch et T. Fujita, « ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure.pdf », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 86, p. 1616-1626, 1964.
- [152] C. Hansch et A. R. Steward, « The Use of Substituent Constants in the Analysis of the Structure-Activity Relationship in Penicillin Derivatives », *J. Med. Chem.*, vol. 7, n° 6, p. 691-694, nov. 1964, doi: 10.1021/jm00336a001.
- [153] S. M. Free et J. W. Wilson, « A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies », *J. Med. Chem.*, vol. 7, n° 4, p. 395-399, juill. 1964, doi: 10.1021/jm00334a001.
- [154] T. Fujita et T. Ban, « Structure-activity relation. 3. Structure-activity study of phenethylamines as substrates of biosynthetic enzymes of sympathetic transmitters », *J. Med. Chem.*, vol. 14, n° 2, p. 148-152, févr. 1971, doi: 10.1021/jm00284a016.
- [155] T. Puzyn, J. Leszczynski, et M. T. Cronin, Éd., *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications*, vol. 8. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. doi: 10.1007/978-1-4020-9783-6.
- [156] K. Roy, Éd., *Advances in QSAR Modeling*, vol. 24. Cham: Springer International Publishing, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-56850-8.
- [157] M. M. C. Ferreira, « Multivariate QSAR », *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 13, n° 6, nov. 2002, doi: 10.1590/S0103-50532002000600004.
- [158] R. Todeschini et V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, 1^{re} éd. Wiley, 2000. doi: 10.1002/9783527613106.
- [159] R. Naef et W. Acree, « Calculation of Five Thermodynamic Molecular Descriptors by Means of a General Computer Algorithm Based on the Group-Additivity Method: Standard Enthalpies of Vaporization, Sublimation and Solvation, and Entropy of Fusion of Ordinary Organic Molecules and Total Phase-Change Entropy of Liquid Crystals », *Molecules*, vol. 22, n° 7, p. 1059, juin 2017, doi: 10.3390/molecules22071059.
- [160] A. Leo, P. Y. C. Jow, et C. Silipo, « Calculation of Hydrophobic Constant (Log P) from and f Constantst », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 18, n° 9, p. 865-868, 1975.

- [161] G. Zhang et C. B. Musgrave, « Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations », *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, n° 8, p. 1554-1561, mars 2007, doi: 10.1021/jp061633o.
- [162] Danishuddin et A. U. Khan, « Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design », *Drug Discovery Today*, vol. 21, n° 8, p. 1291-1302, août 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2016.06.013.
- [163] F. Grisoni, D. Ballabio, R. Todeschini, et V. Consonni, « Molecular Descriptors for Structure–Activity Applications: A Hands-On Approach », in *Computational Toxicology*, vol. 1800, O. Nicolotti, Éd. New York, NY: Springer New York, 2018, p. 3-53. doi: 10.1007/978-1-4939-7899-1_1.
- [164] A. Graovac et T. Pisanski, « On the Wiener index of a graph », *Journal of Mathematical Chemistry*, vol. 8, p. 53-62, 1991.
- [165] L. B. Kier et L. H. Hall, « Intermolecular Accessibility: The Meaning of Molecular Connectivity », *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 40, n° 3, p. 792-795, mai 2000, doi: 10.1021/ci990135s.
- [166] A. T. Balaban, I. Motoc, D. Bonchev, et O. Mekenyan, « Topological indices for structure-activity correlations », in *Steric Effects in Drug Design*, vol. 114, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1983, p. 21-55. doi: 10.1007/BFb0111212.
- [167] S. Prasanna et R. Doerksen, « Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in 2D-QSAR », *CMC*, vol. 16, n° 1, p. 21-41, janv. 2009, doi: 10.2174/092986709787002817.
- [168] T. J. Richmond, « Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins », *Journal of Molecular Biology*, vol. 178, n° 1, p. 63-89, sept. 1984, doi: 10.1016/0022-2836(84)90231-6.
- [169] M. L. Connolly, « Analytical molecular surface calculation », *J Appl Crystallogr*, vol. 16, n° 5, p. 548-558, oct. 1983, doi: 10.1107/S0021889883010985.
- [170] *ChemSketch*.
- [171] M. Karelson, V. S. Lobanov, et A. R. Katritzky, « Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies », *Chem. Rev.*, vol. 96, n° 3, p. 1027-1044, janv. 1996, doi: 10.1021/cr950202r.
- [172] A. R. Katritzky, V. S. Lobanov, et M. Karelson, « QSPR: the correlation and quantitative prediction of chemical and physical properties from structure », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 24, n° 4, p. 279, 1995, doi: 10.1039/cs9952400279.
- [173] A. Cartier et J.-L. Rivail, « Electronic descriptors in quantitative structure—activity relationships », *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 1, n° 4, p. 335-347, oct. 1987, doi: 10.1016/0169-7439(87)80039-4.
- [174] J. D. Roberts et M. C. Caserio, *Basic principles of organic chemistry*, 2d ed. Menlo Park, Calif: W. A. Benjamin, 1977.
- [175] C. Borgnakke, « Thermodynamics », in *Encyclopedia of Aerospace Engineering*, R. Blockley et W. Shyy, Éd. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010, p. eae081. doi: 10.1002/9780470686652.eae081.
- [176] C. P. Hicks et C. L. Young, « Gas-liquid critical properties of binary mixtures », *Chem. Rev.*, vol. 75, n° 2, p. 119-175, avr. 1975, doi: 10.1021/cr60294a001.
- [177] D. Eros, I. Kovcsdi, L. Orfi, K. Takacs-Novak, Gy. Acsady, et Gy. Keri, « Reliability of logP Predictions Based on Calculated Molecular Descriptors: A Critical Review », *CMC*, vol. 9, n° 20, p. 1819-1829, oct. 2002, doi: 10.2174/0929867023369042.
- [178] H. Wan et J. Ulander, « High-throughput pKa screening and prediction amenable for ADME profiling », *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, vol. 2, n° 1, p. 139-155, févr. 2006, doi: 10.1517/17425255.2.1.139.
- [179] Á. Könczöl et G. Dargó, « Brief overview of solubility methods: Recent trends in equilibrium solubility measurement and predictive models », *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 27, p. 3-10, juill. 2018, doi: 10.1016/j.ddtec.2018.06.001.
- [180] K. Roy, S. Kar, et R. N. Das, *A Primer on QSAR/QSPR Modeling*. Cham: Springer International Publishing, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-17281-1.

- [181] European Chemicals Agency., *How to use alternatives to animal testing to fulfil the information requirements for REACH registration. Practical guide* . LU: Publications Office, 2016. Consulté le: sept. 19, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://data.europa.eu/doi/10.2823/194297>
- [182] K. M. Sullivan, J. R. Manuppello, et C. E. Willett, « Building on a solid foundation: SAR and QSAR as a fundamental strategy to reduce animal testing », *SAR and QSAR in Environmental Research*, vol. 25, n° 5, p. 357-365, mai 2014, doi: 10.1080/1062936X.2014.907203.
- [183] J.-M. BRIGNON, L. Maxim, E. Mombelli, D. Tan, et J. C. Vergnaud, « https://www.anses.fr/fr/system/files/RSC08072019Brignon_SM.pdf ». https://www.anses.fr/fr/system/files/RSC08072019Brignon_SM.pdf (consulté le sept. 19, 2021).
- [184] OECD Environment Health and Safety Publications, « GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION OF (QUANTITATIVE) STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP [(Q)SAR] MODELS », n° No. 69, 2007.
- [185] J. Devillers, N. Marchand-Geneste, A. Carpy, et J. M. Porcher, « SAR and QSAR modeling of endocrine disruptors », *SAR and QSAR in Environmental Research*, vol. 17, n° 4, p. 393-412, août 2006, doi: 10.1080/10629360600884397.
- [186] M. Novič et M. Vračko, « QSAR Models for Reproductive Toxicity and Endocrine Disruption Activity », *Molecules*, vol. 15, n° 3, p. 1987-1999, mars 2010, doi: 10.3390/molecules15031987.
- [187] E. Lo Piparo et A. P. Worth, *Review of QSAR models and software tools for predicting developmental and reproductive toxicity*. LU: Publications Office, 2010. Consulté le: sept. 19, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://data.europa.eu/doi/10.2788/9628>
- [188] K. P. Coleman, W. A. Toscano, et T. E. Wiese, « QSAR Models of the in vitro Estrogen Activity of Bisphenol?A Analogs », *QSAR Comb. Sci.*, vol. 22, n° 1, p. 78-88, avr. 2003, doi: 10.1002/qsar.200390008.
- [189] S. Cui, S. Liu, J. Yang, X. Wang, et L. Wang, « Quantitative structure-activity relationship of estrogen activities of bisphenol A analogs », *CHINESE SCI BULL*, vol. 51, n° 3, p. 287-292, févr. 2006, doi: 10.1007/s11434-006-0287-1.
- [190] X. Yang, H. Liu, Q. Yang, J. Liu, J. Chen, et L. Shi, « Predicting anti-androgenic activity of bisphenols using molecular docking and quantitative structure-activity relationships », *Chemosphere*, vol. 163, p. 373-381, nov. 2016, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.062.
- [191] F. L. Christopher A. Lipinski, Paul J. Feeney, Beryl W. Dominy, et Paul J. Feeney, « Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 23, p. 3-25, 1996.
- [192] B. Chandrasekaran, S. N. Abed, O. Al-Attraqchi, K. Kuche, et R. K. Tekade, « Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties », in *Dosage Form Design Parameters*, Elsevier, 2018, p. 731-755. doi: 10.1016/B978-0-12-814421-3.00021-X.
- [193] C. Yap, H. Li, Z. Ji, et Y. Chen, « Regression Methods for Developing QSAR and QSPR Models to Predict Compounds of Specific Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Toxicological Properties », *MRMC*, vol. 7, n° 11, p. 1097-1107, nov. 2007, doi: 10.2174/138955707782331696.
- [194] F. Yoshida et J. G. Topliss, « QSAR Model for Drug Human Oral Bioavailability », *J. Med. Chem.*, vol. 43, n° 13, p. 2575-2585, juin 2000, doi: 10.1021/jm0000564.
- [195] X. Xu *et al.*, « A Novel Chemometric Method for the Prediction of Human Oral Bioavailability », *IJMS*, vol. 13, n° 6, p. 6964-6982, juin 2012, doi: 10.3390/ijms13066964.
- [196] T. L. Moda, C. A. Montanari, et A. D. Andricopulo, « Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability », *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 15, n° 24, p. 7738-7745, déc. 2007, doi: 10.1016/j.bmc.2007.08.060.

- [197] O. Deeb et B. Hemmateenejad, « ANN-QSAR Model of Drug-binding to Human Serum Albumin », *Chem Biol Drug Design*, vol. 70, n° 1, p. 19-29, juill. 2007, doi: 10.1111/j.1747-0285.2007.00528.x.
- [198] C. X. Xue *et al.*, « QSAR Models for the Prediction of Binding Affinities to Human Serum Albumin Using the Heuristic Method and a Support Vector Machine », *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 44, n° 5, p. 1693-1700, sept. 2004, doi: 10.1021/ci049820b.
- [199] J. R. Votano *et al.*, « QSAR Modeling of Human Serum Protein Binding with Several Modeling Techniques Utilizing Structure–Information Representation », *J. Med. Chem.*, vol. 49, n° 24, p. 7169-7181, nov. 2006, doi: 10.1021/jm051245v.
- [200] H. Li *et al.*, « Predicting human plasma protein binding of drugs using plasma protein interaction QSAR analysis (PPI-QSAR) », *Biopharm. Drug Dispos.*, vol. 32, n° 6, p. 333-342, sept. 2011, doi: 10.1002/bdd.762.
- [201] A. A. Toropov, A. P. Toropova, M. Beeg, M. Gobbi, et M. Salmona, « QSAR model for blood-brain barrier permeation », *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 88, p. 7-18, nov. 2017, doi: 10.1016/j.vascn.2017.04.014.
- [202] S. Agatonovic-Kustrin, C. K. Y. Chan, V. Gegechkori, et D. W. Morton, « Models for skin and brain penetration of major components from essential oils used in aromatherapy for dementia patients », *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 38, n° 8, p. 2402-2411, mai 2020, doi: 10.1080/07391102.2019.1633408.
- [203] N. Basant, S. Gupta, et K. P. Singh, « Predicting human intestinal absorption of diverse chemicals using ensemble learning based QSAR modeling approaches », *Computational Biology and Chemistry*, vol. 61, p. 178-196, avr. 2016, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2016.01.005.
- [204] E. Deconinck, H. Ates, N. Callebaut, E. Van Gyseghem, et Y. Vander Heyden, « Evaluation of chromatographic descriptors for the prediction of gastro-intestinal absorption of drugs », *Journal of Chromatography A*, vol. 1138, n° 1-2, p. 190-202, janv. 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2006.10.068.
- [205] C. Suenderhauf, F. Hammann, A. Maunz, C. Helma, et J. Huwyler, « Combinatorial QSAR Modeling of Human Intestinal Absorption », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 8, n° 1, p. 213-224, févr. 2011, doi: 10.1021/mp100279d.
- [206] H. Patel, W. ten Berge, et M. T. D. Cronin, « Quantitative structure–activity relationships (QSARs) for the prediction of skin permeation of exogenous chemicals », *Chemosphere*, vol. 48, n° 6, p. 603-613, août 2002, doi: 10.1016/S0045-6535(02)00114-5.
- [207] A. R. Katritzky *et al.*, « Skin Permeation Rate as a Function of Chemical Structure », *J. Med. Chem.*, vol. 49, n° 11, p. 3305-3314, juin 2006, doi: 10.1021/jm051031d.
- [208] V. Karalis, A. Tsantili-Kakoulidou, et P. Macheras, « Quantitative structure–pharmacokinetic relationships for disposition parameters of cephalosporins », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 20, n° 1, p. 115-123, sept. 2003, doi: 10.1016/S0928-0987(03)00177-5.
- [209] A. Pirovano, S. Brandmaier, M. A. J. Huijbregts, A. M. J. Ragas, K. Veltman, et A. J. Hendriks, « QSARs for estimating intrinsic hepatic clearance of organic chemicals in humans », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 42, p. 190-197, mars 2016, doi: 10.1016/j.etap.2016.01.017.
- [210] Z. D. Zhivkova, « Quantitative Structure – Pharmacokinetic Relationships for Plasma Clearance of Basic Drugs with Consideration of the Major Elimination Pathway », *J Pharm Pharm Sci*, vol. 20, p. 135, mai 2017, doi: 10.18433/J3MG71.
- [211] J. Chen *et al.*, « *In Silico* Prediction of Human Renal Clearance of Compounds Using Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship Models », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 33, n° 2, p. 640-650, févr. 2020, doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00447.
- [212] V. Gombar et S. D. Hall, « Quantitative Structure–Activity Relationship Models of Clinical Pharmacokinetics: Clearance and Volume of Distribution », *J. Chem. Inf. Model*, vol. 53, p. 948-957, 2013, doi: <https://10.1021/ci400001u>.

- [213] C. Quinones-Torrelo, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camanas, et M. J. Medina-Hernandez, « Opioid analgetics retention–pharmacologic activity models using biopartitioning micellar chromatography », *J. Chromatogr. B*, p. 13, 2002.
- [214] T. Ghafourian, M. Barzegar-Jalali, N. Hakimiha, T. Ghafourian, et M. T. D. Cronin, « Quantitative structure-pharmacokinetic relationship modelling: apparent volume of distribution », *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 56, n° 3, p. 339-350, févr. 2010, doi: 10.1211/0022357022890.
- [215] S. Simeon, D. Montanari, et M. P. Gleeson, « Investigation of Factors Affecting the Performance of *in silico* Volume Distribution QSAR Models for Human, Rat, Mouse, Dog & Monkey », *Mol. Inf.*, vol. 38, n° 10, p. 1900059, oct. 2019, doi: 10.1002/minf.201900059.
- [216] N. J. Knight *et al.*, « QSAR analysis of substituent effects on tambjamine anion transporters », *Chem. Sci.*, vol. 7, n° 2, p. 1600-1608, 2016, doi: 10.1039/C5SC03932K.
- [217] N. Busschaert *et al.*, « Towards predictable transmembrane transport: QSAR analysis of anion binding and transport », *Chem. Sci.*, vol. 4, n° 8, p. 3036, 2013, doi: 10.1039/c3sc51023a.
- [218] M. Hewitt, J. C. Madden, P. H. Rowe, et M. T. D. Cronin, « Structure-based modelling in reproductive toxicology: (Q)SARs for the placental barrier† », *SAR and QSAR in Environmental Research*, vol. 18, n° 1-2, p. 57-76, janv. 2007, doi: 10.1080/10629360601053893.
- [219] C. Giaginis, A. Zira, S. Theocharis, et A. Tsantili-Kakoulidou, « Application of quantitative structure–activity relationships for modeling drug and chemical transport across the human placenta barrier: a multivariate data analysis approach », *J. Appl. Toxicol.*, vol. 29, n° 8, p. 724-733, nov. 2009, doi: 10.1002/jat.1466.
- [220] Y.-H. Zhang, Z.-N. Xia, L. Yan, et S.-S. Liu, « Prediction of Placental Barrier Permeability: A Model Based on Partial Least Squares Variable Selection Procedure », *Molecules*, vol. 20, n° 5, p. 8270-8286, mai 2015, doi: 10.3390/molecules20058270.
- [221] A. Eguchi, M. Hanazato, N. Suzuki, Y. Matsuno, E. Todaka, et C. Mori, « Maternal–fetal transfer rates of PCBs, OCPs, PBDEs, and dioxin-like compounds predicted through quantitative structure–activity relationship modeling », *Environ Sci Pollut Res*, vol. 25, n° 8, p. 7212-7222, mars 2018, doi: 10.1007/s11356-015-5436-0.
- [222] K. Nikolic et D. Agababa, « Prediction of hepatic microsomal intrinsic clearance and human clearance values for drugs », *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 28, n° 3, p. 245-252, oct. 2009, doi: 10.1016/j.jmgm.2009.08.002.
- [223] L. Terfloth, B. Bienfait, et J. Gasteiger, « Ligand-Based Models for the Isoform Specificity of Cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 Substrates », *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47, n° 4, p. 1688-1701, juill. 2007, doi: 10.1021/ci700010t.
- [224] R. Gozalbes, M. Jacewicz, R. Annand, K. Tsaion, et A. Pineda-Lucena, « QSAR-based permeability model for drug-like compounds », *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 19, n° 8, p. 2615-2624, avr. 2011, doi: 10.1016/j.bmc.2011.03.011.
- [225] H. PhamThe *et al.*, « In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach », *Mol. Inf.*, vol. 30, n° 4, p. 376-385, avr. 2011, doi: 10.1002/minf.201000118.
- [226] MultiCASE Inc., Consulté le: sept. 21, 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://www.multicase.com/case-ultra-models#ADME_Bundle
- [227] ADMET Predictor. Consulté le: sept. 21, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.simulations-plus.com/software/admetpredictor/>
- [228] R. Kaliszan, *Quantitative structure-chromatographic retention relationships*. 1987.
- [229] R. Kaliszan, « Quantitative structure-retention relationships applied to reversed-phase high-performance liquid chromatography », *Journal of Chromatography A*, vol. 656, n° 1-2, p. 417-435, déc. 1993, doi: 10.1016/0021-9673(93)80812-M.

- [230] M. H. Abraham, « Scales of Solute Hydrogen-bonding: Their Construction and Application to Physicochemical and Biochemical Processes », *Chemical Society Reviews*, n° 22, p. 73-83, 1993, doi: <https://doi.org/10.1039/CS9932200073>.
- [231] N. S. Wilson, M. D. Nelson, J. W. Dolan, L. R. Snyder, R. G. Wolcott, et P. W. Carr, « Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography I. A general quantitative relationship », *J. Chromatogr. A*, p. 23, 2002.
- [232] K. Héberger, « Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships », *Journal of Chromatography A*, vol. 1158, n° 1-2, p. 273-305, juill. 2007, doi: [10.1016/j.chroma.2007.03.108](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.108).
- [233] Š. Ukić *et al.*, « Development of Gradient Retention Model in Ion Chromatography. Part I: Conventional QSRR Approach », *Chromatographia*, vol. 77, n° 15-16, p. 985-996, août 2014, doi: [10.1007/s10337-014-2653-5](https://doi.org/10.1007/s10337-014-2653-5).
- [234] R. I. J. Amos, P. R. Haddad, R. Szucs, J. W. Dolan, et C. A. Pohl, « Molecular modeling and prediction accuracy in Quantitative Structure-Retention Relationship calculations for chromatography », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 105, p. 352-359, août 2018, doi: [10.1016/j.trac.2018.05.019](https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.019).
- [235] K. Goryński, B. Bojko, A. Nowaczyk, A. Buciniński, J. Pawliszyn, et R. Kaliszan, « Quantitative structure–retention relationships models for prediction of high performance liquid chromatography retention time of small molecules: Endogenous metabolites and banned compounds », *Analytica Chimica Acta*, vol. 797, p. 13-19, oct. 2013, doi: [10.1016/j.aca.2013.08.025](https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.08.025).
- [236] R. Kaliszan, « QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships », *Chem. Rev.*, vol. 107, n° 7, p. 3212-3246, juill. 2007, doi: [10.1021/cr068412z](https://doi.org/10.1021/cr068412z).
- [237] C. Giaginis et A. Tsantili-Kakoulidou, « Quantitative Structure–Retention Relationships as Useful Tool to Characterize Chromatographic Systems and Their Potential to Simulate Biological Processes », *Chromatographia*, vol. 76, n° 5-6, p. 211-226, mars 2013, doi: [10.1007/s10337-012-2374-6](https://doi.org/10.1007/s10337-012-2374-6).
- [238] M. Koba, T. Bączek, et M. P. Marszał, « Importance of retention data from affinity and reverse-phase high-performance liquid chromatography on antitumor activity prediction of imidazoacridinones using QSAR strategy », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 64-65, p. 87-93, mai 2012, doi: [10.1016/j.jpba.2012.02.010](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.010).
- [239] H. Gao, H. Huang, A. Zheng, N. Yu, et N. Li, « Determination of quantitative retention-activity relationships between pharmacokinetic parameters and biological effectiveness fingerprints of *Salvia miltiorrhiza* constituents using biopartitioning and microemulsion high-performance liquid chromatography », *Journal of Chromatography B*, vol. 1067, p. 10-17, nov. 2017, doi: [10.1016/j.jchromb.2017.09.018](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.018).
- [240] S. Apostolov, G. Vastag, G. Mrdjan, J. Nakomčić, et I. Stojiljković, « Chromatographic descriptors in QSAR study of barbiturates », *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 42, n° 7-8, p. 194-203, mai 2019, doi: [10.1080/10826076.2019.1590207](https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1590207).
- [241] L. R. Jevrić, S. O. Podunavac-Kuzmanović, J. V. Švarc-Gajić, S. Z. Kovačević, et B. Ž. Jovanović, « RP-HPTLC Retention Data in Correlation with the In-silico ADME Properties of a Series of s-triazine Derivatives », *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, vol. 13, n° 4, p. 1203, 2014.
- [242] N. Perisic-Janjic, R. Kaliszan, P. Wiczling, N. Milosevic, G. Uscumlic, et N. Banjac, « Reversed-Phase TLC and HPLC Retention Data in Correlation Studies with in Silico Molecular Descriptors and Druglikeness Properties of Newly Synthesized Anticonvulsant Succinimide Derivatives », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 8, n° 2, p. 555-563, avr. 2011, doi: [10.1021/mp100373d](https://doi.org/10.1021/mp100373d).
- [243] M. Shahlaei, « Descriptor Selection Methods in Quantitative Structure–Activity Relationship Studies: A Review Study », *Chem. Rev.*, vol. 113, n° 10, p. 8093-8103, oct. 2013, doi: [10.1021/cr3004339](https://doi.org/10.1021/cr3004339).

- [244] L. Eriksson, J. Jaworska, A. P. Worth, M. T. D. Cronin, R. M. McDowell, et P. Gramatica, « Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. », *Environmental Health Perspectives*, vol. 111, n° 10, p. 1361-1375, août 2003, doi: 10.1289/ehp.5758.
- [245] I. I. Baskin, V. A. Palyulin, et N. S. Zefirov, « Neural Networks in Building QSAR Models », in *Artificial Neural Networks*, vol. 458, D. J. Livingstone, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2006, p. 133-154. doi: 10.1007/978-1-60327-101-1_8.
- [246] K. Roy, S. Kar, et R. N. Das, « Statistical Methods in QSAR/QSPR », in *A Primer on QSAR/QSPR Modeling*, Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 37-59. doi: 10.1007/978-3-319-17281-1_2.
- [247] L. C. Yee et Y. C. Wei, « Current Modeling Methods Used in QSAR/QSPR », in *Statistical Modelling of Molecular Descriptors in QSAR/QSPR.*, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA., 2012, p. 32.
- [248] P. Carracedo-Reboredo *et al.*, « A review on machine learning approaches and trends in drug discovery », *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 19, p. 4538-4558, 2021, doi: 10.1016/j.csbj.2021.08.011.
- [249] OECD Environment Health and Safety Publications, « OECD principles for the validation, for regulatory purposes, of (quantitative) structure-activity relationship models ». Consulté le: sept. 21, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/37849783.pdf>
- [250] A. Tropsha, « Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation », *Mol. Inf.*, vol. 29, n° 6-7, p. 476-488, juill. 2010, doi: 10.1002/minf.201000061.
- [251] P. Gramatica et A. Sangion, « A Historical Excursus on the Statistical Validation Parameters for QSAR Models: A Clarification Concerning Metrics and Terminology », *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 56, n° 6, p. 1127-1131, juin 2016, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00088.
- [252] A. Tropsha, P. Gramatica, et V. Gombar, « The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models », *QSAR Comb. Sci.*, vol. 22, n° 1, p. 69-77, avr. 2003, doi: 10.1002/qsar.200390007.
- [253] N. Chirico et P. Gramatica, « Real External Predictivity of QSAR Models. Part 2. New Intercomparable Thresholds for Different Validation Criteria and the Need for Scatter Plot Inspection », *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, n° 8, p. 2044-2058, août 2012, doi: 10.1021/ci300084j.
- [254] N. Chirico et P. Gramatica, « Real External Predictivity of QSAR Models: How To Evaluate It? Comparison of Different Validation Criteria and Proposal of Using the Concordance Correlation Coefficient », *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 51, n° 9, p. 2320-2335, sept. 2011, doi: 10.1021/ci200211n.
- [255] A. Golbraikh et A. Tropsha, « Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection », p. 13, 2000.
- [256] R. GENET, « AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'identification en tant que substance extrêmement préoccupante (SVHC1) du Bisphénol B pour son caractère de perturbateur endocrinien ». ANSES, 2020. Consulté le: sept. 22, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/FREACH2019SA0221.pdf>&clen=486434
- [257] L. M. Gonzalez, A. J. Moeser, et A. T. Blikslager, « Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research », *Translational Research*, vol. 166, n° 1, p. 12-27, juill. 2015, doi: 10.1016/j.trsl.2015.01.004.
- [258] A. Ziegler, L. Gonzalez, et A. Blikslager, « Large Animal Models: The Key to Translational Discovery in Digestive Disease Research », *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 2, n° 6, p. 716-724, nov. 2016, doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.09.003.

- [259] W. Dekant et W. Völkel, « Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 228, n° 1, p. 114-134, avr. 2008, doi: 10.1016/j.taap.2007.12.008.
- [260] A. Ullah *et al.*, « Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats », p. 9, 2018.
- [261] S. Ijaz, A. Ullah, G. Shaheen, et S. Jahan, « Exposure of BPA and its alternatives like BPB, BPF, and BPS impair subsequent reproductive potentials in adult female Sprague Dawley rats », *Toxicology Mechanisms and Methods*, vol. 30, n° 1, p. 60-72, janv. 2020, doi: 10.1080/15376516.2019.1652873.
- [262] W. Qiu *et al.*, « The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms », *Journal of Hazardous Materials*, vol. 406, p. 124303, mars 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124303.
- [263] A. Ullah *et al.*, « Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF, and BPS exposure and reproductive axis function in the male offspring of Sprague Dawley rats », *Hum Exp Toxicol*, vol. 38, n° 12, p. 1344-1365, déc. 2019, doi: 10.1177/0960327119862335.
- [264] C. A. Gély, M. Z. Lacroix, M. Morin, C. Vayssière, V. Gayraud, et N. Picard-Hagen, « Comparison of the materno-fetal transfer of fifteen structurally related bisphenol analogues using an ex vivo human placental perfusion model », *Chemosphere*, vol. 276, p. 130213, août 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130213.
- [265] M. Shi, N. Sekulovski, J. A. MacLean, A. Whorton, et K. Hayashi, « Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Female Reproductive Functions in Mice », *Toxicological Sciences*, vol. 168, n° 2, p. 561-571, avr. 2019, doi: 10.1093/toxsci/kfz014.
- [266] M. R. Syme, J. W. Paxton, et J. A. Keelan, « Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta »:, *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 43, n° 8, p. 487-514, 2004, doi: 10.2165/00003088-200443080-00001.
- [267] C. S. Mazur, S. A. Marchitti, M. Dimova, J. F. Kenneke, A. Lumen, et J. Fisher, « Human and Rat ABC Transporter Efflux of Bisphenol A and Bisphenol A Glucuronide: Interspecies Comparison and Implications for Pharmacokinetic Assessment », *Toxicological Sciences*, vol. 128, n° 2, p. 317-325, août 2012, doi: 10.1093/toxsci/kfs167.
- [268] B. Balakrishnan, K. Henare, E. B. Thorstensen, A. P. Ponnampalam, et M. D. Mitchell, « Transfer of bisphenol A across the human placenta », *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 202, n° 4, p. 393.e1-393.e7, avr. 2010, doi: 10.1016/j.ajog.2010.01.025.
- [269] K. Vähäkangas et P. Myllynen, « Drug transporters in the human blood-placental barrier: Transporters in human placenta », *British Journal of Pharmacology*, vol. 158, n° 3, p. 665-678, oct. 2009, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00336.x.
- [270] D. A. Smith, K. Beaumont, T. S. Maurer, et L. Di, « Volume of Distribution in Drug Design: Miniperspective », *J. Med. Chem.*, vol. 58, n° 15, p. 5691-5698, août 2015, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00201.
- [271] M. Rowland et T. N. Tozer, *Clinical Pharmacokinetics Concepts and Application*, 3^e éd. Williams & wilkins, 1995.
- [272] parlement européen, *Plans et mesures visant à accélérer le passage à une innovation sans recours aux animaux dans la recherche, les essais réglementaires et l'enseignement*. 2021.
- [273] K. M. Usher, C. R. Simmons, et J. G. Dorsey, « Modeling chromatographic dispersion: A comparison of popular equations », *J. Chromatogr. A*, p. 7.
- [274] W. Hao, B. Di, Q. Chen, J. Wang, Y. Yang, et X. Sun, « Study of the peak variance in isocratic and gradient liquid chromatography using the transport model », *Journal of Chromatography A*, vol. 1295, p. 67-81, juin 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.044.
- [275] U. D. Neue et J. R. Mazzeo, « A theoretical study of the optimization of gradients at elevated temperature », *J. Sep. Sci.*, vol. 24, n° 12, p. 921-929, 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20011201\)24:12<921::AID-JSSC921>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20011201)24:12<921::AID-JSSC921>3.0.CO;2-2).

- [276] J. H. Knox et H. P. Scott, « B and C terms in the Van Deemter equation for liquid chromatography », *Journal of Chromatography A*, vol. 282, p. 297-313, déc. 1983, doi: 10.1016/S0021-9673(00)91609-1.
- [277] J. J. Baeza-Baeza, M. J. Ruiz-Ángel, M. C. García-Álvarez-Coque, et S. Carda-Broch, « Half-width plots, a simple tool to predict peak shape, reveal column kinetics and characterise chromatographic columns in liquid chromatography: State of the art and new results », *Journal of Chromatography A*, vol. 1314, p. 142-153, nov. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.09.022.
- [278] F. Tsopelas, T. Vallianatou, et A. Tsantili-Kakoulidou, « Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery », *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 11, n° 5, p. 473-488, mai 2016, doi: 10.1517/17460441.2016.1160886.
- [279] D. M. Pizzurro, M. Seeley, L. E. Kerper, et B. D. Beck, « Interspecies differences in perfluoroalkyl substances (PFAS) toxicokinetics and application to health-based criteria », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 106, p. 239-250, août 2019, doi: 10.1016/j.yrtph.2019.05.008.
- [280] M. C. Huang *et al.*, « Toxicokinetics of perfluorobutane sulfonate (PFBS), perfluorohexane-1-sulphonic acid (PFHxS), and perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) in male and female Hsd:Sprague Dawley SD rats after intravenous and gavage administration », *Toxicology Reports*, vol. 6, p. 645-655, 2019, doi: 10.1016/j.toxrep.2019.06.016.

Annexes

1. Données complémentaires : Développement d'une méthode analytique pour les études de biosurveillance : le dosage de bisphénols glucuronides (BPAG, BPSG et BPF) à l'état de trace dans le sang de cordon ombilical (Annexe 1)

S1. Doehlert experimental design for BP-Gs dansylation

The surface area of response and the estimated BP-Gs areas in the domain were evaluated with the Doehlert matrix given in Table S1. Ellistat Ellipse II (4.36 2018/02) software processed experimental data with a quadratic equation 1:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad \text{equation 1}$$

with :

Y : the responses,

X_i : the coded forms of the Doehlert matrix of the factor U_i ,

b_i : the coefficient of the effect of factors,

b_{ij} : the coefficient of the effect of the factors interaction,

b_{ii} : the coefficient of the quadratic effect of factors.

Experimental design was built according to equation 2:

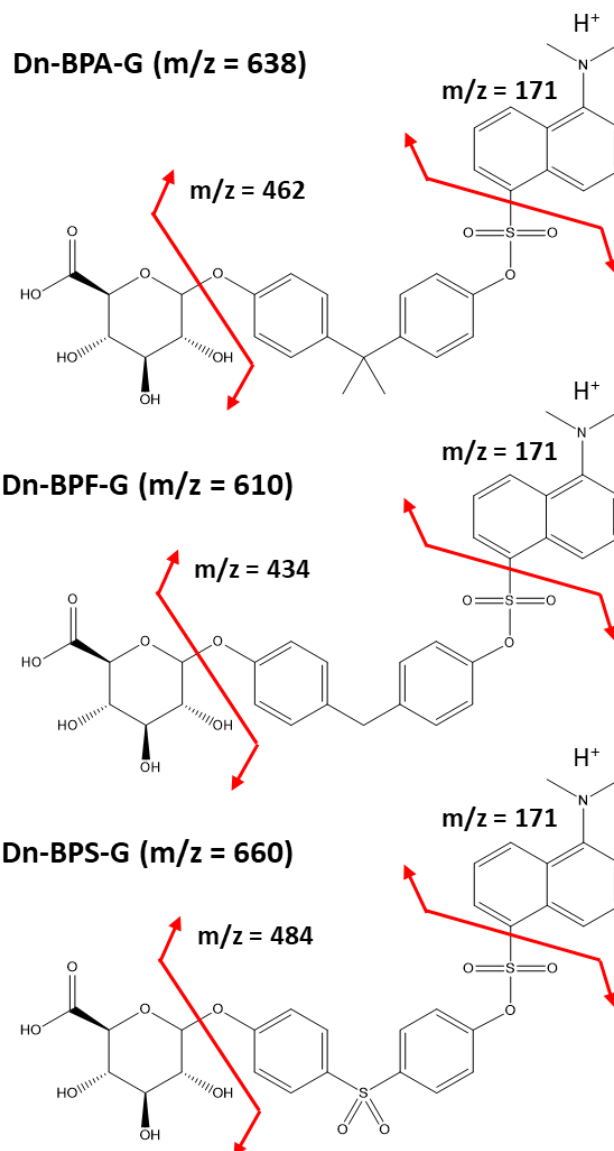
$$U_i = U_i^0 + \Delta U_i \cdot X_i \quad \text{equation 2}$$

X_i dependent on the Doehlert matrix, U_i^0 was the center of the experimental domain (7 for buffer pH and 40°C for incubation temperature) and ΔU_i was the variation step (2 for buffer pH and 15°C for incubation temperature). Five additional experiments on the domain center (exp 1) were performed to validate the statistical significance of the model.

Table S.1: Doehlert experimental design used to optimize BP-Gs dansylation.

Experiment	X1	X2	U_1 (pH)	U_2 (Incubation T°C)
1	0	0	7	40
2	1	0	9	40
3	-1	0	5	40
4	0.5	0.866	8	53
5	-0.5	-0.866	6	27
6	0.5	-0.866	8	27
7	-0.5	0.866	6	53

S2. Fragmentation pattern of Dn-BP-Gs



Each Dn-BP-Gs loose its glucuronic acid and the N,N-dimethylnaphtalen-1-amine moieties of the dansyl group during fragmentation.

S3. Doelhart experimental design for on-line SPE of BP-Gs

Three on-line SPE cartridges were assayed XBridge® C8 Direct connect HP (2.1x30mm, 10µm), XBridge ® C18 Direct connect HP (2.1x30mm, 10µm) and HRX Chromabond (2.1x40mm ; 15µm) with a mixture of BP-Gs spiked in plasma, extracted from plasma by protein precipitation with MeOH and evaporated to dryness before dansylation. Loading time and initial H₂O proportion (acidified or not) were optimized with the Doehlert design shown in Table S2.1 for the three cartridges.

Table S.3.1: Doehlert experimental design used to optimize on-line SPE of Dn-BP-Gs.

Experiment	Loading time (min)	%H ₂ O
1	1.2	75
2	2.2	75
3	0.2	75
4	1.7	100
5	0.7	50
6	1.7	50
7	0.7	100

Two Doehlert designs per cartridge were tested, the first under neutral conditions and the second under acidic conditions (0.1 % formic acid). In neutral conditions, even with the shortest loading time with 100% H₂O, the Dn-BP-Gs were insufficiently retained on the cartridges. Better results were obtained under acidic conditions and optimal conditions were obtained with the C8 cartridges (Table S2.2).

Table S.3.2: On-line SPE conditions optimized by experimental designs for the three cartridges with their respective gain in area of Dn-BPA-G, Dn-BPS-G and Dn-BPF-G.

On-line SPE conditions			Gain in area		
Cartridge	% H ₂ O (0.1 % FA)	Loading time (min)	Dn-BPA-G	Dn-BPS-G	Dn-BPF-G
HRX	75	0.2	1.28	1.29	1.23
C8	80	0.5	3.02	2.40	2.30
C18	100	0.7	3.84	1.44	1.44

The gain in area was determined as the ratio between the BP-Gs peak area of samples assayed by on-line SPE-UHPLC-MS/MS and the same samples directly analyzed by UHPLC-MS/MS without the on-line SPE with the same volume of injection (20 μ L)

S4. Calibration curve results

Table S.4.1: Calibration curve results for Dn-BPA-G, Dn-BPF-G and Dn-BPS-G obtained in human plasma (n= 3) with a linear model weighted by $1/X^2$ (X= nominal concentration).

Nominal concentration (ng/mL)	Dn-BPA-G		Dn-BPF-G		Dn-BPS-G	
	Mean (ng/mL)	RCR%	Mean (ng/mL)	RCR%	Mean (ng/mL)	RCR%
0.05	0.050	-1%	0.046	-7%	0.050	0%
0.1	0.101	1%	0.110	10%	0.098	-2%
0.2	0.192	-4%	0.211	5%	0.199	-1%
0.5	0.560	12%	0.549	10%	0.556	11%
1	0.984	-2%	0.944	-6%	1.018	2%
2	1.903	-5%	1.884	-6%	1.915	-4%
5	4.891	-2%	4.643	-7%	4.678	-6%

Table S.4.2: Lack-of-fit results obtained with the linear model weighted by $1/X^2$ for the calibration of Dn-BPA-G, Dn-BPS-G and Dn-BPF-G in human plasma (n= 3).

	Dn-BPA-G	Dn-BPS-G	Dn-BPF-G
SS tot:	6.5284E-05	0.00038037	3.6851E-05
DF tot:	19	19	19
SS pureError:	5.7551E-05	0.00034672	3.2822E-05
DF pureError:	14	14	14
SS lof:	7.7331E-06	3.3654E-05	4.029E-06
DF lof:	5	5	5
Var pureError:	4.1108E-06	2.4766E-05	2.3445E-06
Var lof:	1.5466E-06	6.7309E-06	8.0581E-07
F:	0.376	0.272	0.344
P-Value:	0.857	0.921	0.878
Results:	linear	linear	linear

Table S.4.3: Comparison of the response of Dn-BPA-G, Dn-BPS-G and Dn-BPF-G in human plasma with response in aqueous standard from 0.05 to 50 ng/mL (n= 3).

Annexes - 1

Nominale concentration (ng/ml)	Dn-BPA-G			Dn-BPF-G			Dn-BPS-G		
	Plasma response	Aqueous response	Ratio plasma/aqueous	Plasma response	Aqueous response	Ratio plasma/aqueous	Plasma response	Aqueous response	Ratio plasma/aqueous
0.05	0.0040	0.0044	0.91	0.0018	0.0011	1.70	0.0071	0.0058	1.22
0.1	0.0094	0.0075	1.25	0.0044	0.0023	1.92	0.0117	0.0121	0.96
0.2	0.0177	0.0141	1.26	0.0077	0.0072	1.07	0.0218	0.0191	1.14
0.5	0.0331	0.0357	0.93	0.0218	0.0170	1.29	0.0483	0.0464	1.04
1	0.0522	0.0535	0.97	0.0356	0.0326	1.09	0.0797	0.0942	0.85
2	0.1151	0.1118	1.03	0.0842	0.0728	1.16	0.1891	0.1804	1.05
5	0.2849	0.2846	1.00	0.2026	0.1694	1.20	0.4465	0.4530	0.99
10	0.5645	0.5790	0.97	0.4012	0.3373	1.19	0.8693	0.8970	0.97
20	0.9402	1.1236	0.84	0.6630	0.6327	1.05	1.4952	1.7968	0.83
50	2.7825	2.7160	1.02	1.9229	1.6128	1.19	4.2819	4.3362	0.99

2. Etude du transfert placentaire de 14 bisphénols analogues du BPA sur un modèle de placenta humain perfusé (Annexe 2)

Supplementary material

Comparison of the materno-fetal transfer of fifteen structurally related bisphenol analogues using an *ex vivo* human placental perfusion model

Clémence A. Gély^{1,2}, Marlène Z. Lacroix², Mathieu Morin³, Christophe Vayssière^{3,4}, Véronique Gayrard¹, Nicole Picard-Hagen¹

¹ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

²INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

³Department of Obstetrics and Gynecology, Paule de Viguier Hospital, CHU Toulouse, Toulouse, France

⁴UMR 1027 INSERM, Team SPHERE, Université de Toulouse, France.

Véronique Gayrard: veronique.gayrard@envt.fr; Clémence Gély: clemence.gely@inrae.fr; Marlène Z. Lacroix: marlene.lacroix@envt.fr, Mathieu Morin: morin.m@chu-toulouse.fr; Nicole Picard-Hagen: nicole.hagen@envt.fr; Christophe Vayssière: vayssiere.c@chu-toulouse.fr.

Corresponding author:

Email: nicole.hagen@envt.fr

UMR1331 Toxalim

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

23 chemin des Capelles, BP 87614

31076 Toulouse cedex 3

France

Supplementary material, Simultaneous quantification of 15 bisphenols in placenta perfusion media

The MRM transitions of BPs and IS with their respective cone voltages and collision energies are given in Table S.1. MRM transition with daughter ion⁺ was used for quantification.

Table S1: Molecular properties and mass data of the 15 bisphenols

Compound	Molecular weight (g/mol)	Retention Time (min)	Parent ions (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone (eV)	Collision (eV)
BP4-4	186	2.61	185	117	40	22
				156*	40	28
BPS	250	2.15	249	92	42	33
				108*	42	26
BPF	200	3.22	199	93	34	22
				105*	34	22
BPE	214	3.66	213	119	14	24
				198*	14	18
BPA	228	4.06	227	133	34	28
				212*	34	20
BPAF	336	4.15	335	197	30	36
				265*	30	22
BPB	242	4.6	241	147	34	18
				212*	34	18
3-3BPA	256	4.86	255	169	34	16
				240*	34	18
BPZ	268	5.51	267	145	42	38
				173*	42	26
BPC	280	4.63	279	71*	26	18
				243	26	14
BPAP	290	5.28	289	195	32	28
				274*	32	20
BPP	346	6.66	345	133	54	42
				330*	54	26
BPM	346	6.42	345	133	48	28
				251*	48	28
BPFL	350	6.05	349	215	42	30
				256*	42	26
BPBP	352	6.23	351	258*	38	24
				274	38	24
BPS-d8	258	2.11	257	112*	40	34
				160	40	28
BPA13C12	240	4.06	239	224*	34	28
				140	34	20
BPAP-d5	295	5.26	294	279*	38	24
				211	38	22
BPAF-d4	340	4.15	339	269*	32	44
				180	32	22
BPP-d16	362	6.61	361	325*	42	34
				140	42	40

3. Etude de la disposition de douze bisphénols suite à leur ingestion sur un modèle porcin (Annexe 3)

Supplemental data: Comparison of toxicokinetic properties of eleven analogues of BPA in pig after intravenous and oral administrations.

Clémence A. Gély^{1,2}, Marlène Z. Lacroix², Béatrice B. Roques², Pierre-Louis Toutain^{2,3}, Véronique Gayraud¹, Nicole Picard-Hagen¹

¹ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

²INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

³The Royal Veterinary College, University of London, London

Table S1: Measured doses of 12 bisphenols relative to the bodyweight administered by IV or oral routes to piglets and for the three periods. The concentrations of in the dosing solutions of the BPs were measured by UHPLC-UV.

	Période 1 (µmol/kg)									Période 2 (µmol/kg)									Période 3 (µmol/kg)								
	Porc A	Porc B	Porc C	Porc D	Porc E	Porc F	Porc G	Porc H	Porc I	Porc A	Porc B	Porc C	Porc D	Porc E	Porc F	Porc G	Porc H	Porc I	Porc A	Porc B	Porc C	Porc D	Porc E	Porc F	Porc G	Porc H	Porc I
BPF	6.5	6.7	6.6	-	-	-	147.4	149.8	150.6	185.4	185.1	169.8	7.0	7.1	7.1	-	-	-	-	-	-	188.5	184.2	6.9	6.6	6.5	
BPA	6.9	7.1	7.1	-	-	-	171.0	173.7	174.7	222.9	222.5	204.1	7.5	7.7	7.7	-	-	-	-	-	-	218.2	213.2	6.5	6.3	6.2	
BPB	6.9	7.1	7.0	-	-	-	158.4	161.0	161.8	204.8	204.4	187.5	6.9	7.1	7.0	-	-	-	-	-	-	206.3	201.5	6.4	6.2	6.1	
BPAF	7.1	7.4	7.3	-	-	-	147.1	149.5	150.3	200.1	199.8	183.3	7.2	7.4	7.3	-	-	-	-	-	-	201.3	196.7	5.1	4.9	4.8	
3-3BPA	6.9	7.2	7.1	-	-	-	146.1	148.5	149.3	197.1	196.8	180.5	7.4	7.6	7.5	-	-	-	-	-	-	200.1	195.5	7.8	7.5	7.4	
BPZ	7.3	7.6	7.5	-	-	-	155.2	157.7	158.5	201.8	201.5	184.8	7.3	7.4	7.4	-	-	-	-	-	-	204.4	199.7	6.2	6.0	5.9	
BPM	7.2	7.4	7.3	-	-	-	123.5	125.5	126.2	176.4	176.1	161.6	7.4	7.6	7.5	-	-	-	-	-	-	181.7	177.5	5.3	5.1	5.0	
BPS	-	-	-	5.4	5.3	5.4	147.4	149.8	150.6	181.4	181.1	166.1	-	-	-	5.7	5.4	5.5	5.5	6.1	5.7	181.8	177.6	-	-	-	
BP4,4'	-	-	-	5.6	5.5	5.7	136.7	138.9	139.7	175.2	174.9	160.4	-	-	-	5.6	5.3	5.4	5.2	5.7	5.4	173.8	169.8	-	-	-	
BPAP	-	-	-	6.6	6.5	6.7	154.5	156.9	157.8	207.0	206.7	189.6	-	-	-	7.1	6.7	6.9	6.9	7.6	7.1	208.8	204.0	-	-	-	
BPFL	-	-	-	6.8	6.7	6.9	146.6	149.0	149.8	199.8	199.4	183.0	-	-	-	7.1	6.7	6.8	6.7	7.3	6.8	201.4	196.8	-	-	-	
BPP	-	-	-	6.6	6.4	6.6	130.4	132.5	133.2	187.6	187.3	171.8	-	-	-	6.5	6.1	6.3	6.3	7.0	6.5	192.4	188.0	-	-	-	
Nominal dose	6	6	6	6	6	6	200	200	200	200	200	200	6	6	6	6	6	6	6	6	6	200	200	200	6	6	6

Table S2: Detection wavelengths used to quantify bisphenols in urine

	Wavelength (nm)		
	Unconjugated bisphenol quantification		Total bisphenols quantification
	low calibration 0.01-2 µg/mL	high calibration 0.5 - 20 µg/mL	calibration 0.2 – 100 µg/mL
BPS	260	230	260
BP4-4	250	230	250
BPF	230	290	230
BPA	230	290	230
BPB	230	290	230
BPAF	230	260	230
3-3 BPA	230	290	230
BPAP	230	290	230
BPZ	230	290	230
BPFL	230	290	260
BPM	230	290	230
BPP	230	290	230

Table S3a: Low calibration ranges, models, weightings, accuracies, intra- day and inter-day precisions of the method of quantification of the 12 unconjugated bisphenols in piglet urines. The performances were evaluated at three-concentration levels (low, medium and high) with quality control (QC) prepared in piglet urines and covering the low calibration range except BPF, due to its LOQ of 1 µg/mL include in the high calibration.

Compound		BP4-4	BPS	BPF	BPA	BPAF	BPB	3-3BPA	BPZ	BPAP	BPP	BPM	BPFL
Model		Linear 1/X ²	Linear 1/X	/	Linear 1/X	Quadratic 1/X	Linear 1/X	Linear 1/X	Linear 1/X	Linear 1/X	Quadratic 1/X ²	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X ²
Calibration range (µg/mL)		0.02-2	0.05-2	/	0.05-2	0.01-2	0.01-2	0.05-2	0.01-2	0.2-2	0.02-2	0.02-2	0.02-2
CV intra-day %	QC = 0.03 µg/mL	12%	-	/	-	22%	16%	-	12%	-	12%	15%	12%
	QC = 0.15 µg/mL	7%	16%	/	9%	10%	9%	9%	7%	11%	5%	7%	5%
	QC = 1.5 µg/mL	3%	10%	/	3%	2%	3%	3%	3%	2%	1%	1%	1%
CV inter-day %	QC = 0.03 µg/mL	16%	-	/	-	22%	16%	-	11%	-	16%	16%	15%
	QC = 0.15 µg/mL	16%	14%	/	12%	10%	9%	9%	7%	11%	6%	8%	5%
	QC = 1.5 µg/mL	14%	10%	/	6%	7%	7%	8%	6%	6%	5%	4%	5%
Accuracy %	QC = 0.03 µg/mL	105%	-	/	-	108%	104%	-	95%	-	107%	100%	97%
	QC = 0.15 µg/mL	100%	106%	/	105%	102%	106%	110%	105%	89%	99%	102%	98%
	QC = 1.5 µg/mL	102%	97%	/	101%	109%	105%	107%	110%	112%	111%	113%	114%
LOQ	Concentration (µg/mL)	0.02	0.05	1	0.05	0.01	0.01	0.05	0.01	0.2	0.02	0.02	0.02
	CV intra-day %	12%	9%	18%	4%	19%	5%	17%	7%	14%	5%	17%	15%
	Accuracy %	102%	81%	98%	121%	87%	101%	98%	120%	119%	117%	116%	107%

Table S3b: High calibration ranges, models, weightings, accuracies, intra-day and inter-day precisions of the method used to quantify of 12 unconjugated bisphenols in piglet urines. The performances were evaluated at three-concentration levels (low, medium and high) with quality control (QC) prepared in piglet urines and covering the high calibration range.

Compound		BP4-4	BPS	BPF	BPA	BPAF	BPB	3-3BPA	BPZ	BPAP	BPP	BPM	BPFL
Model (calibration range : 0.5-20 µg/mL except for BPF: 1-20 µg/mL)		Linear 1/X	Linear 1/X	Quadratic 1/X ²	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X ²
CV intra-day %	QC = 1.5 µg/mL	6%	6%	12%	4%	4%	3%	3%	3%	3%	2%	2%	2%
	QC = 7.5 µg/mL	9%	6%	9%	7%	9%	7%	7%	6%	7%	5%	4%	4%
	QC = 15 µg/mL	11%	9%	11%	8%	9%	8%	7%	8%	7%	9%	7%	6%
CV inter-day %	QC = 1.5 µg/mL	10%	7%	14%	9%	11%	14%	9%	6%	6%	4%	3%	5%
	QC = 7.5 µg/mL	9%	6%	10%	10%	12%	13%	9%	6%	7%	6%	4%	6%
	QC = 15 µg/mL	15%	12%	12%	16%	17%	17%	14%	13%	11%	9%	7%	8%
Accuracy %	QC = 1.5 µg/mL	106%	110%	120%	109%	110%	109%	112%	115%	119%	110%	110%	111%
	QC = 7.5 µg/mL	105%	106%	112%	107%	105%	105%	109%	109%	110%	107%	109%	113%
	QC = 15 µg/mL	107%	105%	105%	103%	98%	100%	105%	107%	106%	111%	110%	114%

Table S4: Calibration ranges, models, weightings, accuracies, intra- day and inter-day precisions of the method to quantify urinary concentrations of 12 total bisphenols (unconjugated + native bisphenol) after enzymatic hydrolysis. The performances were evaluated at three-concentration levels (low, medium and high) with quality control (QC) prepared in piglet urines and covering the calibration range.

Compound		BP4-4	BPS	BPF	BPA	BPAF	BPB	3-3BPA	BPZ	BPAP	BPP	BPM	BPFL
Model		Linear 1/X	Linear 1/X	Linear 1/X	Quadratic 1/X ²	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Linear 1/X ²	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X
Calibration range (µg/mL)		0.5-100	1-100	1-100	0.2-100	0.2-100	0.5-100	0.2-100	0.2-100	0.5-100	0.2-100	0.2-100	0.2-100
CV intra-day %	QC = 0.6 µg/mL	8%	-	-	3%	3%	5%	5%	3%	5%	3%	4%	3%
	QC = 3 µg/mL	5%	4%	9%	4%	5%	4%	5%	5%	6%	6%	7%	7%
	QC = 7.5µg/mL	3%	2%	4%	3%	4%	3%	7%	3%	3%	3%	3%	3%
	QC = 30 µg/mL	2%	2%	2%	13%	15%	11%	11%	10%	12%	13%	13%	12%
	QC = 75µg/mL	3%	3%	3%	9%	10%	9%	9%	8%	9%	13%	9%	8%
CV inter-day %	QC = 0.6 µg/mL	8%	-	-	6%	9%	7%	9%	6%	14%	8%	8%	8%
	QC = 3 µg/mL	6%	4%	12%	4%	5%	5%	4%	5%	5%	6%	6%	6%
	QC = 7.5µg/mL	3%	2%	12%	4%	4%	4%	4%	3%	4%	3%	3%	3%
	QC = 30 µg/mL	3%	5%	3%	15%	20%	15%	15%	12%	16%	16%	16%	17%
	QC = 75µg/mL	3%	5%	4%	10%	10%	9%	10%	7%	9%	14%	9%	9%
Accuracy %	QC = 0.6 µg/mL	112%	-	-	109%	101%	92%	95%	102%	96%	90%	90%	91%
	QC = 3 µg/mL	98%	103%	94%	109%	109%	114%	118%	114%	114%	98%	101%	113%
	QC = 7.5µg/mL	96%	99%	98%	106%	108%	109%	116%	111%	112%	101%	102%	112%
	QC = 30 µg/mL	112%	117%	121%	106%	113%	99%	103%	110%	111%	118%	107%	107%
	QC = 75µg/mL	103%	98%	101%	99%	98%	100%	108%	90%	103%	98%	103%	103%
LOQ	Concentration (µg/mL)	0.5	1	1	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.2
	CV intra-day %	12%	9%	3%	7%	8%	3%	2%	2%	2%	4%	2%	2%
	Accuracy %	107%	98%	82%	95%	80%	90%	118%	119%	104%	112%	109%	84%

Table S5: Molecular weights, MRM transitions, cone voltage and collision energies of the 12 bisphenols used in the UHPLC/MS/MS method.

Compound	Molecular weight (g/mol)	Parent ions (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone (eV)	Collision (eV)
BP4-4	186	185	117	40	22
			156*	40	28
BPS	250	249	92	42	33
			108*	42	26
BPF	200	199	93	34	22
			105*	34	22
BPA	228	227	133	34	28
			212*	34	20
BPAF	336	335	197	30	36
			265*	30	22
BPB	242	241	147	34	18
			212*	34	18
3-3BPA	256	255	169	34	16
			240*	34	18
BPZ	268	267	145	42	38
			173*	42	26
BPAP	290	289	195	32	28
			274*	32	20
BPP	346	345	133	54	42
			330*	54	26
BPM	346	345	133	48	28
			251*	48	28
BPFL	350	349	215	42	30
			256*	42	26
BPS-d8	258	257	112*	40	34
			160	40	28
BPA13C12	240	239	224*	34	28
			140	34	20
BPAP-d5	295	294	279*	38	24
			211	38	22
BPAF-d4	340	339	269*	32	44
			180	32	22
BPP-d16	362	361	325*	42	34
			140	42	40

* MRM transition with daughter ion* was used for quantification

Table S6: Calibration ranges, models, weightings, accuracies, intra-day and inter-day precisions of the method to quantify the 12 unconjugated bisphenols in piglet plasma. The performances of the assay were evaluated at five-concentration levels with QC prepared in piglet plasma.

Compound		BP4-4	BPS	BPF	BPA	BPAF	BPB (n=5)	3-3BPA	BPZ	BPAP	BPP	BPM	BPFL
Internal Standard		BPA13C12	BPSd8	BPA13C12	BPA13C12	BPAFd4	BPA13C12	BPA13C12	BPA13C12	BPAPd5	BPPd16	BPA13C12	BPAPd5
Model		Quadratic 1/X2	Linear 1/X2	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X2	Quadratic 1/X2	Quadratic 1/X2	Quadratic 1/X2	Quadratic 1/X	Linear 1/X2	Linear 1/X	Quadratic 1/X	Quadratic 1/X ²
CV intra-day %	QC = 2,5 ng/mL	-	-	-	-	13%	-	-	-	-	-	-	-
	QC = 7,5 ng/mL	7%	6%	11%	6%	11%	24%	13%	17%	13%	8%	10%	15%
	QC = 25 ng/mL	13%	5%	9%	7%	9%	16%	9%	19%	17%	14%	29%	20%
	QC = 250 ng/mL	7%	6%	7%	4%	8%	12%	13%	18%	8%	10%	15%	14%
	QC = 2500 ng/mL	7%	4%	5%	3%	-	7%	4%	18%	7%	7%	8%	12%
CV inter-day %	QC = 2,5 ng/mL	-	-	-	-	12%	-	-	-	-	-	-	-
	QC = 7,5 ng/mL	13%	7%	11%	6%	16%	30%	25%	16%	14%	12%	12%	18%
	QC = 25 ng/mL	17%	6%	17%	7%	15%	17%	21%	20%	16%	20%	27%	22%
	QC = 250 ng/mL	7%	6%	9%	4%	11%	14%	21%	18%	7%	13%	20%	15%
	QC = 2500 ng/mL	8%	4%	5%	3%	-	11%	17%	17%	8%	16%	22%	13%
Accuracy %	QC = 2,5 ng/mL	-	-	-	-	120%	-	-	-	-	-	-	-
	QC = 7,5 ng/mL	100%	102%	93%	90%	122%	107%	97%	86%	83%	105%	99%	96%
	QC = 25 ng/mL	82%	98%	76%	95%	119%	72%	89%	92%	91%	96%	66%	87%
	QC = 250 ng/mL	94%	104%	87%	94%	119%	85%	93%	75%	98%	98%	84%	98%
	QC = 2500 ng/mL	121%	101%	100%	98%	-	84%	107%	73%	106%	97%	85%	105%
Accuracy %	LOQ ng/mL	5,00	5,00	2,50	2,50	2,50	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
		110%	104%	100%	93%	123%	111%	119%	91%	114%	96%	123%	123%
CV inter-day %		13%	9%	18%	26%	14%	25%	13%	7%	7%	16%	25%	17%
Accuracy %	ULOQ ng/mL	2500,00	5000,00	5000,00	5000,00	1000,00	2500,00	5000,00	2500,00	5000,00	5000,00	2500,00	5000,00
		120%	96%	91%	100%	-	75%	88%	64%	114%	86%	82%	115%
CV inter-day %		7%	5%	4%	3%	-	5%	2%	34%	5%	10%	14%	7%

Table S7: Limits of quantification (LOQ, ng/ml) applied to the BPs assay in the plasma samples of piglets, as function of the performance of the different run assays.

	LOQ (ng/mL)	
	IV	Oral
BPS	5	5
BP44	10	5
BPAP	10 (pigs A, C, H, I) / 5 (pigs D, E, F, G)	5
BPP	5	10 (pigs A, B, C) / 5 (pigs D, F, G, H, I)
BPFL	5	10
BPA	2.5	2.5
BPAF	5 (pigs A, B, C, D) / 2.5 (pigs F, G, H, I)	2.5
BPB	5	10 (pigs A, B) / 25 (pigs C, D, F) / 5 (pigs G, H, I)
BPF	5	2.5 (pigs A, B, G, H, I) / 5 (pigs C, D, F)
BPM	5 (pigs A, B, C, D) / 25 (pigs F, G, H, I)	10 (pigs A, B, C, D, F) / 5 (pigs G, H, I)
BPZ	10 (pigs A, B, C, D) / 5 (pigs F, G, H, I)	5
3-3BPA	5	5

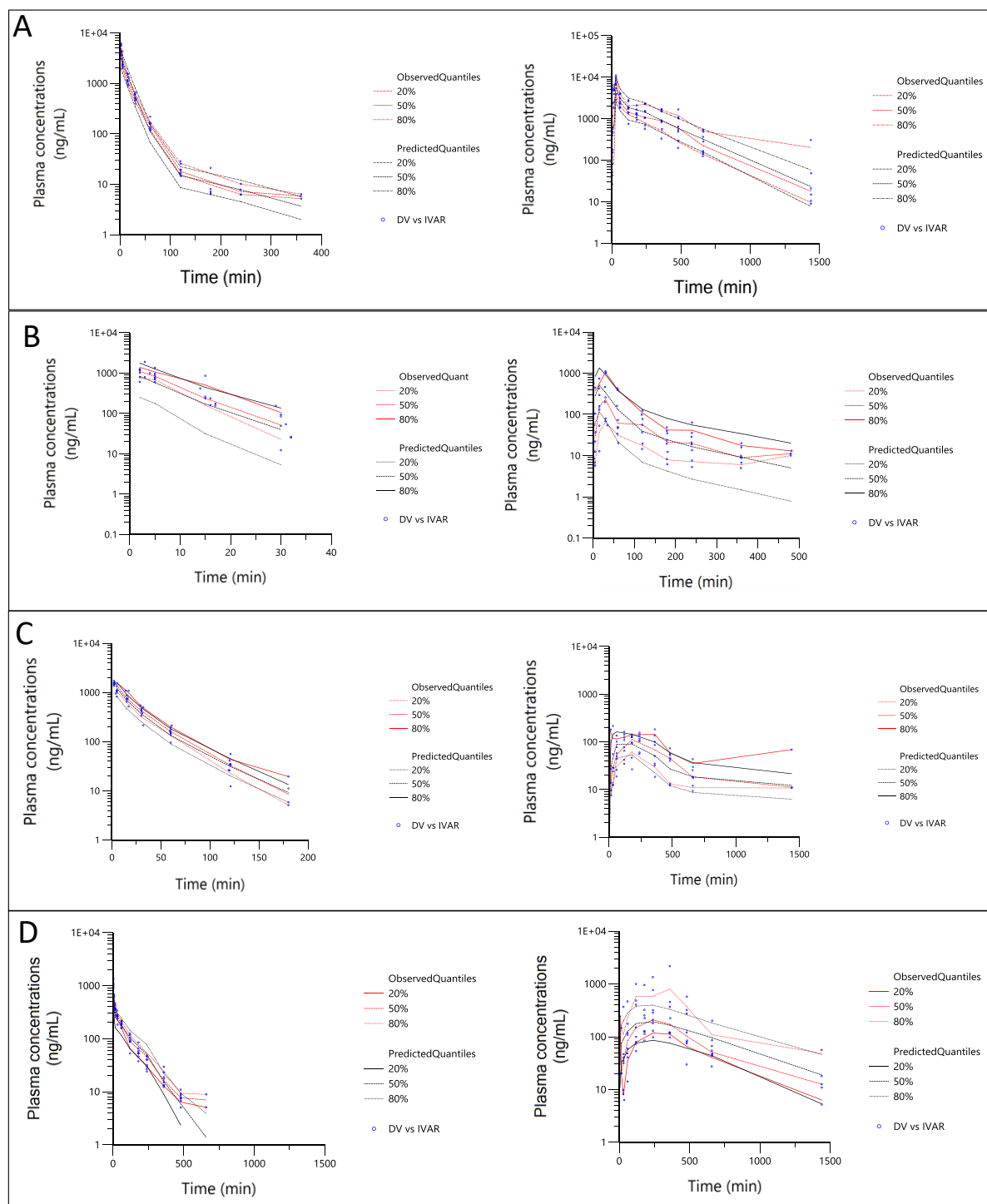


Figure S1: Visual predictive Check (VPC) of plasma BPS (A), BP4-4 (B), BPAP (C), BPP (D) concentrations (ng/mL) after an IV (left) and an oral administration (right). Red lines: observed quantiles (20, 50 and 80%); black lines: predicted quantiles by Monte Carlo Simulation (20, 50 and 80%); blue symbols: observed data. When the model ideally predicts the data, the observed and predicted quantiles are expected to be superimposed. For BPS and BPAP, three detected concentrations at time higher than 1440 min were ignored. For VPC of BPP two detected concentrations at time higher than 1440 min were ignored.

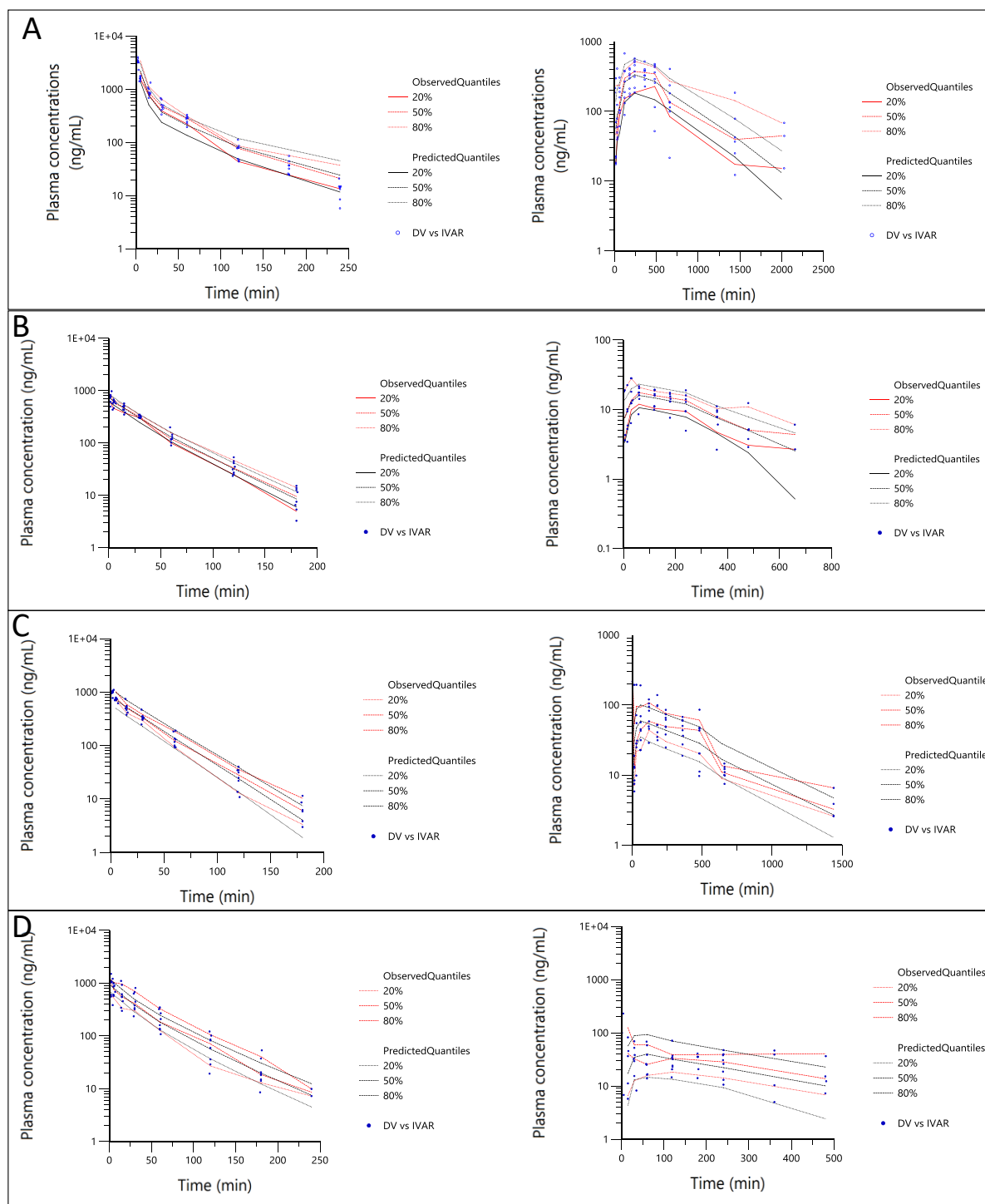


Figure S2: Visual predictive Check (VPC) of plasma BPFL (A), BPA (B), BPAF (C), BPB (D) concentrations (ng/mL) after an IV (left) and an oral administration (right). Red lines: observed quantiles (20, 50 and 80%); black lines: predicted quantiles by Monte Carlo Simulation (20, 50 and 80%); blue symbols: observed data. When the model ideally predicts the data, the observed and predicted quantiles are expected to be superimposed. For BPFL one detected concentrations at time higher than 2030 min were ignored after oral administration and three detected concentrations at time higher than 240 min. For BPAF and for BPA, one detected concentrations at time higher than 180 min were ignored after IV administration

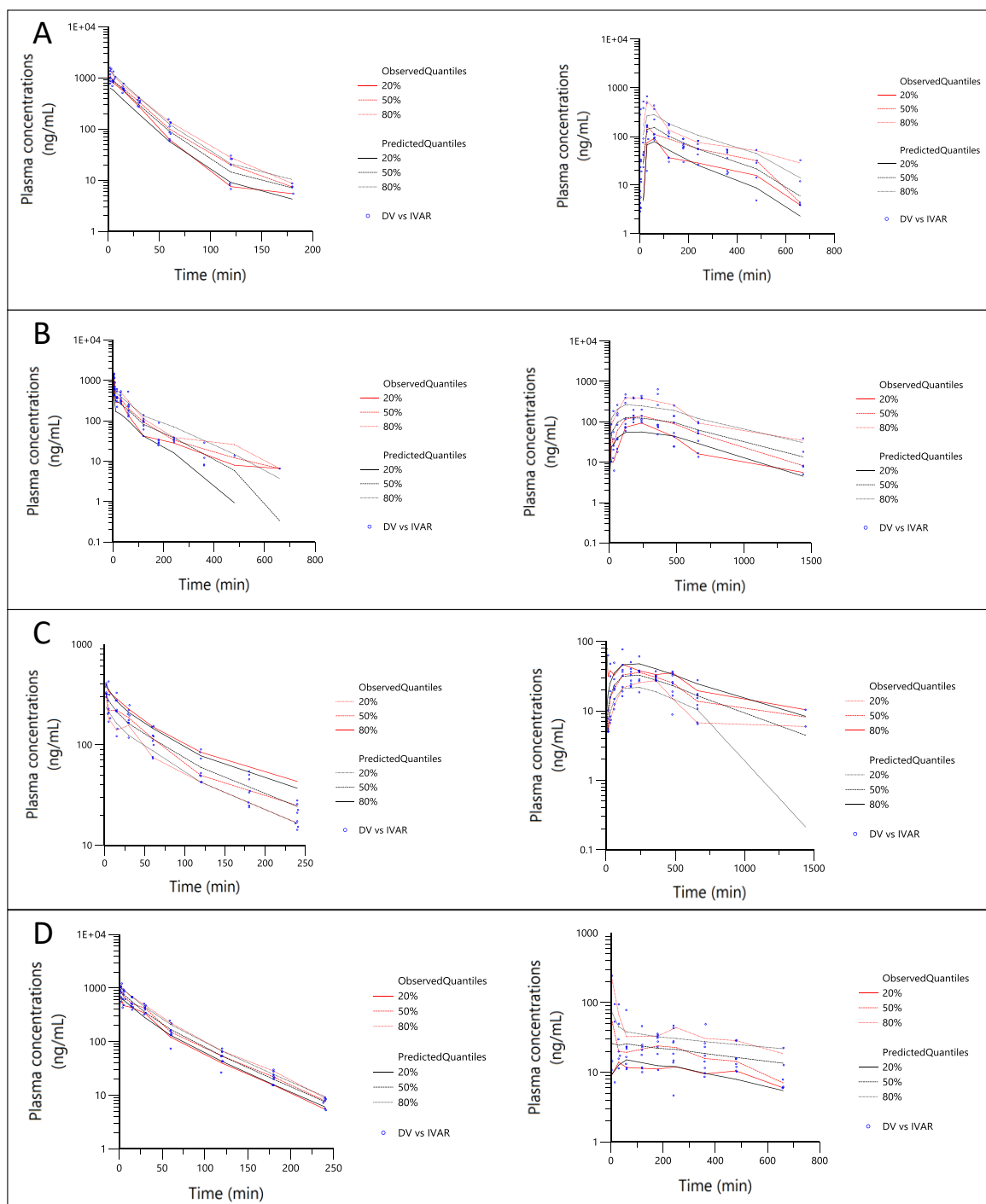


Figure S3: Visual predictive Check (VPC) of plasma BPF (A), BPM (B), BPZ (C), 3-3BPA (D) concentrations (ng/mL) after an IV (left) and an oral administration (right). Red lines: observed quantiles (20, 50 and 80%); black lines: predicted quantiles by Monte Carlo Simulation (20, 50 and 80%); blue symbols: observed data. When the model ideally predicts the data, the observed and predicted quantiles are expected to be superimposed. For BPZ one detected concentrations at time higher than 240 min were ignored after IV administration and higher than 1440 min were ignored after oral administration.

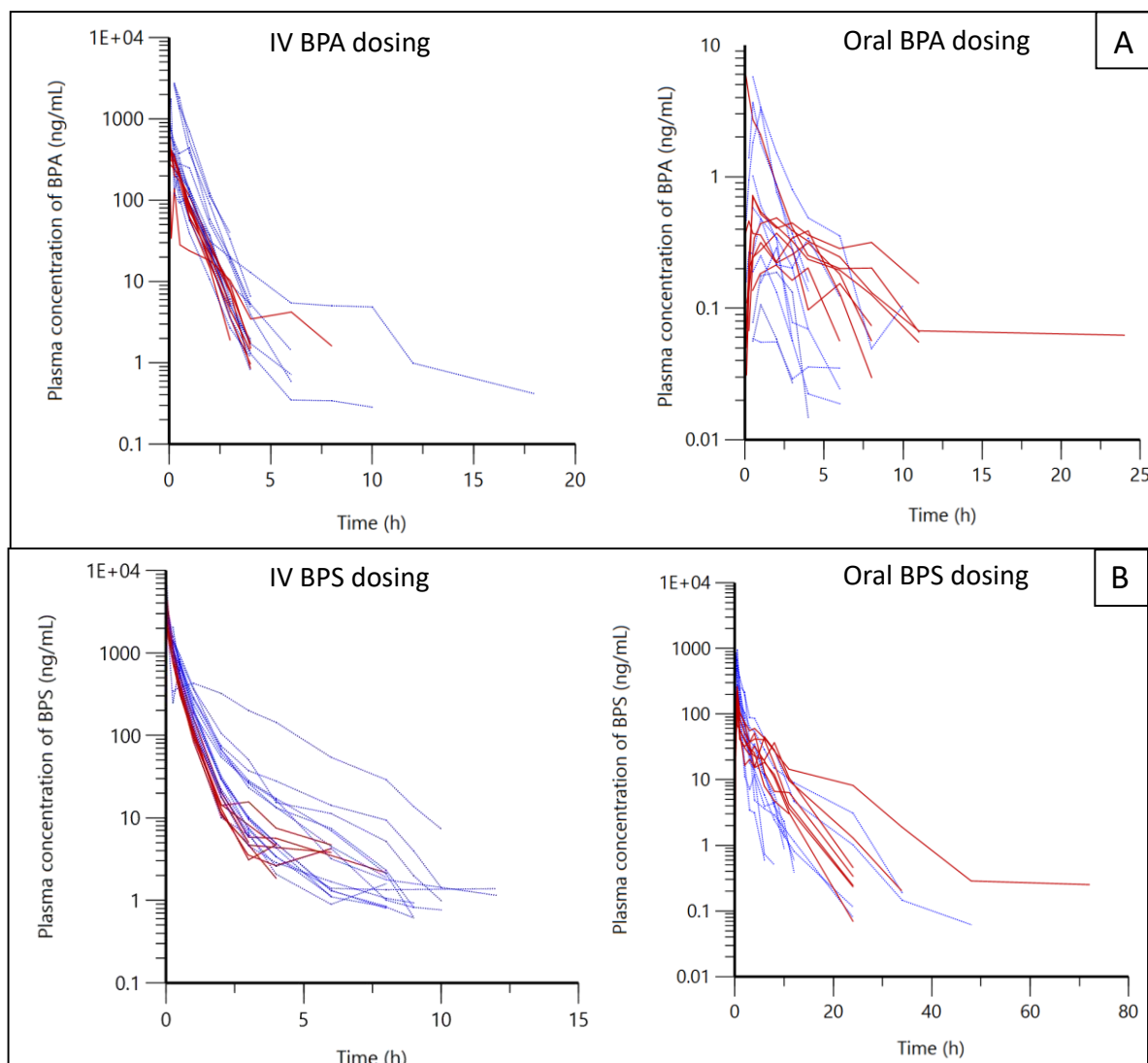


Figure S4: Semi-logarithmic plots of individual plasma concentrations-time profiles relative to dose (ng/mL per mg/kg) of BPA (A) and BPS (B) after IV administration (left) of both a single dosing of BPA/BPS (blue) and simultaneous dosing of 5 to 7 (IV) (red) and after oral administration (right) of both a single dosing of BPA/BPS (blue) and simultaneous dosing of 12 bisphenols in mixture (red) in piglets. Plasma concentrations-time profiles of single injection of BPA/BPS were obtained from Gayraud et al., 2019

Table S8: Toxicokinetic parameters (mean \pm SD) of 3-3BPA, BPS, BP4-4, BPAP, BPP, BPFL, BPA, BPAF, BPB, BPF, BPM and BPZ estimated by non-compartmental analysis after simultaneous IV administration to 8 piglets of 5 to 7 BPs (6 μ mol/kg BW). The bioavailability by oral route was estimated by non-compartmental analysis after simultaneous oral administrations of 12 BPs (200 μ mol/kg BW) to 8 piglets.

Non-compartmental analysis after IV dosing			3-3BPA	BPS	BP4-4	BPAP	BPP	BPFL	BPA	BPAF	BPB	BPF	BPM	BPZ
Clearance	mL/min/kg	mean	55.19	19.55	80.85	50.09	51.97	36.90	59.35	76.68	45.61	45.60	55.16	82.34
		SD	10.09	2.14	25.63	9.44	5.99	4.65	6.41	17.94	17.24	6.51	14.71	19.81
		CV (%)	18%	11%	32%	19%	12%	13%	11%	23%	38%	14%	27%	24%
Vss	mL/kg	mean	2613	518	753	1522	5784	1538	2345	2545	2067	1220	4178	8113
		SD	504	190	192	165	774	208	290	632	640	249	1856	2776
		CV (%)	19%	37%	25%	11%	13%	13%	12%	25%	31%	20%	44%	34%
HL_lambda	min	mean	40.66	83.76	6.55	24.09	110.40	52.49	29.03	24.95	34.13	21.28	65.68	75.77
		SD	4.30	68.12	1.39	2.58	20.81	19.48	3.49	3.96	3.77	5.32	38.20	14.11
		CV (%)	11%	81%	21%	11%	19%	37%	12%	16%	11%	25%	58%	19%
MRT ^c	min	mean	47.38	26.34	9.61	30.81	112.16	41.77	39.71	33.46	46.47	27.11	74.64	97.31
		SD	3.50	8.55	1.89	3.18	16.95	3.99	5.05	4.64	6.11	6.03	25.73	14.71
		CV (%)	7%	32%	20%	10%	15%	10%	13%	14%	13%	22%	34%	15%
Non-compartmental analysis after IV and oral dosing														
F	%	mean	1.6%	51.6%	7.4%	5.9%	16.9%	16.9%	1.0%	4.7%	1.2%	6.2%	0.09	4.9%
		SD	0.5%	27.2%	5.5%	4.7%	20.2%	9.2%	0.9%	2.5%	1.0%	4.0%	0.05	2.5%
		CV (%)	34%	53%	74%	80%	120%	54%	85%	53%	80%	64%	54%	51%
Cmax	nmol/mL	mean	0.25	29.90	2.43	0.49	1.62	1.41	0.24	0.27	0.27	1.51	0.82	0.17
		SD	0.29	9.17	2.20	0.16	1.97	0.31	0.42	0.17	0.28	1.10	0.58	0.06
		CV (%)	114%	31%	91%	32%	122%	22%	176%	62%	101%	73%	71%	36%
Tmax	min	mean	152	29	37	206	277	262	62	142	122	43	262	218
		SD	167	6	34	98	116	91	50	71	103	33	85	119
		CV (%)	109%	22%	91%	48%	42%	35%	80%	50%	84%	78%	32%	54%
AUC/dose	min*nmol/ mL / mmol/kg	mean	716	24617	934	1154	3068	4738	191	641	432	1303	2101	551
		SD	1068	10045	750	751	2923	2613	118	342	334	733	1020	217
		CV (%)	149%	41%	80%	65%	95%	55%	62%	53%	77%	56%	49%	39%

Vss: Volume of distribution at steady state

Cmax: Maximal concentration after oral administration

HL_lambda: Elimination half-life corresponding to the last elimination slope
time to maximum concentration

Tmax:

MRT: Mean time of residence

F:

Bioavailability by the oral route

AUC/Dose: Dose scaled area under the plasma concentration-time curve from dosing time to the time of the last measurable plasma concentration after oral administration.

4. Développement d'un outil prédictif du passage placentaire des bisphénols avec une étude de type relation-structure-activité (Annexe 4)

Supplementary data: The contribution of different chromatographic variables in QSAR studies: application to the placental passage of bisphenols.

Clémence A. Gély^{1,2}, Nicole Picard-Hagen¹, Malika Chassan², Jean-Christophe Garrigues³,
Véronique Gayrard¹, Marlène Z. Lacroix²

¹ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

²INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

³Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, UMR 5623, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France.

R codes to carry out ANN, with input, the descriptors and output the clearance indices.

```
library(neuralnet)
data=cbind.data.frame(input,output)
train=data$output
formule= paste(colnames(data[-ncol(data)]),collapse = "+")
print(formule)
formule=paste("train ~ ",formule,sep = "")
print(formule)
set.seed(100)
neuralnet=neuralnet::neuralnet(as.formula(formule),data=data,hidden = 0, linear.output = FALSE,
stepmax = 100000, threshold = 0.005)
```

Table S1: Molecular descriptors used in QSAR development. Molecular descriptors for the 15 bisphenols are described in the Excel file supplementary data.

Molecular descriptors			
	Molecular parameters	Units	Descriptor name
ChemPropPro	Molecular weight	g/mol	MM
	Boiling Point	Kelvin	CPP 1
	Critical Pressure	Bar	CPP 2
	Critical Temperature	Kelvin	CPP 3
	Critical Volume	cm ³ /mol	CPP 4
	Gibbs Free Energy	kJ/mol	CPP 5
	Heat Of Formation	kJ/mol	CPP 6
	Henry's Law constant		CPP 7
	Ideal Gas Thermal Capacity	J/(mol.K)	CPP 8
	logP		CPP 9
	Melting Point	Kelvin	CPP 10
Mol Refractivity	cm ³ /mol	CPP 11	
Log P	Log P Viswanadhan's fragmentation		LP 2
	Log P Broto's fragmentation		LP 3
MR	MR Crippen's fragmentation	cm ³ /mol	MR 1
	MR Viswanadhan's fragmentation	cm ³ /mol	MR 2
ChemPropStd	Connolly Accessible Area	Å ²	CPS 1
	Connolly Molecular Area	Å ²	CPS 2
	Connolly Solvent Excluded Volume	Å ³	CPS 3
	Number of HBond Acceptors		CPS 4
CLogP Driver	Mol Refractivity		CD 1
	Partition Coefficient		CD 2
Molecular Networks	Log P		MN 1
	Log S		MN 2
	pKa1		MN 3
	pKa2		MN 4
Molecular Topology	Balaban Index		MT 1
	Cluster Count		MT 2
	Molecular Topological Index		MT 3
	Num Rotatable Bonds	Bonds	MT 4
	Polar Surface Area	Å ²	MT 5
	Radius	Atoms	MT 6
	Shape Attribute		MT 7
	Shape Coefficient		MT 8

	Sum Of Degrees		MT 9
	Sum Of Valence Degrees		MT 10
	Topological Diameter	Bonds	MT 11
	Total Connectivity		MT 12
	Total Valence Connectivity		MT 13
	Wiener Index		MT 14
Electronic descriptors	Heat of formation	kJ/mol	DE 1
	Total Energy	eV	DE 2
	Electronic Energy	eV	DE 3
	Core-core repulsion	eV	DE 4
	Cosmo Area	Å ²	DE 5
	Cosmo Volume	Å ³	DE 6
	Ionisation Potential	eV	DE 7
	Homo Energy	eV	DE 8
	Lumo Energy	eV	DE 9
	Dipole moment	debye	DE 10

Table S2: Chromatographic descriptors used in QSAR development. Chromatographic descriptors values for the 15 bisphenols are available in Excel file supplementary data.

Chromatographic descriptors			
Column / solvent	Chromatographic parameters	Units	Descriptor name
BEH C18 100*2.1 1.7 µm AcN	Width 5%	min	C18A 2
	Retention Factor /BPA		C18A 5
	Asymmetry		C18A 7
	Peak Tailing		C18A 8
CSH Phenyl hexyl 100*2.1 1.7 µm AcN	Width 5%	min	PHA 2
	Retention Factor /BPA		PHA 5
	Asymmetry		PHA 7
	Peak Tailing		PHA 8
CSH Fluoro Phenyl 100*2.1 1.7 µm ACN	Width 5%	min	FPA 2
	Retention Factor /BPA		FPA 5
	Asymmetry		FPA 7
	Peak Tailing		FPA 8
BEH C8 100*2.1 1.7 µm ACN	Width 5%	min	C8A 2
	Retention Factor /BPA		C8A 5
	Asymmetry		C8A 7
	Peak Tailing		C8A 8
BEH Phenyl 100*2.1 1.7	Width 5%	min	PA 2

µm ACN	Retention Factor /BPA		PA 5
	Asymmetry		PA 7
	Peak Tailing		PA 8
HSS T3 100*2.1 1.8 µm ACN	Width 5%	min	T3A 2
	Retention Factor /BPA		T3A 5
	Asymmetry		T3A 7
	Peak Tailing		T3A 8
raptor biphenyl 100*2.1 2.7 µm ACN	Width 5%	min	RBA 2
	Retention Factor /BPA		RBA 5
	Asymmetry		RBA 7
	Peak Tailing		RBA 8
HSS PFP 100*2.1 1.8 µm ACN	Width 5%	min	PFPA 2
	Retention Factor /BPA		PFPA 5
	Asymmetry		PFPA 7
	Peak Tailing		PFPA 8
BEH RP18 Shield 100*2.1 1.7 µm ACN	Width 5%	min	RPA 2
	Retention Factor /BPA		RPA 5
	Asymmetry		RPA 7
	Peak Tailing		RPA 8
HSS CYANO 100*2.1 1.8 µm ACN	Width 5%	min	CNA 2
	Retention Factor /BPA		CNA 5
	Asymmetry		CNA 7
	Peak Tailing		CNA 8
Force Biphenyl 100*2.1 1.8 µm ACN	Width 5%	min	FBA 2
	Retention Factor /BPA		FBA 5
	Asymmetry		FBA 7
	Peak Tailing		FBA 8
Raptor (Corshell) Biphenyl 100*2.1 1.8 µm ACN	Width 5%	min	RCBA 2
	Retention Factor /BPA		RCBA 5
	Asymmetry		RCBA 7
	Peak Tailing		RCBA 8
Cortecs C18 + (corshell)100*2.1 1.6 µm ACN	Width 5%	min	CC18A 2
	Retention Factor /BPA		CC18A 5
	Asymmetry		CC18A 7
	Peak Tailing		CC18A 8
BEH C18 100*2.1 1.7 µm MeOH	Width 5%	min	C18M 2
	Retention Factor /BPA		C18M 5
	Asymmetry		C18M 7
	Peak Tailing		C18M 8
CSH Phenyl hexyl	Width 5%	min	PHM 2

100*2.1 1.7 µm MeOH	Retention Factor /BPA		PHM 5
	Asymmetry		PHM 7
	Peak Tailing		PHM 8
CSH Fluoro Phenyl 100*2.1 1.7 µm MeOH	Width 5%	min	FPM 2
	Retention Factor /BPA		FPM 5
	Asymmetry		FPM 7
	Peak Tailing		FPM 8
BEH C8 100*2.1 1.7 µm MeOH	Width 5%	min	C8M 2
	Retention Factor /BPA		C8M 5
	Asymmetry		C8M 7
	Peak Tailing		C8M 8
BEH Phenyl 100*2.1 1.7 µm MeOH	Width 5%	min	PM 2
	Retention Factor /BPA		PM 5
	Asymmetry		PM 7
	Peak Tailing		PM 8
HSS T3 100*2.1 1.8 µm MeOH	Width 5%	min	T3M 2
	Retention Factor /BPA		T3M 5
	Asymmetry		T3M 7
	Peak Tailing		T3M 8
raptor biphenyl 100*2.1 2.7 µm MeOH	Width 5%	min	RBM 2
	Retention Factor /BPA		RBM 5
	Asymmetry		RBM 7
	Peak Tailing		RBM 8
HSS PFP 100*2.1 1.8 µm MeOH	Width 5%	min	PFPM 2
	Retention Factor /BPA		PFPM 5
	Asymmetry		PFPM 7
	Peak Tailing		PFPM 8
BEH RP18 Shield 100*2.1 1.7 µm MeOH	Width 5%	min	RPM 2
	Retention Factor /BPA		RPM 5
	Asymmetry		RPM 7
	Peak Tailing		RPM 8
HSS CYANO 100*2.1 1.8 µm MeOH	Width 5%	min	CNM 2
	Retention Factor /BPA		CNM 5
	Asymmetry		CNM 7
	Peak Tailing		CNM 8
Force Biphenyl 100*2.1 1.8 µm MeOH	Width 5%	min	FBM 2
	Retention Factor /BPA		FBM 5
	Asymmetry		FBM 7
	Peak Tailing		FBM 8
Raptor (Corshell)	Width 5%	min	RCBM 2

Biphenyl 100*2.1 1.8 μm MeOH	Retention Factor /BPA		RCBM 5
	Asymmetry		RCBM 7
	Peak Tailing		RCBM 8
Cortecs C18 + (corshell) 100*2.1 1.6 μm MeOH	Width 5%	min	CC18M 2
	Retention Factor /BPA		CC18M 5
	Asymmetry		CC18M 7
	Peak Tailing		CC18M 8

Table S3: Predicted clearance indices for the 15 bisphenols determined using three QSAR models based on either molecular descriptors, a combination of molecular and chromatographic descriptors or chromatographic descriptors. Leverage values were determined with R software package olsrr, leverage higher than threshold given by Olsrr were identified the asterisk. Predicted CI were compared with the observed clearance indices of the 15 bisphenols determined on five perfused human placentae.

Bisphenol	Observed CI	Molecular descriptors		Molecular and chromatographic descriptors		Chromatographic descriptors	
		Predicted CI	Leverage	Predicted CI	Leverage	Predicted CI	Leverage
33BPA	0.65	0.69	0.03	0.62	0.06	0.67	0.05
	0.82		0.03		0.05		0.04
	0.66		0.03		0.06		0.05
	0.73		0.03		0.06		0.04
	0.75		0.03		0.05		0.04
BP44	0.75	0.63	0.04	0.59	0.08	0.63	0.17
	0.78		0.04		0.08		0.16
	0.47		0.07		0.13		0.27*
	0.57		0.05		0.11		0.22*
	0.74		0.04		0.09		0.17
BPA	0.70	0.64	0.02	0.76	0.03	0.62	0.03
	0.85		0.02		0.03		0.03
	0.81		0.02		0.03		0.03
	0.85		0.02		0.03		0.03
	0.85		0.02		0.03		0.03
BPAF	0.42	0.49	0.24*	0.51	0.17	0.57	0.14
	0.49		0.21*		0.15		0.12
	0.60		0.17*		0.12		0.10
	0.54		0.19*		0.13		0.11
	0.57		0.18*		0.13		0.10
BPAP	0.48	0.39	0.01	0.63	0.07	0.60	0.04
	0.53		0.01		0.06		0.04
	0.62		0.01		0.05		0.03

	0.61		0.01		0.06		0.03
	0.61		0.01		0.06		0.03
BPB	0.71	0.64	0.02	0.74	0.04	0.83	0.10
	0.87		0.02		0.03		0.08
	0.88		0.02		0.03		0.08
	0.83		0.02		0.04		0.09
	0.92		0.02		0.03		0.08
BPBP	0.20	0.14	0.04	0.21	0.17	0.29	0.12
	0.24		0.04		0.14		0.10
	0.28		0.03		0.12		0.09
	0.24		0.04		0.14		0.10
	0.32		0.03		0.11		0.08
BPC	0.27	0.43	0.05	0.35	0.21*	0.33	0.16
	0.37		0.04		0.16		0.12
	0.46		0.03		0.13		0.09
	0.42		0.03		0.14		0.10
	0.44		0.03		0.13		0.10
BPE	0.54	0.63	0.03	0.77	0.06	0.69	0.10
	0.91		0.02		0.04		0.06
	0.70		0.03		0.05		0.08
	0.75		0.02		0.04		0.07
	0.53		0.03		0.06		0.11
BPF	0.71	0.63	0.03	0.61	0.12	0.77	0.07
	0.83		0.03		0.10		0.06
	0.70		0.03		0.12		0.07
	0.78		0.03		0.11		0.07
	0.46		0.05		0.18		0.11
BPFL	0.04	0.08	0.24*	0.06	0.29*	0.06	0.29*
	0.05		0.20*		0.23*		0.23*
	0.08		0.12		0.14		0.14
	0.06		0.16*		0.19		0.19*
	0.09		0.11		0.13		0.13
BPM	0.45	0.44	0.07	0.33	0.10	0.39	0.02
	0.19		0.16		0.25*		0.06
	0.53		0.06		0.09		0.02
	0.47		0.06		0.10		0.02
	0.57		0.05		0.08		0.02
BPP	0.49	0.43	0.06	0.50	0.10	0.32	0.01
	0.40		0.07		0.12		0.01
	0.41		0.07		0.12		0.01
	0.45		0.07		0.11		0.01
	0.51		0.06		0.10		0.01
BPS	0.07	0.08	0.23*	0.08	0.23*	0.08	0.23*

	0.07		0.23*		0.22*		0.23*
	0.10		0.16*		0.16		0.16
	0.07		0.23*		0.22*		0.23*
	0.10		0.16*		0.16		0.16
BPZ	0.21	0.54	0.04	0.40	0.13	0.32	0.11
	0.25		0.04		0.11		0.10
	0.44		0.02		0.06		0.05
	0.35		0.03		0.08		0.07
	0.34		0.03		0.08		0.07

Table S4: Molecular descriptors significantly describing the chromatographic descriptors selected in QSAR models based either on chromatographic parameters alone or both chromatographic and molecular. Significant molecular descriptors were identified using ANN model with chromatographic descriptors as output data, molecular descriptors with weight higher than twice the median were considered significant.

	Significant descriptors included in the model based on chromatographic descriptors						Significant chromatographic descriptors included in the model based on chromatographic + molecular descriptors			
	T3A 2	PFPA 7	CC18A 7	C8M 7	PFPM 7	CNM 8	C8A 2	RCBA 8	PFPM 2	PFPM 7
Molecular weight										
Boiling Point										
Critical Pressure	X									
Critical Temperature	X							X	X	
Critical Volume										
Gibbs Free Energy			X							
Heat Of Formation	X									
Henry's Law constant	X	X	X			X	X	X	X	
Ideal Gas Thermal Capacity										
logP						X				
Melting Point								X		
Mol Refractivity										
Log P Viswanadhan's fragmentation	X					X				
Log P Broto's fragmentation										
MR Crippen's fragmentation										
MR Viswanadhan's fragmentation										
Connolly Accessible Area										
Connolly Molecular Area	X				X		X	X	X	X
Connolly Solvent Excluded	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Volume										
Number of HBond Acceptors										
Mol Refractivity	X									
Partition Coefficient										
Log P	X					X				
Log S	X									
pKa1		X								
pKa2			X							
Balaban Index										
Cluster Count	X	X		X					X	
Molecular Topological Index										
Num Rotatable Bonds										
Polar Surface Area	X	X	X	X	X		X	X	X	X
Radius							X			
Shape Attribute										
Shape Coefficient									X	
Sum Of Degrees										
Sum Of Valence Degrees						X				
Topological Diameter			X				X			
Total Connectivity	X								X	
Total Valence Connectivity	X								X	
Wiener Index										
Heat of formation	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Total Energy	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Electronic Energy										
Core-core repulsion										
Cosmo Area	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cosmo Volume										
Ionisation Potential	X	X	X	X	X			X		X
Homo Energy			X		X					X
Lumo Energy		X	X	X	X	X		X		X
Dipole moment	X		X							

