

Université de Montréal

Étude du métabolisme et de la toxicocinétique des dérivés chlorés du Bisphénol  
A (Cl<sub>x</sub>BPA) chez le rat et l'humain

Par

Noémie PLATTARD

Département de santé environnementale et santé au travail, École de Santé Publique de  
l'Université de Montréal (ESPUM)

Faculté de Médecine

Thèse réalisée en cotutelle avec l'École doctorale Rosalind Franklin à l'Université de Poitiers,  
présentée vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D)  
en santé publique option toxicologie et analyse du risque

Août 2022

©Noémie PLATTARD, 2022

Université de Montréal

Département de santé environnementale et santé au travail / École de santé publique de

l'Université de Montréal

---

*Cette thèse intitulée*

**Étude du métabolisme et de la toxicocinétique des dérivés chlorés du Bisphénol A  
(Cl<sub>x</sub>BPA) chez le rat et l'humain**

Présentée par

**Noémie PLATTARD**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Nolwenn Noisel**

Président-rapporteur

**Sami Haddad**

Directeur de recherche

**Nicolas Venisse**

Codirecteur

**Jérôme Lavoué**

Membre du jury

**Véronique Gayrard**

Examineur externe

**Jean-Lou Dorne**

Examineur externe

## Résumé

Les dérivés chlorés du Bisphénol A ( $\text{Cl}_x\text{BPA}$ ) sont des polluants émergents qui possèdent des effets perturbateurs endocriniens. Lors du traitement de l'eau potable par chloration, le Bisphénol A (BPA) présent dans l'environnement peut réagir avec les molécules de chlore pour former des dérivés chlorés ( $\text{ClBPA}$ ,  $\text{Cl}_2\text{BPA}$ ,  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  et  $\text{Cl}_4\text{BPA}$ ) ou  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ . Ils sont présents dans divers milieux aquatiques tels que eaux usées et l'eau potable. Ces polluants émergents ont également été retrouvés chez l'humain, dans l'urine, le colostrum et le tissu placentaire. Dans une étude transversale, la présence de concentrations urinaires élevées de  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  chez l'humain a été positivement associée au diabète de type 2. Les  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  ont aussi été associés à l'obésité et à l'infarctus du myocarde.

Dans la littérature, il n'existait que très peu de données sur la toxicocinétique des  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  chez l'animal ou chez l'humain. Cette recherche doctorale vise à évaluer le risque lié à ces polluants émergents en déterminant les constantes métaboliques des  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ , puis en élaborant une méthode analytique des métabolites du 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$  par HPLC-MS/MS pour finalement valider un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) chez l'animal.

Dans un premier temps, les constantes métaboliques ( $K_m$ ,  $V_{\max}$  et la clairance intrinsèque) ont été déterminées à l'aide d'expérience *in vitro* avec des hépatocytes de rats et d'humain. Les essais ont révélé que les constantes métaboliques des  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  peuvent varier considérablement en fonction des substances et des espèces. Ces expériences *in vitro* ont montré que la chloration avait un impact sur la clairance intrinsèque hépatique des  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  chez les rats et les humains.

Deuxièmement, nous avons développé une méthode analytique pour les métabolites du 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$  par HPLC-MS/MS dans le plasma à l'Université de Poitiers. Nous avons pu valider cette méthode avec des échantillons de rats et d'humain. Les résultats ont montré que chez le rat Sprague-Dawley après administration i.v., le 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ -glucuronide est largement présent par rapport au 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ -sulfate. Pour l'humain, seul le 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ -G-d<sub>12</sub> a été quantifié.

Finalement, nous avons utilisé des méthodes *in vitro* (dialyse à l'équilibre) et *in silico* pour les paramètres physico-chimiques de chaque  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ . Enfin, nous avons construit des modèles PBPK afin de simuler la pharmacocinétique i.v. chez le rat Sprague-Dawley pour

chaque dérivé chloré. Deux modèles PBPK ont été développés : un avec le ClBPA, le Cl<sub>2</sub>BPA et le Cl<sub>3</sub>BPA versus le Cl<sub>4</sub>BPA avec un modèle à diffusion limitée. Il a été validé par une expérience *in vivo* sur 80 rats Sprague-Dawley. Le modèle calibré a prédit les concentrations mesurées des Cl<sub>x</sub>BPA dans le plasma, le cerveau et les muscles après l'administration de 4 et 40 mg/kg pour ClBPA et Cl<sub>2</sub>BPA; 0,4 et 4 mg/kg pour Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA.

Ce projet doctoral a contribué à 1) déterminer les constantes métaboliques (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>, Clairance intrinsèque) des Cl<sub>x</sub>BPA, 2) de développer et valider une méthode analytique par HPLC-MS/MS des métabolites du Cl<sub>2</sub>BPA dans le plasma animal et humain et 3) de valider deux modèles PBPK chez le rat afin de connaître la distribution plasmatique et tissulaire des Cl<sub>x</sub>BPA.

**Mots-clés :** Dérivés chlorés du bisphénol A (Cl<sub>x</sub>BPA), métabolisme, toxicocinétique, perturbateurs endocriniens, modélisation toxicocinétique à base physiologique, PBPK, santé publique.



## Abstract

Chlorinated derivatives of Bisphenol A ( $\text{Cl}_x\text{BPA}$ ) are emerging pollutants with endocrine disrupting effects. During the treatment of drinking water by chlorination, Bisphenol A (BPA) present in the environment can react with chlorine molecules to form chlorinated derivatives ( $\text{ClBPA}$ ,  $\text{Cl}_2\text{BPA}$ ,  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  and  $\text{Cl}_4\text{BPA}$ ) or  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ . They are present in various aquatic environments such as wastewater and drinking water. These emerging pollutants have also been found in humans, in urine, colostrum and placental tissue. In a cross-sectional study, high urinary  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  levels in humans were positively associated with type 2 diabetes.  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  has also been associated with obesity and myocardial infarction.

In the literature, there was very limited data on the toxicokinetics of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  in animals or in humans. This doctoral research aims to assess the risk related to these emerging pollutants by determining the metabolic constants of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  and then developing an analytical method for 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$  metabolites by HPLC-MS/MS to validate a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model in animals.

First, metabolic constants ( $K_m$ ,  $V_{max}$ , and intrinsic clearance) were determined using *in vitro* experiments with rat and human hepatocytes. The tests revealed that the metabolic constants of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  can vary considerably between substances and species. These *in vitro* experiments showed that chlorination impacted the intrinsic hepatic clearance of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  in rats and humans.

Second, we developed an analytical method for 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$  metabolites by HPLC-MS/MS in plasma at the University of Poitiers. We were able to validate this method with rat and human samples. The results demonstrated that in Sprague-Dawley rats after an i.v. administration, 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ -glucuronide is largely present compared to 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ -sulfate. For humans, only 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ -G-d<sub>12</sub> was quantified.

Finally, we used *in vitro* (equilibrium dialysis) and *in silico* methods for the physicochemical parameters of each  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ . Finally, we constructed PBPK models to simulate the i.v. pharmacokinetics in Sprague-Dawley rats for each chlorinated derivative. Two PBPK models were developed: one with  $\text{ClBPA}$ ,  $\text{Cl}_2\text{BPA}$  and  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  versus  $\text{Cl}_4\text{BPA}$  with a diffusion-limited model. It was validated by an *in vivo* experiment on 80 Sprague-Dawley rats. The calibrated model predicted measured  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  concentrations in plasma, brain, and muscle after

administration of 4 and 40 mg/kg for ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA: 0.4 and 4 mg/kg for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA.

This doctoral project contributed to 1) determine the metabolic constants ( $K_m$ ,  $V_{max}$ , Intrinsic Clearance) of Cl<sub>x</sub>BPA, 2) develop and validate an analytical method by HPLC-MS/MS of Cl<sub>2</sub>BPA metabolites in animal and human plasma and 3) validate two PBPK models in rats to understand the plasma and tissue distribution of Cl<sub>x</sub>BPA.

**Keywords:** Chlorinated derivatives of bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA), endocrine disruptors, physiologically based toxicokinetic modeling, toxicokinetics, public health.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	14
Liste des figures.....	16
Liste des sigles et abréviations.....	19
Remerciements.....	22
Chapitre 1: Introduction Générale.....	25
1 Mise en contexte.....	25
1.1 Contexte et justification de la recherche doctorale.....	26
1.2 État des connaissances.....	30
1.2.1 Niveaux et sources d'exposition aux Cl <sub>x</sub> BPA.....	30
1.2.1.1 Sources d'exposition aux Cl <sub>x</sub> BPA.....	30
1.2.1.2 Niveaux d'exposition chez l'humain.....	37
1.3 Effets toxiques des dérivés chlorés du BPA (Cl <sub>x</sub> BPA) rapportés dans la littérature.....	41
1.3.1 Études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	41
1.3.2 Études épidémiologiques.....	43
1.4 Mécanismes d'action possibles des Cl <sub>x</sub> BPA.....	46
1.5 Toxicocinétique des Cl <sub>x</sub> BPA reportée dans la littérature.....	48
1.5.1 Absorption.....	48
1.5.1.1 Par voie orale.....	48
1.5.1.2 Par contact cutané.....	48
1.5.1.3 Par inhalation.....	49
1.5.2 Distribution.....	49
1.5.3 Métabolisme.....	51
1.5.4 Excrétion.....	52
1.6 Lacunes dans les écrits.....	53
1.7 Problématique de la recherche doctorale.....	54
1.8 Objectifs de la recherche doctorale.....	56

1.8.1	Objectif général.....	56
1.8.2	Objectifs spécifiques.....	56
1.9	Organisation de la thèse.....	57
Chapitre 2	– Méthodologie de la recherche doctorale.....	59
2	Méthodes d'étude.....	59
2.1	Choix des substances.....	60
2.2	Modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK).....	61
2.2.1	Généralités sur les modèles PBPK et leur utilisation.....	61
2.2.2	Représentation du modèle PBPK des Cl <sub>x</sub> BPA chez le rat Sprague-Dawley ....	68
2.3	Caractérisation <i>in vitro</i> du métabolisme.....	71
2.4	Caractérisation de la distribution.....	73
2.4.1	Mesures <i>in vitro</i> .....	73
2.4.2	Estimations <i>in silico</i> .....	75
2.5	Expositions <i>in vivo</i> et toxicocinétique animale et humaine.....	76
2.5.1.1	Étude d'exposition intraveineuse des Cl <sub>x</sub> BPA chez le rat Sprague-Dawley	77
2.5.1.2	Étude clinique chez l'humain présente dans l'article 2.....	77
2.6	Analyses chimiques.....	78
2.6.1	Principe général de la HPLC-MS/MS.....	78
2.6.2	Matériel utilisé.....	80
2.6.3	Conditions chromatographiques.....	81
2.6.4	Conditions d'extraction chez l'animal.....	82
2.6.4.1	Extraction plasmatique.....	82
2.6.4.2	Extraction tissulaire.....	82
Chapitre 3	– Article 1.....	84
3	Article 1. Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl <sub>x</sub> BPA) and interspecies differences between rats and humans.....	84
3.1	Contribution de l'étudiante et des co-auteurs.....	85
3.2	Résumé.....	86
3.3	Abstract.....	87
3.4	Introduction.....	88
3.5	Materials and Methods.....	89

3.5.1	Chemicals and Materials.....	89
3.5.2	<i>In vitro</i> metabolism assays in hepatocytes suspension .....	90
3.5.3	Equilibrium dialysis and determination of unbound fraction in incubation media of Cl <sub>x</sub> BPA .....	91
3.5.4	Quantification of Cl <sub>x</sub> BPA and their metabolites.....	92
3.5.4.1	Cl <sub>x</sub> BPA with UHPLC-MS/MS quantification.....	92
3.5.4.2	Peak area of metabolite samples with UHPLC-MS/MS method .....	93
3.5.5	Data Analysis .....	93
3.6	Results.....	94
3.7	Discussion.....	96
3.8	Acknowledgment .....	100
3.9	Authorship Contributions .....	100
3.10	Declaration of interest statement .....	100
3.11	Funding.....	100
3.12	References.....	101
3.13	Supplementary materials.....	110
Chapitre 4 – Article 2.....		116
4	Article 2. Quantification of conjugated forms of dichlorobisphenol A (3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA) in rat and human plasma using HPLC-MS/MS assay .....	116
4.1	Contribution de l'étudiante et des co-auteurs .....	117
4.2	Résumé.....	118
4.3	Abstract.....	120
4.4	Introduction.....	121
4.5	Materials and methods .....	124
4.5.1	Chemicals and reagents.....	124
4.5.2	Preparation of stock solutions, working standard solutions, calibration standards, and quality control .....	124
4.5.3	Sample preparation .....	125
4.5.4	Liquid chromatography.....	125
4.5.5	Mass spectrometry .....	125
4.5.6	Method optimization.....	126

4.5.7	Method validation .....	126
4.5.8	Method application .....	127
4.6	Results.....	129
4.6.1	LC-MS/MS conditions and optimization.....	129
4.6.2	Method validation.....	131
4.6.2.1	Selectivity .....	131
4.6.2.2	Precision and Trueness .....	131
4.6.2.3	Linearity and intercept .....	132
4.6.2.4	Recovery and matrix effect.....	132
4.6.3	Method application .....	133
4.7	Discussion and conclusion.....	135
4.8	Conclusion .....	138
4.9	Contributors .....	139
4.10	Acknowledgment .....	139
4.11	Declaration of interest statement .....	139
4.12	Funding.....	139
4.13	References.....	140
4.14	Supplementary materials.....	144
Chapitre 5 – Article 3.....		151
5	Article 3. Distribution of chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl <sub>x</sub> BPA) in plasma and tissues using physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK) for Sprague-Dawley rat	151
5.1	Contribution de l'étudiante et des co-auteurs .....	152
5.2	Résumé.....	153
5.3	Abstract.....	154
5.4	Introduction.....	155
5.5	Materials and Methods.....	157
5.5.1	Chemicals and reagents.....	157
5.5.2	Animals .....	158
5.5.3	Extraction from plasma.....	158
5.5.4	Extraction from tissues .....	159

5.5.5	Model representation .....	160
5.5.6	Model parametrization .....	162
5.5.6.1	Physiological parameters .....	162
5.5.6.2	Physico-chemical parameters.....	162
5.5.6.2.1	Determination of plasma protein binding ( $F_{up}$ ), plasma: buffer and blood: plasma partition (BPR) coefficient .....	162
5.5.6.2.2	Determination of tissues: plasma partition coefficients.....	164
5.5.6.3	Metabolic constants <i>in vitro</i> .....	165
5.5.7	Quantification methods.....	165
5.5.7.1	$Cl_x$ BPA with HPLC/FLD quantification for physico-chemical parameters	165
5.5.7.2	$Cl_x$ BPA with an HPLC-MS/MS quantification for rat tissues.....	166
5.5.8	Extrapolation <i>in vitro-in vivo</i> for metabolism.....	167
5.5.9	Model simulation and calibration .....	168
5.6	Results.....	169
5.6.1	Overview of the kinetic data from <i>in vivo</i> study.....	169
5.6.2	Estimation of parameters .....	173
5.6.3	Model calibration .....	174
5.6.3.1	Simulation of plasma concentrations for $Cl_x$ BPA .....	174
5.6.3.2	Simulation of brain concentrations for $Cl_x$ BPA.....	178
5.6.3.3	Simulation of muscles concentrations for $Cl_x$ BPA.....	181
5.7	Discussion .....	184
5.8	Conclusion .....	189
5.10	Acknowledgment .....	192
5.11	Declaration of interest statement .....	192
5.12	Funding.....	192
5.13	References.....	193
5.14	Supplementary materials.....	198
Chapitre 6 – Intégration et synthèse.....		206
6	Discussion Générale.....	206
6.1	Lien entre les trois articles de la thèse .....	207
6.2	Approche méthodologique du projet de thèse .....	208

6.3	Principaux résultats novateurs de cette thèse.....	212
6.4	Limites des travaux de la thèse .....	217
6.5	Perspectives de recherche découlant du projet doctoral .....	220
Chapitre 7 – Conclusion.....		223
7	Portée de ce projet doctoral et conclusion .....	223
7.1	Portée de ce projet doctoral.....	224
7.2	Conclusion .....	226
Références bibliographiques.....		227
8	Annexe 1 .....	244
An overview of the literature on emerging pollutants: Chlorinated derivatives of bisphenol A (Cl <sub>x</sub> BPA).....		244
8.1	Contribution de l'étudiante et des co-auteurs .....	245
8.2	Résumé.....	246
8.3	Abstract.....	247
8.4	Introduction.....	248
8.5	Literature search.....	250
8.6	Levels and sources of exposure to Cl <sub>x</sub> BPA .....	252
8.6.1	Sources of exposure to Cl <sub>x</sub> BPA .....	252
8.6.2	Exposure levels .....	258
8.7	Toxic effects of chlorinated derivatives of BPA (Cl <sub>x</sub> BPA) reported in the literature 262	
8.7.1	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> studies .....	262
8.7.2	Epidemiological studies .....	263
8.8	Possible mechanisms of action of chlorinated derivatives of BPA .....	266
8.9	Toxicokinetics of chlorinated derivatives of BPA reported in the literature (ADME) 268	
8.9.1	Absorption.....	268
8.9.1.1	Orally .....	268
8.9.1.2	By dermal route.....	268
8.9.1.3	By inhalation.....	269
8.9.2	Distribution .....	269



8.9.3	Metabolism .....	271
8.9.4	Excretion .....	272
8.10	Discussion and conclusion .....	273
8.11	Funding .....	277
8.12	Acknowledgment .....	277
8.13	References .....	278
9	Annexe 2 : Certificat d'éthique animal .....	293
10	Annexe 3 : Certificat d'éthique humaine .....	295
11	Annexe 4 : Autres contributions réalisées durant et en lien avec les études doctorales 305	
11.1	Exposés lors de congrès, conférences .....	305
11.2	Bourses et distinctions .....	305

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Niveau d'exposition des dérivés chlorés du BPA (Cl <sub>x</sub> BPA) dans les tissus et matrices humains (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1) .....	39
Tableau 2 : Études épidémiologiques des Cl <sub>x</sub> BPA (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1) .....	45
Tableau 3 : Valeurs d'IC50 de la liaison compétitive du 17β-estradiol, du BPA et des dérivés chlorés du BPA aux ERα et ERβ chez l'humain (Adapté de (Takemura et al., 2005)). Les valeurs de l'IC50 représentent la concentration de composé à tester nécessaire pour réduire de 50 % la liaison du 17-beta-(3H) -estradiol, l'hormone stéroïde féminine naturelle.....	47
Tableau 4 : Descriptive table of MS/MS parameters of ClBPA-G, ClBPA-S, Cl <sub>2</sub> BPA-G, Cl <sub>2</sub> BPA-S, Cl <sub>4</sub> BPA-G, Cl <sub>4</sub> BPA-S: retention time (min), precursor ions (m/z) and MS/MS optimization conditions (declustering potential DP and collision energy). .....	104
Tableau 5 : Kinetics parameters of metabolism of Bisphenol A in hepatocytes of rats and humans, BPAG, BPAS and BPA adapted from Kurebayashi et al. (2010).....	105
Tableau 6 : Summary table of metabolic constants data (estimated values [with 95% confidence bounds].) in Sprague-Dawley rats and humans for all Cl <sub>x</sub> BPA. ....	106
Tableau 7 : Peak area for 3 of Cl <sub>x</sub> BPA: ClBPA; Cl <sub>2</sub> BPA and Cl <sub>4</sub> BPA for 25 ng. mL <sup>-1</sup> to compare the proportion of metabolites between Sprague-Dawley rats and humans with a UHPLC-MS/MS method. ....	107
Tableau 8 : Kinetic parameters of metabolism of Bisphenol A in hepatocytes of rats and humans (in nmol), BPAG, BPAS and BPA adapted from Kurebayashi et al. (2010). ....	114
Tableau 9 : Summary table of metabolic constants data (estimated values [with 95% confidence bounds]) in Sprague-Dawley rats and humans for all Cl <sub>x</sub> BPA in nmol. ....	115
Tableau 10. Descriptive table of MS/MS parameters of 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G, 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S, 3,3'- Cl <sub>2</sub> BPA-glucuronide-d <sub>12</sub> : retention time (min), precursor ions (m/z) and MS/MS optimization conditions (declustering potential, DP; entrance potential, EP; collision energy, CE; collision cell exit potential, CXP) for each analyte. The values for CE and CXP are presented for quantification and confirmation ions respectively. ....	130
Tableau 11. 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G and 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S concentrations measured in Sprague-Dawley rat (n=2) for a 2.85 mg/kg IV dose at 2 different times.....	134
Tableau 12. 3,3'- Cl <sub>2</sub> BPA-G-d <sub>12</sub> concentrations measured in human samples (n=2) for a 0.05 mg/kg administered by cutaneous or oral route at 2 different times. ....	134
Tableau 13 : Chemical structure of 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA -glucuronide and 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA -sulfate. ....	144

Tableau 14. Intra and inter-day accuracy and precision for each analyte in human plasma samples at each level of QC (n=5).....	146
Tableau 15 : Quality control (QCs) prepared in Sprague-Dawley rat plasma (n =5) and analyzed with a human calibration curve .....	148
Tableau 16 : Mean ( $\pm$ SD) slope, correlation coefficient ( $r^2$ ) and y-intercept of calibration curves prepared with blank plasma samples (n = 5).....	149
Tableau 17 : Determination of matrix effect: IS-normalized MF, mean (+/- SD) and CV (%) in plasma samples at low and high concentration levels for each analyte (n =5).....	150
Tableau 18 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for ClBPA provided by the <i>in vivo</i> study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 4 and 40 mg/kg. ....	171
Tableau 19 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for Cl <sub>2</sub> BPA provided by the <i>in vivo</i> study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 4 and 40 mg/kg. ....	171
Tableau 20 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for Cl <sub>3</sub> BPA provided by the <i>in vivo</i> study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 0.4 and 4 mg/kg. ....	172
Tableau 21 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for Cl <sub>4</sub> BPA provided by the <i>in vivo</i> study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 0.4 and 4 mg/kg. ....	172
Tableau 22 : Plasma protein binding ( $F_{up}$ ) and in silico tissues/serum distribution ratios in Sprague-Dawley rats (Poulin et al., 2012; Waters et al., 2008; Ye et al., 2017). ....	174
Tableau 23 : Physiological model parameters for adults Sprague-Dawley rats.....	190
Tableau 24 : Chemical specific model parameters for Sprague-Dawley rat.....	191
Tableau 25 : Physiological Input Parameters Used in the Tissue-Composition-Based Models for rats from Rodgers and Rowland (2005), Poulin and Krishnan (1996a,b) (Poulin et al., 1996a, 1996b; Rodgers.T, 2005).....	198
Tableau 26 : Cl <sub>x</sub> BPA doses analyzed for Sprague-Dawley rats by HPLC-MS/MS.....	199
Tableau 27 : Chemical specific model parameters for Sprague-Dawley rat to obtain hepatic clearance for all Cl <sub>x</sub> BPA (L/h).....	200
Tableau 28 : Exposure levels of chlorinated derivatives of BPA (Cl <sub>x</sub> BPA) in human tissue and matrices .....	260
Tableau 29 : Epidemiological studies of chlorinated derivatives of BPA (Cl <sub>x</sub> BPA).....	265
Tableau 30 : The IC <sub>50</sub> values of the competitive binding of 17 $\beta$ -estradiol, BPA and chlorinated BPA to human ER $\alpha$ and ER $\beta$ (Adapted from (Takemura et al., 2005))......	267

## Liste des figures

Figure 1 : Réaction entre le BPA et l'hypochlorite de sodium (NaOCl) (Hu et al., 2002) et tiré de Plattard et al, (2021) ; annexe 1).....	28
Figure 2 : Structures moléculaires de ClBPA, 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA, 3,5-Cl <sub>2</sub> BPA, Cl <sub>3</sub> BPA et Cl <sub>4</sub> BPA (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1).....	30
Figure 3 : Schéma conceptuel de l'exposition aux dérivés chlorés du BPA (Cl <sub>x</sub> BPA) (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1).....	36
Figure 4 : Représentation schématique de la structure d'un modèle PBPK pour le Bisphénol A (BPA) chez le rat Sprague-Dawley nouveau-né et adulte (Yang et al., 2013). TRP = Tissus Richement Perfusés et TPP = Tissus Pauvrement Perfusés. ....	62
Figure 5 : Représentation fonctionnelle d'une équation différentielle pour un compartiment donné.....	63
Figure 6 : Représentation de la distribution du composé dans un organe à perfusion limitée (A) et un organe à diffusion limitée (B). C représente les concentrations dans, respectivement, l'artère (C <sub>A</sub> ), le tissu (C <sub>T</sub> ), la veine (C <sub>v</sub> ), l'espace extracellulaire (C <sub>E,T</sub> ) et intracellulaire (C <sub>I,T</sub> ), V <sub>T</sub> correspond au volume tissulaire et PA <sub>T</sub> au coefficient de perméabilité entre les deux sous compartiments. ....	65
Figure 7 : Les différentes étapes de construction et de développement d'un modèle PBPK (tiré de (Brochot.C et al.)).....	67
Figure 8. Représentation conceptuelle du modèle toxicocinétique à base physiologique chez les rats Sprague-Dawley pour le ClBPA, le Cl <sub>2</sub> BPA et le Cl <sub>3</sub> BPA, adapté du modèle PBPK du BPA de Yang et al. (2013). Les Cl <sub>x</sub> BPA ont été administrés par voie intraveineuse à des rats adultes. Pour le Cl <sub>4</sub> BPA, un modèle à diffusion limitée a été réalisé pour une meilleure prédiction des concentrations tissulaires. ...	70
Figure 9. Appareil de dialyse à l'équilibre rapide (A) et cellule de dialyse individuelle (B) provenant de l'article de Waters et al. (2008). ....	74
Figure 10 : Photographie de la HPLC-MS/MS utilisée au laboratoire à Poitiers.....	79
Figure 11 : schéma d'une analyse par HPLC.....	80
Figure 12 : Principe de fonctionnement du mode MRM.....	81
Figure 13 : Kinetics metabolism of monochlorobisphenol A (ClBPA) in Sprague-Dawley rats vs humans .....	108
Figure 14 : Kinetics metabolism of 3,3'-dichlorobisphenol A (Cl <sub>2</sub> BPA) in Sprague-Dawley rats vs humans.....	108
Figure 15 : Kinetics metabolism of trichlorobisphenol A (Cl <sub>3</sub> BPA) in Sprague-Dawley rats vs humans .....	109

Figure 16 : Kinetics metabolism of tetrachlorobisphenol A (Cl <sub>4</sub> BPA) in Sprague-Dawley rats vs humans. .....	109
Figure 17. Examples of chromatograms obtained for medium quality control (0.391 ng/mL for 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G and 6.25 ng/mL for 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S) in human plasma samples. ....	131
Figure 18 : Examples of chromatogram obtained for blank human plasma sample: 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G and 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S .....	145
Figure 19: Examples of chromatograms corresponding to the lower limit of quantification (LLOQ): lowest standard prepared in blank human plasma at 0.006 ng/mL for 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G and 0.391 ng/mL for 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S. ....	147
Figure 20. Conceptual representation of the physiologically based toxicokinetic model in Sprague-Dawley rats for ClBPA, Cl <sub>2</sub> BPA and Cl <sub>3</sub> BPA adapted from the PBPK model of BPA of Yang et al. (2013). Cl <sub>x</sub> BPA is given intravenously doses to adult's rats. For Cl <sub>4</sub> BPA, a diffusion-limited model was made for a better prediction of tissue concentrations. ....	161
Figure 21 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for ClBPA for 4 and 40 mg/kg during 24h .....	176
Figure 22 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for Cl <sub>2</sub> BPA at 4 and 40 mg/kg during 24h .....	176
Figure 23 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for Cl <sub>3</sub> BPA at 0.4 and 4 mg/kg during 24h .....	177
Figure 24 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for Cl <sub>4</sub> BPA at 0.4 and 4 mg/kg during 24h .....	177
Figure 25 : Time-profile in log-scale of brain concentration for ClBPA for 4 and 40 mg/kg during 24h .....	179
Figure 26 : Time-profile in log-scale of brain concentration for Cl <sub>2</sub> BPA for 4 and 40 mg/kg during 24h .....	179
Figure 27 : Time-profile in log-scale of brain concentration for Cl <sub>3</sub> BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h .....	180
Figure 28 : Time-profile in log-scale of brain concentration for Cl <sub>4</sub> BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h .....	180
Figure 29 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for ClBPA for 4 and 40 mg/kg during 24h .....	182
Figure 30 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for Cl <sub>2</sub> BPA for 4 and 40 mg/kg during 24h.....	182

Figure 31 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for Cl <sub>3</sub> BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h .....	183
Figure 32 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for Cl <sub>4</sub> BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h .....	183
Figure 33. Reaction between BPA and sodium hypochlorite (NaOCl) (Hu et al., 2002) .....	250
Figure 34. Search strategy that shows the various steps of selection, identification, and inclusion/exclusion until the final list.....	251
Figure 35. Molecular structures of ClBPA, 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA, 3,5-Cl <sub>2</sub> BPA, Cl <sub>3</sub> BPA and Cl <sub>4</sub> BPA.....	252
Figure 36. Conceptual diagram of exposure to chlorinated derivatives of BPA (Cl <sub>x</sub> BPA) .....	257

## Liste des sigles et abréviations

ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
BPR	Coefficient de partage sang : plasma
BPA	Bisphénol A
Cl <sub>x</sub> BPA	Dérivés chlorés du Bisphénol A
C <sub>max</sub>	Concentration sanguine maximale
CReSP	Centre de Recherche en Santé Publique
EfOM	Solution de matière organique
ESRD	Insuffisance rénale terminale
FCP	Papiers en contact avec les aliments
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LOD	Limite de Détection
LogP <sub>ow</sub>	Coefficient de partage octanol/eau
LOQ	Limite de Quantification
NCS	Sérum de nouveau-né
OL-HDF	Hemodiafiltration en ligne
PBPK	Modèle Toxicocinétique à Base Physiologique
PC	Coefficients de partage
PE	Perturbateurs endocriniens
RXR	Récepteurs X des rétinoïdes

WME Milieu William E (type de milieu de culture)

WWTPs Stations de traitement des eaux usées



« Quand le dernier arbre aurait été abattu, quand la dernière rivière  
aura été empoisonnée, quand le dernier poisson aura été pêché, alors  
on saura que l'argent ne se mange pas »

Geronimo

## Remerciements

Après 3 ans d'école maternelle, 5 ans d'école primaire, 5 ans de collège dont un redoublement, 5 ans d'école d'ingénieur et presque 4 ans de doctorat en cotutelle de thèse, je peux enfin dire que mes études sont terminées (encore un MBA, et ce sera vraiment fini!). Cette thèse représente le fruit de 4 années de travail toujours très intéressant. Bien que mon nom soit celui de la page de couverture, cette thèse est pour moi la représentation même d'un très beau travail d'équipe outre-Atlantique. Cette cotutelle de thèse fut pour moi un enrichissement professionnel et personnel très stimulant. C'est grâce à l'implication, professionnelle ou personnelle, d'un bon nombre de personnes sympathiques et stimulantes que je peux aujourd'hui être fière de ce document, qui je l'espère, saura contribuer humblement à l'avancée de la toxicologie.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Sami Haddad, mon directeur de thèse canadien. Sami Haddad a été un directeur encourageant et rigoureux. Il a su m'épauler dans les moments les plus difficiles de ce doctorat. Je le remercie pour son aide précieuse, sa supervision, son attitude positive, sa flexibilité et son sens de l'écoute. Je le remercie pour m'avoir encadré tout au long de ce doctorat, et de m'avoir prodigué des conseils avisés afin que je réussisse au mieux ce programme. Merci pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Je remercie également très chaleureusement Nicolas Venisse, mon co-directeur de thèse français. Nicolas Venisse a été un codirecteur rigoureux et précis. Sa disponibilité, sa sollicitude et sa confiance en moi ont été des motifs de persévérance durant ce cheminement doctoral. Mon année de cotutelle de thèse à Poitiers (09/2020-09/2021) a été pour moi un excellent souvenir et Nicolas Venisse m'a apporté tout le soutien nécessaire à la réussite de celle-ci.

Une thèse comporte évidemment beaucoup de travail d'équipe. Pour le côté canadien, je tiens à remercier tout d'abord Badr El Aroussi, agent de recherche de Sami Haddad pour son aide précieuse et Marc Mantha, technicien de laboratoire de Michèle Bouchard pour son écoute et son soutien moral. Je suis aussi reconnaissante aux professeurs (Michèle Bouchard, Mathieu

Valcke, Nolwenn Noisel, Jérôme Lavoué, Maximilien Debia, Maryse Bouchard, Marc-André Verner), à mes collègues (Sarah, Michel, Marc, Jairo, Sandra, Elham, Zeineb, Maryam et tant d'autres!) et membres du personnel du DSEST, ainsi que du programme doctoral de l'ESPUM qui ont enrichi mon passage dans ce programme. Je tiens aussi à remercier tout le personnel de la division des animaleries de l'UdeM pour son soutien et son aide technique lors des expositions animales.

Pour le côté français, je tiens à remercier tout d'abord Pascale-Pierre Eugène, technicienne au laboratoire à l'Université de Poitiers pour sa participation au projet, aux excellentes stagiaires et maintenant amies que j'ai pu superviser pendant leur stage de fin d'étude : Riciga et Aida, à Julien et Alexis, pour nos conversations enrichissantes, aux personnes que j'ai pu côtoyer à la Vie la Santé notamment Ophélie, aux corps professorales de l'Inserm CIC 1402 (Virginie Migeot, Pascal Carato, Antoine Dupuis, Sandrine Lefeuvre, Marion Albouy). Merci de m'avoir fait bénéficier de votre rigueur scientifique, de votre sympathie et de votre chaleur humaine.

Le doctorat est une expérience épanouissante et parfois éprouvante parsemé de doutes. Lors de mes périodes de doutes, j'ai toujours pu compter sur mon conjoint, mon meilleur ami et mon partenaire de vie depuis 5 ans maintenant, Raoul. Ton amour, ta grande sensibilité et ta patience ont éclairé les jours sombres. Merci pour ta compréhension, ton soutien et sur nos discussions existentielles sur les sens des mots « avenir », « profiter de la vie » et « investissements ». Je suis chanceuse de t'avoir rencontré et de partager ma vie avec toi. Je tiens également à remercier ma famille, mes parents, mes grands-parents, mes cousins/es, merci de votre soutien sans faille à 6 000 km de distance. Je remercie aussi ma France, le pays qui m'a vu grandir et qui fait de moi une partie de ce que je suis aujourd'hui.

Je n'aurais pas pu me consacrer aussi intensément à ce projet sans le soutien financier de nombreux partenaires. Tout d'abord, je tiens tout particulièrement à remercier mes deux directeurs de thèse : Sami Haddad et Nicolas Venisse à travers leur subvention de recherche de l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Merci à la Fondation Poitiers Université et au ministère de l'Éducation du Québec

(MEES) pour ses généreuses bourses de mobilité dans le cadre de ma cotutelle de thèse. Un très grand merci aux donateurs de la bourse d'excellence Rosdev qui a souligné ma persévérance dans mon parcours universitaire. Je tiens aussi à remercier les Études Supérieures et Postdoctorales (ESP) de l'Université de Montréal (UdeM) pour m'avoir accordé une bourse de fin d'études de 4<sup>ème</sup> année et au jury du prix Jules Brodeur qui m'ont accordé ce prestigieux prix.

Enfin, je désire mentionner que l'Université de Montréal est située sur des territoires autochtones non-cédés. En effet, ce territoire a longtemps servi de lieu de rencontres et d'échanges autochtones, notamment les peuples Haudenosaunee et les Anishinaabeg. Je reconnais que la nation Kanien'Kehà : ka comme gardienne des terres et des eaux sur lesquelles nous nous trouvons aujourd'hui.

# **Chapitre 1: Introduction Générale**

## **1 Mise en contexte**

## 1.1 Contexte et justification de la recherche doctorale

Il est désormais largement admis que l'apparition de certaines maladies chroniques est le résultat d'une interaction complexe entre des facteurs environnementaux et génétiques (Feinberg, 2007). En effet, de nombreux produits chimiques sont constamment introduits dans notre environnement. Les conséquences toxicologiques de l'exposition à ces composés et leur impact sur la santé de la population sont une préoccupation croissante. Parmi ces produits chimiques, la classe des perturbateurs endocriniens (PE) est particulièrement préoccupante.

Le terme de perturbateur endocrinien s'applique aux composés qui peuvent affecter les hormones endogènes, ou les systèmes associés, responsables de la transmission d'un signal d'une cellule à une autre. Il existe environ 900 produits chimiques qui ont été identifiés comme des perturbateurs endocriniens par l'Union européenne dans trois listes différentes : la liste I (substances identifiées comme perturbateurs endocriniens au niveau de l'UE), la liste II (substances en cours d'évaluation pour perturbation endocrinienne en vertu de la législation de l'UE) et la liste III (substances considérées, par l'autorité nationale d'évaluation, comme ayant des propriétés de perturbation endocrinienne) (EU, 2020). L'exposition aux perturbateurs endocriniens a été associée à des problèmes de santé chez l'humain, notamment l'infertilité, le diabète, l'obésité, les cancers hormono-dépendants, la réduction de la qualité du sperme, la prématurité à la naissance, l'intolérance au glucose, le syndrome des ovaires polykystiques, ou encore les troubles du développement cérébral, et constitue un risque majeur pour la santé humaine (Kahn et al., 2020).

De plus, l'impact économique est lié aux problèmes de santé. Plus précisément, les charges économiques liées aux perturbateurs endocriniens ont été estimées à 163 milliards d'euros dans l'UE et 340 milliards de dollars aux USA, annuellement (Attina et al., 2016; Kassotis et al., 2020; Trasande et al., 2015; Trasande et al., 2016).

Les perturbateurs endocriniens restent présents dans notre vie quotidienne (cosmétiques, alimentation, eau, produits de soins personnels, ordinateur portable, canapé, etc) malgré les réglementations et politiques visant à les réduire. Ils constituent une préoccupation particulière

pour les populations vulnérables (femmes enceintes et nourrissons principalement) (Kassotis et al., 2020).

Selon l'hypothèse des origines développementales de la santé et des maladies (DoHaD), il existe des fenêtres de susceptibilité pendant lesquelles le développement d'un tissu peut être modifié par des facteurs environnementaux (Heindel et al., 2017). Même à faible dose, l'exposition aux perturbateurs endocriniens pendant la période de susceptibilité peut provoquer des dysfonctionnements et des maladies qui apparaîtront plus tard dans la vie (Heindel et al., 2017). De grandes quantités de perturbateurs endocriniens ont été libérés dans l'environnement depuis la Seconde Guerre mondiale (Colborn et al., 1993). Actuellement, l'exposition à des produits chimiques environnementaux, dont certains perturbateurs endocriniens, a été objectivée dans l'urine, le sérum et les tissus humains et peut s'étendre sur la vie entière pour certains polluants (Calafat et al., 2008; Dodson et al., 2012; Kato et al., 2011). Diverses mesures reflètent le contact avec les perturbateurs endocriniens par l'alimentation, l'eau, l'absorption cutanée et l'atmosphère.

Aujourd'hui, notre eau est contaminée par une multitude de produits chimiques, dont le Bisphénol A (BPA), un additif largement utilisé dans la fabrication des plastiques en polycarbonate et en résine époxy. Le BPA est un contaminant omniprésent dans l'environnement, que l'on retrouve dans l'eau du robinet (Dupuis et al., 2012; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015; Zhou et al., 2015) et il peut réagir avec une multitude de substances présentes dans l'eau, comme les ions hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ) provenant de l'hypochlorite de sodium ( $\text{NaOCl}$ ) qui sont souvent ajoutés à l'eau du robinet comme désinfectant (Fukazawa et al., 2001; Gallart-Ayala et al., 2010).

Un groupe émergent de contaminants qui se forment principalement dans l'eau présente un risque pour la population humaine : les dérivés chlorés du BPA ou  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  (ClBPA, 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ , 3,5- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ ,  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  et  $\text{Cl}_4\text{BPA}$ ). En effet, les ions hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ) sont responsables de l'attaque électrophile des groupes phénoliques sur la molécule de BPA, agissant comme un précurseur de la formation de  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  comme présenté dans la Figure 1 (Andra, Charisiadis, et al., 2015; Gallard et al., 2004; Hu et al., 2002; Liu et al., 2009). Les  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  sont des polluants émergents aux effets perturbateurs endocriniens (Mutou et al., 2006) retrouvés

chez l'Homme. Cependant, ils n'ont pas encore été officiellement classés comme perturbateurs endocriniens en Europe (EU, 2020). Les informations sur les propriétés toxicologiques du Cl<sub>4</sub>BPA sont plus abondantes que pour les autres congénères, et ce congénère présente aussi des propriétés de perturbateur endocrinien (Kitamura et al., 2005; Lei et al., 2017). Le Cl<sub>4</sub>BPA présente également une toxicité pour le développement et la reproduction (Pellizzari et al., 2019). De plus, des études épidémiologiques ont montré que les Cl<sub>x</sub>BPA sont associés à l'obésité (Andra & Makris, 2015), au diabète de type II (Andra, Kalyvas, et al., 2015) et à l'infarctus du myocarde (Hu et al., 2019), constituant ainsi un risque pour la santé humaine.

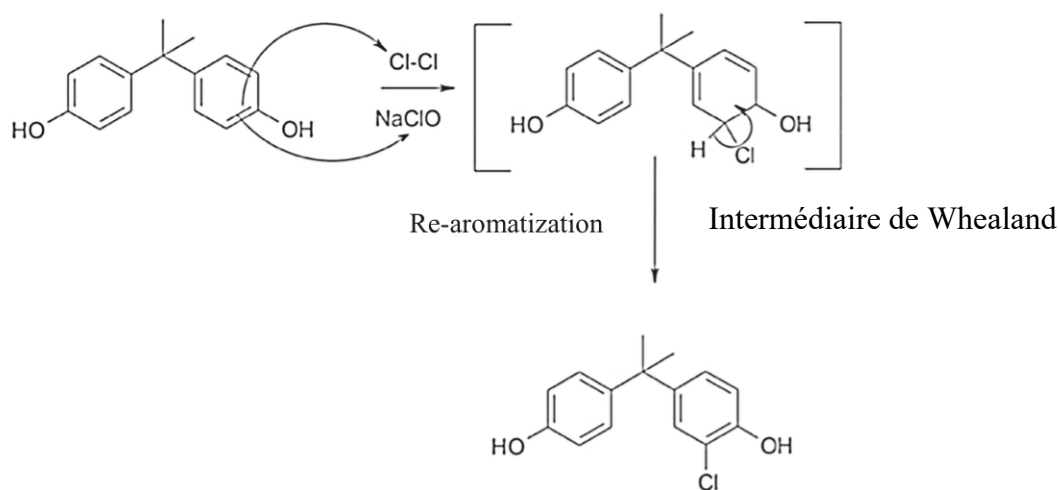


Figure 1 : Réaction entre le BPA et l'hypochlorite de sodium (NaOCl) (Hu et al., 2002) et tiré de Plattard et al, (2021) ; annexe 1)

Les Cl<sub>x</sub>BPA ont été détectés dans divers milieux aqueux (Chang et al., 2014; Dorival-Garcia et al., 2012; Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013; Gallart-Ayala et al., 2010; Li et al., 2015; Song et al., 2014; Yuan et al., 2010). Par ailleurs, les Cl<sub>x</sub>BPA ont également été retrouvés dans les matrices biologiques humaines (Cambien et al., 2020; Fernandez et al., 2007; Li et al., 2020; Migeot et al., 2013; Niu et al., 2021; Venisse et al., 2014). L'étude de ces polluants émergents est donc très importante pour comprendre comment nous sommes exposés, et par conséquent prévenir l'exposition des populations les plus sensibles à ces perturbateurs endocriniens.



Cependant, très peu de données existent sur leur métabolisme et leur toxicocinétique que ce soit chez l'animal ou chez l'humain. Pour pallier ce manque, des expériences *in vitro* pour déterminer les constantes métaboliques des Cl<sub>x</sub>BPA, une méthode analytique des métabolites principaux d'un des Cl<sub>x</sub>BPA et un modèle PBPK ont été développés et validés dans cette présente thèse. En effet, un modèle PBPK est un très bon outil pour intégrer les données toxicocinétiques obtenues par différentes méthodes (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) décrivant l'ensemble du processus d'ADME et prédisant l'évolution dans le temps du produit chimique parent et du ou des métabolites dans un organisme vivant (Lipscomb et al., 2012). En outre, un modèle PBPK peut décrire la distribution des dérivés chlorés du BPA dans le plasma et les tissus chez l'animal. Malheureusement, aucun modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal n'existe dans la littérature, et la plupart des paramètres toxicocinétiques spécifiques nécessaires au paramétrage de tels modèles ne sont pas disponibles et doivent être déterminés expérimentalement.

Cette recherche doctorale a pour but de contribuer à l'analyse du risque lié à ces contaminants émergents à travers l'étude de leur métabolisme et de leur toxicocinétique chez l'animal d'abord, et l'humain ensuite. Ce document, qui résume les travaux de thèse effectués pour y arriver est présenté de la façon suivante : tout d'abord, une revue de littérature servant d'introduction à cette thèse sur les dérivés chlorés du Bisphénol A (Cl<sub>x</sub>BPA) est présentée. Puis, une brève synthèse sur les lacunes révélées dans les écrits, les lacunes desquelles émane la problématique de cette thèse. Après l'énoncé de la problématique de cette recherche doctorale, de ses objectifs, et de son organisation, suivront respectivement la présentation de nos travaux doctoraux (articles), puis la discussion générale sur l'ensemble du travail effectué et enfin la conclusion générale de ce projet des deux côtés de l'atlantique.

## 1.2 État des connaissances

Cette partie est tirée de l'annexe 1 qui est mon premier article scientifique publié. Il représente une revue de littérature (Plattard N, Dupuis A, Migeot V, Haddad S, Venisse N. An overview of the literature on emerging pollutants : Chlorinated derivatives of Bisphenol A ( $\text{Cl}_x\text{BPA}$ ). Environ Int. 2021 Aug; 153:106547. Doi: 10.1016/j.envint.2021.106547. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33831741).

### 1.2.1 Niveaux et sources d'exposition aux $\text{Cl}_x\text{BPA}$

#### 1.2.1.1 Sources d'exposition aux $\text{Cl}_x\text{BPA}$

Les dérivés chlorés du BPA (voir Figure 2) ont été détectés dans différents milieu comme les stations de traitement des eaux usées (WWTPs) (Dorival-Garcia et al., 2012; Gallart-Ayala et al., 2010), les boues d'épuration (Song et al., 2014), les sédiments (Chang et al., 2014; Yuan et al., 2010), les tuyaux de distribution ainsi que dans l'eau potable (Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015).

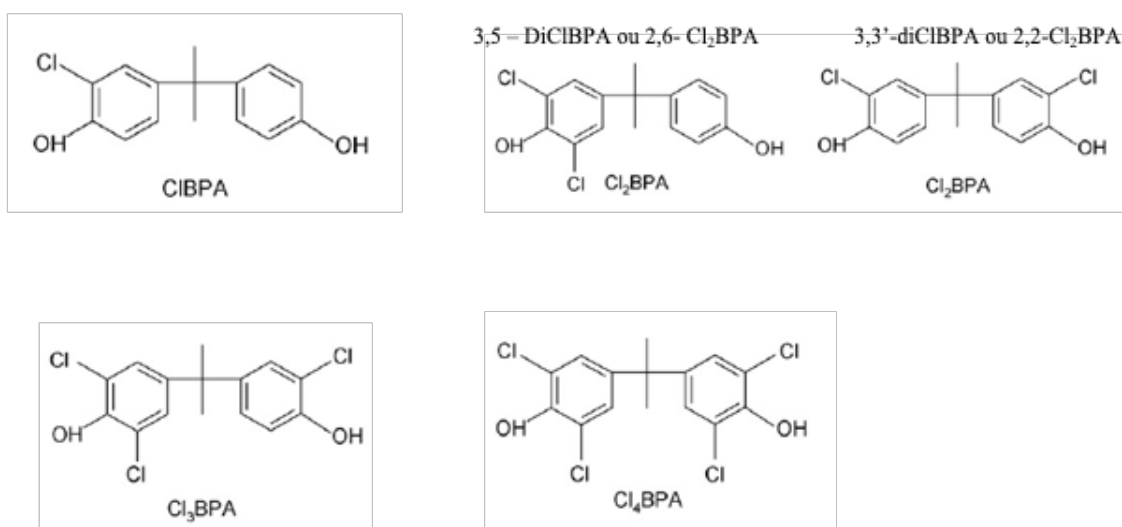


Figure 2 : Structures moléculaires de CIBPA, 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ , 3,5- $\text{Cl}_2\text{BPA}$ ,  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  et  $\text{Cl}_4\text{BPA}$  (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1)

Les Cl<sub>x</sub>BPA ont été détectés dans les eaux usées d'usines de recyclage de papiers au Japon, dans lesquelles ont été trouvés du ClBPA et du Cl<sub>2</sub>BPA (Fukazawa et al., 2001). De plus, alors que le Cl<sub>4</sub>BPA a été fréquemment détecté (57.7%) dans des boues d'épuration en Chine à une concentration moyenne de 0.29 ng/g (Fukazawa et al., 2001), une étude récente de Qian et al. (2021) n'a pas trouvé de Cl<sub>4</sub>BPA dans les eaux usées ou les boues d'épuration provenant des stations de traitement des eaux usées (WWTPs) à Shenzhen, en Chine (Qian et al., 2021). Fukazawa et al. (2001) ont montré que le ClBPA se dégrade beaucoup plus rapidement que les trois autres Cl<sub>x</sub>BPA dans les effluents finaux de huit usines de fabrication de papier (Fukazawa et al., 2001). Par rapport au Cl<sub>2</sub>BPA qui est biodégradable très lentement, il a été démontré que le BPA et le ClBPA sont rapidement biodégradés, c'est-à-dire qu'ils disparaissent à plus de 50% après un jour (Fukazawa et al., 2001). Les différences entre les Cl<sub>x</sub>BPA détectés dans les effluents de ces usines peuvent s'expliquer par les différents procédés de fabrication de pâte à papier utilisés et les traitements appliqués aux eaux usées (Fukazawa et al., 2001). De plus, Wan et al. (2020) ont ajouté les Cl<sub>x</sub>BPA à une solution de matière organique (EfOM) sous une lumière solaire simulée afin d'observer le devenir environnemental de ses contaminants dans les effluents des WWTPs et de démontrer leur photodégradation (Wan et al., 2020). Les auteurs suggèrent que la photodégradation est une voie importante pour l'élimination et la détoxification des Cl<sub>x</sub>BPA dans les effluents et dans la réception des eaux naturelles sous la lumière du soleil. Un degré élevé de chloration facilite la photodégradation. En effet, plus il y a de chlore sur les Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA > Cl<sub>2</sub>BPA > Cl<sub>3</sub>BPA > Cl<sub>4</sub>BPA), et plus la constante de vitesse de réaction est élevée, permettant ainsi une photodégradation plus rapide (Wan et al., 2020). Le Cl<sub>4</sub>BPA va donc plus rapidement se dégrader au soleil dans les effluents de WWTPs que ses autres congénères.

La littérature scientifique sur les produits de dégradation des Cl<sub>x</sub>BPA dans l'eau potable est très limitée. Cependant, deux études réalisées par Yamamoto et al. (2002) et Bourgin et al. (2013) ont montré qu'après la formation du Cl<sub>4</sub>BPA, la chaîne isopropylidène de ce composé est attaquée par l'ion hypochlorite, puis clivée pour former du 2,4,6-trichlorophenol (T<sub>3</sub>CP) (Bourgin et al., 2013; Yamamoto et al., 2002). Ensuite, ces deux produits de dégradation sont transformés en deux molécules distinctes : l'une par déshydratation et l'autre par méthylation mais les auteurs n'ont pas encore déterminé ce qui conduit à ces transformations (Yamamoto et

al., 2002). A l'heure actuelle, ils n'ont pas démontré de toxicité potentielle sur ces produits de dégradation des Cl<sub>x</sub>BPA. Leurs expériences ont été menées *in vitro* et la présence des produits de dégradation dans les milieux environnementaux n'a pas été rapportée.

Le BPA et les Cl<sub>x</sub>BPA sont généralement retrouvés dans des stations de traitement d'eau potable à proximité de grandes villes en Chine (Fan et al., 2013). Parmi les quatre dérivés chlorés du BPA quantifiés dans l'eau du robinet, le ClBPA présentait le taux de détection le plus élevé (100%) et la concentration la plus forte (maximum : 26.7 ng/L) par rapport au Cl<sub>2</sub>BPA (98%, 6.3 ng/L), au Cl<sub>3</sub>BPA (60%, 7.7 ng/L) et au Cl<sub>4</sub>BPA (50%, 4.9 ng/L) (Fan et al., 2013). De même que l'étude de Doumas et al., (2018) a retrouvé des concentrations et des taux comparables (85.71% détectés pour le ClBPA, 66.67% pour le Cl<sub>2</sub>BPA, 76.19% pour le Cl<sub>3</sub>BPA et 61.90% pour le Cl<sub>4</sub>BPA) dans l'eau du robinet au domicile des femmes (n=21) de la cohorte BREDI (Breast Endocrine Disruptors Endocrine Investigation) en France (Doumas et al., 2018). Enfin, les Cl<sub>x</sub>BPA sont tous présents dans l'eau potable, ce qui constitue la principale voie d'exposition pour ces substances émergentes (Andra, Charisiadis, et al., 2015; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015).

La contamination par contact cutané lors de l'utilisation domestique (douche, bain, etc...) et de la piscine pourrait également être une voie d'exposition pertinente, mais elle n'a pas encore été étudiée. Par ailleurs, Kalyvas et al. (2014) n'ont pas trouvé d'association entre le ClBPA urinaire et les activités d'hygiène personnelle évaluées par un questionnaire, mais des études complémentaires sont nécessaires pour le confirmer (Kalyvas et al., 2014).

Les Cl<sub>x</sub>BPA ont également été trouvés dans l'eau médicale utilisée pour l'hémodialyse. Une étude récente a démontré que les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale (ESRD) traités par hémodiafiltration en ligne (OL-HDF) présentent un risque de surexposition au BPA et aux Cl<sub>x</sub>BPA apportés par la perfusion intraveineuse de liquide de remplacement (Bacle et al., 2019). En utilisant l'OL-HDF, de grandes quantités de BPA et de Cl<sub>x</sub>BPA sont directement disponibles pour une exposition systémique, et bien que le risque pour ces patients atteints de maladies chroniques soit inconnu, il reste préoccupant. Les patients traités pendant des années à raison de 3 à 4 séances par semaine en moyenne sont ainsi exposés de manière chronique au BPA transmis par les dispositifs médicaux ainsi qu'aux Cl<sub>x</sub>BPA présents dans l'eau pour

hémodialyse (environ 170 L pour une séance), ce qui constitue un risque pour cette population vulnérable (Bacle et al., 2019). De plus, le générateur de dialyse étudié contient deux ultrafiltres mais c'est dans le premier qui assure l'ultra pureté de l'eau de dialyse que les Cl<sub>x</sub>BPA ont été quantifiés. Ce premier ultrafiltre assure l'ultra pureté de l'eau de dialyse afin d'éviter le développement de biofilms à l'intérieur du générateur de dialyse. Le Cl<sub>2</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA ont été alors fréquemment détectés dans ces échantillons d'eau prélevés dans le premier ultrafiltre, respectivement à  $15.30 \pm 13.00$  ng/L et  $1.90 \pm 2.30$  ng/L en moyenne. Le ClBPA et le Cl<sub>3</sub>BPA ont également été détectés, mais le plus souvent à un niveau inférieur à la limite de quantification (LOQ) (Bacle et al., 2019). Ces résultats démontrent que l'eau de dialyse doit être considérée comme une source importante d'exposition aux perturbateurs endocriniens.

Les Cl<sub>x</sub>BPA ont également été détectés dans les papiers en contact avec les aliments (FCPs) dans lesquels ils avaient des fréquences de détection de 41% pour le ClBPA, 24% pour le Cl<sub>2</sub>BPA (mélange du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA et du 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA, 1/0.25 (v/v), 11% de Cl<sub>3</sub>BPA et de Cl<sub>4</sub>BPA (Zhou et al., 2015). Le ClBPA était prédominant avec une concentration moyenne ( $\pm$  l'écart-type) de  $0.016 \pm 0.044$  ng/g, suivi du Cl<sub>2</sub>BPA avec une concentration moyenne de  $0.0063 \pm 0.020$  ng/g (Zhou et al., 2015). Concernant les papiers en contact avec les aliments (FCPs), Zhou et al. (2015) ont comparé les papiers blanchis et non blanchis afin de déterminer si les mêmes fréquences de détection étaient toujours présentes. Presque aucun Cl<sub>x</sub>BPA (<10% de Cl<sub>x</sub>BPA) n'a été trouvé dans le papier non blanchi.

Les Cl<sub>x</sub>BPA présents dans certains filtres à café blanchis et emballages alimentaires peuvent migrer dans les aliments et les boissons. En effet, Zhou et al. (2015) ont démontré que les Cl<sub>x</sub>BPA étaient retrouvés à des concentrations plus élevées dans les FCPs blanchis par rapport aux FCPs non blanchis. De plus, le niveau de concentration des Cl<sub>x</sub>BPA est lié à la concentration initiale de BPA et dépend des procédés de blanchiment du papier. La concentration maximale de BPA qui a migré d'un filtre à café vers une tasse de café (150 mL) était de  $100 \pm 14$  ng /L (Zhou et al., 2015). En outre, les Cl<sub>x</sub>BPA pourraient migrer des filtres à café vers les solutions de café avec une proportion de migration de  $47 \pm 1.4\%$  pour le ClBPA, alors que tous les autres Cl<sub>x</sub>BPA n'ont pas été retrouvés contrairement au BPA ( $71 \pm 10\%$ ) (Zhou et al., 2015). En conclusion, ces résultats montrent que l'utilisation de filtres à café ou

d'autres FCPs pourrait augmenter de manière significative l'exposition humaine aux Cl<sub>x</sub>BPA provenant des produits alimentaires et la migration de ces contaminants à partir des filtres à café pourrait être une voie importante d'exposition humaine. Ces résultats sont particulièrement importants pour les personnes qui consomment de grandes quantités de café (Zhou et al., 2015).

Le BPA résiduel est souvent présent dans les produits ménagers de nettoyage et de soins personnels (Dodson et al., 2012; Liao et al., 2013). Une source majeure d'exposition par voie cutanée et par inhalation est l'utilisation de produits de nettoyage qui pourraient agir comme précurseur dans la formation des Cl<sub>x</sub>BPA au contact de l'eau chlorée du robinet, tels que les détergents pour lave-vaisselle, les poudres à récurer ou à blanchir et les produits de nettoyage contenant de l'hypochlorite de sodium (Kalyvas et al., 2014). Dans l'étude de Kalyvas et al. (2014), l'exposition au ClBPA était plus fréquente chez les femmes (1.35 fois plus que les hommes) qui effectuaient la vaisselle à la main, ainsi que plus de tâches ménagères en général (Canada, 2021)

Pour le Cl<sub>4</sub>BPA, les sources d'exposition sont très différentes des autres Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA) car cette substance est utilisée comme retardateur de flamme halogénée (Tian et al., 2017; Zhao et al., 2019) tandis que les autres Cl<sub>x</sub>BPA ne le sont pas. Il est également utilisé comme additif dans les plastiques, les matériaux de construction et les textiles synthétiques (Kitamura et al., 2002; Molina-Molina et al., 2013). De plus, certains pays comme la Chine l'utilise comme agent antibactérien (Tian et al., 2017). Les composés organiques halogénés, dont le Cl<sub>4</sub>BPA, qui sont libérés par les matériaux ignifuges peuvent contaminer le sol, l'eau, les sédiments et d'autres milieux environnementaux, pénétrant ainsi dans le corps humain, les animaux, les plantes et d'autres milieux biologiques (Chang et al., 2014; Chu et al., 2005; Yuan et al., 2010). L'accumulation à long terme de Cl<sub>4</sub>BPA peut atteindre des concentrations élevées en raison de la bioamplification du Cl<sub>4</sub>BPA dans la chaîne alimentaire, et pourrait également avoir des effets néfastes sur la faune et la vie humaine en raison de sa persistance, de ses caractéristiques lipophiles et de sa bioaccumulation (Huang et al., 2013; Mascolo et al., 2010).

Aucune étude n'a documenté la présence de Cl<sub>4</sub>BPA dans la poussière intérieure. Cependant, un autre BPA halogéné, le tétrabromobisphénol A (TBBPA), a été trouvé dans la poussière intérieure à des concentrations très élevées (3 435 ng/g) dans des maisons chinoises proche de centres de déchets électroniques (Wu et al., 2016), en Belgique (0.85–1480 ng/g), au Japon (490–520 ng/g) et au Royaume-Uni (<1–382 ng/g) (Abdallah et al., 2008; Geens et al., 2009; Takigami et al., 2009). Il convient de noter que le TBBPA est le retardateur de flamme halogéné le plus utilisé dans le monde, représentant 60% du marché mondial des retardateurs de flamme (Wang et al., 2015). Cependant, les données d'exposition au Cl<sub>4</sub>BPA ne reflètent pas une deuxième source d'exposition en tant que retardateur de flamme. Il est possible que le Cl<sub>4</sub>BPA ne soit pas suffisamment utilisé dans cette application pour permettre d'observer des concentrations plus élevées par rapport aux autres Cl<sub>x</sub>BPA dans différentes matrices biologiques humaines. En outre, on peut émettre l'hypothèse, que malgré sa lipophilie plus élevée, le Cl<sub>4</sub>BPA ne s'accumule pas dans l'organisme (Doumas et al., 2018).

Enfin, il a été émis l'hypothèse que les atomes de chlore libre ou le chloroforme présents dans l'air pourraient réagir avec le BPA, conduisant à la formation des Cl<sub>x</sub>BPA et à des expositions ultérieures, mais cela reste à démontrer expérimentalement (Kalyvas et al., 2014). La figure 3 représente un schéma conceptuel de l'exposition aux Cl<sub>x</sub>BPA, qui résume les sources d'exposition à ces polluants émergents.

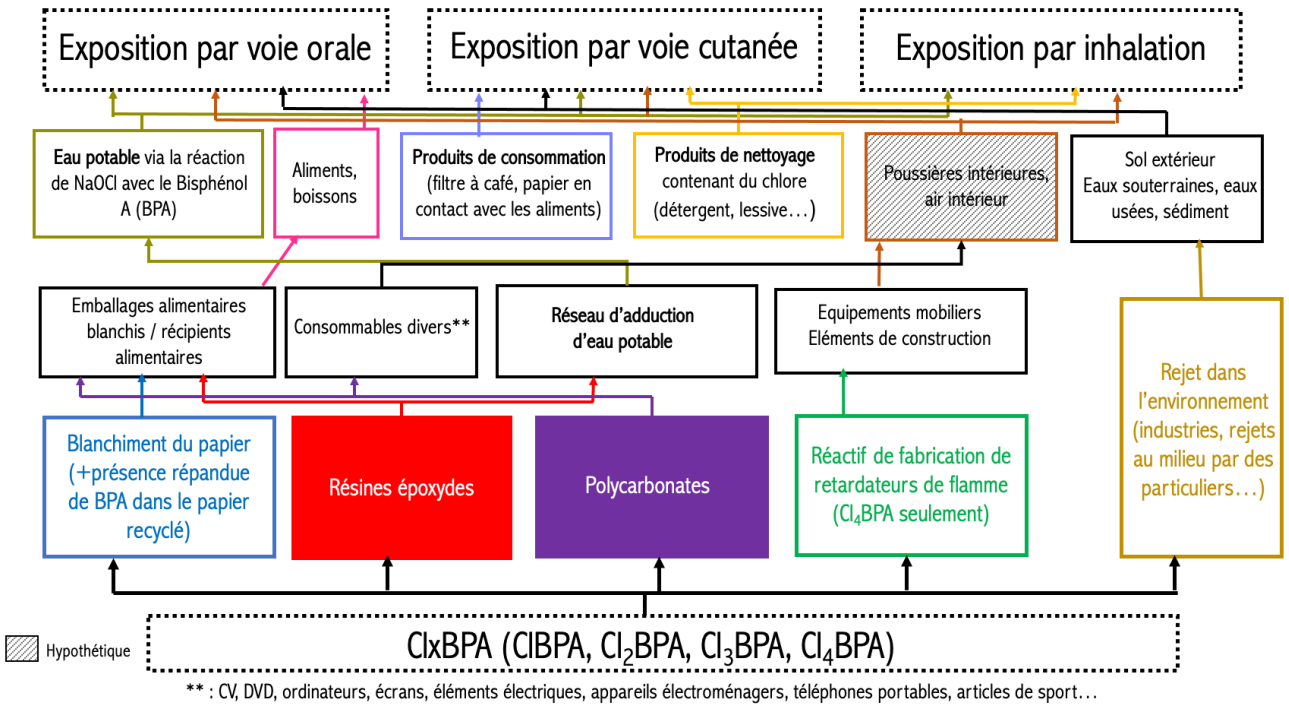


Figure 3 : Schéma conceptuel de l'exposition aux dérivés chlorés du BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1)



### 1.2.1.2 Niveaux d'exposition chez l'humain

Dans cette sous-section, nous nous concentrons sur l'exposition humaine aux Cl<sub>x</sub>BPA qui pose un problème de santé publique, en évaluant les niveaux de détection de ces polluants émergents dans différentes matrices biologiques. La connaissance des voies d'exposition est importante, mais il est également important de déterminer les niveaux d'exposition aux Cl<sub>x</sub>BPA pour savoir s'ils présentent un risque pour la santé humaine. A cette fin, le tableau 1 décrit les données disponibles sur les niveaux d'exposition dans les tissus et matrices humaines. Les données d'exposition et les méthodes analytiques développées pour la détermination des Cl<sub>x</sub>BPA dans les matrices humaines, ont été précédemment revue par Andra et al. (2016).

Les Cl<sub>x</sub>BPA ont été retrouvés dans différents tissus et fluides corporels de la population générale. Cependant, certains composés sont présents en plus grande quantité dans certaines matrices humaines que dans d'autres. C'est notamment le cas du Cl<sub>2</sub>BPA (mélange des deux formes : 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA et 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA), qui a été détecté le plus fréquemment dans les milieux biologiques que les autres Cl<sub>x</sub>BPA. En effet, des études ont rapporté des taux de détection de Cl<sub>2</sub>BPA dans les échantillons biologiques de 80% (16/20 échantillons) dans les tissus adipeux contre environ 15% (3/20) pour le ClBPA, 10% (2/20) pour le Cl<sub>3</sub>BPA, et 0% (0/20) pour le Cl<sub>4</sub>BPA (Fernandez et al., 2007). Cependant, une étude récente (Venisse et al., 2019) a mis en évidence des taux de détection différents dans 5 échantillons de tissu adipeux mammaire obtenus chez des femmes ayant subi une chirurgie mammaire après un cancer du sein. En effet, les auteurs ont trouvé 0% (0/5) de Cl<sub>2</sub>BPA (<LOD), 40% (2/5) de ClBPA, 20% (1/5) de Cl<sub>3</sub>BPA, et 60% (3/5) de Cl<sub>4</sub>BPA. Néanmoins, la LOQ a été validée pour les Cl<sub>x</sub>BPA dans l'article de Fernandez et al. (2007) mais les valeurs définies comme la LOD étaient élevées (0.5-3.0 ng/mL) par rapport à la LOQ de Venisse et al. (2019) qui était de 0.0125 ng/mL.

Dans le plasma, Cambien et al. (2020) ont trouvé plus de ClBPA avec un taux de détection de 40% contre 20% pour Cl<sub>2</sub>BPA et Cl<sub>3</sub>BPA, 0% pour le Cl<sub>4</sub>BPA, tandis que l'étude de Li et al. (2020) a trouvé 29.3% de Cl<sub>4</sub>BPA chez les femmes enceintes en Chine.

Concernant le tissu placentaire, les deux études de Vela-Soria et al. (2011, 2015) n'ont pas trouvé de Cl<sub>x</sub>BPA alors que Jimenez-Diaz et al. (2010) ont détecté 51% de ClBPA et de Cl<sub>2</sub>BPA, 49% de Cl<sub>3</sub>BPA et 0% de Cl<sub>4</sub>BPA. Dans le lait maternel, Cariot et al. (2012) ont

obtenus un taux de détection de 100% pour le Cl<sub>2</sub>BPA par rapport au ClBPA (0%) et au Cl<sub>3</sub>BPA (33%) et l'étude de Rodriguez-Gomez et al. (2014) a détecté principalement du Cl<sub>2</sub>BPA (20%), et pratiquement pas de ClBPA, Cl<sub>3</sub>BPA ou de Cl<sub>4</sub>BPA. Une étude très récente de Niu et al. (2021) a confirmé que le Cl<sub>2</sub>BPA est le principal dérivé chloré retrouvé dans le lait maternel (Niu et al., 2021). De plus, dans le colostrum, première sécrétion des glandes mammaires après l'accouchement, Migeot et al. (2013) ont constaté que le Cl<sub>2</sub>BPA est aussi le plus fréquemment détecté (Migeot et al., 2013).

Dans les urines, le ClBPA est le Cl<sub>x</sub>BPA le plus fréquemment détecté dans toutes les études les plus pertinentes. Kalyvas et al. (2014) ont détecté le composé, qui est le seul qu'ils ont étudié dans 90% de leurs échantillons, tandis que Venisse et al. (2014) ont détecté le ClBPA dans 60% des échantillons contre 40% pour le Cl<sub>2</sub>BPA, le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA (Venisse et al., 2014). Parallèlement, Liao et al. (2012) ont observé le même taux de détection pour ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA et Cl<sub>3</sub>BPA (20%) alors que 3 études (Liao et al., 2012; Venisse et al., 2014; Yang et al., 2014) n'ont pas trouvé de Cl<sub>4</sub>BPA dans les urines. De plus, des différences significatives dans l'exposition aux Cl<sub>x</sub>BPA ont été trouvées entre deux études de cohorte : SURDIAGENE et ESTHER (Allemagne) (Hu et al., 2019) avec un taux de détection de 1 à 9% en Allemagne contre 18 à 33% en France (Hu et al., 2019). Les procédés de chloration de l'eau diffèrent entre les deux pays. En effet, la France utilise principalement de l'hypochlorite de sodium, tandis que l'Allemagne utilise du dioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>), ce qui peut expliquer les différences observées dans les taux de détection. En tant que désinfectant, le dioxyde de chlore ne produit aucun dérivé chloré en réaction avec les phénols (dont le BPA), contrairement au chlore (Ganiev et al., 2003; Masschelein, 1979).

Pellizzari et al. (2019) indiquent le Cl<sub>4</sub>BPA comme substance prioritaire sur laquelle des études de biosurveillance devraient être menées pour mieux comprendre son exposition. Par ailleurs, la présence des Cl<sub>x</sub>BPA a été confirmée dans une population vulnérable constituée de femmes enceintes dans différentes matrices biologiques (plasma, placenta et colostrum/lait maternel). Enfin, plusieurs études ont démontré que les quatre Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) présentent une accumulation et des taux de détection plus élevés dans les tissus riches en lipides (Migeot et al., 2013).

Tableau 1 : Niveau d'exposition des dérivés chlorés du BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) dans les tissus et matrices humains (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1)

Références	Tissus et matrices humains	Pays et date de l'étude	Cl <sub>x</sub> BPA analysé	N	Type de population (population, âge, IMC)	Taux de détection des Cl <sub>x</sub> BPA	LOD/LOQ (ng/mL)
Cambien et al. (2020) (a) Li et al. (2020) (b)	Plasma	(a) France, n.a (b) Chine, 2016	CIBPA, (a) Cl <sub>2</sub> BPA(a), Cl <sub>3</sub> BPA, (a) Cl <sub>4</sub> BPA (a, b)	(a) N=10 (b) N = 181	(a) Patients souffrant d'insuffisance rénale terminale, n.a, n. a (b) Femmes enceintes, âgées de plus de 18 ans, n. a	(a) 40% CIBPA; 20% Cl <sub>2</sub> BPA; 20% Cl <sub>3</sub> BPA et 0% Cl <sub>4</sub> BPA (b) 29,3% de Cl <sub>4</sub> BPA	(a) LOQ =0.005 pour CIBPA, Cl <sub>2</sub> BPA et Cl <sub>3</sub> BPA; 0.02 pour Cl <sub>4</sub> BPA (b) 0.001/ 0.002
Liao et al. (2012)(c); (Yang et al., 2014) (d); (Kalyvas et al., 2014) (e); (Velasoria et al., 2014)(f); (Venisse et al., 2014)(g) (Hu et al., 2019) (h)	Urine	(c) USA, 2011 (d) Chine, 2013 (e) Chypre, 2012 (f) Espagne, n.a (g) France, n. a (h) Allemagne et France, 2002	CIBPA (c, e, f, g, h) Cl <sub>2</sub> BPA: mélange des 2 formes) (c,f,g,h) Cl <sub>3</sub> BPA (c, f, g, h) Cl <sub>4</sub> BPA (d, f, g, h)	(c) N = 31 (d) N = 94 (e) N = 224 (f) N = 20 (g) N = 10 (h) N=126 (Allemagne) et N= 166	(c) Volontaires sains, 11-66 ans, n.a (d) Adultes, 26-84 ans, n.a (e) Adultes, 51 ans (17), 26 kg.m <sup>-2</sup> (f) Volontaires femmes et hommes, n.a, n.a (g) Donneurs, n.a, n. a (h) Patients atteints de TD2M ou ayant développé un infarctus du myocarde	(c) 16,1% CIBPA, 19.4% 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA, 19.4% Cl <sub>3</sub> BPA (d) 0% Cl <sub>4</sub> BPA (e) 90% CIBPA (f) 0% pour tous les Cl <sub>x</sub> BPA (g) 60% CIBPA, 40%: 3,5-Cl <sub>2</sub> BPA, Cl <sub>3</sub> BPA, 20% Cl <sub>4</sub> BPA, 20% 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA (h) Allemagne: 1% CIBPA, 4% Cl <sub>2</sub> BPA, 9% Cl <sub>3</sub> BPA, 4% Cl <sub>4</sub> BPA vs en France: 18% CIBPA, 20% Cl <sub>2</sub> BPA, 24% Cl <sub>3</sub> BPA et 33% Cl <sub>4</sub> BPA	(c) 0.02 / 0.05 pour tous les Cl <sub>x</sub> BPA (d) 0.01 / 0.03 (e) 0.032 / 0.108 (f) 0.03 / 0.1 pour tous les Cl <sub>x</sub> BPA (g) 0.014 / 0.05 for CIBPA et Cl <sub>4</sub> BPA; 0.009/0.05 pour Cl <sub>2</sub> BPA; 0.018/0.05 pour Cl <sub>3</sub> BPA (h) 0.025 / 0.05 pour tous les Cl <sub>x</sub> BPA

(Vela-Soria et al., 2015)(i), (Vela-Soria et al., 2011)(j); (Jimenez-Diaz et al., 2010)(k)	Tissus placentaire	(i) Espagne, n.a (j) Espagne, n.a (k) Espagne, n.a	C1BPA; C2BPA; C3BPA; C4BPA (h, i, j)	(i) N = 10 (j) N = 50 (k) N = 49	(i) Volontaires, n.a, n.a (j) Volontaires, n.a, n.a (k) Femmes, n.a, n.a	(i) 0% de tous les C1xBPA (j) 0% de tous les C1xBPA (k) 51% C1BPA et C2BPA, 49% C3BPA, 0% C4BPA	(i) 0.1 / 0.3 pour tous les C1xBPA (j) 0.3/1.0 pour C1BPA et C2BPA; 0.4/1.4 pour C3BPA et 0.6/2.0 pour C4BPA (k) Même chose que (j)
(Cariot et al., 2012) (l); (Rodriguez-Gomez, Zafraga-Gomez, et al., 2014)(m), (Rodriguez-Gomez, Jimenez-Diaz, et al., 2014)(n), (Niu et al., 2021) (o)	Lait maternel	(l) France, n.a, (m) Espagne, n.a (n) Espagne, n. a (o)Chine, 2014	C1BPA; C2BPA mix des 2 formes; C3BPA (except o); C4BPA (except l)	(l) N=3 (m) N=10 (n) N=10 (o) N=181	(l)Femmes, n.a, n.a (m)Femmes, n.a, n.a (n)Femmes saines, n.a, n. a (o) Femmes saines, 25-35 ans, 18.5 < IMC < 25	(l) 0% C1BPA, 100%, C2BPA 33% C3BPA and C4BPA, 20% pour C2BPA (m)0% pour C1BPA, C3BPA and C4BPA, 20% pour C2BPA (n)0% pour tous les C1xBPA (o) 3.3% C1BPA, 17.1% C2BPA et 1.7% C4BPA	(l) 0.01/0.4 C1BPA, 0.05/0.4 pour C2BPA et C3BPA;0.04/0.4 pour C4BPA (m) 0.04/0.12 pour tous les C1xBPA (n) 0.1/0.2 C1BPA, 0.1/0.3 C2BPA, 0.2/0.5 C3BPA et 0.3/1.0 C4BPA (LC) (o) 0.001/0.003 C1BPA, 0.002/0.005 C2BPA et C4BPA
Migeot et al. (2013) (p)	Colostrum	(p) France, n. a	C1BPA; 3,3'-C2BPA; 3,5-C2BPA; C3BPA	(p)N=21	(p) Femmes, 33 ans, 22.1 kg.m <sup>-2</sup>	(p)0% pour C1BPA,100% 3,5-C2BPA, 52% 3,3'-C2BPA, 19% C3BPA	(p)0.01/0.40 C1BPA, 0.05/0.4 C2BPA et C3BPA, 0.04/0.4 C4BPA
Fernandez et al. (2007) (q) Venisse et al. (2019) (r)	Tissus adipeux	(q) Espagne, n.a (r) France, n. a	C1BPA; C2BPA: mix des 2 formes; C3BPA; C4BPA (q,r)	(q) N= 20 (r) N =5	(q) Femmes adultes, 59.7 ans, 31.9 kg.m <sup>-2</sup> (r) Femmes recevant une chirurgie du sein pour des lésions mammaires, n.a, n. a	(q) 15% C1BPA, 80% C2BPA, 20% C3BPA, 0% C4BPA 40% C1BPA, 0% C2BPA, 40% C3BPA et 60% C4BPA (r)	(q) 0.5 / n.a C1BPA et C2BPA, 2.7 / n.a C3BPA, 3.0/n.a C4BPA (r) 0.05/0.0125 pour tous les C1xBPA

## **1.3 Effets toxiques des dérivés chlorés du BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) rapportés dans la littérature**

Des études toxicologiques et épidémiologiques ont démontré que les dérivés chlorés du BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) ont des propriétés de perturbation du système endocrinien.

### **1.3.1 Études *in vitro* et *in vivo***

Des études toxicologiques sur des animaux et sur des cultures cellulaires ont révélé des effets néfastes des Cl<sub>x</sub>BPA tels que la perturbation endocrinienne (Mutou et al., 2006), l'œstrogénicité (Kuruto-Niwa et al., 2005; Kuruto-Niwa et al., 2002), la génotoxicité (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b) et la perturbation du métabolisme énergétique (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2014).

Les Cl<sub>x</sub>BPA sont également des ligands des récepteurs PPAR- $\gamma$  pouvant être impliqués dans les effets métaboliques (Riu et al., 2011b). En effet, les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) sont des facteurs de transcriptions, impliqués dans la fonction métabolique et jouent un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique de l'organisme (Tyagi et al., 2011). Ils ont une affinité de liaison avec les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) 10 à 100 fois supérieure à celle du BPA (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b), dont le dysfonctionnement a été associé à l'apparition de l'obésité et du diabète de type 2 (TD2M) *in vivo* chez l'humain (Somm et al., 2009; Swedenborg et al., 2009).

Plusieurs études ont démontré que le système hormonal thyroïdien semble également être une cible potentielle. L'étude de Yamauchi et al. (2003) a démontré que les Cl<sub>x</sub>BPA entrent en compétition avec la triiodothyronine (T3) pour la fixation à la transthyrétine de poulet et de grenouille-taureau et que l'affinité est plus grande pour les dérivés chlorés du BPA que pour le BPA. La puissance relative des Cl<sub>x</sub>BPA dépendait du degré de chloration (Yamauchi et al., 2003). De plus, dans un essai de double hybride dans la levure sur une préparation S9 de foie de rat (Kitamura et al., 2002; Terasaki et al., 2011), il a été démontré que Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA

augmentent les activités des hormones thyroïdiennes mais inhibent la liaison de la triiodothyronine (T3) par rapport au Cl<sub>2</sub>BPA, ClBPA et au BPA.

De plus, l'exposition au Cl<sub>4</sub>BPA induit des dommages cellulaires par l'accumulation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaire en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle (Zhang et al., 2020). Il a été démontré que le Cl<sub>4</sub>BPA induit une accumulation de lipides *in vitro* (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b). Des études sur la croissance de poissons zèbres exposés au BPA halogéné pendant la phase précoce de développement ont révélé l'induction de l'obésité à un stade ultérieure de la vie (Riu et al., 2014), soutenant ainsi la théorie de l'obésité tardive due à l'exposition à des xénobiotiques (c'est-à-dire obésogènes) tôt dans la vie d'un individu (Janesick et al., 2011a, 2011b, 2012).

De plus, une étude récente de Wang et al. (2021) a démontré que le Cl<sub>4</sub>BPA affecte le système immunitaire *in vivo*. Dans cette étude, des souris BALB/c ont été exposées au Cl<sub>4</sub>BPA par gavage avec une dose de 5 ou 50 mg/kg/jour pendant 14 jours. Les auteurs ont montré que le Cl<sub>4</sub>BPA peut induire une immunosuppression chez les souris en augmentant la sécrétion de cytokines liées à l'inflammation et en réduisant le rapport entre les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> et les cellules T régulatrices. Il a été démontré que les Cl<sub>x</sub>BPA présentent des affinités avec les récepteurs d'œstrogènes jusqu'à 100 fois supérieures à celle du BPA. Cette propriété toxicologique a été suggérée pour la première fois par Hu et al. (2002) qui ont utilisé un mélange de Cl<sub>x</sub>BPA en solution avec un essai de levure à double hybride (Hu et al., 2002). L'activité oestrogénique de chaque Cl<sub>x</sub>BPA a depuis été démontrée (Takemura et al., 2005). Les mêmes auteurs ont démontré que chez des rats ovariectomisés (OVX), l'exposition au 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA et au ClBPA augmentait le poids humide utérin de la même manière que le BPA (Takemura et al., 2005). De plus, dans leurs expériences *in vivo*, le BPA, le ClBPA et le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA ont augmenté de manière significative la surface de l'endomètre utérin à une dose de 100 mg/kg/jour. Notons qu'un œdème pathologique a été observé dans l'utérus des souris femelles traitées au Cl<sub>4</sub>BPA chez plus de 80% d'entre elles après 14 jours d'exposition (Wang et al., 2021).

Une équipe de recherche chinoise (Lei et al., 2021) a étudié le rôle de la signalisation du récepteur membranaire des œstrogènes couplé à la protéine G (GPER) dans la prolifération cellulaire du cancer du sein, induite par le Cl<sub>4</sub>BPA, en analysant l'expression des protéines et les niveaux d'ARNm des cibles pertinentes du signal. Ils ont alors démontré que de faibles concentrations de Cl<sub>4</sub>BPA induisaient de manière significative la prolifération des cellules de cancer du sein *in vitro* : MCF-7, SKBR3 et MDA-MB-231, mais ce sont les cellules MCF-7 qui sont les plus sensibles à l'exposition du Cl<sub>4</sub>BPA (Lei et al., 2021).

### 1.3.2 Études épidémiologiques

Toutes les études épidémiologiques menées sur les Cl<sub>x</sub>BPA ont été résumées dans le tableau 2. Fernandez et al. (2007) ont étudié le rôle des dérivés chlorés du BPA dans les tissus adipeux de femmes obèses dans une population espagnole limitée (n=20) (IMC =  $31.9 \pm 11.5$  kg/m<sup>2</sup>). Parmi les différents Cl<sub>x</sub>BPA, le Cl<sub>2</sub>BPA est le plus fréquemment (16/20, 80%) trouvé dans le tissu adipeux des femmes, suivi du BPA (55%), du ClBPA (15%) et du Cl<sub>3</sub>BPA (10%). En outre, le Cl<sub>2</sub>BPA constitue 94.6% de tous les Cl<sub>x</sub>BPA. L'étude suggère qu'il existe une association possible entre la présence de Cl<sub>x</sub>BPA dans le tissu adipeux et l'apparition de l'obésité, mais la taille de l'échantillon (n=20) est trop faible pour tirer des conclusions définitives.

Une autre étude épidémiologique transversale réalisée par Andra et al. (2015) à Chypre sur une population de 223 personnes montre une forte corrélation entre les niveaux urinaires de ClBPA et l'indice de masse corporelle (OR = 2.34 avec un intervalle de confiance à 95%, IC : 1.10, 5.10; P = 0.027). D'autres études épidémiologiques sont toutefois nécessaires pour confirmer les éventuels effets obésogènes du dérivé monochloré.

La même équipe a réalisé une autre étude épidémiologique portant sur 151 participants (âgés de plus de 18 ans), incluant 20 personnes qui ont reçu un diagnostic de diabète de type II (TD2M) et 131 adultes non diabétiques. Les chercheurs ont trouvé une association positive entre les concentrations urinaires de ClBPA et l'apparition du diabète de type II (OR = 3.29 avec un intervalle de confiance à 95%, CI : 1.10, 11.4; P < 0.05) (Andra, Kalyvas, et al., 2015). Bien

qu'une relation entre l'exposition au ClBPA et le T2DM ai été démontrée, il n'existe actuellement aucune étude épidémiologique évaluant les autres Cl<sub>x</sub>BPA.

Dans une étude cas-témoins nichée dans une cohorte de patients diabétiques français (SURDIAGENE), Hu et al., (2019) ont montré une forte association entre l'exposition au Cl<sub>x</sub>BPA et la survenue d'infarctus du myocarde (18 à 32% de détection dans les urines, OR = 14.15 (2.77–72.40). Cette association n'a pas été confirmée dans une cohorte allemande (ESTHER) dont les patients présentaient des niveaux d'exposition au Cl<sub>x</sub>BPA beaucoup plus faibles (1 à 9%, dans les urines, OR = 0.17 (0.02–1.23).

Par ailleurs, dans une étude de cas-témoins de 212 participants, Andrianou et al. (2016) n'ont pas démontré d'association entre l'exposition au ClBPA, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA, 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA et les fonctions thyroïdiennes contrairement au BPA. D'autres études épidémiologiques sont nécessaires pour confirmer que l'exposition au Cl<sub>3</sub>BPA et au Cl<sub>4</sub>BPA est associé aux fonctions thyroïdiennes comme le suggèrent des études *in vitro* (Kitamura et al., 2002; Terasaki et al., 2011). Cependant, une co-exposition à d'autres perturbateurs endocriniens peut constituer un biais de cette étude puisque les 212 femmes adultes ont été exposées à une multitude de contaminants durant celle-ci (produits d'hygiène, vernis à ongles, maquillage, aliments en conserve, habitudes de nettoyage, etc...).



Tableau 2 : Études épidémiologiques des Cl<sub>x</sub>BPA (tiré de Plattard et al, 2021 ; annexe 1)

Type d'effets	Étude	Type d'étude	Pays	N	Type de population (âge, BMI)	Concentrations (ng/g) et détection (%) des Cl <sub>x</sub> BPA	Résultats
<b>Obésité</b>	Andra and Makris (2015)	Transversale	Chypre	223	Hommes et femmes adultes, 2 groupes d'IMC: IMC normal (25 kg/m <sup>2</sup> , n =97) et IMC supérieur à la normal (> 25 kg/m <sup>2</sup> , n = 126)	CIBPA: > 4.68 ng. g <sup>-1</sup> , 63% avec un IMC supérieur à la normal	Association positive entre le niveau urinaire de CIBPA et l'obésité (OR = 2.34)
<b>Fonction thyroïdienne</b>	Andrianou et al. (2016)	Cas-témoin	Roumanie et Chypre	212	Femme adulte, 47 à 52 ans, 25 kg/m <sup>2</sup> à 27 kg/m <sup>2</sup> ,	CIBPA; 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA; 3,5-Cl <sub>2</sub> BPA ont été mesurés. Aucune différence de concentration entre les cas et les contrôles	Aucune association entre l'exposition aux Cl <sub>x</sub> BPA (CIBPA et Cl <sub>2</sub> BPA seulement) et la fonction thyroïdienne
<b>Diabète de type II (TD2M)</b>	Andra, Kalyvas, et al. (2015)	Transversale	Chypre	151	20 adultes atteint de TD2M (64 ans, 30 kg/m <sup>2</sup> ) et 131 pas diabétiques (44 ans, 25 kg/m <sup>2</sup> )	CIBPA avec une concentration urinaire ajustée à la créatinine: 92 ng/g pour les non-diabétiques et 191 ng/g pour les diabétiques	Association positive entre la concentration urinaire de CIBPA et l'apparition du diabète de type II (OR = 3.29)
<b>Infarctus du myocarde (MI)</b>	Hu et al. (2019)	Cas-témoin nichée dans 2 cohortes	France et Allemagne	292	Hommes, 65-70 ans, 29 kg/m <sup>2</sup> , patients diabétiques	Cohorte SURDIAGENE: 18 à 32%. Cohorte ESTHER (Allemagne): 1 à 9%.	Très forte association avec l'infarctus du myocarde dans la cohorte française (OR = 14.15), mais non reproduite dans la cohorte ESTHER (OR = 0.17)

## 1.4 Mécanismes d'action possibles des Cl<sub>x</sub>BPA

Bien que les mécanismes d'action de ces dérivés chlorés soient mal connus, il a été établi que les quatre Cl<sub>x</sub>BPA exercent des effets oestrogéniques sur les cellules MCF-7, favorisent la prolifération cellulaire et augmentent la synthèse et la sécrétion de protéines spécifiques à des concentrations de 1 µM et plus (Rivas et al., 2002). De plus, il a été démontré *in vitro* que le BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA présentent une affinité pour le récepteur des œstrogènes et expriment un potentiel prolifératif dans la lignée cellulaire MCF-7 du cancer du sein humain (Lei et al., 2021; Olsen et al., 2003). Il existe des similitudes avec le BPA :

- Le BPA et ses dérivés chlorés sont actifs et entrent en compétition avec le 17β- estradiol, une hormone sexuelle, dans leur liaison aux protéines ER<sub>α</sub> et ER<sub>β</sub>. Takemura et al. (2005) ont démontré que le ClBPA et le 3,3'- Cl<sub>2</sub>BPA entrent plus efficacement en compétition pour la liaison à ER<sub>α</sub> que le BPA (Valeurs de IC<sub>50</sub> :  $2.48 \times 10^{-5}$ ,  $1.28 \times 10^{-5}$ , et  $1.08 \times 10^{-4}$  M, respectivement). Ils ont une activité similaire à celle du BPA dans la compétition pour la liaison ER<sub>β</sub> (valeurs de IC<sub>50</sub> :  $1.43 \times 10^{-5}$ ,  $1.87 \times 10^{-5}$ , et  $2.59 \times 10^{-5}$  M, respectivement) (voir Tableau 3).

Tableau 3 : Valeurs d'IC50 de la liaison compétitive du 17β-estradiol, du BPA et des dérivés chlorés du BPA aux ERα et ERβ chez l'humain (Adapté de (Takemura et al., 2005)). Les valeurs de l'IC50 représentent la concentration de composé à tester nécessaire pour réduire de 50 % la liaison du 17-beta-(3H) -estradiol, l'hormone stéroïde féminine naturelle.

Produit chimique	IC <sub>50</sub> (M)	
	ERα	ERβ
<i>BPA</i>	1.08x10 <sup>-4</sup>	2.59x10 <sup>-5</sup>
<i>3-ClBPA</i>	2.48x10 <sup>-5</sup>	1.43x10 <sup>-5</sup>
<i>3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA</i>	1.28x10 <sup>-5</sup>	1.87x10 <sup>-5</sup>
<i>17β-estradiol</i>	1.15x10 <sup>-8</sup>	1.13x10 <sup>-8</sup>

- Les Cl<sub>x</sub>BPA sont des ligands des récepteurs PPAR-γ qui induisent l'adipogenèse via leurs récepteurs nucléaires (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b). Les données fonctionnelles et structurelles présentées dans l'étude de Riu et al. (2011a) démontrent que le BPA halogéné peut activer les récepteurs PPAR-γ et les récepteurs X rétinoïdes (RXR) via des interactions directes caractérisées par des affinités de liaison 10 à 100 fois supérieures à celles d'autres perturbateurs PPAR-γ proposés. Les RXR sont un type de récepteur nucléaire qui appartient à la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Ce sont des protéines qui régulent l'expression des gènes en réponse à des signaux hormonaux. De plus, il active ces mêmes récepteurs chez le poisson zèbre et le xenopus laevis pour le Cl<sub>4</sub>BPA (Riu et al., 2011a). Tous ces dysfonctionnements métaboliques conduisent à une accumulation de lipides (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2014).

## 1.5 Toxicocinétique des Cl<sub>x</sub>BPA reportée dans la littérature

Peu de données toxicocinétiques chez l'animal ou l'humain sur les Cl<sub>x</sub>BPA étaient disponibles dans la littérature. Les voies de métabolisme et/ou de détoxification, l'étendue de la distribution tissulaire et le pourcentage d'élimination de l'organisme restaient pour la plupart inconnus. Les Cl<sub>x</sub>BPA sont des composés lipophiles dont les logP<sub>ow</sub> sont supérieurs à 4 (les valeurs vont de 4.4 à 6.4). Comme attendu, plus on ajoute de chlore à la molécule, plus elle devient lipophile selon l'ordre suivant des Cl<sub>x</sub>BPA : Cl<sub>4</sub>BPA > Cl<sub>3</sub>BPA > Cl<sub>2</sub>BPA > ClBPA (Doumas et al., 2018).

### 1.5.1 Absorption

#### 1.5.1.1 Par voie orale

Les études de biosurveillance humaine suggèrent une absorption orale par ingestion d'eau potable, mais ces données ne permettent pas de déterminer la biodisponibilité ou la constante d'absorption des dérivés chlorés du BPA. Aucune donnée n'est disponible concernant le taux et l'étendue de l'absorption par voie orale. Ces composés présentent des propriétés lipophiles plus élevées que le BPA, ce qui peut favoriser leur diffusion passive à travers la barrière intestinale. Le BPA est rapidement absorbé chez l'humain (Volkel et al., 2002) et un schéma d'absorption similaire est attendu avec les Cl<sub>x</sub>BPA.

L'ingestion de poussières est une voie importante d'exposition humaine au TBBPA (Wang et al., 2015), qui pourrait hypothétiquement être une voie d'exposition au Cl<sub>4</sub>BPA.

#### 1.5.1.2 Par contact cutané

Une étude transversale a démontré que le ClBPA urinaire était significativement corrélé à l'âge et au temps quotidien passé à nettoyer avec de l'eau chlorée du robinet (Kalyvas et al.,

2014), ce qui suggère que les principales voies d'exposition des produits ménagers en contact avec l'eau chlorée sont cutanées et pulmonaires. Cependant, aucune autre étude ne la démontre. La fréquence et la durée des activités de nettoyage doivent donc être prises en considération afin de mieux évaluer l'exposition aux Cl<sub>x</sub>BPA. En revanche, aucune des expositions liées aux activités individuelles ou cumulées d'hygiène et de loisirs telles que la douche, le bain et la baignade en piscine n'a été significativement associée au ClBPA urinaire (Kalyvas et al., 2014). Ces observations avec le ClBPA restent à confirmer avec d'autres Cl<sub>x</sub>BPA. Malheureusement, dans la littérature scientifique, aucune information sur la perméabilité cutanée ou la biodisponibilité n'est actuellement disponible concernant les Cl<sub>x</sub>BPA. Cependant, elle pourrait être calculé *in silico* à l'aide des paramètres physico-chimiques des Cl<sub>x</sub>BPA (Howes et al., 1996). Enfin, l'ajout d'atomes de chlore à la molécule de BPA augmente la lipophilie des dérivés chlorés du BPA, ce qui pourrait augmenter les taux d'absorption cutanée des Cl<sub>x</sub>BPA, bien que cela reste à évaluer.

#### 1.5.1.3 Par inhalation

Il est possible que, lorsqu'il est utilisé comme retardateur de flamme, le Cl<sub>4</sub>BPA se retrouve dans la poussière intérieure, comme cela a été observé avec le TBBPA (Abdallah et al., 2008; Geens et al., 2009; Wang et al., 2015; Wu et al., 2016), mais aucune étude n'a tenté de le démontrer ; jusqu'à l'obtention de nouvelles données démontrant la présence de Cl<sub>x</sub>BPA dans l'air, cette voie d'exposition reste purement hypothétique.

### 1.5.2 Distribution

Comme mentionné ci-dessus, les Cl<sub>x</sub>BPA ont été retrouvés dans plusieurs matrices biologiques humaines telles que l'urine (Liao et al., 2012), le tissu adipeux (Fernandez et al., 2007), le lait maternel (Cariot et al., 2012), le colostrum (Migeot et al., 2013), le plasma (Cambien et al., 2020; Del Olmo et al., 2005; Li et al., 2020) et le tissu placentaire (Jimenez-Diaz et al., 2010; Vela-Soria et al., 2011).

Les valeurs de  $\log P_{ow}$  suggèrent que ces substances pourraient s'accumuler dans les tissus adipeux (Haddad et al., 2000). Les différents  $Cl_x$ BPA sont plus lipophiles que le BPA ( $BPA < ClBPA < Cl_2BPA < Cl_3BPA < Cl_4BPA$ ) (Migeot et al., 2013), il est donc plausible que ces composés s'accumulent davantage dans les matrices contenant des lipides, comme le lait maternel et le tissu adipeux, plutôt que dans l'urine ou le sang (Andra, Charisiadis, et al., 2015). En effet, les données montrent que les deux formes de  $Cl_2$ BPA ont été détectées dans 20 à 100% des échantillons de lait maternel étudiés (Cariot et al., 2012; Migeot et al., 2013) et dans 80% des échantillons de tissus adipeux, ainsi que dans environ 20% des échantillons pour le  $ClBPA$  et le  $Cl_3BPA$  et 0% des échantillons pour le  $Cl_4BPA$  (Fernandez et al., 2007), contre 0 à 40% de détection dans les urines (Liao et al., 2012; Vela-Soria et al., 2014; Venisse et al., 2014). En outre, Venisse et al. (2019) ont trouvé des  $Cl_x$ BPA dans des échantillons de graisse mammaire provenant de femmes présentant des lésions cancéreuses, frontières ou bénignes. Dans 5 échantillons provenant de femmes atteintes d'un cancer du sein, les concentrations de  $ClBPA$ ,  $Cl_2BPA$ ,  $Cl_3BPA$  et de  $Cl_4BPA$  étaient en moyenne respectivement de 0.0295 ng/mL (2/5), <LOD (0/5), 0.013 ng/mL (2/5) et de 0.021 ng/mL (3/5). Le  $ClBPA$  et le  $Cl_4BPA$  sont les deux composés majoritairement retrouvés dans la graisse mammaire : 40 et 60% respectivement. La distribution des  $Cl_x$ BPA reste inconnue, bien qu'ils soient plus lipophiles que le BPA. De plus, des parallèles peuvent être établis avec la distribution du BPA, qui est retrouvé dans tous les tissus, principalement dans le foie et les reins (ANSES, 2013). Les  $Cl_x$ BPA sont retrouvés dans le tissu placentaire (Jimenez-Diaz et al., 2010; Vela-Soria et al., 2011), et ces substances traversent la barrière placentaire, tout comme le BPA.

Une étude a démontré le transfert maternel des  $Cl_x$ BPA de la mère au fœtus en analysant ces substances dans le decidua (tissu correspondant à la femme enceinte) et le premier chorion (villosités choriales), correspondant au fœtus de 25 femmes enceintes (Chen et al., 2016). Chen et al. (2016) ont trouvé du  $ClBPA$  et du  $Cl_2BPA$  (mélange des deux formes) dans la plupart de ces cellules (76 et 72% respectivement dans le decidua; 80 et 72% respectivement dans le premier chorion). De plus, le coefficient de partage (PC) tissu : plasma étant un paramètre important pour les données toxicocinétiques, Chen et al. (2016) ont évalué le PC decidua: plasma et villosités choriales : plasma pour le  $ClBPA$  et le  $Cl_2BPA$  (mélange des deux formes) mais pas pour le  $Cl_3BPA$  et le  $Cl_4BPA$  en raison de leur faible fréquence de détection dans ces

matrices. Le PC decidua : plasma a été estimé à 17.4 et 3.79 respectivement pour le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA. Pour le PC villosités choriales : plasma, il a été estimé à 25.2 et 4.94 respectivement pour le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA. Ces valeurs de PC montrent également que le ClBPA est plus largement distribué dans les tissus de la femme enceinte (decidua et villosités choriales) que le Cl<sub>2</sub>BPA (Chen et al., 2016).

Un autre paramètre de distribution qui n'est pas connu pour tous les Cl<sub>x</sub>BPA est le degré de liaison aux protéines plasmatiques. La mesure de la fraction non liée dans le plasma ( $F_{up}$ ) aiderait grandement à estimer la capacité de ces substances à se distribuer en dehors du compartiment vasculaire vers d'autres tissus. En revanche, il a été constaté dans la littérature que le BPA est très fortement lié aux protéines plasmatiques chez les rongeurs et chez l'Homme. La partie liée représente 90–95% et la partie libre, qui est biologiquement active, entre 5 et 10% du BPA total (Nagel et al., 1997; Teegarden et al., 2005). Il est fort possible que les Cl<sub>x</sub>BPA aient une liaison aux protéines plasmatiques au moins équivalente à celle du BPA.

### 1.5.3 Métabolisme

Les informations sur le métabolisme des Cl<sub>x</sub>BPA sont très rares et peu d'expériences *in vivo* ou *in vitro* avec des hépatocytes ou des microsomes ont été réalisées. Bien qu'aucune donnée sur le devenir métaboliques de la forme mono-, di-, trichloro des Cl<sub>x</sub>BPA ne soit disponible, chez toutes les espèces étudiées, la principale voie métabolique du BPA est la glucuronoconjugaison (Volkel et al., 2002).

En revanche, certaines données sont disponibles pour le Cl<sub>4</sub>BPA. Chez le poisson zèbre, le Cl<sub>4</sub>BPA est principalement métabolisé en sulfoconjugués (Riu et al., 2014). Riu et al. (2011) ont réalisé des analyses métaboliques du Cl<sub>4</sub>BPA dans des cellules HepG2 montrant que le Cl<sub>4</sub>BPA était complètement métabolisé en dérivé glucuro et sulfo après une incubation de 24 heures, dans des proportions de 14% et 86% respectivement. De plus, ils ont démontré que la sulfatation du Cl<sub>4</sub>BPA, n'éliminait pas son activité oestrogénique, contrairement à ce qui est observé avec le BPA (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b). L'étendue de la sulfoconjugaison *in vivo* chez l'Homme et son activité restent inconnues et doivent être étudiées plus en profondeur. Un profil de métabolites similaire a été trouvé pour l'équivalent bromé du Cl<sub>4</sub>BPA : chez le rat,

le principal métabolite du TBBPA dans le plasma et l'urine était le TBBPA-sulfate (Hakk et al., 2000; Schauer et al., 2006). Dans le plasma humain, le TBBPA-glucuronide était présent à des concentrations détectables dans tous les échantillons de sang alors que le TBBPA-sulfate n'a été détecté que dans les échantillons de sang de deux humains (Schauer et al., 2006). Le TBBPA-glucuronide a été le premier métabolite détecté dans l'urine alors que le TBBPA-sulfate était inférieur à la limite de détection après administration orale (0.1 mg TBBPA/ kg) (Schauer et al., 2006; Yu et al., 2019).

De plus, comme il a été constaté dans le decidua et les villosités choriales (Chen et al., 2016), les Cl<sub>x</sub>BPA pourraient être transférés au fœtus, mais nous ne savons pas si le fœtus est capable de métaboliser ces contaminants émergents. En effet, il est possible que le métabolisme des Cl<sub>x</sub>BPA ressemble au métabolisme du BPA dans le placenta, or on sait que les expositions cumulées au BPA conjugué sont plus importantes chez le fœtus (Corbel et al., 2014; Gauderat et al., 2017; Patterson et al., 2013; Vom Saal et al., 2014). Une analogie peut être faite pour le métabolisme fœtal des Cl<sub>x</sub>BPA, mais cela reste à vérifier.

#### **1.5.4 Excrétion**

Bien que quatre études aient démontré la présence de Cl<sub>x</sub>BPA dans les urines (Grignon et al., 2016; Liao et al., 2012; Vela-Soria et al., 2014; Venisse et al., 2014), les données d'excrétion des Cl<sub>x</sub>BPA ne sont disponibles que pour les humains (urine mais pas fèces) et non pour les animaux. Cela dit, il est possible que l'excrétion des Cl<sub>x</sub>BPA soit similaire à celle du BPA puisque les Cl<sub>x</sub>BPA ont une structure similaire à la substance originale. Venisse et al. (2014) ont détecté des Cl<sub>x</sub>BPA dans l'urine de 10 échantillons humains, mais à des concentrations très faibles. Le Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA ont été retrouvés respectivement dans 3/10 des échantillons à 132.3 pg/mL, 287 pg/mL, et 667.7 pg/mL en moyenne. Les deux formes de Cl<sub>2</sub>BPA ont été les plus fréquemment retrouvées : 2/10 à 83 pg/mL.

Les résultats de Grignon et al. (2016) sont similaires à ceux de Venisse et al. (2014). Nous savons que l'élimination du BPA et de ses métabolites (principalement le BPA-glucuronide) se fait de manière différente selon les espèces étudiées, notamment entre l'Homme et les rongeurs. L'excrétion du BPA conjugué se fait par voie biliaire/fécale chez le rat et par voie urinaire chez l'Homme (Volkel et al., 2002). Cela empêcherait la recirculation



entérohépatique chez l'Homme, contrairement au rat, chez qui les  $\beta$ - glucuronidases intestinales pourraient dégrader le conjugué excrété et libérer le BPA pour une réabsorption systémique (Ginsberg et al., 2009).

En outre, plusieurs études ont montré une excrétion limitée du BPA dans le lait maternel (Vandenberg et al., 2007). Quelques études (Cariot et al., 2012; Migeot et al., 2013; Rodriguez-Gomez, Jimenez-Diaz, et al., 2014; Rodriguez-Gomez, Zafra-Gomez, et al., 2014) ont trouvé des Cl<sub>x</sub>BPA dans le lait maternel, ainsi que dans le colostrum, qui serait donc une voie d'élimination de ces substances.

En conclusion, l'excrétion des Cl<sub>x</sub>BPA peut avoir plusieurs voies comme l'excrétion urinaire. Cependant, l'excrétion biliaire ou fécale des Cl<sub>x</sub>BPA reste encore inconnue tant chez l'animal que chez l'Homme et ne peut être exclue. Ces polluants sont également éliminés par le lait maternel, ce qui constitue un risque potentiel pour le nourrisson puisque les effets des Cl<sub>x</sub>BPA sur le développement de l'enfant restent inconnus.

## 1.6 Lacunes dans les écrits

La revue générale de la littérature ainsi effectuée fait état de nombreuses lacunes dans les écrits qu'il importe de souligner, notamment en ce qui concerne le métabolisme et la toxicocinétique des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal et chez l'humain qui sont très peu présents dans la littérature. Il est nécessaire de connaître leur distribution chez ces deux espèces afin de mieux analyser leur risque pour la santé. A ce jour, il n'existe que de très rares données toxicocinétiques *in vitro* ou *in vivo* pour ces polluants émergents que sont les Cl<sub>x</sub>BPA. Ces composés ont été retrouvés dans divers milieux biologiques chez l'humain (Andra, Charisiadis, et al., 2015), mais leurs principales caractéristiques toxicocinétiques (constantes d'absorption, fixation aux protéines plasmatiques, métabolisme, volume de distribution, clairance, ...) restent inconnues.

De plus, une autre lacune a trait à l'absence de modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK) pouvant prédire la distribution des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal et l'humain

dans la littérature. En effet, un modèle PBPK est un très bon outil pour intégrer les données toxicocinétiques obtenues par différentes méthodes (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) décrivant l'ensemble du processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME) et prédisant l'évolution dans le temps du produit chimique parent et du ou des métabolites dans l'organisme humain (Lipscomb et al., 2012). Malheureusement, aucun modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal et chez l'humain n'existe actuellement dans la littérature, et comme décrit dans la revue de littérature faite précédemment, la plupart des paramètres toxicocinétiques spécifiques nécessaires au paramétrage de tels modèles ne sont pas disponibles et doivent être déterminés expérimentalement. En outre, la connaissance des propriétés toxicocinétiques aidera à déterminer les biomarqueurs adéquats de l'exposition ; les fractions actives ou les métabolites mesurés dans l'urine ou dans le plasma des Cl<sub>x</sub>BPA.

## 1.7 Problématique de la recherche doctorale

Malgré des normes environnementales présumées élevées, la population mondiale est exposée à un cocktail de produits chimiques dont le risque pour la santé d'un individu tout au long de sa vie reste inconnu. Pour les principaux sous-produits de la chloration présents dans l'eau : Trihalométhanes (THM), Acides haloacétiques (HAA) et chlorites, il existe des valeurs indicatives pour l'eau du robinet dans différents pays (Canada, 2006; EPA, 2006; OMS, 1996); cependant, il n'existe actuellement aucune réglementation concernant le seuil de toxicité des Cl<sub>x</sub>BPA dans l'eau potable, que ce soit en Europe, aux États-Unis ou au Canada, ce qui représente un problème de santé publique.

Les Cl<sub>x</sub>BPA sont présents en plus petites quantités que les autres principaux sous-produits de la chloration, de l'ordre du nanogramme par litre les Cl<sub>x</sub>BPA (Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013) et de l'ordre du microgramme par litre pour les THM, les HAA ou les chlorites (EPA, 2006) dans l'eau potable. Ces substances émergentes s'étant révélées être des perturbateurs endocriniens (Mutou et al., 2006), il est fortement suggérer dans la littérature scientifique qu'elles peuvent être associées à une relation dose-réponse non monotone, c'est-à-dire qu'elles pourraient avoir un effet toxique à très faible dose, ce qui rend encore plus difficile la détermination de valeurs de référence dans l'eau potable (EFSA, 2016). Ce modèle de relation

dose-réponse a rendu considérablement plus complexe les décisions des décideurs politiques en matière de prévention des risques liés aux perturbateurs endocriniens. Quels que soient les produits chimiques ou les techniques utilisés pour le processus de traitement de l'eau, le risque de sous-produits indésirables existe. Le traitement de l'eau potable devient alors un choix politique, dans lequel les organisations environnementales jouent un rôle très important pour la santé publique.

Les Cl<sub>x</sub>BPA sont des substances émergentes présentant un problème de santé environnementale, et plus largement, un problème potentiel de santé publique contribuant à l'augmentation de la pollution environnementale. Il est nécessaire de réaliser une analyse de risque complète incluant l'étude de la toxicocinétique (ADME) de ces substances puisque l'eau potable est une ressource vitale pour les humains, ce qui signifie que l'exposition aux Cl<sub>x</sub>BPA se produit de manière continue. Pour cela, une évaluation précise de l'exposition est nécessaire et peut être estimée à partir des mesures *in vivo* (animal, humain) utilisant un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK).

## 1.8 Objectifs de la recherche doctorale

### 1.8.1 Objectif général

L'objectif général de cette thèse est de caractériser le métabolisme et la toxicocinétique des dérivés chlorés du Bisphénol A ( $Cl_x$ BPA) chez le rat et l'humain.

### 1.8.2 Objectifs spécifiques

1. Mesurer et comparer les constantes métaboliques de chaque dérivé chloré du BPA chez l'animal et l'humain ( $K_m$ ,  $V_{max}$  et la clairance intrinsèque) grâce à des expérimentations *in vitro* avec des hépatocytes de rats et d'humain.
2. Développer et valider une méthode analytique des principaux métabolites (phase II) du 3,3'- $Cl_2$ BPA par HPLC-MS/MS et l'appliquer à des échantillons animaux et humains provenant d'une étude clinique.
3. Développer et valider un modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK) des  $Cl_x$ BPA chez l'animal à l'aide des paramètres physiologiques, biochimiques et physico-chimiques (fraction non liée aux protéines plasmatiques, constantes métaboliques, PC tissus : plasma) estimés *in silico*, *in vitro* et/ou mesurés *in vivo*.

## 1.9 Organisation de la thèse

Le chapitre 1 dresse l'état des connaissances sur les dérivés chlorés du BPA : leur niveaux et sources d'exposition, leurs effets toxiques rapportés dans la littérature (*in vitro*, *in vivo* et lors d'études épidémiologiques), leurs mécanismes d'action possible et enfin leur toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme et excrétion). Les chapitres 2 à 5 présentent les travaux de recherche réalisés pour atteindre l'objectif de cette thèse. Les chapitres 6 et 7 sont une discussion et une conclusion générale sur l'ensemble des travaux rapportés.

L'étude présentée au chapitre 3 relate des expériences *in vitro* avec des hépatocytes de rats et d'humain qui ont été effectués dans le but de déterminer les constantes métaboliques ( $V_{max}$ ,  $K_m$ , clairance intrinsèque) de chaque  $Cl_x$ BPA ( $Cl_1$ BPA,  $Cl_2$ BPA,  $Cl_3$ BPA et  $Cl_4$ BPA). Après avoir réalisé ces expériences au laboratoire à Poitiers, nous avons analysé les résultats grâce à l'application « curve fitting » de Matlab qui a pu estimer les constantes métaboliques grâce à l'équation de Michaelis-Menten et l'équation de la clairance intrinsèque. Ensuite, nous avons pu comparer ces résultats entre les deux espèces (animal et humain). Enfin, dans ce chapitre, nous avons aussi analysé les surnageants des hépatocytes afin de comparer les aires de pics des deux métabolites des  $Cl_x$ BPA en HPLC-MS/MS :  $Cl_x$ BPA-glucuronide et  $Cl_x$ BPA-sulfate entre l'animal et l'humain. Nous avons réalisé ces manipulations afin de compléter le modèle PBPK chez l'animal puisque pour créer ce genre de modèle, nous avons besoin de nombreux paramètres (physiologiques, physico-chimiques et biochimiques) dont les constantes métaboliques, qui permettent de prédire le devenir des  $Cl_x$ BPA dans un organisme vivant.

Le chapitre 4 rapporte le développement d'une méthode analytique des métabolites du  $Cl_2$ BPA : le  $Cl_2$ BPA-glucuronide et le  $Cl_2$ BPA-sulfate par HPLC-MS/MS. Cette étude a été effectuée à Poitiers lors de mon année de cotutelle de thèse avec l'aide de Riciga Gnanasegaran, une stagiaire de maîtrise. Nous avons pu vérifier la sélectivité de la méthode, la justesse et la précision, la limite de quantification (LOQ) et les effets de matrice. De plus, cette méthode a été appliquée à des échantillons de rats provenant de l'étude *in vivo* de l'Université de Montréal et des échantillons d'humains provenant de l'étude clinique faite à Poitiers (mars 2021-octobre 2021). Nous avons pu comparer les concentrations de ces métabolites dans le temps chez les deux espèces, et ainsi mieux comprendre les profils de ceux-ci pour le  $Cl_2$ BPA.

Le chapitre 5 présente le développement et la validation d'un modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK) des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal. Ce modèle a été développé sur la base du modèle PBPK pour le BPA chez le rat de Yang et al. (2013). Nos modèles PBPK sont composés de 7 compartiments tissulaires interconnectés avec des compartiments sanguins artériels et veineux. En effet, deux modèles ont été nécessaires afin de simuler d'une part le ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA et le Cl<sub>3</sub>BPA et d'autre part le Cl<sub>4</sub>BPA avec est un modèle PBPK à diffusion limitée. Pour paramétrer ces modèles PBPK, nous avons calculé les paramètres physico-chimiques de chaque Cl<sub>x</sub>BPA en utilisant des modèles *in silico* pour obtenir la fraction non liée aux protéines plasmatiques (F<sub>up</sub>) et les PC tissus : plasma. Pour valider ces résultats *in silico*, nous avons effectué des expériences *in vitro* en utilisant la dialyse à l'équilibre afin de comparer les deux méthodes. Ces modèles ont ensuite été validés par une expérience *in vivo* sur 80 rats Sprague-Dawley. Le modèle calibré a prédit les concentrations mesurées des Cl<sub>x</sub>BPA dans le plasma, le cerveau et les muscles après l'administration de 4 et 40 mg/kg pour ClBPA et Cl<sub>2</sub>BPA; 0.4 et 4 mg/kg pour Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA.

# **Chapitre 2 – Méthodologie de la recherche doctorale**

## **2 Méthodes d'étude**

Ce projet de thèse a pour but de caractériser le métabolisme et la toxicocinétique des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal et l'humain. Cette étude doctorale comporte trois séries différentes de travaux ayant conduit chacun à la production d'un article scientifique. La première série de travaux (Article 1 au chapitre 3) a permis de mesurer et de comparer les constantes métaboliques dans le foie des quatre Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) entre les composés et entre les espèces (rat Sprague-Dawley vs humain). Les deux autres séries consécutives de travaux présentés respectivement à l'article 2 (Chapitre 4) et à l'article 3 (Chapitre 5) comportent respectivement le développement et la validation d'une méthode analytique des métabolites du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA chez le volontaire sain et le rat Sprague-Dawley, et enfin le développement et la validation de modèles PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal.

## 2.1 Choix des substances

Les dérivés chlorés du Bisphénol A (Cl<sub>x</sub>BPA) ont été choisis pour ce projet de thèse car ce sont des contaminants émergents qui sont majoritairement présents en milieu hydrique et qui présentent des effets de perturbation endocrinienne *in vitro* (Mutou et al., 2006). En effet, ils ont été détectés dans l'eau du robinet dans 60 à 80% des cas selon le composé (Doumas et al., 2018).

Cependant, ils n'ont pas encore été officiellement classés comme perturbateurs endocriniens en Europe (EU, 2020). Les informations sur les propriétés toxicologiques du Cl<sub>4</sub>BPA sont plus abondantes que pour les autres congénères, et ce congénère présente des propriétés de perturbateur endocrinien (Kitamura et al., 2005; Lei et al., 2017). Le Cl<sub>4</sub>BPA présente également une toxicité pour le développement et la reproduction (Pellizzari et al., 2019). De plus, des études épidémiologiques ont montré que les Cl<sub>x</sub>BPA sont associés à l'obésité (Andra & Makris, 2015), au diabète de type II (Andra, Kalyvas, et al., 2015) et à l'infarctus du myocarde (Hu et al., 2019), constituant ainsi un risque pour la santé humaine.

Depuis 2002, première étude sur les effets des Cl<sub>x</sub>BPA (Hu et al., 2002), la toxicocinétique de ces polluants environnementaux n'a été que très peu étudiée, d'où le choix de ce projet de recherche novateur. Dans les articles 1 (Chapitre 3) et 3 (Chapitre 5), tous les Cl<sub>x</sub>BPA ont été étudiés. Cependant, dans l'article 2 (Chapitre 4), seuls les métabolites du 3,3'-



Cl<sub>2</sub>BPA ont été étudiés plutôt que les quatre Cl<sub>x</sub>BPA car ce dérivé chloré est le plus retrouvé dans les études de biosurveillance humaine (Cant et al., 2016). De plus, la validation de la méthode analytique de ces métabolites a été effectuée avec les échantillons plasmatiques d'une étude clinique menée chez 12 volontaires sains de sexe féminin qui ont été exposés au Cl<sub>2</sub>BPA par voie orale (n=6) et sous-cutanée (n=6) au CIC Inserm 1402 (Poitiers, France).

## 2.2 Modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK)

### 2.2.1 Généralités sur les modèles PBPK et leur utilisation

La toxicocinétique est l'étude des processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME) des produits chimiques et de leurs métabolites dans l'organisme. Dans ce projet doctoral, nous avons utilisé des données complémentaires que nous avons vu précédemment (*in vitro*, *in vivo* et *in silico*) afin d'effectuer un modèle mathématique à base physiologique (PBPK) pour prédire la toxicocinétique des dérivés chlorés du Bisphénol A (Cl<sub>x</sub>BPA) chez l'animal.

Un modèle PBPK est une représentation simplifiée d'un organisme vivant (animal ou humain) dans lequel des compartiments décrivent l'ensemble des tissus ou organes relatifs à la substance étudiée (voir un exemple Figure 4) (Andersen et al., 1987). Ce type de modélisation utilisée en toxicologie est une méthode permettant, grâce à l'utilisation d'une série d'équations mathématiques, l'étude quantitative de l'évolution en fonction du temps des processus d'ADME des composés chimiques et de leurs métabolites dans un organisme vivant (Lipscomb et al., 2012). Sa construction associe plusieurs disciplines scientifiques : la programmation informatique, la biologie, la biochimie, la physiologie, la toxicologie et les mathématiques. Plusieurs logiciels sont utilisés pour construire un modèle PBPK, on peut citer les logiciels ACSL (Advanced Continuous Simulation Language), PK-Sim, ou Matlab notamment avec son application Simbiology que nous avons utilisé.

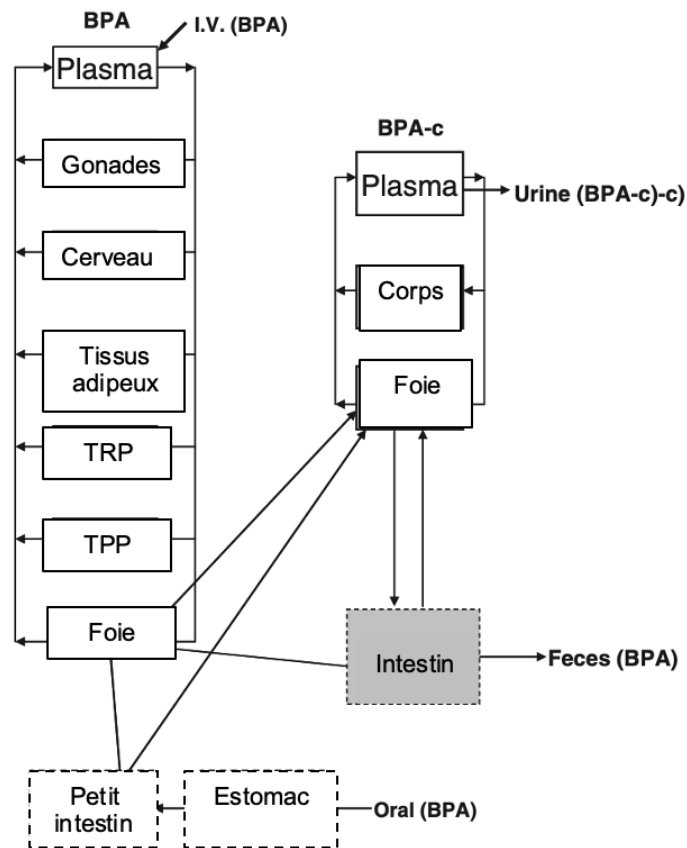


Figure 4 : Représentation schématique de la structure d'un modèle PBPK pour le Bisphénol A (BPA) chez le rat Sprague-Dawley nouveau-né et adulte (Yang et al., 2013). TRP = Tissus Richement Perfusés et TPP = Tissus Pauvrement Perfusés.

La structure du modèle PBPK (voir un exemple à la Figure 4) doit refléter le minimum des éléments essentiels caractérisant l'organisme vivant concerné. Son développement nécessite d'avoir les informations requises obtenues par différentes méthodes obtenues *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*. Chaque compartiment représente un organe ou un tissu (gonades, cerveau, tissu adipeux, foie : voir Figure 4) et peut aussi représenter un ensemble de tissus par exemple les tissus pauvrement perfusés (muscles, peau) et les richement perfusés (cœur, reins, pancréas, etc...). Ceci est déterminé par la pertinence de ce dernier pour l'organe cible, la toxicité, le mode d'action, ainsi que ses mécanismes toxicocinétiques connus dans la littérature (Andersen et al.,

1987). Dans le modèle PBPK de la Figure 4, le métabolisme est limité au compartiment hépatique et c'est généralement le cas pour la modélisation PBPK (Lipscomb et al., 2012). Toutefois, le métabolisme peut avoir lieu dans d'autres tissus (ex : poumons, reins). Dans tous les cas, l'élimination métabolique est ajoutée à l'équation mathématique reliée au compartiment du métabolisme (foie en général). Le métabolisme y est intégré comme un processus saturable généralement décrit par l'équation de Michaelis-Menten, représenté par  $V_{max}$  (vitesse maximale, en mg/h) et par  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten, en mg/L).  $V_{max}$ , représente la vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de  $Cl_xBPA$  et  $K_m$ , représente la constante de Michaelis-Menten. Elle caractérise la réaction enzymatique et est la concentration en  $Cl_xBPA$  pour laquelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique de phase II est à la moitié de la vitesse initiale maximale.

Les équations d'un modèle PBPK utilisent les principes physiques du transport de masse, de la dynamique des fluides, et de la biochimie pour décrire et simuler le devenir d'un contaminant dans le corps. Les connexions entre compartiments correspondent à leurs connexions physiologiques (par exemple, le sang veineux en sortie du tractus gastro-intestinal passe ensuite en majorité par le foie, *etc.*). Ces équations sont maintenant connues dans la littérature scientifique (Fisher et al., 2020; Haddad et al., 2006).

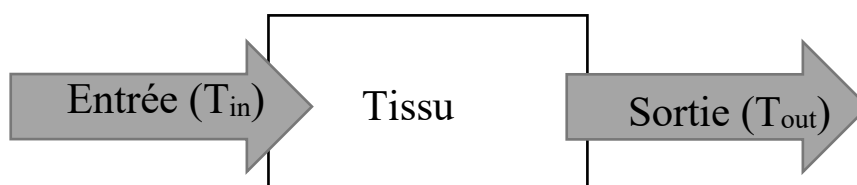


Figure 5 : Représentation fonctionnelle d'une équation différentielle pour un compartiment donné

L'ensemble des processus ADME subis par la molécule sont transcrits sous la forme d'équations différentielles. Dans la majorité des modèles PBPK, les échanges entre les différents compartiments sont basés sur le transfert de masse via la circulation sanguine. (Voir

Figure 5).

$$V_t * \frac{dC_x}{dt} = \frac{dA_x}{dt} = T_{in} - T_{out} \quad [1]$$

Où  $T_{in}$  est le taux d'entrée de la substance dans le compartiment donné,  $T_{out}$  le taux de sortie,  $C_x$  est la concentration du xénobiotique (ng/mL) dans le compartiment tissulaire, et  $A$  la quantité (ng) du xénobiotique.

De plus, la distribution d'une substance dans un tissu du corps peut être en général limitée soit par la perfusion sanguine, soit par la perméabilité des membranes tissulaires ou cellulaires. C'est le cas pour le Cl<sub>4</sub>BPA où un modèle PBPK à diffusion limitée a été développé. Dans le cas d'une limitation par perfusion, si la substance est majoritairement transportée par le sang, la vitesse de transport vers les cellules du tissu est limitée par le débit de sang irriguant le tissu. Cela est en général vrai pour les petites molécules lipophiles. Dans ces conditions, la variation instantanée de la quantité de substance dans un compartiment est simplement égale au produit du débit sanguin volumétrique par la différence entre les concentrations entrantes et sortantes de substance. Ainsi, dans un tissu sans processus d'absorption ou d'élimination, l'évolution de la quantité  $Q_T$  dans le tissu est donnée selon la loi de Fick :

$$\frac{dQ_T(t)}{dt} = Flux_T \times \left( C_{art}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T.S}} \right) \quad [2]$$

Où  $C_{art}$  est la concentration dans le sang artériel,  $C_T$  la concentration dans le tissu et  $F_T$  est le débit sanguin. Dans le cas d'une limitation par la diffusion comme c'est le cas pour le Cl<sub>4</sub>BPA, la distribution de la molécule est dépendante de la perméabilité de l'organe. L'organe est subdivisé en deux sous-compartiments : l'espace extracellulaire correspondant à la vascularisation du tissu et l'espace intracellulaire. La surface d'échange entre les deux compartiments est représentée par le coefficient de perméabilité PAT (dont l'unité est volume/temps/poids de tissus). Les deux modèles de distribution sont représentés ci-dessous en Figure 6 :

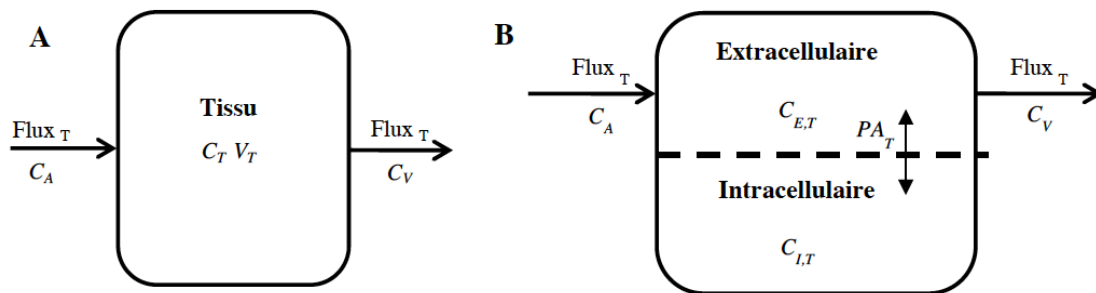


Figure 6 : Représentation de la distribution du composé dans un organe à perfusion limitée (A) et un organe à diffusion limitée (B).  $C$  représente les concentrations dans, respectivement, l'artère ( $C_A$ ), le tissu ( $C_T$ ), la veine ( $C_V$ ), l'espace extracellulaire ( $C_{E,T}$ ) et intracellulaire ( $C_{I,T}$ ),  $V_T$  correspond au volume tissulaire et  $PA_T$  au coefficient de perméabilité entre les deux sous compartiments.

Le développement d'un modèle PBPK nécessite d'avoir les informations sur deux types de paramètres : les paramètres physiologiques de l'être vivant étudié (volume des tissus, débit sanguin, débits tissulaires, etc...) et les paramètres spécifiques à la substance. Les valeurs des paramètres physiologiques peuvent être aisément pris dans la littérature existante. Cependant, les paramètres spécifiques à la substance étudiée peuvent être obtenus à travers plusieurs méthodes complémentaires différentes (*in silico*, *in vitro* et *in vivo*). Ces paramètres incluent les PC (qui décrivent la distribution du composé dans le tissu représentant un compartiment), les paramètres biochimiques ( $V_{max}$ ,  $K_m$ , clairance intrinsèque) et l'affinité aux protéines plasmatiques ( $F_{up}$ ) ainsi que tout autre paramètre relatif à la substance. Toutes les méthodes de ces paramètres ont été décrites plus bas. De plus, les étapes de construction d'un modèle PBPK sont décrites dans la Figure 7.

Parmi les modèles qui ont été et qui continuent d'être exploités en toxicologie et en évaluation du risque, les modèles mécanistiques tels que les modèles toxicocinétiques à base physiologique (PBPK) sont les plus intéressants comparé aux modèles compartimentaux classiques. En effet, ces derniers ne requièrent pas une connaissance à priori du système et dépendent uniquement des données expérimentales obtenues. Ils ne prennent pas en compte la

réalité physiologique d'un organisme vivant et ne devraient donc pas être utilisés pour des extrapolations animal- humain par exemple.

Les modèles PBPK, quant à eux sont des modèles basés sur des interrelations présumées entre les éléments d'un système et donnent la possibilité d'expliquer des phénomènes. Ils sont aussi plus utilisés dans les extrapolations animal-humain, ce qui permet de mieux comprendre la cinétique et les hypothèses reliées aux mécanismes potentiels. De plus, ces modèles permettent d'intégrer beaucoup d'informations sur la substance étudiée notamment son affinité aux protéines plasmatiques ( $F_{up}$ ), sa distribution dans les tissus à travers les PC tissus : plasma et les échanges de matières qui sont régis par les flux sanguins, lymphatiques ou autres transports et diffusions identifiables physiologiquement, ce qui rend le modèle PBPK plus réaliste et plus prédictif en termes de toxicocinétique. Cependant, ils impliquent souvent beaucoup de recherche et de ressources.

Pour vérifier qu'un modèle PBPK a été correctement construit et que les courbes de toxicocinétiques plasmatiques et tissulaires sont bien prédites, nous devons le plus souvent les comparer à des données obtenues *in vivo* chez l'animal ou l'humain ayant été exposé volontairement au contaminant de l'étude. Évidemment, pour cette comparaison la simulation doit reproduire les conditions d'expositions utilisées lors de l'étude d'exposition *in vivo* (Andersen et al., 1987).

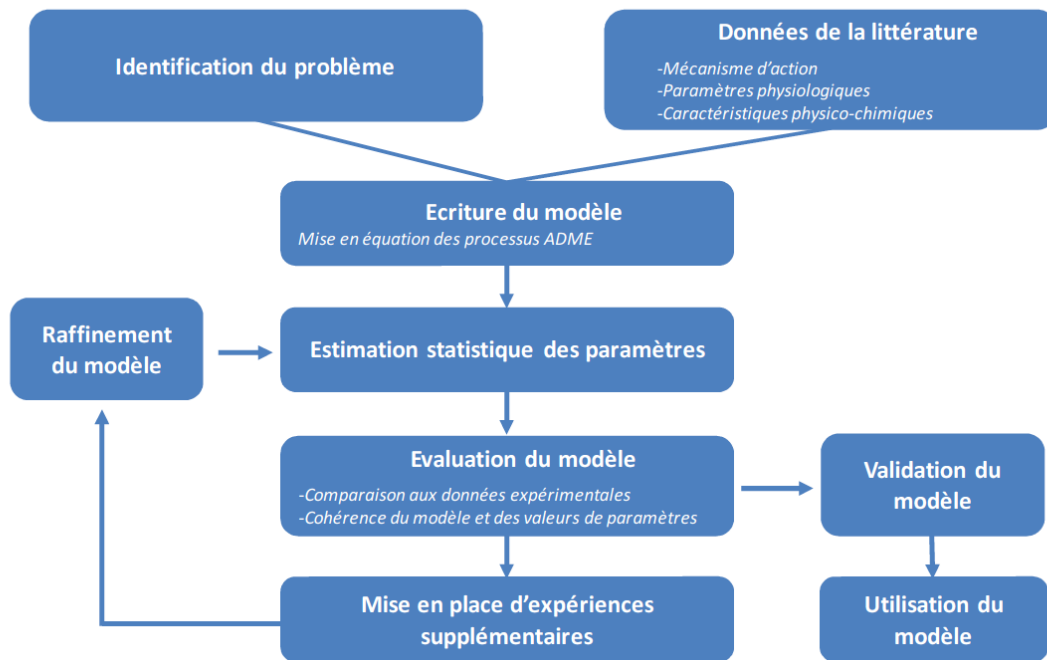


Figure 7 : Les différentes étapes de construction et de développement d'un modèle PBPK (tiré de (Brochot.C et al.))

Enfin, les modèles PBPK ont de multiples applications en évaluation du risque toxicologique (caractérisation de la relation entre la dose d'exposition et les effets toxiques, transposition animal-humain et interprétation des données de biosurveillance humaine). Ils permettent de prendre en compte la toxicocinétique d'un xénobiotique (seul ou en mélange) chez l'animal ou l'humain. Originellement conçus pour effectuer des extrapolations interespèces, fortes doses à faibles doses et entre différentes voies d'administration ou d'exposition (Fisher et al., 2020), les applications des modèles PBPK se sont rapidement étendues dans le temps en évaluation du risque. Ils peuvent être développés pour aider à tester des hypothèses sur des mécanismes pharmacocinétiques, intervenir dans les extrapolations *in vitro* à *in vivo*, ou bien prédire des doses internes de xénobiotique dans le corps humain en simulant une exposition environnementale via plusieurs voies d'administration (respiratoire, orale, cutané). Les modèles PBPK ont également permis de prédire chez l'humain des doses internes résultant d'interactions toxicocinétique entre différents composés chimiques, de simuler la variabilité humaine de la

toxicocinétiques de divers xénobiotiques et enfin de comprendre l'influence de la variabilité physiologique sur les mesures de doses internes (Fisher et al., 2020). De plus, les modèles PBPK ont également servi à interpréter des données de biosurveillance de divers contaminants environnementaux (Clewell, H. J. et al., 2008; Tan et al., 2007). Ils sont maintenant très importants dans les étapes de l'analyse du risque d'un xénobiotique.

## **2.2.2 Représentation du modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat Sprague-Dawley**

Nous avons choisi d'utiliser un modèle PBPK et non un modèle toxicocinétique classique pour les Cl<sub>x</sub>BPA car nous avons comme but dans ce projet de thèse d'extrapoler le modèle animal à l'humain puis à la femme enceinte. Un modèle toxicocinétique classique ne permettait pas une extrapolation du modèle.

Le développement du modèle PBPK a suivi une approche en quatre étapes : représentation du modèle, paramétrage, simulation et validation.

Ce modèle présenté ici était basé sur un modèle PBPK du Bisphénol A de Yang et al. (2013). Pour simuler la pharmacocinétique des Cl<sub>x</sub>BPA, le rat a été représenté comme un réseau de compartiment tissulaires interconnectés avec du sang artériel et veineux (voir Figure 8). En effet, le modèle est décrit comme un réseau de tissus avec 7 compartiments différents : plasma, gonades, cerveau, tissus adipeux, tissus richement perfusés, muscles et foie (Figure 8). Le métabolisme des Cl<sub>x</sub>BPA dans les tissus a été initialement décrit comme un processus de métabolisme extrahépatique dans tous les tissus représentés par un ratio d'extraction (E).

Un modèle PBPK différent des trois premières substances (Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA) a été développé pour le Cl<sub>4</sub>BPA car une diffusion limitée dans les tissus (cerveau et muscles) a dû être décrit pour permettre de simuler et expliquer les concentrations obtenues dans ceux-ci. En effet, les tissus cérébraux et musculaires ont été subdivisés en deux sous-compartiments : un sous-compartiment sanguin et un sous-compartiment cellulaire (voir Figure 8). En plus d'un métabolisme hépatique, un métabolisme extrahépatique a été décrit pour le Cl<sub>4</sub>BPA dans le cerveau, les muscles et les tissus richement perfusés. Une clairance intrinsèque a été ajustée



pour les muscles et le cerveau pour le métabolisme et non un rapport d'extraction (E) comme les trois premiers contaminants.

Les quantités dans les muscles et le cerveau pour le ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA et Cl<sub>3</sub>BPA ont été calculées selon les équations différentielles suivantes :

$$dA_{br}/dt = (Q_{br} \times C_a) - (Q_{br} \times C_{vbr}) - (E_{br} \times C_a \times Q_{br}) \quad [3]$$

$$dA_m/dt = (Q_m \times C_a) - (Q_m \times C_{vm}) - (E_m \times C_a \times Q_m) \quad [4]$$

Où  $Q_{br}$  et  $Q_m$  sont les débits tissulaires (L/h);  $E_m$  et  $E_{br}$  sont les ratios d'extraction tissulaires (dans le cas où il n'y a pas de métabolisme extrahépatique,  $E_{br}$  ou  $E_m = 0$ ).  $C_a$  est la concentration artérielle et  $C_v$  tissulaire est la concentration veineuse dans les tissus ( $C_{vbr}$  et  $C_{vm}$ ).

Les quantités dans les sous-compartiments des tissus démontrant une distribution limitée par la diffusion ont été calculées selon les équations différentielles suivantes pour le Cl<sub>4</sub>BPA :

-Sous-compartiment vasculaire :

$$dA_{vT}/dt = -- (PA_{TC} * C_T) + ((PA_{TC} * C_{tv})/P_{tissusb}) - (Q_t * C_{tv}) \quad [5]$$

-Sous-compartiment tissulaire :

$$dA_T/dt = + (PA_{TC} * C_T) - ((PA_{TC} * C_{tv})/P_{tissusb}) - (C_{tv} * CL_{inttissus}) \quad [6]$$

Où  $PA_{TC}$  est le coefficient de perméabilité dans le tissu. Ils représentent une mesure quantitative de la capacité des Cl<sub>x</sub>BPA à traverser la barrière biologique prévue, soit les muscles ou le cerveau dans notre cas.  $C_{tv}$  est la concentration vasculaire du tissu et  $C_T$  est la concentration tissulaire pour un modèle à diffusion limitée.  $P_{tissusb}$  est le coefficient de partage tissus : sang.  $CL_{inttissus}$  est la clairance intrinsèque tissulaire.

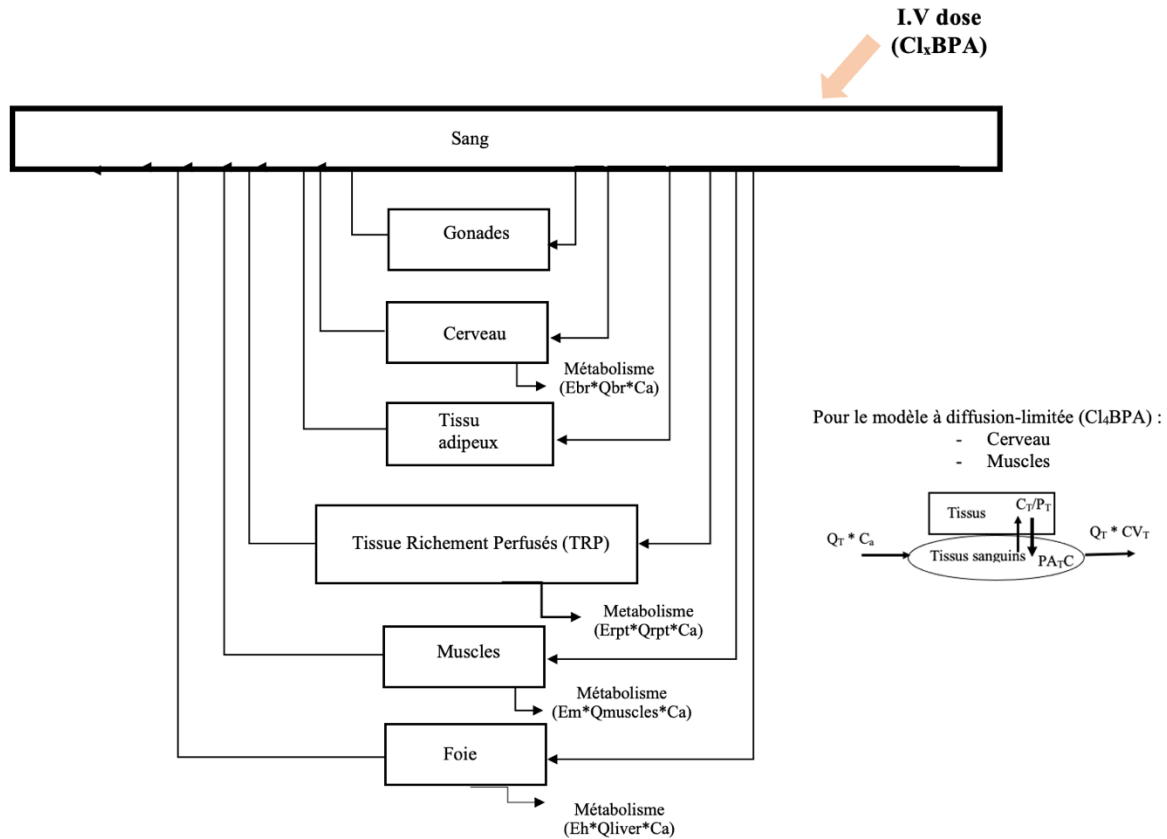


Figure 8. Représentation conceptuelle du modèle toxicocinétique à base physiologique chez les rats Sprague-Dawley pour le Cl<sub>1</sub>BPA, le Cl<sub>2</sub>BPA et le Cl<sub>3</sub>BPA, adapté du modèle PBPK du BPA de Yang et al. (2013). Les Cl<sub>x</sub>BPA ont été administrés par voie intraveineuse à des rats adultes. Pour le Cl<sub>4</sub>BPA, un modèle à diffusion limitée a été réalisé pour une meilleure prédiction des concentrations tissulaires.

$E_{rpt}$ ,  $E_m$ ,  $E_h$ ,  $E_{br}$  sont les ratios d'extraction tissulaire ;  $Q_{rpt}$ ,  $Q_{liver}$ ,  $Q_{muscles}$ ,  $Q_{br}$  sont les débits tissulaires ;  $C_a$  est la concentration artérielle sanguine. Pour le modèle à diffusion limitée du Cl<sub>4</sub>BPA :  $PA_T C$  est le coefficient de perméabilité tissulaire ;  $C_T$  est la concentration de Cl<sub>x</sub>BPA dans le tissu ;  $CV_T$  est la concentration veineuse qui quitte le tissu ;  $P_T$  est le coefficient de partage tissus : sang.

## 2.3 Caractérisation *in vitro* du métabolisme

Pour obtenir les valeurs des constantes métaboliques de chaque Cl<sub>x</sub>BPA (Km, Vmax, CLint) chez le rat et l'humain, des expériences *in vitro* avec des hépatocytes de foie ont été effectuées.

Km représente la constante de Michaelis-Menten. Elle caractérise la réaction enzymatique et est la concentration en Cl<sub>x</sub>BPA pour laquelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique de phase II est à la moitié de la vitesse initiale maximale. Cette constante est une concentration. Cela se traduit en général par une faible affinité de l'enzyme pour la substance. Quant au Vmax, cela représente la vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de Cl<sub>x</sub>BPA. Finalement, la clairance intrinsèque (CLint) se définit par la mesure de l'activité métabolique du foie. Plus la clairance intrinsèque est élevée, et plus la substance est métabolisée dans le foie.

Pour identifier ces constantes métaboliques, des essais métaboliques ont été réalisés dans des suspensions d'hépatocytes ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ mL) qui ont été incubées à 37 °C dans des tubes eppendorfs et agitées à 600 rpm. Les suspensions ont été pré-incubées pendant 15 min, après quoi les Cl<sub>x</sub>BPA dissous dans du milieu de culture William E (10% de sérum de veau nouveau-né) ont été ajoutés. Dans une étude préliminaire, nous avons d'abord déterminé la période de temps où le taux d'élimination est constant (linéarité) et avons choisi un temps d'incubation pour chaque Cl<sub>x</sub>BPA (Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) dans cette période. Deux concentrations de Cl<sub>x</sub>BPA (25 ng/mL et 2,5 ng/mL) ont été ajoutées dans un petit volume de milieu d'incubation (300 µL) à chaque flacon. Puis, ces suspensions ont été incubées avec les Cl<sub>x</sub>BPA à 7 temps différents pour deux espèces différentes (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 et 2 h pour les rats vs 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 4 h pour les humains) à 37 °C et agitées à 600 rpm à l'aide d'un bloc de 1,5 mL de mélangeur Thermomixer R d'Eppendorf (Eppendorf, MA, USA). Les incubations ont été lancées dès l'introduction du Cl<sub>x</sub>BPA. Les contrôles sont considérés au moment t = 0 h, c'est-à-dire lorsque les Cl<sub>x</sub>BPA sont ajoutés au milieu d'incubation dans les eppendorfs. Des tests ont été effectués pour déterminer si le BPA et les Cl<sub>x</sub>BPA étaient présents en utilisant des eppendorfs en plastique plutôt que des tubes en verre et aucune différence de concentration n'a été trouvée entre le verre et le plastique. Par conséquent, pour

des raisons pratiques, les eppendorfs en plastique ont été utilisés. Après incubation, les réactions ont été arrêtées en ajoutant 1,2 ml d'acétonitrile froid contenant du bisphénol A (BPA) comme standard interne. Les échantillons ont été agités au vortex pendant 1 minute et mis sur la glace pendant 30 minutes. Ensuite, les échantillons de Cl<sub>x</sub>BPA ont été centrifugés pendant 20 min à 12 000g à 25 °C. Le surnageant a été retiré et mis dans un flacon avant d'être analysé à - 20 °C.

Les analyses métaboliques ont été réalisées à des concentrations de Cl<sub>x</sub>BPA de 0,04, 0,5, 1, 2,5, 3,33, 5, 10 et 25 ng/mL dans du milieu de culture William's E (WME) avec 10 % de sérum de veau nouveau-né avec  $0,5 \times 10^6$  hépatocytes/mL dans des volumes totaux de 300 µL dans chaque flacon. Ces faibles concentrations ont été utilisées, car les Cl<sub>x</sub>BPA ne sont pas solubles dans l'eau à des concentrations plus élevées. Les suspensions ont été incubées pendant le temps d'incubation déterminé précédemment à 37 °C et agitées à 600 rpm. Après incubation, les réactions ont été arrêtées en utilisant la même méthode que dans l'étude préliminaire.

Après avoir effectué les expériences de métabolisme, les constantes de cinétiques enzymatiques ont été calculées par un modèle de régression non linéaire en utilisant l'application d'ajustement des courbes dans le logiciel Matlab version 2020b (MathWorks, Natick MA). En utilisant cette application, les paramètres de l'équation de Michaelis-Menten ont été ajustés aux données expérimentales. Les concentrations à t=0h et après incubation ont été mesurées, puis la différence de concentration a été calculée pour avoir la quantité métabolisée dans le foie (Amet). Enfin, la vitesse exprimée en ng/min/millions d'hépatocytes a été calculée à partir de la quantité métabolisée. Pour effectuer l'ajustement des courbes dans le logiciel curve fitting de Matlab, la concentration au début de l'incubation (T=0h) (ng/mL) versus la vitesse ont été ajoutées pour estimer les constantes métaboliques : V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> ou la clairance intrinsèque (CL<sub>int</sub>) comme dans l'article 1.

## 2.4 Caractérisation de la distribution

### 2.4.1 Mesures *in vitro*

Pour obtenir différents paramètres physico-chimiques utilisés dans les modèles PBPK, une méthode *in vitro* a été utilisée : la dialyse à l'équilibre (RED). La fraction non liée dans le milieu d'incubation ( $F_{U_{inc}}$ ), l'affinité aux protéines plasmatiques ( $F_{up}$ ), le PC plasma : tampon et le PC sang : plasma (BPR) ont été déterminés à l'aide de ce dispositif.

Cette méthode consiste à évaluer l'affinité d'une substance pour un milieu ou des protéines. Elle fonctionne avec des inserts qui sont placés dans des puits d'une plaque en téflon (voir Figure 9). Chaque insert est séparé par une membrane semi-perméable, avec un seuil de coupure de poids moléculaire (MWCO) d'environ 8 kDa. Ainsi, chaque insert à usage unique est composé de deux compartiments (ou chambres) côte à côte, l'un correspondant aux échantillons de milieu d'incubation (chambre rouge) et l'autre au tampon physiologique (chambre blanche) (voir Figure 9) (Waters et al., 2008; Ye et al., 2017). Le tampon physiologique peut aussi être remplacé par un autre milieu tel que le sang pour la détermination du PC sang : plasma par exemple.

Pour la fraction non liée dans le milieu d'incubation ( $F_{U_{inc}}$ ), les chambres rouges des inserts ont été complétées avec du milieu William E (WME), du sérum de veau nouveau-né (10 %), des suspensions d'hépatocytes de rat Sprague-Dawley ( $0,5 \times 10^6$  cellules/mL) et une concentration de  $Cl_x$ BPA pour un volume total égal à 300  $\mu$ L. En outre, 450  $\mu$ L de tampon physiologique (PBS) ont été ajoutés dans la chambre blanche. À la suite de cela, la plaque de base en téflon a été placée dans un agitateur orbital (600 rpm) par Fisherbrand<sup>TM</sup> et incubée à 37 °C pendant 12 h (équilibre largement atteint). A la fin de l'incubation, l'équilibre a été atteint entre les deux chambres et les échantillons ont été collectés dans les deux compartiments. Les échantillons ont ensuite été extraits avec la même méthode d'extraction que pour l'étude des constantes métaboliques et analysés par HPLC-MS/MS à l'Inserm CIC 1402 à Poitiers.

La détermination du  $F_{U_{inc}}$  a été effectuée en triplicat à deux concentrations différentes : l'une plus élevée (25 ng/mL) et l'autre dix fois plus faible (2.5 ng/mL) pour chaque  $Cl_x$ BPA ( $Cl_1$ BPA ;  $Cl_2$ BPA,  $Cl_3$ BPA et  $Cl_4$ BPA). Des courbes standards pour les  $Cl_x$ BPA ont été utilisées

pour quantifier les concentrations totales ( $C_{total}$ ) trouvées dans la chambre du milieu d'incubation et les concentrations libres ( $C_u$ ) ont été identifiées et mesurées dans la chambre blanche (PBS). Enfin, la détermination de  $C_{total}$  et des concentrations de  $C_u$  nous ont permis de calculer la fraction non liée ( $FU_{inc}$ ) en divisant  $C_u/C_{total}$ .



Figure 9. Appareil de dialyse à l'équilibre rapide (A) et cellule de dialyse individuelle (B) provenant de l'article de Waters et al. (2008).

La fraction non liée dans le milieu d'incubation ( $FU_{inc}$ ) a permis d'évaluer l'affinité de chaque  $Cl_xBPA$  au milieu d'incubation contenant des hépatocytes de rats et d'humain. Ce paramètre est important pour extrapoler les données des essais métaboliques *in vitro* aux conditions *in vivo* dans le foie (IVIVE). Cet essai *in vitro* a été utilisé dans un milieu d'incubation exempté de protéines plasmatiques afin de réduire certaines erreurs expérimentales.

Les méthodes IVIVE utilisant des données déterminées dans des essais *in vitro* comme avec la dialyse à l'équilibre exempté de protéines plasmatiques corrigent généralement la fraction non liée dans le milieu d'incubation due à la liaison non spécifique (Poulin et al., 2021). Par conséquent, la  $CL_{int}$  est corrigée en la divisant par la  $FU_{inc}$  pour obtenir la clairance intrinsèque non liée au milieu d'incubation qui sera utilisée dans l'extrapolation de la  $CL_{int}$  *in vivo*.

L'affinité aux protéines plasmatiques ( $F_{up}$ ), le PC plasma : tampon et le PC sang : plasma (BPR) ont été utilisés dans le modèle PBPK chez le rat Sprague-Dawley. Ces paramètres physico-chimiques sont importants dans la prédiction des cinétiques plasmatiques et tissulaires. Enfin, la technique de la dialyse à l'équilibre (RED) se distingue par ses nombreux avantages : test à haut débit (équilibre atteint sur une courte période de temps), analyse après l'équilibre, réduction de la liaison non spécifique (van Liempd et al., 2011), utilisation de très petits volumes, et choix du seuil de coupure de poids moléculaire pour les membranes. La technique RED est recommandée particulièrement pour presque tous les composés à petites tailles moléculaires (Buscher et al., 2014).

## 2.4.2 Estimations *in silico*

Les coefficients de partage (PC) tissus : plasma ont été obtenus à l'aide d'une méthode *in silico* présentée dans l'article de Poulin et al. (2012). Cependant, ce sont les PC tissus : sang qui ont ensuite été injectés dans le modèle PBPK afin de se rapprocher le plus possible de la réalité physiologique de l'animal.

Les  $K_p$ , coefficients de partage tissus : plasma (gonade : plasma, cerveau : plasma, foie : plasma, adipeux : plasma, muscles : plasma, tissus richement perfusés : plasma et érythrocytes : plasma) ont été prédits pour les composés hautement lipophiles, basés sur la représentation conceptuelle de la distribution d'un composé organique dans la matrice biologique (l'équivalent de la fraction volumique de l'eau dans la matrice  $F_{wm}$ , l'équivalent de la fraction volumique des lipides neutres dans la matrice  $F_{nlm}$ , le terme d'ionisation pour la matrice  $I_m$ , etc....) (Poulin et al., 2012) à l'aide de l'équation suivante :

$$K_p = \frac{(1+I_{wt}) \times F_{wt} + P_{nlw} \times F_{nlt}}{(1+I_{wp}) \times F_{wp} + P_{nlw} \times F_{nlp}} \quad [7]$$

Où  $F_{wt}$  et  $F_{wp}$  sont les volumes fractionnaires de l'équivalent en eau dans les tissus et dans le plasma respectivement,  $F_{nlt}$  et  $F_{nlp}$  sont les volumes fractionnaires de l'équivalent en lipides neutres dans les tissus et dans le plasma respectivement, et enfin,  $P_{nlw}$  est le coefficient de partage lipides neutres-eau. Toutes les valeurs de ces paramètres sont présentées dans le tableau

1 de l'annexe de l'article 3 (chapitre 5) en données complémentaires et les coefficients de partage tissus : plasma sont présentés dans le tableau 1 de l'article 3 (chapitre 5). Les valeurs de  $pK_{a1}$  et  $pK_{a2}$  pour chaque  $Cl_x$ BPA ont été calculées avec un logiciel QSAR (Chemaxon, Marvin Sketch, 22.11).

De plus, les valeurs de  $I_{wt}$ , terme d'ionisation de la phase aqueuse dans les tissus ou de l'eau extracellulaire et  $I_{wp}$ , terme d'ionisation du plasma dans les tissus, ont été calculées pour l'équation de l'acide diprotique en fonction du pH des matrices (tissus ou plasma) d'après Berezhkovskiy et al. (2011) (Berezhkovskiy, 2011):

$$I_{wt,p} = 10^{pH-pK_{a1}} + 10^{pH-pK_{a2}} + 10^{2*pH-pK_{a1}-pK_{a2}} \quad [8]$$

En effet, une méthode basée sur les composés ne contenant pas d'atomes d'oxygène dans leur structure moléculaire a été utilisée pour calculer le PC tissus adipeux : plasma en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Log } P_{vow} = 1,0654 \times \text{log } P_{ow} - 0,232 \quad [9]$$

Tous les calculs des coefficients de partage pour cette méthode ont été ajoutés dans le document « matériels supplémentaires » de l'article 3 (chapitre 5).

De plus, le PC sang : plasma (BPR) a été calculé comme suit :

$$\text{BPR} = \frac{P_e \cdot (V_e + V_{pl})}{V_e + V_{pl}} \quad [10]$$

Où  $P_e$  est le coefficient de partage érythrocytes : plasma,  $V_e$  et  $V_{pl}$  sont respectivement le volume d'érythrocytes et de plasma présent chez le rat (Loccisano et al., 2012; Mirfazaelian et al., 2007).

## 2.5 Expositions *in vivo* et toxicocinétique animale et humaine

Durant ce doctorat, deux études *in vivo* ont été effectuées. La première était une étude d'exposition sur des rats Sprague-Dawley, réalisée à l'animalerie de l'Université de Montréal. Nous avons effectué cette étude d'exposition chez le rat afin de comparer et de calibrer le modèle PBPK sur les cinétiques plasmatiques et tissulaires observées. La deuxième étude fut une étude



clinique chez l'humain où nous avons utilisé quelques données de cinétique ( $t=1$ , et 2h) afin de valider la méthode analytique des métabolites du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA (article 2, chapitre 4).

#### 2.5.1.1 Étude d'exposition intraveineuse des Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat Sprague-Dawley

Des rats mâles Sprague-Dawley (environ 281 g) ont été obtenus des Laboratoires Charles Rivers (Montréal, Canada). Les animaux ont été logés à raison d'un par cage dans des pièces à température ( $22,5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) et humidité ( $50,5 \pm 10\%$ ) contrôlées sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à l'animalerie de l'Université de Montréal. Les rats Sprague-Dawley ont été acclimatés à la cage métabolique pendant quatre jours : 1h, 2h, 4h et 8h avant l'utilisation. Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (CDEA) de l'Université de Montréal. 80 rats Sprague-Dawley ont été utilisés pour l'exposition aux Cl<sub>x</sub>BPA par injection intraveineuse (iv). Les animaux ont été exposés au ClBPA, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA (20 rats/substance pour 2 doses) dans de l'eau glucosée avec 20% d'Alkamuls-EL620. Des doses de 4 et 40 mg/kg ont été injectées pour le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA et 0.4 et 4 mg/kg pour le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA. Après l'administration des doses, des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine latérale de la queue à 7 moments différents : 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 et 24h. Ensuite, les animaux ont été sacrifiés par euthanasie au CO<sub>2</sub>, et le cerveau et les muscles ont été prélevés et lavés avec un tampon phosphate (pH = 7,4). Tous les tissus ont été stockés dans un récipient en verre à -20°C à l'Université de Montréal et ont été analysés à l'Université de Poitiers au laboratoire HEDEX, CIC Inserm 1402 par HPLC-MS/MS. Tous les échantillons ont été stockés à -20°C à l'Université de Poitiers avant d'être analysés.

#### 2.5.1.2 Étude clinique chez l'humain présente dans l'article 2

Des échantillons de plasma humain ont été obtenus dans le cadre d'une étude clinique menée par le Centre d'Investigation Clinique (CIC Inserm 1402, Poitiers) entre avril et octobre 2021. Cette étude clinique a été menée chez des femmes volontaires saines afin d'évaluer la cinétique du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-d<sub>12</sub> chez l'humain. Seules des femmes volontaires ont été incluses car l'objectif final du projet était d'extrapoler un modèle PBPK aux femmes enceintes. Une dose orale (n = 6) ou une dose cutanée (n = 6) de 50 mg/kg de 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-d<sub>12</sub> a été administrée à chaque volontaire. L'évolution dans le temps du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-d<sub>12</sub> et du conjugué glucuronidé

(3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G-d<sub>12</sub>) dans le plasma a été établie en effectuant des prélèvements sanguins en série à l'aide d'un cathéter installé dans le bras controlatéral. L'autre métabolite majeur (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S-d<sub>12</sub>) n'a pas été quantifié dans ces échantillons car le standard correspondant n'était pas disponible au laboratoire de l'Université de Poitiers. Des échantillons de sang ont été collectés dans des tubes d'héparine à différents moments (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12 et 24 heures) pendant les 24 heures suivant l'exposition (n = 12 échantillons par individu). Dans l'heure suivant le prélèvement, le plasma a été isolé par centrifugation des échantillons pendant 10 minutes à 2200 g à 4°C. L'essai clinique a été approuvé par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) et le Comité de protection des personnes (CPP, 2020-A02116-33, numéro IDRCB) en France. Cette étude clinique a été enregistrée sur le site ClinicalTrials.gov avec l'identification NCT04788810. Tous les échantillons humains ont été conservés à -20°C avant utilisation.

Dans l'article 2 (chapitre 4), seules les concentrations de métabolites mesurées chez le rat et l'humain à 1 et 2 heures après l'administration sont présentées afin de démontrer l'adéquation de la méthode analytique développée. Tous les résultats de l'étude clinique seront présentés dans un article de toxicocinétique chez l'humain où l'on présentera les données urinaires et plasmatiques, ainsi que les paramètres toxicocinétiques du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA.

## **2.6 Analyses chimiques**

### **2.6.1 Principe général de la HPLC-MS/MS**

La chromatographie est un processus par lequel diverses molécules d'un mélange sont séparées les unes des autres. La séparation s'effectue par le passage du mélange sur un lit de phase stationnaire. Le déplacement de la phase mobile permet la migration des analytes. La nature et l'importance des interactions des analytes dépendent de la phase mobile et de la phase stationnaire utilisée. Tous ces facteurs déterminent l'efficacité de la séparation entre les différentes substances d'un mélange. La vitesse de déplacement et la température de la phase mobile affectent aussi la qualité de la séparation.

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS) est une méthode d'analyse combinant les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse (voir Figure 10). Cette technique d'analyse sert à identifier et/ou quantifier précisément de nombreuses substances.



Figure 10 : Photographie de la HPLC-MS/MS utilisée au laboratoire à Poitiers

L'échantillon liquide à analyser est placé dans un injecteur et envoyé dans la boucle d'injection. Après avoir été dégazé, l'éluant est pompé à son tour dans la boucle grâce à des pompes, ce qui permet de délivrer un débit précis et constant durant la séparation des analytes du mélange. Ces pompes permettent de travailler en mode isocratique, c'est-à-dire avec un mélange d'éluant de composition constante, ou en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la composition du mélange d'éluant. Le mélange passe ensuite dans la colonne qui est composée de silice greffée de molécules qui varient en fonction du type d'échantillon à analyser. A la sortie de la colonne, les composés entrent en contact avec le détecteur (ici le spectromètre de masse en tandem : MS/MS). La spectrométrie de masse permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêts en mesurant leur masse, et de caractériser leur structure chimique (voir schéma en Figure 11).

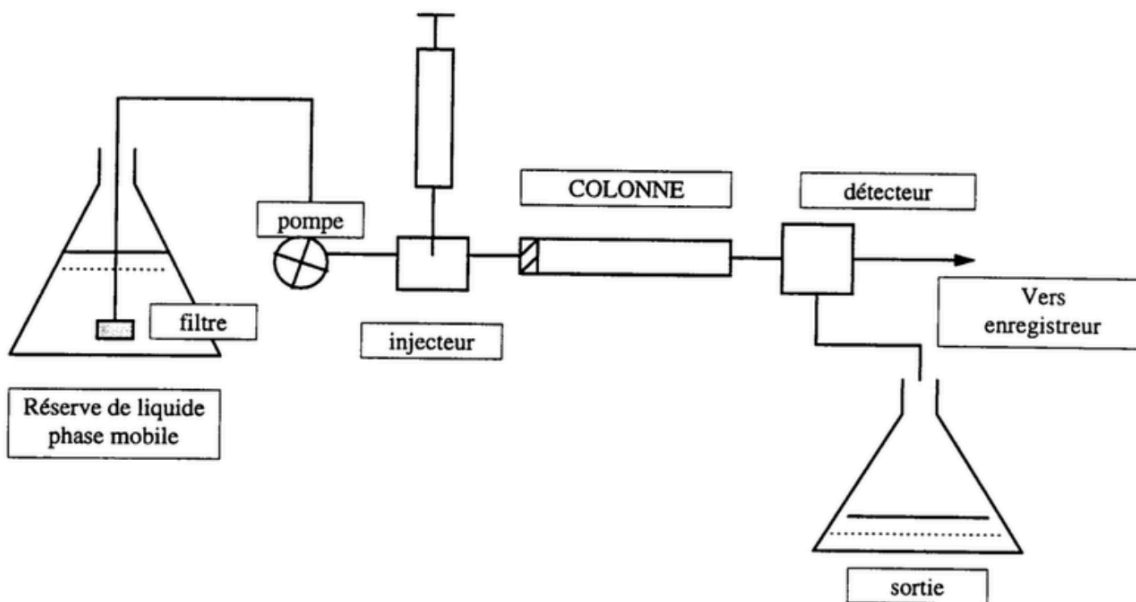


Figure 11 : schéma d'une analyse par HPLC

## 2.6.2 Matériel utilisé

L'appareil utilisé est une chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC-MS/MS). Le système chromatographique UHPLC Shimadzu comprenait deux pompes Nexera X2 LC-30AD, un four CTO-30A Nexera X2 et un passeur d'échantillons SIL-30AC. Les composés dans le plasma et les tissus ont été séparés respectivement avec une colonne chromatographique Kinetex C18 (taille des particules 2,6  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm, Phenomenex®) et une colonne Waters® Acquity CSH C18 (taille des particules 3,5  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm, Milford, États-Unis).

La détection est assurée par un spectromètre de masse Qtrap 6500+ de chez ABSciex® (Concord, Canada) équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI : Electrospray Source Ionization) opérant en mode négatif. L'analyse quantitative est effectuée en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) permettant d'identifier spécifiquement la transition entre l'ion

père (fragmenté par la suite dans la cellule de collision) et l'ions fils de l'analyte d'intérêt comme représenté dans la Figure 12 ci-dessous.

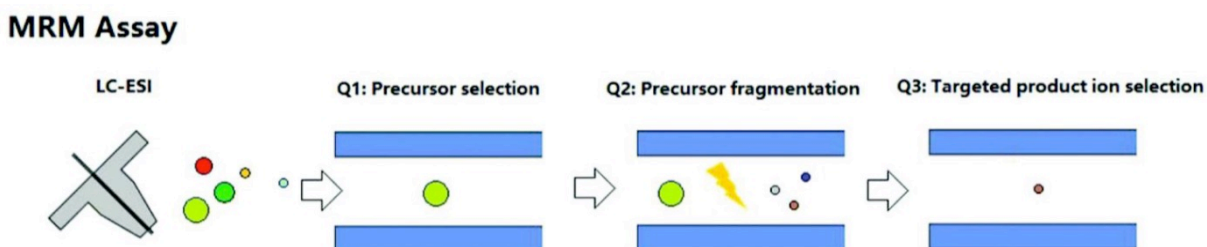


Figure 12 : Principe de fonctionnement du mode MRM

Après infusion de chaque composé à la concentration de 1 µg/mL à un débit de 10 µL/min, deux transitions ont été optimisées. La première permettant la quantification des composés et la seconde servant à confirmer que le composé détecté est bien celui recherché. Les dwell time ont été optimisés pour obtenir une forme de pic satisfaisante. Les logiciels Analyst® et MultiQuant® ont été utilisés pour l'analyse des échantillons et le traitement des données respectivement.

### 2.6.3 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques sont différentes pour la matrice plasma et tissus chez le rat. En effet, pour le plasma, le système UHPLC Shimadzu® Nexera X2 (Kyoto, Japon) était équipé d'une colonne Kinetex C18 (taille des particules 2,6 µm, 2,1 x 100 mm, Phenomenex®) maintenue à 40°C, et une phase mobile binaire était délivrée en mode gradient, à un débit de 350 µL/min. L'eau (A) et l'ACN (B) ont été utilisés comme solvants de la phase mobile. Le gradient commençait à 30 % de B et augmentait linéairement jusqu'à 90 % de B (0,01-6,50 min), puis jusqu'à 99 % de B (6,5-7 min) ; il était maintenu à 99 % de B pendant 5 minutes (7-12 min) ; il diminuait jusqu'à 30 % de B (12-12,50 min), puis était maintenu à 30 % de B (12,50-15 min) pour rééquilibrer la colonne.

Pour quantifier la concentration de Cl<sub>x</sub>BPA dans les tissus des échantillons de rats Sprague-Dawley, une méthode HPLC-MS/MS a été utilisée. Cette méthode était basée sur les articles publiés par Venisse et al. (2019) et Cambien et al. (2020). Pour cette méthode, une

pompe HPLC Shimadzu® Nexera X2 (Kyoto, Japon) a été équipée d'une colonne Waters® Acquity CSH C18 (taille des particules 3,5 µm, 2,1 × 100 mm, Milford, États-Unis) chauffée à 40 °C. La séparation chromatographique a été réalisée en utilisant une phase mobile binaire (eau (A)/méthanol (B)) délivrée en mode gradient à un débit de 350 µL/min. L'élution par gradient a commencé à 30 % de B (0-0,5 min) ; puis a augmenté linéairement à 90 % de B (0,5-7 min) ; puis à 99 % de B (7-7,5 min) ; maintenue à 99 % de B pendant 5 min (7,5-12,5 min) ; puis a diminué à 30 % de B (12,5-13 min) et enfin maintenue à 30 % de B pendant 2,5 min (13-15,5 min) pour rééquilibrer la colonne.

## **2.6.4 Conditions d'extraction chez l'animal**

### **2.6.4.1 Extraction plasmatique**

La gamme d'étalonnage a été réalisée dans des tubes à hémolyse de 5 mL en ajoutant 200 µL de plasma, 20 µL de solution d'étalon interne et de la solution standard de surcharge. Pour le blanc et l'échantillon inconnu, la solution standard est remplacée par 20 µL de méthanol. Ensuite 500 µL d'acétonitrile ont été ajoutés pour précipiter les différentes protéines contenues dans le plasma puis le mélange est vortexé. Après centrifugation à 1730 g à 25 °C pendant 10 min, un volume de 400 µL de surnageant est récupéré puis évaporé à sec sous un flux d'azote à 37 °C. Le résidu sec obtenu est solubilisé dans 200 µL de phase A (Eau). Après agitation au vortex les 200 µL de solution sont déposés dans un insert contenu dans un vial pour l'analyse. Vingt microlitres sont injectés dans l'appareil HPLC-MS/MS. La gamme de calibration s'étendait de 0,5 à 100 ng/mL (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 ng/mL).

### **2.6.4.2 Extraction tissulaire**

Le tissu hépatique (foie) et les autres tissus et organes (muscles, cerveau et tissu adipeux) utilisés pour la gamme provenaient de l'animalerie de l'Université de Poitiers. Des broyats tissulaires ont été obtenus par broyage de 2 g de tissus dans 10 mL d'eau de qualité UHPLC-MS à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax® (IKA® T18 Basic). Les broyats ont été conservés à -20 °C avant analyse.

Cinq cents microlitres de broyat ont été surchargés par 50  $\mu$ L de solution d'étalon interne et de la solution standard de surcharge. Pour le blanc et l'échantillon inconnu, la solution standard est remplacée par 50  $\mu$ L de méthanol. Cinq cents microlitres d'acétonitrile sont ajoutés puis la solution est agitée au vortex pendant 1 min. Après ajout de 100 mg de réactifs QuEACHERS MIX I, le mélange est centrifugé pendant 5 min à 2330 g à 25 °C. Cinq cents microlitres de surnageant sont transférés dans un tube à hémolyse propre puis 200 mg de réactifs QuEACHERS MIX VI sont ajoutés. Après ajout de MIX VI, le mélange est agité puis centrifugé pendant 5 min à 2330 g à 25 °C. Un volume de 100  $\mu$ L de surnageant est récupéré et évaporé à sec sous un flux d'azote à 37 °C. Le résidu obtenu est solubilisé avec 200  $\mu$ L d'un mélange Eau/MeOH (70/30, v/v). Enfin après centrifugation (5 min, à 2330 g à 25 °C) le surnageant est repris dans un insert contenu dans un vial pour l'analyse. Vingt microlitres de solution sont injectés dans le système LC-MS/MS. Les points de gamme utilisés étaient 0.05 ; 0.1 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL de broyat.

## Chapitre 3– Article 1

### 3 Article 1. Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA) and interspecies differences between rats and humans

Métabolisme hépatique des dérivés chlorés du bisphénol A (Cl<sub>x</sub>BPA) et différences interespèces entre le rat et l'humain

*Plattard.N<sup>a, b</sup>, Venisse.N<sup>b, c</sup>, Carato.P<sup>b</sup>, Dupuis.A<sup>b, c</sup>, Haddad.S<sup>a\*</sup>*

\*Auteur-ressource

<sup>a</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, CReSP, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup> INSERM, CIC1402, University Hospital of Poitiers, University of Poitiers, CIC1402, HEDEX Research Group, 86021, Poitiers Cedex, France

<sup>c</sup> Biology-Pharmacy-Public Health Department, University Hospital of Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86201, Poitiers Cedex, France

L'article a été soumis à la revue **Archives of Toxicology** (IF = 4.21, 2021) le 29 octobre 2021 et a été publié électroniquement le 24 janvier 2022.

**Plattard N**, Venisse N, Carato P, Dupuis A, Haddad S. Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA) and interspecies differences between rats and humans. Arch Toxicol. 2022 Mar;96:783-792. doi: 10.1007/s00204-021-03217-7. Epub 2022 Jan 24. PMID: 35072755.



### 3.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs

**Noémie Plattard:** L'étudiante a contribué à la conception de cette étude, ainsi qu'à l'établissement des méthodologies. L'étudiante a réalisé toutes les expériences en laboratoire ainsi que l'analyse des résultats. Elle a rédigé l'article et les corrections subséquentes.

**Nicolas Venisse:** Dr. Venisse est le chercheur principal du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à l'élaboration du projet de recherche, aux méthodes d'analyses en HPLC-MS/MS au laboratoire à Poitiers pour de nouveaux réactifs. Dr Venisse a aussi réalisé l'analyse des données et a contribué à la rédaction de cet article.

**Pascal Carato:** Dr. Carato a contribué aux nouveaux outils analytiques en HPLC-MS/MS au laboratoire à Poitiers. Il a aussi synthétisé les dérivés chlorés du BPA et leurs métabolites dans le laboratoire de chimie organique du groupe Hedex. Dr. Carato a aussi contribué à la rédaction de ce manuscrit notamment sur la partie chimie organique.

**Antoine Dupuis:** Dr. Dupuis fait partie intégrante du projet de recherche financé par l'ANSES et a aussi contribué à la rédaction de cet article.

**Sami Haddad :** Dr. Haddad est le co-chercheur du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à l'élaboration du projet de recherche et a analysé les données de cet article. Dr. Haddad a aussi contribué à sa rédaction.

## 3.2 Résumé

Lors des traitements de l'eau potable par chloration, le bisphénol A (BPA) présent dans l'eau peut réagir avec le chlore pour former des dérivés chlorés du BPA (dérivés mono, di, tri et tétra-chlorés) ou Cl<sub>x</sub>BPA. Ces substances émergentes sont des perturbateurs endocriniens associés à l'obésité, au diabète de type II (TD2M) et à l'infarctus du myocarde. Les Cl<sub>x</sub>BPA sont présents dans différentes matrices biologiques humaines mais leur toxicocinétique reste inconnue. L'objectif de cette étude était de mesurer et de comparer la cinétique métabolique dans le foie de quatre Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) entre composés et entre espèces (rats Sprague-Dawley vs humains).

Pour estimer leurs constantes métaboliques (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, clairance intrinsèque), des essais métaboliques ont été réalisés dans des suspensions d'hépatocytes. Les essais ont révélé que les constantes métaboliques du Cl<sub>x</sub>BPA peuvent varier considérablement en fonction des substances et des espèces. Alors que le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA présentent des clairances intrinsèques non liées (CL<sub>intU</sub>) similaires dans les milieux d'incubation des rats, les valeurs pour le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA sont très différentes (3,109 et 0,684 mL/min/10<sup>6</sup> hépatocytes respectivement). Contrairement à ce qui se passe chez le rat, les résultats chez l'homme sont très différents puisque le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA ont des clairances intrinsèques non liées similaires alors que le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA divergent (0,350 et 1,363 mL/min/10<sup>6</sup> hépatocytes respectivement). Chez les deux espèces, le Cl<sub>2</sub>BPA et le Cl<sub>3</sub>BPA ont des clairances relativement similaires, et le ClBPA est très différent du Cl<sub>4</sub>BPA. Bien que nous ayons quantifié la proportion de métabolites sulfo et glucuro, d'autres métabolites peuvent avoir été formés (par exemple, conjugués avec le glutathion, le disulfate ou des métabolites oxydatifs). Cette étude a montré que la chloration avait un impact sur la clairance intrinsèque hépatique du Cl<sub>x</sub>BPA chez les rats et les humains et les valeurs mesurées seront précieuses pour le développement de modèles PBPK utilisés dans l'évaluation de l'exposition.

**Mots clés** : Dérivés chlorés du bisphénol A ; toxicocinétique ; métabolisme hépatique ; *in vitro* ; hépatocytes ; rats Sprague-Dawley ; santé humaine.

### 3.3 Abstract

During chlorination treatments of drinking water, aqueous bisphenol A (BPA) can react with chlorine to form chlorinated derivatives of BPA (mono, di, tri and tetra-chlorinated derivatives) or Cl<sub>x</sub>BPA. These emerging substances are endocrine disruptors associated with obesity, type II diabetes (TD2M) and myocardial infarction. Cl<sub>x</sub>BPA are present in different human biological matrices but their toxicokinetics remain unknown. The aim of this study was to measure and compare the metabolic kinetics in the liver of four Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA) between compounds and between species (Sprague-Dawley rats vs humans).

To estimate their metabolic constants (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, Intrinsic clearance), metabolic assays were performed in hepatocyte suspensions. Assays revealed that metabolic constants of Cl<sub>x</sub>BPA can greatly vary depending on substances and species. While ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA show similar unbound intrinsic clearances (CL<sub>intU</sub>) in rat incubation media, values for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA are very different (3.109 and 0.684 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes respectively). Unlike in rats, human results are quite different as Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA have similar unbound intrinsic clearances while ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA diverge (0.350 and 1.363 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes respectively). In both species, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA have relatively similar clearances, and ClBPA is very different from Cl<sub>4</sub>BPA. Although, we quantified the proportion of sulfo- and glucuro-metabolites, other metabolites may have been formed (e.g., glutathione, disulfate, or oxidative metabolites). This study showed that chlorination had an impact on hepatic intrinsic clearance of Cl<sub>x</sub>BPA in rats and humans and measured values will be valuable for the development of PBPK models for use in exposure assessment.

**Keywords:** Chlorinated derivatives of Bisphenol A; toxicokinetic; liver metabolism; *in vitro*; hepatocytes; Sprague-Dawley rats; human health

### 3.4 Introduction

During chlorination in drinking water treatment, aqueous bisphenol A (BPA) can react with chlorine to form chlorination by-products named chlorinated derivatives of Bisphenol A (mono-, di-, tri- and tetra-chlorinated derivatives) or Cl<sub>x</sub>BPA (Fukazawa et al., 2001; Gallart-Ayala et al., 2010). Cl<sub>x</sub>BPA are emerging pollutants with endocrine- disrupting effects (Mutou et al., 2006) found in humans. Indeed, Cl<sub>x</sub>BPA are active in competing with 17β-estradiol, a sexual hormone, in their binding to human Erα et ERβ proteins (Takemura et al., 2005). These pollutants have an effect on estrogen receptors up to 100 times greater than bisphenol A and are also ligands for PPAR-γ receptors that may be involved in metabolic effects (Riu et al., 2011a; Takemura et al., 2005). Moreover, epidemiological studies have shown that Cl<sub>x</sub>BPA is associated with obesity (Andra & Makris, 2015), type II diabetes (Andra, Kalyvas, et al., 2015) and myocardial infarction (Hu et al., 2019) thereby constituting a risk to human health.

Indeed, these emerging pollutants have mainly been detected in aqueous media such as wastewater treatment plant (WWTPs) (Dorival-Garcia et al., 2012; Gallart-Ayala et al., 2010), sewage sludge (Song et al., 2014), sediments (Chang et al., 2014; Yuan et al., 2010), distribution pipes as well as in drinking water (Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015). Cl<sub>x</sub>BPA have also been found in several human biological matrices such as urine (Liao et al., 2012), adipose tissue (Fernandez et al., 2007), breast milk (Cariot et al., 2012), colostrum (Migeot et al., 2013), plasma (Cambien et al., 2020; Del Olmo et al., 2005; Li et al., 2020) and placental tissue (Jimenez-Diaz et al., 2010; Vela-Soria et al., 2011), demonstrating that humans are exposed to these compounds.

Toxicokinetic data in animals or humans on Cl<sub>x</sub>BPA are not yet available in the literature except for scarce data on Cl<sub>4</sub>BPA (Plattard et al., 2021). Absorption (absorption constant or bioavailability), extent of tissue distribution, pathways of metabolism and/or detoxification, and elimination from the body therefore remain unknown. Riu et al. (2011b) have demonstrated that Cl<sub>4</sub>BPA was completely and mostly conjugated in Cl<sub>4</sub>BPA-sulfate *in vitro* using HepG2 cells and in zebrafish. They also demonstrated that the sulfation of Cl<sub>4</sub>BPA did not eliminate its estrogenic activity, unlike what is observed with Bisphenol A (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b) highlighting the importance of further metabolic studies with Cl<sub>x</sub>BPA. To our

knowledge, no studies have been performed to determine the metabolic clearance, *in vitro* or *in vivo*, of any of these Cl<sub>x</sub>BPA.

The objective of this study is to provide for the first time hepatic metabolic clearance data for all Cl<sub>x</sub>BPA and to perform an interspecies comparison between Sprague-Dawley rats and humans. With that in mind, we measured *in vitro* the rate of disappearance of the parent products in suspended hepatocytes to determine the different metabolic constants: maximal velocity (V<sub>max</sub>) and Michaelis affinity constant (K<sub>m</sub>) for saturable kinetics, or intrinsic clearance (CL<sub>int</sub>) for linear kinetics, using adult rat and human hepatocytes. This article is part of a larger project to develop a PBPK model in rats, then in humans and finally in pregnant women of Cl<sub>x</sub>BPA. For this, hepatocyte experiments were conducted with material from male rather than female Sprague-Dawley rats insofar as the ultimate objective is to use the data for the extrapolation to the *in vivo* situation to simulate the toxicokinetics of the 4 compounds in the male rats and in women hepatocytes to develop a PBPK model for pregnant women.

We then quantified the proportion of metabolites (glucuronide and sulfate) in the supernatant of metabolism experiments for ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA, the objective being to better explain the differences of metabolic constants.

## 3.5 Materials and Methods

### 3.5.1 Chemicals and Materials

Cryopreserved male Sprague-Dawley rat hepatocytes (reference number RSCP01, pooled from 2 adult donors, Batch number RSD181132A) and cryopreserved human female hepatocytes (reference number HUUCS10PF, pooled from 10 adult donors, batch number HUP190381) were purchased from Lonza company (Basel, Switzerland). The cells were stored in liquid nitrogen until use.

Bisphenol A was purchased from Sigma-Aldrich ® (St Louis, USA). Monochlorinated bisphenol A (> 99.8%), 3,3'-dichlorobisphenol A (>99.2%), trichlorobisphenol A (>97.5%), tetrachlorobisphenol A (>99.8%), monochlorinated BPA-glucuronide (>81.0%), monochlorinated BPA-sulfate (>81.0%), 3,3'-dichlorobisphenol A-glucuronide (>81.0%), 3,3'-

dichlorobisphenol A-sulfate (>81.0%), tetrachlorobisphenol A-glucuronide (>81.0%), tetrachlorobisphenol A-sulfate (>81.0%), were synthesized chemically and purified by our organic chemistry laboratory (HEDEX research group, CIC INSERM 1402) according to our published methods for parent compounds (Doumas et al., 2018), whereas there does not exist a published method for Cl<sub>x</sub>BPA metabolites. Concerning the structures of these metabolites, they can be found in supplementary data. William's medium E (WME) and newborn calf serum (NCS) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and VWR (Radnor, PA, USA), respectively. Solvents were of Optima LC-MS grade (Fischer Chemicals, Hampton, NH, USA). All other chemicals were of analytical grade.

### **3.5.2 *In vitro* metabolism assays in hepatocytes suspension**

In order to identify metabolic constants ( $V_{max}$  and  $K_m$ , or  $CL_{int}$ ) for each Cl<sub>x</sub>BPA, metabolic assays were performed in hepatocyte suspensions ( $0.5 \times 10^6$  cells. mL<sup>-1</sup>) that were incubated at 37°C in eppendorfs and agitated at 600 rpm. Suspensions were pre-incubated for 15 min after which Cl<sub>x</sub>BPA dissolved in WME (10% NCS) was added. In a preliminary study, we first determined the period of time where the elimination rate is constant (linearity) and chose an incubation time for each Cl<sub>x</sub>BPA (Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA) in that period. Two concentrations of Cl<sub>x</sub>BPA (25 ng.mL<sup>-1</sup> and 2.5 ng.mL<sup>-1</sup>) were added in a small volume of incubation medium (300 µL) to each vial and the suspensions were incubated with Cl<sub>x</sub>BPA for 7 different times for two different species (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 and 2 h for rats vs 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 and 4 h for humans) at 37°C and agitated at 600 rpm using an Eppendorf Thermomixer R mixer 1.5 mL Block (Eppendorf, MA, USA). Incubations were initiated upon introduction of Cl<sub>x</sub>BPA. Controls are considered at time t=0h, i.e., when Cl<sub>x</sub>BPA is added to incubation medium in eppendorfs. Tests were conducted to determine if Cl<sub>x</sub>BPA contamination was present using plastic eppendorfs rather than glass tubes and there were no differences in concentrations found between glass and plastic. Therefore, for practical purposes, plastic eppendorfs were used.

After incubation, reactions were stopped by adding 1.2 mL of cold acetonitrile containing Bisphenol A (BPA) as internal standard. Samples were vortexed for 1 minute and put on ice for 30 minutes. After, Cl<sub>x</sub>BPA samples were centrifugated for 20 minutes at 12 000g at 25°C. Supernatant was withdrawn and put into a vial prior to analysis at -20°C.

Metabolic assays were conducted at concentrations of Cl<sub>x</sub>BPA of 0.04, 0.5, 1, 2.5, 3.33, 5, 10 and 25 ng.mL<sup>-1</sup> in WME with 10% of NCS with 0.5x10<sup>6</sup> hepatocytes.mL<sup>-1</sup> in total volumes of 300 μL in each vial. These low concentrations were used because Cl<sub>x</sub>BPA are not soluble in water at higher concentrations. The suspensions were incubated during previously determined incubation time at 37°C and agitated at 600 rpm. After incubation, reactions were stopped using the same method as in the preliminary study.

### **3.5.3 Equilibrium dialysis and determination of unbound fraction in incubation media of Cl<sub>x</sub>BPA**

The unbound fraction in incubation media (FU<sub>inc</sub>) of Cl<sub>x</sub>BPA was measured experimentally using the procedure of Rapid Equilibrium Dialysis device (RED) (Waters et al., 2008; Ye et al., 2017). The inserts were placed in wells at the level of the Teflon base plate. Each RED insert is separated by a semi-permeable membrane, with an approximately 8 kDa molecular weight cut-off threshold (MWCO). Therefore, each single-use insert is composed of two compartments (or chambers) side by side, one corresponding to the incubation medium samples (red chamber) and the other one to the physiological tampon (white chamber).

The Teflon base plate, inserts, and all the other RED accessories were purchased from Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology) Inc. (Rockford, IL). Red chambers of the inserts were completed with William's medium E, Newborn Calf Serum (10%), Sprague-Dawley rat hepatocyte suspensions (0.5x10<sup>6</sup> cells. mL<sup>-1</sup>) and Cl<sub>x</sub>BPA concentration for a total volume equal to 300 μL. Furthermore, 450 μL of physiological buffer (PBS) were added in the white chamber. Following this, the Teflon base plate was placed in an orbital shaker (600 rpm) by Fisherbrand™ and incubated at 37°C for 12 hours (equilibrium largely achieved). At the end of the incubation, equilibrium was achieved between the two chambers and samples were collected in both compartments. Samples were then extracted with the same method of metabolism assays and analyzed by UHPLC-MS/MS in Poitiers laboratory, France.

The determination of  $FU_{inc}$  was performed in triplicate at two different concentrations: one higher (25 ng. mL<sup>-1</sup>) and the other 10 times lower (2.5 ng. mL<sup>-1</sup>) for each  $Cl_x$ BPA ( $Cl_1$ BPA;  $Cl_2$ BPA,  $Cl_3$ BPA and  $Cl_4$ BPA). Standard curves for  $Cl_x$ BPA were used to quantify the total concentrations ( $C_{total}$ ) found in the incubation media chamber and free concentrations ( $C_u$ ) were identified and measured in the white room (PBS). Finally, the analysis of  $C_{total}$  and  $C_u$  concentrations enabled us to calculate the unbound fraction ( $FU_{inc}$ ) by dividing  $C_u/C_{total}$ .

### 3.5.4 Quantification of $Cl_x$ BPA and their metabolites

#### 3.5.4.1 $Cl_x$ BPA with UHPLC-MS/MS quantification

$Cl_x$ BPA metabolic rates were estimated by measuring the disappearance rate of the parent compound concentration in samples. All samples were vortexed for 1 min each and were injected into an UHPLC Shimadzu® Nexera X2 (Kyoto, Japan) coupled with an API6500+ mass spectrometer from Sciex® (Concord, Canada).

A pump of UHPLC Shimadzu® Nexera X2 (Kyoto, Japan) was installed with Waters Acquity Peptide CSH C18 (1.7 µm particle size, 2.1 mm x 100 mm, Milford, USA) column heated at 40°C. Chromatographic separation was conducted using a Waters Acquity Peptide CSH C18 (1.7 µm particle size, 2.1 mm x 100 mm, Milford, USA) column heated at 40°C and a binary mobile phase (Water (A) / methanol (B)) supplied in the gradient mode at a flow rate of 350 µL.min<sup>-1</sup>. Gradient elution began at 30% of B (0-0.5min), and linearly increased to 90% of B (0.5-7min); then to 99% of B (7-7.5min); held at 99% of B for 5 min (7.5-12.5min), before being decreased to 30% of B (12.5-13min) and finally held at 30% of B for 2.5min (13-15.5min) to equilibrate the column.

Chemical quantification was achieved with an API6500+ mass spectrometer from Sciex® (Concord, Canada) using an electrospray ionization (ESI) interface, working in negative ionization mode. Ion source and MS/MS conditions were based on a previously validated assay developed for adipose tissue (Venisse et al., 2019). For each analyte, multiple reaction monitoring mode (MRM) with two specific daughter fragment transitions for one parent precursor ion was performed. The first was selected for quantification while the second was



used for confirmation. Data were collected with Analyst<sup>®</sup> software and quantification was obtained with MultiQuant<sup>®</sup> software.

#### 3.5.4.2 Peak area of metabolite samples with UHPLC-MS/MS method

To determine relative proportions of Cl<sub>x</sub>BPA metabolites (i.e., Cl<sub>x</sub>BPA-glucuronide and Cl<sub>x</sub>BPA-sulfate production between rat and human hepatocytes, the peak area of 2 transitions (G1 and G2; S1 and S2) in supernatants of metabolism experiments were measured. The first transition (G1 and S1) was used for quantification while the second (G2 and S2) was used for confirmation (Table 1). All samples were vortexed for 1min each and were injected into an UHPLC Shimadzu<sup>®</sup> Nexera X2 (Kyoto, Japan) coupled with an API6500+ mass spectrometer from Sciex<sup>®</sup> (Concord, Canada).

Chromatographic separation was conducted using a Phenomenex Acquity UPLC<sup>®</sup> Kinetex C18 (100 Å, 2.6 µm particle size, 2.1 mm x 100 mm, Milford, USA) column heated at 40°C and a binary mobile phase (Water (A) / acetonitrile (B)) supplied in the gradient mode at a flow rate of 350 µL.min<sup>-1</sup>. Gradient elution began at 0% of B (0-4.5min); then increased to 60% of B (4.5-15min); raised at 100% of B for 0.5 min (15-15.5min); then held to 100% of B (15.5-17.5min) and finally decreased at 0% of B for 2.5min (17.5-20min) to equilibrate the column. Determination of peak area of each metabolite was obtained with MultiQuant<sup>®</sup> software.

### 3.5.5 Data Analysis

Enzyme kinetic constants were calculated by non-linear regression model using curve fitting application in Matlab software (Matlab 2020b). Using the curve fitting module, we fitted parameters of the Michaelis Menten kinetic equation (Equation 1) to the experimental data as follows:

$$\text{Velocity} = \frac{V_{max} \times C}{K_m + C}$$

where V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> represent the maximal velocity (ng/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) of metabolism and apparent affinity constant (ng/mL), respectively. C is the chemical concentration in ng/ml.

When no optimum value could be obtained because no saturation could be observed, linear curves, were used as follows:

$$\text{Velocity} = Cl_{int}$$

where  $Cl_{int}$  are in mL/min/ $10^6$  hepatocytes and  $C$  is the substrate concentration of  $Cl_x$ BPA in ng.mL<sup>-1</sup>.

For comparison purposes between  $Cl_x$ BPA and species,  $Cl_{int}$  were also determined for  $C \ll K_m$  conditions for compounds that display saturable metabolism, as follows:

$$Cl_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

For the robustness of the data, we used the mathematical method known as "bisquare" for the fitting. The bisquare weighting method is preferable to the LAR method because it simultaneously aims to find a curve that fits most of the data using the usual least squares approach and minimizes the effect of outliers.

## 3.6 Results

*In vitro* assays for estimating the metabolic constants were carried out with incubation times of 0.083, 0.1, 0.67 and 1h for ClBPA, 3'3-Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA for Sprague-Dawley rats, respectively. For humans, the incubation times are 0.17, 4.5, 2.5, and 0.25 h for ClBPA, 3'3-Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA, respectively. Assays revealed that metabolic constants of  $Cl_x$ BPA are very variable depending on the substances and the different species. In Sprague-Dawley rat, only dichlorobisphenol A (Cl<sub>2</sub>BPA) showed saturable enzyme kinetics under the given conditions (Figure 14). Moreover, values of intrinsic clearance, which represent enzymatic activity of these emerging pollutants, are similar for ClBPA (0.135 mL/min/ $10^6$  hepatocytes) and Cl<sub>2</sub>BPA (0.150 mL/min/ $10^6$  hepatocytes) in rats and decrease with an

increasing number of chlorine atoms (Tableau 6, Figure 13, Figure 14); i.e., Cl<sub>3</sub>BPA had CL<sub>int</sub> value of 0.085 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes (Figure 15) and Cl<sub>4</sub>BPA of 0.039 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes (Figure 16). However, the intrinsic unbound clearance values (CL<sub>int U</sub>) of ClBPA (1.525 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) and Cl<sub>2</sub>BPA (1.057 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) are similar whereas the values for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA are very different (3.109 and 0.684 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) compared to the clearance values that do not consider the fraction unbound to the incubation medium (FU<sub>inc</sub>). Even when considering the unbound fraction, intrinsic clearance of Cl<sub>4</sub>BPA remains the lowest of the four chemicals (0.684 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) in rats (see Tableau 6).

In human hepatocytes, only ClBPA has saturable metabolism under the given conditions. Unlike in the rat, there no clear trend for higher clearances for lesser chlorinated BPA derivatives. The CL<sub>int</sub> values of the mono and trichlorinated BPAs are lower (i.e., 0.0310 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes for ClBPA and 0.0605 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes for Cl<sub>3</sub>BPA) (Tableau 6, Figure 13, Figure 15); and the di and tetra chlorinated compounds have higher values (i.e., 0.1934 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes for Cl<sub>2</sub>BPA, and 0.1565 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes for Cl<sub>4</sub>BPA). However, when comparing unbound intrinsic clearance (CL<sub>int U</sub>), Cl<sub>3</sub>BPA (2.222 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) and Cl<sub>4</sub>BPA (2.750 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) are more similar and a CL<sub>int U</sub> values of ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA are now different by approximately factor 4 (0.350 vs 1.363 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes). It bears mentioning that in humans, the more chlorine atoms are present in the Cl<sub>x</sub>BPA molecule, the greater the unbound intrinsic clearance becomes (Cl<sub>4</sub>BPA > Cl<sub>3</sub>BPA > Cl<sub>2</sub>BPA > ClBPA).

When comparing values between both species, it can be observed that rats metabolize the mono derivative at rates 4 times greater than humans, and that humans metabolize the tetra chlorinated derivative at rates 4 times greater than rats (see Figure 16). The di and tri chloro-derivative were metabolized at similar rates in both species (Tableau 6, Figure 14, Figure 15). Moreover, we observe that the proportion of ClBPA-G in rats is more than 4-fold greater than in humans (5.594x10<sup>5</sup> vs 1.352x10<sup>5</sup> cps respectively), while the sulfate metabolite (ClBPA-S) is not detected in rats but present in humans (7.42x10<sup>2</sup> cps). For Cl<sub>2</sub>BPA, the signal for Cl<sub>2</sub>BPA-G is similar between rats and humans (3.806x10<sup>5</sup> and 2.795x10<sup>5</sup> cps, respectively) but there are

approximately 3 time more Cl<sub>2</sub>BPA-S in Sprague-Dawley rats than in humans (Tableau 7). Moreover, the proportion of metabolites of Cl<sub>3</sub>BPA could not be investigated because Cl<sub>3</sub>BPA-G and Cl<sub>3</sub>BPA-S are unstable and could not be synthesized by our organic chemistry laboratory (HEDEX research group, CIC INSERM 1402). Moreover, the metabolites of Cl<sub>x</sub>BPA have no analytical standards due to their relatively low purity (>81%). Finally, rats form approximately 4 times more Cl<sub>4</sub>BPA-G1 than humans, while sulfoconjugates of Cl<sub>4</sub>BPA were only detected in rats.

### 3.7 Discussion

This is the first study reporting the metabolism for all Cl<sub>x</sub>BPA. In two studies of Riu et al. (2011b and 2014), several authors had studied metabolism of Cl<sub>4</sub>BPA, but had never estimated the metabolic constants (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>, or intrinsic clearance).

In this study, we observe differences between the different Cl<sub>x</sub>BPA and between two species: Sprague-Dawley rats and humans. Hepatocyte experiments were conducted with material from male rather than female Sprague-Dawley rats insofar as the ultimate objective is to use the data for the extrapolation to the *in vivo* situation to simulate the toxicokinetics of the 4 compounds in the male rats and in women. Indeed, metabolism experiments were performed with women hepatocytes in order to develop a PBPK model for pregnant women, and female cells therefore seemed more appropriate since the metabolism of BPA is different between sexes (Kim et al., 2003) ; women have a better sulfation capacity than men (Kim et al., 2003).

In Sprague-Dawley rat hepatocytes, values of intrinsic clearance (CL<sub>intU</sub>) for ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA were very similar (Table 3). Indeed, the proportions of glucuronide metabolites for these two substances are very similar, unlike for sulfoconjugates: ClBPA-S is not detected in supernatant while Cl<sub>2</sub>BPA-S is detected in rats (Table 4). Although the intrinsic clearance values are similar between ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA (1.525 vs. 1.057 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes), a minor difference of 0.5 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes could possibly explain a difference between the sulfate metabolites of these compounds. Concerning, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA in rats, their metabolic rates differ greatly. Cl<sub>3</sub>BPA exhibits the greatest intrinsic clearance (CL<sub>int U</sub>) value compared to all the other Cl<sub>x</sub>BPA in rats while Cl<sub>4</sub>BPA has the lowest value. Although we were

unable to obtain the metabolites of Cl<sub>3</sub>BPA, it probably has a very high proportion of glucuronide compared to other Cl<sub>x</sub>BPA, but this is only a hypothesis. Further experimentation is needed.

For human hepatocytes, the results indicate that the more chlorine atoms on the Cl<sub>x</sub>BPA molecule, the greater the values of unbound intrinsic clearance (Cl<sub>4</sub>BPA > Cl<sub>3</sub>BPA > Cl<sub>2</sub>BPA > ClBPA). Indeed, the proportion of Cl<sub>4</sub>BPA-G is greater than Cl<sub>4</sub>BPA-S, which is not detectable in the supernatant (Table 4). Tetrachlorobisphenol A (Cl<sub>4</sub>BPA) is therefore the chlorinated derivative with the slowest metabolism in Sprague-Dawley rats, and thereby has an impact on the excretion of this substance. Moreover, partition coefficient n-octanol/water (Pow) of chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA) in silico are between 4.35 < logPow < 6.43 (Doumas et al., 2018) and the more chlorines in the molecule, the greater the Pow increase.

In the present study, we initially assumed that the phase II metabolites were the major metabolic pathways similarly to BPA and therefore analyzed only the phase II metabolites. Metabolism rates were estimated by measuring the disappearance rate of the parent compound concentration in samples and the proportion of phase II metabolites was identified by a targeted LC-MS/MS assay (Table 4).

Except for the proportion of Cl<sub>2</sub>BPA-G, which is the same in rats and humans, all other metabolites differ between these two species. Significant inter-species differences are present. In view of the intrinsic clearance differences, it is possible that there exist not only phase II metabolites, but also other metabolic pathways, including an oxidative pathway, the formation of glutathione, methylation or possible disulfate formation on the two -OH of the Cl<sub>x</sub>BPA molecule but confirmation is necessary. An untargeted mass spectrometric method will be required for that purpose with a HMR instrument like an Orbitrap LC-MS. It remains to be determined if phase I metabolites are formed significantly for these chemicals.

This may be the case for Cl<sub>4</sub>BPA, which has a high intrinsic clearance in humans while there is less Cl<sub>4</sub>BPA-G and no Cl<sub>4</sub>BPA-S, whereas in rats there is more glucuronide and more sulfate. Riu et al. (2011b) have performed metabolic assays of Cl<sub>4</sub>BPA in HepG2 cells showing that Cl<sub>4</sub>BPA was completely metabolized into the glucuro- and sulfo-derivatives after 24h incubation, in proportions of 14% and 86% respectively but their experiments are not

comparable to ours insofar as they used a human liver cancer cell line (Hep-G2). In fact, the enzymatic expression of some metabolic pathways may be altered in Hep-G2 compared to cryopreserved normal hepatocytes in suspension. Moreover, Riu et al. (2011b) demonstrated that Cl<sub>4</sub>BPA sulfation, did not eliminate this estrogenic activity, unlike what is observed with Bisphenol A (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b).

Although the peak areas of these metabolites were analyzed in the supernatants of metabolic assays, the extent of sulfation activity of Cl<sub>x</sub>BPA in humans remains unknown and should be further investigated. Moreover, it seems that the major metabolic pathways of Cl<sub>x</sub>BPA is glucuronidation, a detoxification process in most cases, although an additional pathway could be present.

Bisphenol A (BPA) molecule is structurally similar to Cl<sub>x</sub>BPA. The metabolism of this molecule has been studied in the literature for 20 years (Snyder et al., 2000). Our metabolic constant values for Cl<sub>x</sub>BPA could be compared to those of BPA.

Of all species studied in the scientific literature for BPA, the major metabolic pathway is the conjugation of Bisphenol A with glucuronic acid to form BPA-glucuronide. In different studies (Ye et al., 2005; Yokota et al., 1999), the authors found 70% of BPA-glucuronide, 21% of BPA-sulfate and 9% of unconjugated BPA in urine vs less than 1% of unconjugated BPA circulates in the human blood (Volkel et al., 2005; Volkel et al., 2002; Volkel et al., 2008). All of these major metabolic pathways are detoxification processes.

Only Kurebayashi et al. (2010) have studied the rate of disappearance of BPA-G and BPA-S in Sprague-Dawley rat hepatocytes (Kurebayashi et al., 2010). In Tableau 5, the intrinsic clearance value of BPA was calculated as the sum of the intrinsic clearance of BPA-G and BPA-S for rats and humans. For Sprague-Dawley rats, the unbound intrinsic clearance (CL<sub>intU</sub>) value of BPA (0.435 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) is three times higher than the clearance values for ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA, and about 7 and 2 times higher than the values for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA respectively. For humans, the unbound intrinsic clearance (CL<sub>intU</sub>) value of BPA (0.045 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) is very similar to the clearance values for ClBPA (0.035 mL/min/10<sup>6</sup>

hepatocytes) but the clearances of Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA are approximately 30 to 60-fold higher than BPA (Tables 2 and 3).

In this study, we performed experiments with both species to avoid directly extrapolating the metabolism results for humans and to avoid uncertainty on our values. Differences for these emerging pollutants were observed between species. These interspecies variabilities are important to consider the risk characterization of these environmental contaminants as it will impact the extrapolation to humans. Intersex differences could also be important because women have a better sulfation capacity than men for BPA (Kim et al., 2003). Since we did not only compare intra-species but there is also a sex difference to consider. It is not possible to suggest that females would have a better sulfation capacity than males in the same species. However, our results demonstrated that male rats have more Cl<sub>x</sub>BPA-S (Table 4) than women. It can still be hypothesized that females have a better sulfation than males in rats or humans, but this remains to be verified.

To conclude, the present study demonstrates that the chlorinated derivatives of BPA that are most rapidly metabolized in humans are Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA considering FU<sub>inc</sub>. For Sprague-Dawley rats, the compound that is most quickly metabolized is Cl<sub>3</sub>BPA but in contrast to humans, the more chlorinated molecule, Cl<sub>4</sub>BPA, has the lowest rate. The measured values for the metabolic hepatic rates of Cl<sub>x</sub>BPA will be useful for the development of physiologically based pharmacokinetic models that will be used for the exposure assessment of pregnant women to these emergent chemicals.

### **3.8 Acknowledgment**

We wish to thank Jeffrey Arsham, an American scientific translator, for his highly helpful reading of our original text.

### **3.9 Authorship Contributions**

Participated in research design: N. Plattard and S. Haddad.

Conducted experiments: N. Plattard.

Contributed new reagents or analytic tools: N. Venisse and P. Carato.

Performed data analysis: N. Plattard, S. Haddad, N. Venisse

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: N. Plattard, S. Haddad, N. Venisse, A. Dupuis and P. Carato.

### **3.10 Declaration of interest statement**

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

### **3.11 Funding**

This project was funded by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (2018/1/230).



## 3.12 References

- Andra SS, Kalyvas H, Andrianou XD, Charisiadis P, Christophi CA, Makris KC (2015) Preliminary evidence of the association between monochlorinated bisphenol A exposure and type II diabetes mellitus: A pilot study. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 50(3):243-59 doi:10.1080/10934529.2015.981111
- Andra SS, Makris KC (2015) Association between urinary levels of bisphenol A and its monochlorinated derivative and obesity. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 50(11):1169-79 doi:10.1080/10934529.2015.1047674
- Cambien G, Venisse N, Migeot V, et al. (2020) Simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human plasma: Development, validation and application of a UHPLC-MS/MS method. *Chemosphere* 242:125236 doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125236
- Cariot A, Dupuis A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S, Migeot V (2012) Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta* 100:175-82 doi:10.1016/j.talanta.2012.08.034
- Chang BV, Liu JH, Liao CS (2014) Aerobic degradation of bisphenol-A and its derivatives in river sediment. *Environ Technol* 35(1-4):416-24 doi:10.1080/09593330.2013.831111
- Del Olmo M, Zafra-Gomez A, Suarez B, Gonzalez-Casado A, Taoufiki J, Vilchez JL (2005) Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* Volume 817:167-172 doi:doi:10.1016/j.jchromb.2004.11.059
- Dorival-Garcia N, Zafra-Gomez A, Navalon A, Vilchez JL (2012) Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *J Chromatogr A* 1253:1-10 doi:10.1016/j.chroma.2012.06.079
- Doumas M, Rouillon S, Venisse N, et al. (2018) Chlorinated and brominated bisphenol A derivatives: Synthesis, characterization and determination in water samples. *Chemosphere* 213:434-442 doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.061
- Fan Z, Hu J, An W, Yang M (2013) Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds. *Environ Sci Technol* 47(19):10841-50 doi:10.1021/es401504a
- Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, et al. (2007) Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 24(2):259-64 doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.007
- Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y (2001) Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere* 44(5):973-9 doi:10.1016/s0045-6535(00)00507-5
- Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT (2010) On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A* 1217(21):3511-8 doi:10.1016/j.chroma.2010.03.028
- Hu C, Schottker B, Venisse N, et al. (2019) Bisphenol A, Chlorinated Derivatives of Bisphenol A and Occurrence of Myocardial Infarction in Patients with Type 2 Diabetes: Nested

- Case-Control Studies in Two European Cohorts. *Environ Sci Technol* 53(16):9876-9883 doi:10.1021/acs.est.9b02963
- Jimenez-Diaz I, Zafra-Gomez A, Ballesteros O, et al. (2010) Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878(32):3363-9 doi:10.1016/j.jchromb.2010.10.021
- Kim YH, Kim CS, Park S, Han SY, Pyo MY, Yang M (2003) Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun* 312(2):441-8 doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.135
- Kosaka K, Hayashida T, Terasaki M, et al. (2012) Elution of bisphenol A and its chlorination by-products from lined pipes in water supply process. *Water Supply Volume 12(Issue 6):791-798* doi:<https://doi.org/10.2166/ws.2012.055>
- Kurebayashi H, Okudaira K, Ohno Y (2010) Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett* 198(2):210-5 doi:10.1016/j.toxlet.2010.06.017
- Li A, Zhuang T, Shi W, et al. (2020) Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China. *Sci Total Environ* 707:136100 doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136100
- Li C, Wang Z, Yang YJ, Liu J, Mao X, Zhang Y (2015) Transformation of bisphenol A in water distribution systems: a pilot-scale study. *Chemosphere* 125:86-93 doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.047
- Liao C, Kannan K (2012) Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 46(9):5003-9 doi:10.1021/es300115a
- Migeot V, Dupuis A, Cariot A, Albouy-Llaty M, Pierre F, Rabouan S (2013) Bisphenol a and its chlorinated derivatives in human colostrum. *Environ Sci Technol* 47(23):13791-7 doi:10.1021/es403071a
- Mutou Y, Ibuki Y, Terao Y, Kojima S, Goto R (2006) Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol a after exposure to ultraviolet B. *Biol Pharm Bull* 29(10):2116-9 doi:10.1248/bpb.29.2116
- Plattard N, Dupuis A, Migeot V, Haddad S, Venisse N (2021) An overview of the literature on emerging pollutants: Chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA). *Environ Int* 153:106547 doi:10.1016/j.envint.2021.106547
- Riu A, Grimaldi M, le Maire A, et al. (2011a) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 119(9):1227-32 doi:10.1289/ehp.1003328
- Riu A, le Maire A, Grimaldi M, et al. (2011b) Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci* 122(2):372-82 doi:10.1093/toxsci/kfr132
- Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SC, Fennell TR (2000) Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 168(3):225-34 doi:10.1006/taap.2000.9051
- Song S, Song M, Zeng L, et al. (2014) Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environ Pollut* 186:14-9 doi:10.1016/j.envpol.2013.11.023

- Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K (2005) In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 207(2):215-21 doi:10.1016/j.tox.2004.09.015
- Vela-Soria F, Jimenez-Diaz I, Rodriguez-Gomez R, et al. (2011) A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC–MS/MS. *Analytical Methods*(9) doi:10.1039/c1ay05162h
- Venisse N, Cambien G, Robin J, et al. (2019) Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in adipose tissue. *Talanta* 204:145-152 doi:10.1016/j.talanta.2019.05.103
- Volkel 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(11):1748-57 doi:10.1124/dmd.105.005454
- Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W (2002) Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15(10):1281-7 doi:10.1021/tx025548t
- Volkel W, Kiranoglu M, Fromme H (2008) Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett* 179(3):155-62 doi:10.1016/j.toxlet.2008.05.002
- Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B (2008) Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *J Pharm Sci* 97(10):4586-95 doi:10.1002/jps.21317
- Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM (2005) Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 383(4):638-44 doi:10.1007/s00216-005-0019-4
- Ye Z, Zetterberg C, Gao H (2017) Automation of plasma protein binding assay using rapid equilibrium dialysis device and Tecan workstation. *J Pharm Biomed Anal* 140:210-214 doi:10.1016/j.jpba.2017.03.019
- Yokota H, Iwano H, Endo M, et al. (1999) Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 340 ( Pt 2):405-9
- Yuan SY, Li HT, Huang HW, Chang BV (2010) Biodegradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment and the microbial community changes. *J Environ Sci Health B* 45(5):360-5 doi:10.1080/03601231003799820

Tableau 4 : Descriptive table of MS/MS parameters of ClBPA-G, ClBPA-S, Cl<sub>2</sub>BPA-G, Cl<sub>2</sub>BPA-S, Cl<sub>4</sub>BPA-G, Cl<sub>4</sub>BPA-S: retention time (min), precursor ions (m/z) and MS/MS optimization conditions (declustering potential DP and collision energy).

Analyte	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Quantification ion (m/z) G1/S1	Confirmation ion (m/z) G2/S2	Declustering Potential DP (V)	Collision energy (V)
<i>In Sprague-Dawley rats and humans</i>						
ClBPA-G	8.8	437.2	182.1	246.0	-80.0	-72.0
ClBPA-S	14.8	341.1	262.1	216.0	-125.0	-44.0
Cl <sub>2</sub> BPA-G	9.3	471.2	244.1	216.1	-30.0	-54.0
Cl <sub>2</sub> BPA-S	10.5	375.1	296.1	259.0	-55.0	-48.0
Cl <sub>4</sub> BPA-G	9.5	540.9	365.0	175.0	-20.0	-24.0
Cl <sub>4</sub> BPA-S	7.7	445.0	365.1	314.0	-40.0	-26.0

Tableau 5 : Kinetics parameters of metabolism of Bisphenol A in hepatocytes of rats and humans, BPAG, BPAS and BPA adapted from Kurebayashi et al. (2010).

Compounds	BPA-G	BPA-S	BPA
<b>In Sprague-Dawley rats</b>			
Vmax (ng/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>a</sup>	208.9	60.5	269.4
Km (ng/mL) <sup>a</sup>	639.2	1 278.4	1 917.6
CLint (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>a</sup>	0.33	0.047	<b>0.37</b>
FU <sub>inc</sub> <sup>b</sup>	-	-	0.86
Km U (ng/mL) <sup>a,d</sup>	-	-	1 649.2
CLintU (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>d</sup>	-	-	<b>0.44</b>
<b>In humans</b>			
Vmax <sup>a</sup> (ng/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	40.3	4.6	44.9
Km (ng/mL) <sup>a</sup>	1 209.9	2 305.7	3 515.7
CLint (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>a</sup>	0.033	0.0021	<b>0.035</b>
FU <sub>inc</sub> <sup>b</sup>	-	-	0.79
Km U (ng/mL) <sup>c</sup>	-	-	2 759.8
CLintU (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>d</sup>	-	-	<b>0.045</b>

<sup>a</sup> Values are converted in nmol in Supplementary data.

<sup>b</sup> Results from Vmax/Km

<sup>c</sup> Estimated with equations of Poulin.P *et al.* (2013) but we assume that there is no albumin in the incubation medium Poulin

<sup>d</sup> Km U equation = Km\*FU<sub>inc</sub>

<sup>e</sup> Intrinsic clearance U (CLint U) was obtained to divide intrinsic clearance on FUinc value

Tableau 6 : Summary table of metabolic constants data (estimated values [with 95% confidence bounds].) in Sprague-Dawley rats and humans for all Cl<sub>x</sub>BPA.

Compounds	Cl <sub>1</sub> BPA	Cl <sub>2</sub> BPA	Cl <sub>3</sub> BPA	Cl <sub>4</sub> BPA
<b>In Sprague-Dawley rats<sup>a</sup></b>				
V <sub>max</sub> (ng/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	-	12.5 [7.337, 17.68]	-	-
K <sub>m</sub> (ng/mL)	-	83.4 [39.99, 126.8]	-	-
CL <sub>int</sub> (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>b</sup>	0.14 [0.13, 0.14]	0.15 <sup>b</sup>	0.085 [0.081, 0.088]	0.039 [0.037, 0.041]
FU <sub>inc</sub> <sup>c</sup>	0.091 <sup>c</sup>	0.14	0.032	0.067
K <sub>m</sub> U (ng/mL) <sup>c</sup>	-	11.84	-	-
CL <sub>int</sub> U (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>d</sup>	1.53 <sup>d</sup>	1.06	3.11	0.68
<b>In humans<sup>a</sup></b>				
V <sub>max</sub> (ng/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	0.83 [0.6403, 0.9599]	-	-	-
K <sub>m</sub> (ng/mL)	25.8 [18.03, 33.61]	-	-	-
CL <sub>int</sub> (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	0.031 <sup>b</sup>	0.193 [0.1925, 0.1944]	0.061 [0.0575, 0.0633]	0.16 [0.1507, 0.1622]
K <sub>m</sub> U <sup>e</sup> (ng/mL) <sup>c</sup>	2.3	-	-	-
CL <sub>int</sub> U (mL/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes) <sup>d</sup>	0.35 <sup>d</sup>	1.36	2.22	2.75

<sup>a</sup>All metabolism assays were repeated in triplicate.

<sup>b</sup>Results from V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>

<sup>c</sup>K<sub>m</sub>U equation = K<sub>m</sub>\*FU<sub>inc</sub>

<sup>d</sup>Intrinsic clearance U (CL<sub>int</sub> U) was obtained to divide intrinsic clearance on FU<sub>inc</sub> value

<sup>e</sup>FU<sub>inc</sub> values for the humans was assumed to be the same as in Sprague-Dawley rats. All-unbound incubation fraction (FU<sub>inc</sub>) was repeated in triplicate for each concentration of Cl<sub>x</sub>BPA and was the average of two concentrations (25 and 2.5 ng. mL<sup>-1</sup>)

Tableau 7 : Peak area for 3 of Cl<sub>x</sub>BPA: ClBPA; Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA for 25 ng. mL<sup>-1</sup> to compare the proportion of metabolites between Sprague-Dawley rats and humans with a UHPLC-MS/MS method.

Compounds	Metabolite compounds <sup>b</sup>	Peak area in UHPLC-MS/MS (cps)	
		Sprague-Dawley rats <sup>a</sup>	Humans <sup>a</sup>
<b>ClBPA</b>	ClBPA-G1	5.594x10 <sup>5</sup>	1.352x10 <sup>5</sup>
	ClBPA-G2	3.448x10 <sup>5</sup>	8.530x10 <sup>4</sup>
	ClBPA-S1	ND*	ND
	ClBPA-S2	ND	ND
<b>Cl<sub>2</sub>BPA</b>	Cl <sub>2</sub> BPA -G1	3.806x10 <sup>5</sup>	2.795x10 <sup>5</sup>
	Cl <sub>2</sub> BPA -G2	3.988x10 <sup>5</sup>	3.060x10 <sup>5</sup>
	Cl <sub>2</sub> BPA -S1	3.327x10 <sup>4</sup>	9.793x10 <sup>3</sup>
	Cl <sub>2</sub> BPA -S2	1.028x10 <sup>4</sup>	3.198x10 <sup>3</sup>
<b>Cl<sub>4</sub>BPA</b>	Cl <sub>4</sub> BPA -G1	3.103x10 <sup>4</sup>	5.626x10 <sup>3</sup>
	Cl <sub>4</sub> BPA -G2	9.536x10 <sup>3</sup>	7.102x10 <sup>2</sup>
	Cl <sub>4</sub> BPA -S1	3.892x10 <sup>4</sup>	ND
	Cl <sub>4</sub> BPA -S2	9.872x10 <sup>3</sup>	ND

<sup>a</sup>All metabolism assays were repeated in triplicate.

<sup>b</sup> G1 vs G2 and S1 vs S2 are different transitions in UHPLC-MS/MS method.

\*ND = Not detected

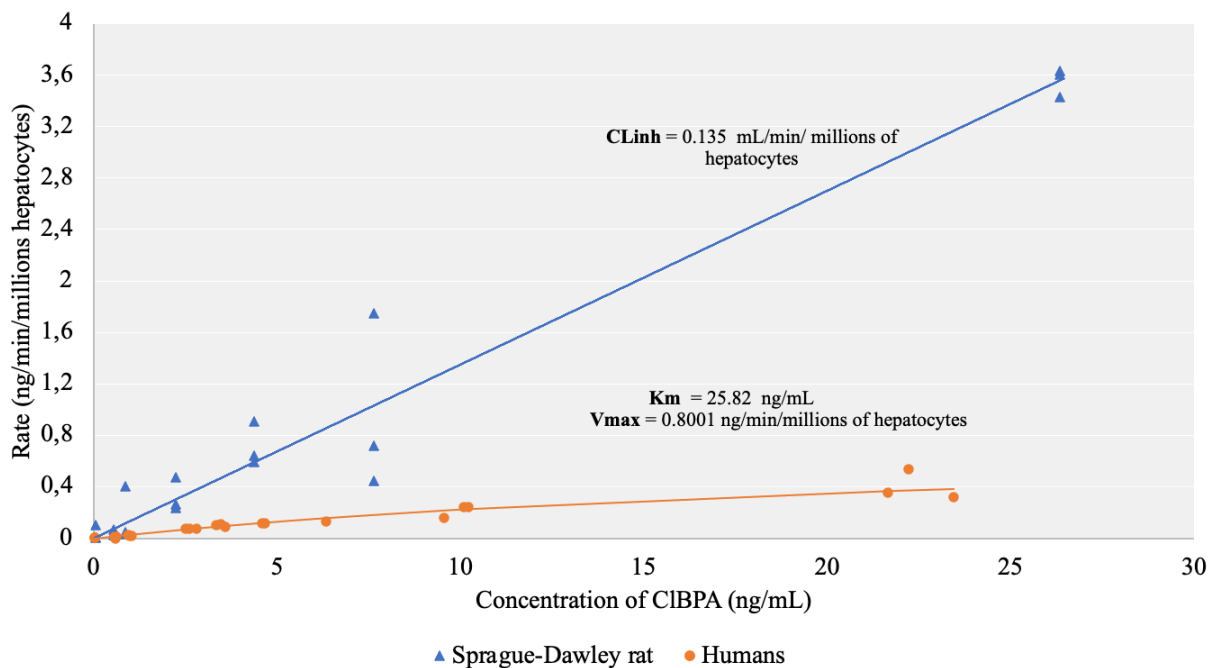


Figure 13 : Kinetics metabolism of monochlorobisphenol A (CIBPA) in Sprague-Dawley rats vs humans

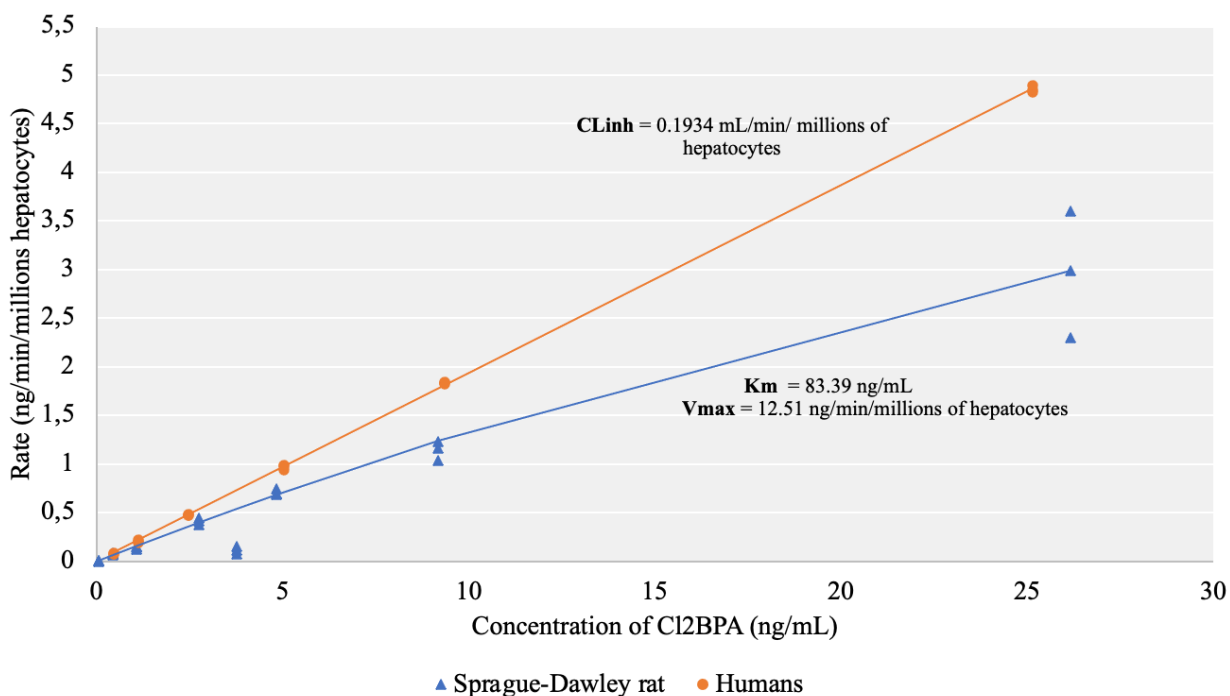


Figure 14 : Kinetics metabolism of 3,3'-dichlorobisphenol A (Cl<sub>2</sub>BPA) in Sprague-Dawley rats vs humans



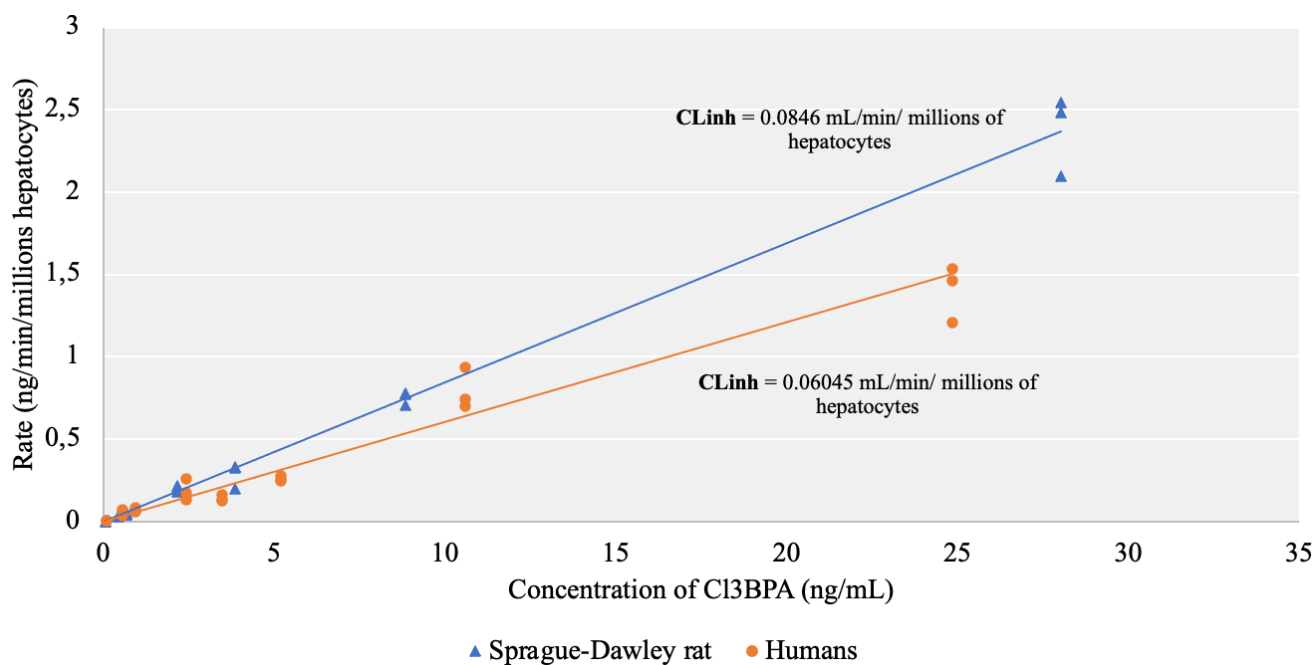


Figure 15 : Kinetics metabolism of trichlorobisphenol A (Cl<sub>3</sub>BPA) in Sprague-Dawley rats vs humans

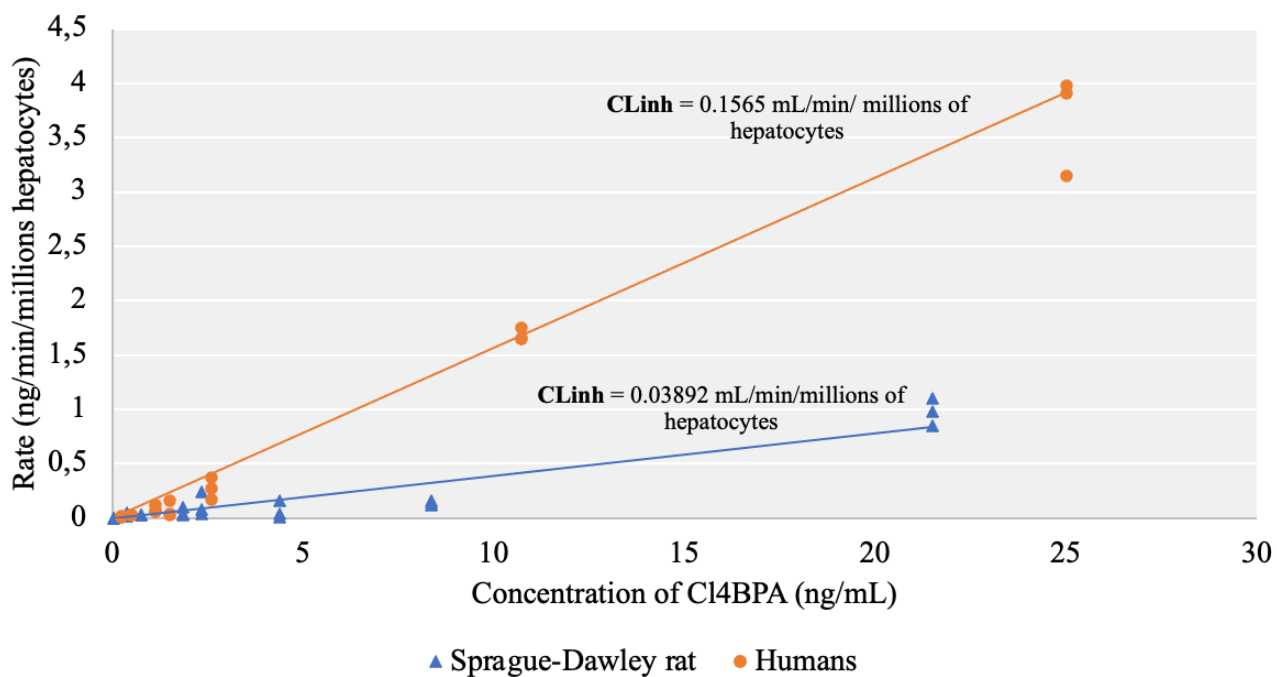


Figure 16 : Kinetics metabolism of tetrachlorobisphenol A (Cl<sub>4</sub>BPA) in Sprague-Dawley rats vs humans.

### 3.13 Supplementary materials

#### Various structures of conjugated Cl<sub>x</sub>BPA

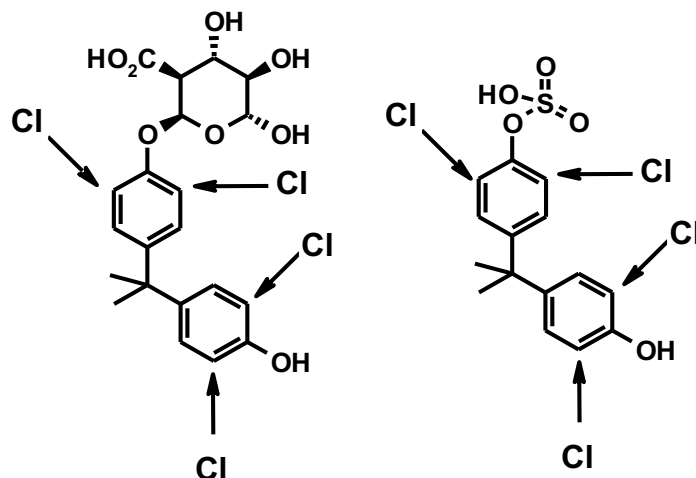


Figure S1. General structure of Cl<sub>x</sub>BPA monoglucuronide (left) and monosulfate

For Cl<sub>2</sub>BPA (for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA and not 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA), there is only one glucurono-metabolite and one sulfo-metabolite (Fig S2).

For Cl<sub>3</sub>BPA: no metabolites could adequately be synthesized.

For Cl<sub>4</sub>BPA, there is only one glucurono-metabolite and one sulfo-metabolite (Fig S3)

For ClBPA, there are 2 positional isomers with glucuronide and sulfation (Fig S4).

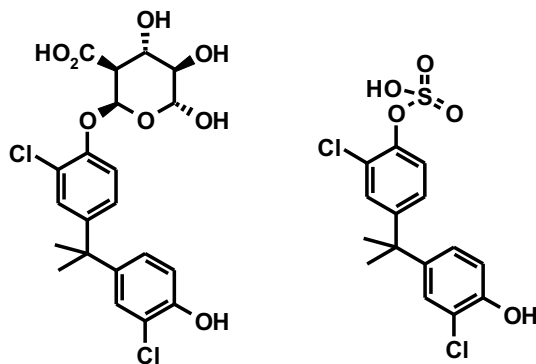


Figure S2. Structure of Cl<sub>2</sub>BPA monoglucuronide (left) and monosulfate

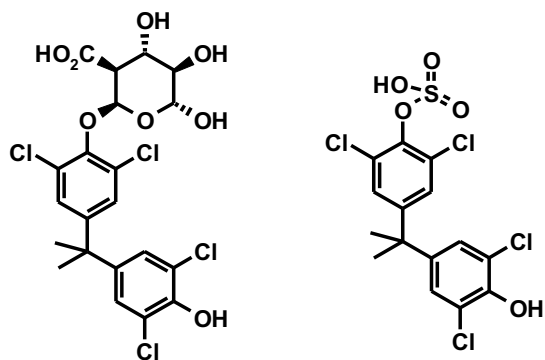


Figure S3. Structure of Cl<sub>4</sub>BPA monoglucuronide (left) and monosulfate

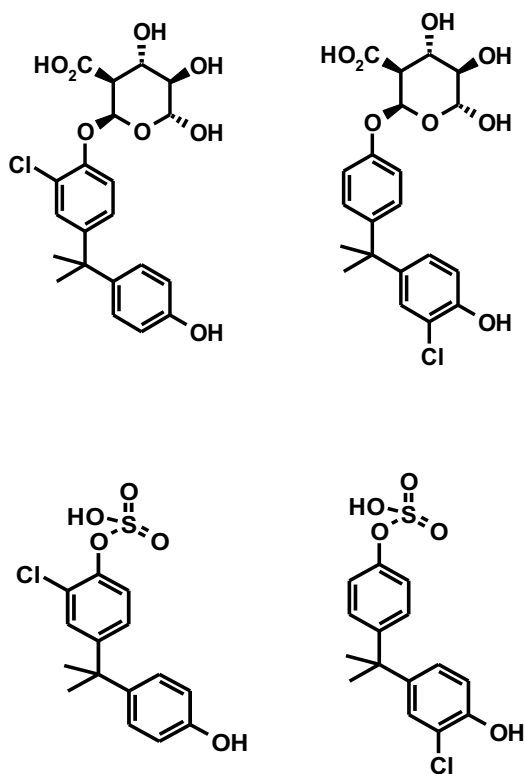


Figure S4. Structure of the two isomers of the ClBPA monoglucuronide (top) and monosulfate (bottom): with conjugate position on O-4 (left) and O-4'

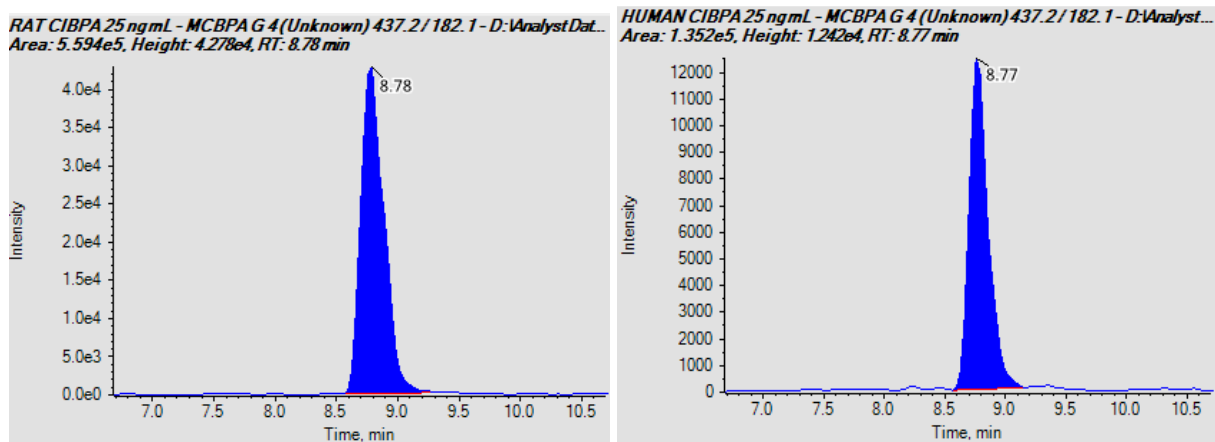


Figure S5. Example of chromatograms of CIBPA-G1 for Sprague-Dawley rat and human (25 ng/mL is the concentration of Cl<sub>x</sub>BPA in hepatocytes)

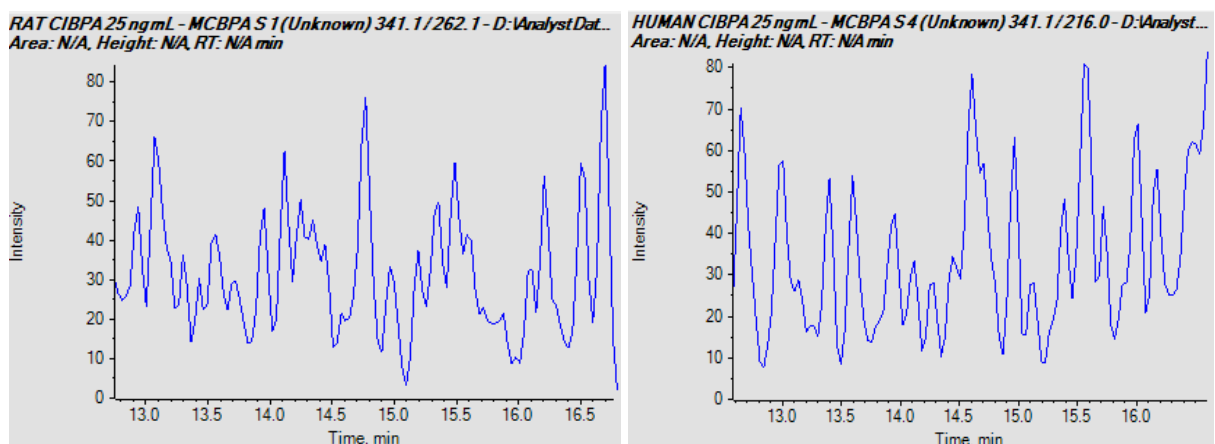


Figure S6. Example of chromatograms of CIBPA-S1 for Sprague-Dawley rat and human (25 ng/mL is the concentration of Cl<sub>x</sub>BPA in hepatocytes)

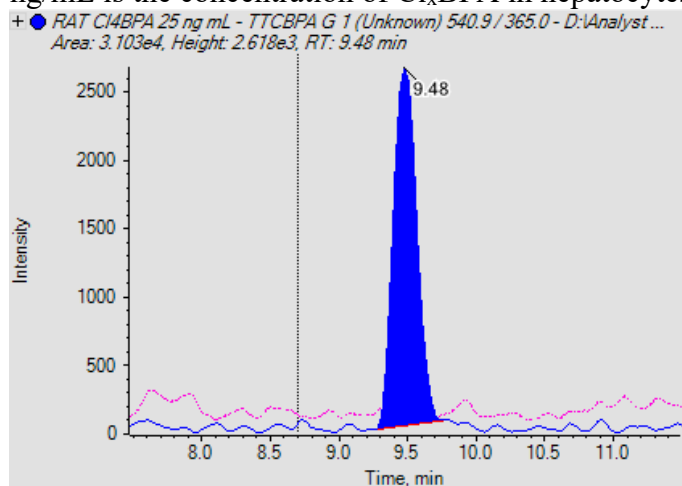


Figure S7. Example of chromatograms of Cl<sub>4</sub>BPA-G1 for Sprague-Dawley rat (25 ng/mL is the concentration of Cl<sub>x</sub>BPA in hepatocytes)

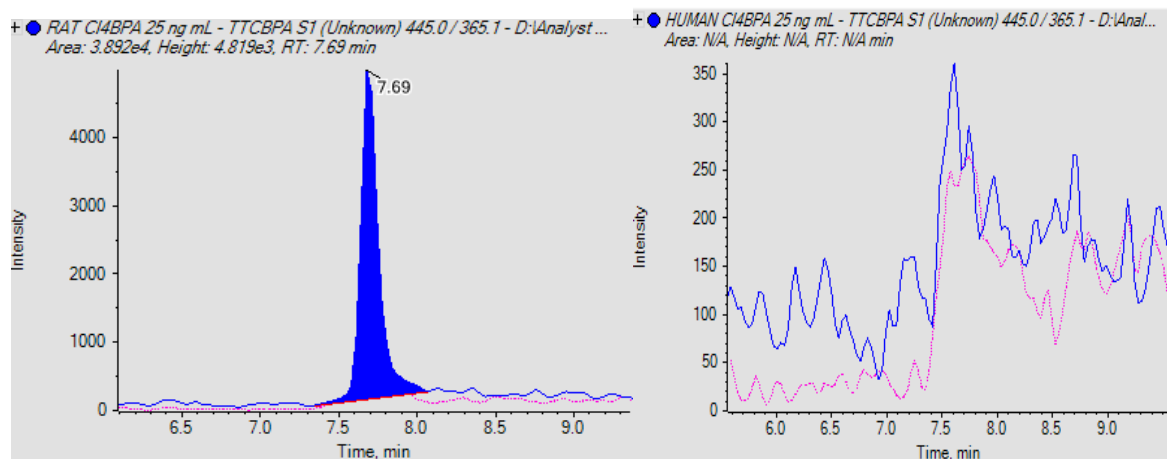


Figure S8. Example of chromatograms of Cl<sub>4</sub>BPA-S1 for Sprague-Dawley rat and human (25 ng/mL is the concentration of Cl<sub>x</sub>BPA in hepatocytes)

Tableau 8 : Kinetic parameters of metabolism of Bisphenol A in hepatocytes of rats and humans (in nmol), BPAG, BPAS and BPA adapted from Kurebayashi et al. (2010).

Compounds	BPA-G	BPA-S	BPA
<b>In Sprague-Dawley rats</b>			
Vmax (nmol/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	0.52	0.20	1.18
Km (nmol/mL)	1.58	4.15	8.38
Km U (nmol/mL) <sup>b</sup>	-	-	7.20
<b>In humans</b>			
Vmax (nmol/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	0.10	0.012	0.20
Km (nmol/mL)	2.99	7.49	15.36
Km U (nmol/mL) <sup>b</sup>	-	-	12.06

<sup>a</sup> Results from Vmax/Km

<sup>b</sup> Km U equation = Km\*FU<sub>inc</sub>

Tableau 9 : Summary table of metabolic constants data (estimated values [with 95% confidence bounds]) in Sprague-Dawley rats and humans for all Cl<sub>x</sub>BPA in nmol.

Compounds	C1BPA	C2BPA	C3BPA	C4BPA
<b>In Sprague-Dawley rats<sup>a</sup></b>				
V <sub>max</sub> (nmol/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	-	0.04 [0.025, 0.059]	-	-
K <sub>m</sub> (nmol/mL)	-	0.28 [0.13, 0.43]	-	-
K <sub>m</sub> U (nmol/mL) <sup>b</sup>	-	0.040	-	-
<b>In humans<sup>a</sup></b>				
V <sub>max</sub> (nmol/min/10 <sup>6</sup> hepatocytes)	0.0032 [0.0024, 0.0037]	-	-	-
K <sub>m</sub> (nmol/mL)	0.098 [0.069, 0.13]	-	-	-
K <sub>m</sub> U <sup>c</sup> (nmol/mL) <sup>b</sup>	0.0088	-	-	-

<sup>a</sup>All metabolism assays were repeated in triplicate.

<sup>b</sup>K<sub>m</sub>U equation = K<sub>m</sub>\*FU<sub>inc</sub>

## Chapitre 4 – Article 2

### 4 Article 2. Quantification of conjugated forms of dichlorobisphenol A (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA) in rat and human plasma using HPLC-MS/MS assay

Quantification des formes conjuguées du dichlorobisphénol A (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA) dans le plasma de rat et d'humain par HPLC-MS/MS

*Plattard.N<sup>a, b</sup>, Gnanasegaran.R<sup>b</sup>, Krekesheva.A<sup>b</sup>, Carato.P<sup>b</sup>, Dupuis.A<sup>b, c</sup>, Migeot V<sup>b, c</sup>, Albouy.M<sup>b, c</sup>, Haddad.S<sup>a</sup>, Venisse.N<sup>b, c\*</sup>*

\*Auteur-ressource

<sup>a</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, CresP, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup> INSERM CIC1402, CHU Poitiers, Université de Poitiers, HEDEX Research Group, 86021, Poitiers Cedex, France

<sup>c</sup> Biology-Pharmacy-Public Health Department, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86201, Poitiers Cedex, France

L'article a été acceptée dans la revue **Therapeutic Drug Monitoring** (IF = 3.11, 2021) le 18 août 2022 et a été publié électroniquement le 16 janvier 2023.

**Plattard N**, Gnanasegaran R, Krekesheva A, Carato P, Dupuis A, Migeot V, Albouy M, Haddad S, Venisse N. Quantification of the Conjugated Forms of Dichlorobisphenol A (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA) in Rat and Human Plasma Using HPLC-MS/MS. *Ther Drug Monit.* 2023 Jan 16. doi: 10.1097/FTD.0000000000001074. Epub ahead of print. PMID: 36649713.



## 4.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs

**Noémie Plattard:** L'étudiante a contribué à la conception de cette étude, ainsi qu'à l'établissement des méthodologies. L'étudiante a supervisé toutes les expériences en laboratoire. Elle a aussi procédé à l'analyse de tous les résultats. Elle a rédigé l'article et les corrections subséquentes.

**Riciga Gnanasegaran:** L'étudiante en stage de maîtrise (Master 2, France) a effectué toutes les expérimentations en laboratoire afin de valider la méthode analytique. Elle a contribué à la conception et au design de l'étude, ainsi qu'à l'interprétation des résultats.

**Aida Krekesheva:** L'étudiante en stage de maîtrise (Master 2, France) a aidé Riciga dans les expérimentations en laboratoire. Elle a aussi contribué à l'analyse des résultats et à l'écriture de ce manuscrit.

**Pascal Carato:** Dr. Carato a contribué aux nouveaux outils analytiques en HPLC-MS/MS au laboratoire à Poitiers. Il a aussi synthétisé les dérivés chlorés du BPA et leurs métabolites dans le laboratoire de chimie organique du groupe Hedex. Dr. Carato a aussi contribué à la rédaction de ce manuscrit notamment sur la partie chimie organique.

**Antoine Dupuis:** Dr. Dupuis fait partie intégrante du projet de recherche financé par l'ANSES et a aussi contribué à la rédaction de cet article.

**Virginie Migeot :** Dr. Migeot a contribué à la rédaction de cet article.

**Marion Albouy :** Dr. Albouy a contribué à la relecture de cet article.

**Sami Haddad :** Dr. Haddad est le co-chercheur du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à l'élaboration du projet de recherche et a analysé les données de cet article. Dr. Haddad a aussi contribué à sa rédaction.

**Nicolas Venisse:** Dr. Venisse est le chercheur principal du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également

contribué à l'élaboration du projet de recherche, aux méthodes d'analyses en HPLC-MS/MS au laboratoire à Poitiers pour de nouveaux réactifs. Dr Venisse a aussi réalisé l'analyse des données et a contribué à la rédaction de cet article.

## 4.2 Résumé

Contexte : Le bisphénol A (BPA) est un contaminant omniprésent qui a des effets perturbateurs endocriniens. Les dérivés chlorés du BPA se forment lors de la chloration de l'eau potable et ont une plus grande activité de perturbation endocrinienne. Le dichlorobisphénol A (Cl<sub>2</sub>BPA) est le dérivé chloré du BPA le plus abondant dans plusieurs matrices biologiques humaines. Des expériences *in vitro* récentes ont montré que le Cl<sub>2</sub>BPA est métabolisé en composés sulfo et glucuro-conjugués. À ce jour, aucun test n'a été développé pour quantifier les sulfo- et glucuro-conjugués du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S et 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G, respectivement).

Méthode : Un essai de chromatographie liquide à haute performance et de spectrométrie de masse en tandem pour la détermination des formes conjuguées du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA dans des échantillons de plasma a été mis au point et validé conformément aux directives de l'Agence européenne des médicaments (EMA). La quantification a été réalisée en mode surveillance des réactions multiples pour tous les analytes cibles à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem SCIEX 6500+ doté d'une source électrospray fonctionnant en mode ionisation négative. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne C18 maintenue à 40 °C et d'une phase mobile binaire délivrée en mode gradient à un débit de 0.35 ml/min. L'échantillon a été préparé par simple précipitation à l'aide d'acétonitrile. L'essai a été validé et appliqué à des échantillons de plasma humain et de rat.

Résultats : La linéarité a été démontrée sur la plage de 0.006-25 ng/mL pour le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G et de 0.391-100 ng/mL pour le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S. Les valeurs de biais intra- et inter-journalier étaient comprises entre 95 et 109 %, et l'imprécision < 9 %. Les effets de matrice corrigés par l'étalon interne ont également été étudiés. Cette méthode a permis de quantifier les formes conjuguées du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA dans des échantillons de plasma.

Conclusion : Il s'agit du premier article sur le développement et la validation d'une méthode analytique pour la quantification du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G et du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S dans la matrice plasmatique. Cette étude est également le premier article sur la présence *in vivo* de ces métabolites.

**Mots-clés** : Dérivés chlorés du BPA ; 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-glucuronide ; 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-sulfate ; métabolites ; LC-MS/MS ; rat Sprague-Dawley ; humain ; plasma

## 4.3 Abstract

**Background:** Bisphenol A (BPA) is a ubiquitous contaminant that has endocrine-disrupting effects. Chlorinated derivatives of BPA are formed during chlorination of drinking water and have higher endocrine-disrupting activity. Dichlorobisphenol A (Cl<sub>2</sub>BPA) is the most abundant chlorinated BPA derivative found in several human biological matrices. Recent *in vitro* experiments have shown that Cl<sub>2</sub>BPA is metabolized in sulfo- and glucuro-conjugated compounds. To date, no assay has been developed to quantify the sulfo- and glucuro-conjugates of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G, respectively).

**Methods:** A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the determination of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA conjugated forms in plasma samples was developed and validated according to the European Medicines Agency (EMA) guidelines. Quantification was performed in the multiple reaction monitoring mode for all target analytes using a SCIEX 6500+ tandem mass spectrometer with an electrospray source operating in the negative ionization mode. Chromatographic separation was achieved using a C18 column maintained at 40 °C and a binary mobile phase delivered in the gradient mode at a flow rate of 0.35 mL/min. Sample was prepared via simple precipitation using acetonitrile. The assay was validated and applied to rat and human plasma samples.

**Results:** Linearity was demonstrated over the range of 0.006–25 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 0.391–100 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S. Intra- and inter-day bias values were in the 95–109% range, and the imprecision < 9%. Internal standard corrected matrix effects were also investigated. This method enabled quantification of the conjugated forms of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA in plasma samples.

**Conclusions:** This is the first report on the development and validation of an analytical method for the quantification of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S in the plasma matrix. This study is also the first report on the *in vivo* occurrence of these metabolites.

**Keywords:** Chlorinated derivatives of BPA; 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-glucuronide; 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-sulfate; metabolites; LC-MS/MS; Sprague-Dawley rat; human; plasma

## 4.4 Introduction

Bisphenol A (BPA), a well-known endocrine disruptor (ED), is a chemical substance used primarily in the manufacture of polycarbonate plastics, epoxy resins, and as a non-polymer additive to other plastics <sup>1</sup> and is present in many common consumer products. During chlorination during drinking water treatment, aqueous BPA can react with chlorine to form chlorination by-products called chlorinated derivatives of BPA (mono-, di-, tri-, and tetra-chlorinated derivatives) or Cl<sub>x</sub>BPA. <sup>2,3</sup>

Cl<sub>x</sub>BPA has a 24-fold higher binding affinity than BPA in a human estrogen receptor (ER) binding assay <sup>4,5</sup> and is also a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) receptors, which may be involved in metabolic effects. <sup>4</sup> Furthermore, epidemiological studies have shown that Cl<sub>x</sub>BPA is associated with obesity <sup>6</sup>, type II diabetes <sup>7</sup>, and myocardial infarction <sup>8</sup>. Accordingly, these epidemiological studies have demonstrated a risk to human health. Exposure to Cl<sub>x</sub>BPA occurs mainly through drinking water, possibly leading to its oral and dermal absorption. <sup>9</sup> Traces of Cl<sub>x</sub>BPA have also been found in paper bleached by chlorine, including coffee paper filters, which may come in contact with food <sup>10</sup> and Cl<sub>4</sub>BPA is used as a flame retardant in consumer products, such as building materials, paints, synthetic textiles, and plastic products, including epoxy resin electronic circuit boards and other electronic equipment. <sup>11</sup> The putative routes of exposure include dermal contact, inhalation, or ingestion.

Assessing human exposure to environmental pollutants is a major component of health risk assessments. <sup>12</sup> Indeed, Cl<sub>x</sub>BPA have been found in several human biological matrices, such as urine <sup>13</sup>, adipose tissue <sup>14</sup>, breast milk <sup>15</sup>, colostrum <sup>16</sup>, plasma <sup>13,17-19</sup>, and placental tissue <sup>20,21</sup>, demonstrating that humans are exposed to these compounds. Dichlorobisphenol A (Cl<sub>2</sub>BPA) is the most common chlorinated derivative found in certain biological human matrices, such as adipose tissues in patients with breast cancer, breast milk, and placental tissue, with detection frequencies ranging from 51 to 100% in pregnant women. <sup>22</sup> Owing to its endocrine-disrupting properties, exposure to this compound is of particular concern, especially for vulnerable populations, such as pregnant women and infants.

According to the developmental origins of health and disease (DoHaD) hypothesis, there exist windows of susceptibility during which the development of a tissue can be modified by environmental factors.<sup>23</sup> Exposure to endocrine disruptors during critical periods of development, especially in utero, may cause functional and morphological alterations in humans, affecting growth, reproduction, and development.<sup>24-27</sup> The fetus is very sensitive to these pollutants, including unconjugated Cl<sub>x</sub>BPA, which can pass through the blood-placental barrier.<sup>28</sup>

Toxicokinetics are a major component of the risk assessment of environmental pollutants, contributing to the identification of the main routes of absorption, distribution to target organs, and elimination pathways. The toxicokinetics of Cl<sub>x</sub>BPA remain mostly unknown, but a recent paper by Plattard et al. (2022) reported the metabolic constants of Cl<sub>x</sub>BPA (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, and intrinsic clearance). Moreover, phase II metabolites (glucuronide and sulfate) of Cl<sub>2</sub>BPA were identified by UHPLC-MS/MS. Metabolite measurements in biological matrices could be important because they may contribute to the understanding of the in vivo toxicokinetics of Cl<sub>x</sub>BPA. Furthermore, combined with the measurement of the parent compound, it could be used as a biomarker of exposure.

Two methods are available for determining phase II metabolite concentrations: an indirect method using enzymatic deconjugation, which is commonly used because of its convenience, and a direct quantification method that requires the availability of standard compounds. Indirect measurement of conjugated forms of BPA requires measuring the total BPA after enzymatic hydrolysis by β-glucuronidase and sulfatase at 37 °C for several hours.<sup>29</sup> The indirect method may have some disadvantages due to variable deconjugation recovery, leading to potential underestimation of the actual exposure of humans to environmental compounds, as demonstrated with BPA by Gerona et al. (2020), although these findings have been challenged.<sup>30</sup> In this study, the direct method was preferred because analytical standards were available.

Several methods have been developed to determine the concentrations of unconjugated Cl<sub>x</sub>BPA<sup>13,17-19</sup> but to our knowledge, there have been no studies on the quantification of Cl<sub>x</sub>BPA metabolites in plasma or urine. Therefore, the objectives of this study were to develop and validate a UHPLC-MS/MS assay for the simultaneous determination of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA metabolites, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S, in plasma using a simple protein precipitation

method. Toxicokinetic studies were performed on a set of Sprague–Dawley rats and human samples to demonstrate its adequacy and relevance.

## 4.5 Materials and methods

### 4.5.1 Chemicals and reagents

Conjugated metabolites, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S, were synthesized and purified by our organic chemistry laboratory (Université de Poitiers, CNRS 7267 EBI, 86000, Poitiers, France). The structures were confirmed via <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, LC/MS-MS, and purity was confirmed using HPLC coupled to a diode array detector. The chemical structures of these compounds are listed in Table 13 in the Supplementary Material. The internal standard (IS), 3,3'-dichlorobisphenol A-glucuronide-d<sub>12</sub> (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G-d<sub>12</sub>), was purchased from @rtMolecule (Poitiers, France). The solvents (acetonitrile and water) were of optimal LC-MS grade (Fisher Chemicals, Hampton, NH, USA). All other chemicals used were of analytical grade. Glassware and polypropylene labware were tested to avoid contamination by the target analytes.

### 4.5.2 Preparation of stock solutions, working standard solutions, calibration standards, and quality control

Stock solutions of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S and IS were prepared at 1000 µg/mL in methanol (MeOH). All solutions were stored at -20 °C until use.

For each experiment, two working solutions were prepared extemporaneously in MeOH: the analytical standard (AS) solution at 1 µg/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA metabolites (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S) and the IS solution at 100 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA -G-d<sub>12</sub>. AS solution was then diluted in MeOH to obtain final calibration standard concentrations ranging from 100–0,006 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA -S.

Quality control solutions (QCs) were prepared from an independent QC stock solution to obtain three final QC concentrations of 0.006, 0.39, and 25 ng/mL for Cl<sub>2</sub>BPA-G and 0.391, 6.25 and 100 ng/mL for Cl<sub>2</sub>BPA -S.

Human plasma samples collected from anonymous donors at the University Hospital of Poitiers (CHU, Poitiers, France) were used to prepare the calibration standards for plasma and quality control samples (QCs).



### 4.5.3 Sample preparation

Each plasma sample (200  $\mu\text{L}$ ) was spiked with 20  $\mu\text{L}$  IS. Then, the samples were spiked with 20  $\mu\text{L}$  of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA metabolite standard solution to obtain standard final concentrations ranging from 0.006–100 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 0.391–100 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S. Blank samples were prepared using plasma without the analyte of interest and an internal standard, and zero samples were plasma spiked with IS alone.

Five hundred microliters of acetonitrile were added, and samples were then vortex-mixed for 30 seconds and centrifuged at 3000 tr/min (1730 g) for 10 min. The upper organic layer (400  $\mu\text{L}$ ) was transferred into a clean glass tube and evaporated to dryness at 37°C under a gentle nitrogen stream. The dry residues were dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of LC-MS grade water, vortex-mixed, and transferred into glass vials for injection. Finally, 20  $\mu\text{L}$  of the extract was injected into the UHPLC–MS/MS system.

### 4.5.4 Liquid chromatography

The UHPLC Shimadzu Nexera X2 system (Kyoto, Japan) was equipped with a Kinetex C18 (2.6  $\mu\text{m}$  particle size, 2.1 x 100 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) column maintained at 40 °C, and a binary mobile phase was delivered in the gradient mode at a flow rate of 350  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Water (A) and ACN (B) were used as the mobile phase solvents. The gradient started at 30% of B and linearly increased to 90% of B (0.01–6.50 min) and then to 99% of B (6.5–7 min), maintained at 99% of B for 5 minutes (7–12 min), decreased to 30% of B (12–12.50 min), and then maintained at 30% B (12.50–15 min) to re-equilibrate the column.

### 4.5.5 Mass spectrometry

Quantification was performed using an API6500 + mass spectrometer from ABSciex (Concord, ON, Canada) equipped with an electrospray ionization (ESI) interface operating in negative ionization mode. The ion source and MS/MS conditions were optimized by infusing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solutions of the individual analytes into the mass spectrometer at a flow rate of 10

$\mu\text{L}/\text{min}$ . Each compound was analyzed in multiple reaction monitoring mode using two specific transitions of each precursor ion. The first was used for quantification, whereas the second was used for confirmation. The dwell times were optimized to obtain a satisfactory peak shape. Data were acquired using Analyst software (version 1.7.2), and quantification was performed using MultiQuant software (version 3.0.3) (both from SCIEX).

#### 4.5.6 Method optimization

The choice of column was based on the selectivity, sensitivity, resolution, and lifetime. Other types of columns were tested, such as a Waters Acquity BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$  particle size, 2.1 mm x 100 mm, Milford, USA), and the Kinetex C18 (2.6  $\mu\text{m}$  particle size, 2.1 x 100 mm, Phenomenex) was selected. Two different solvents, methanol, and acetonitrile were tested for protein precipitation.

#### 4.5.7 Method validation

The analytical method was validated according to EMA guidelines.<sup>31</sup> The validation parameters included the selectivity, precision, trueness, linearity, and matrix effect (ME). The linearity of the seven-point calibration curves ranging from 0.006–25 ng/ml for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 0.391 to 100 ng/ml for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S was assessed. The slope, intercept, and coefficient of determination ( $r^2$ ) were obtained by using a 1/x weighting factor. Linearity was validated when the mean coefficient of determination ( $r^2$ ) was over 0.998 for five standard curves, and the back-calculated concentrations did not exceed  $\pm 15\%$  of the nominal value and  $\pm 20\%$  for the lower limit of quantification (LLOQ). LLOQ is the lowest concentration of analyte in a sample that can be quantified reliably with acceptable accuracy and precision (see below).<sup>31</sup> The LLOQ was considered the lowest calibration standard.

Intra- and inter-day precision and accuracy were assessed by analysis of quality control samples prepared in blank plasma samples at three different concentrations: 0.006, 0.391, and 25 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA -G and 0.391, 6.25, and 100 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S. Five samples per level were analyzed in one analytical run for intraday evaluation, and five analytical runs were repeated over five different days for the interday evaluation. The precision calculated by the coefficient of variation (CV) should not

exceed 15 and 20% for LLOQ. The accuracy was validated when the mean concentration was within  $\pm 15\%$  of the nominal value of the QCs samples and  $\pm 20\%$  for the LLOQ.

Each analytical run included a calibration curve, QCs, blank, and zero sample. The limit of detection (Ramal-Sanchez et al.) was determined for each batch of analysis to be three times the standard deviation of the mean peak area ( $n=5$ ) obtained using zero plasma samples. The analyte was considered to be detected when the peak area was more than three times the standard deviation of zero plasma samples ( $n = 5$ ) of the day's analysis.<sup>32</sup> The LLOQs were validated using low-quality control samples prepared in blank plasma.

Matrix effects (ME) were determined using five different lots of blank matrices from five human donors. For each analyte and IS, the matrix factor (MF) was calculated as the ratio of the peak area in the presence of matrix (measured by analyzing the blank matrix spiked after extraction with analyte) to the peak area in the absence of matrix (pure solution of the analyte). The IS-normalized MF was calculated by dividing the MF of the analyte by the MF of the IS. The CV of the IS-normalized MF calculated from the five lots of the matrix was used to assess the ME. This determination was performed at both low and high concentration level.<sup>31</sup>

Selectivity was evaluated by injecting blank plasma samples and examining the absence of the peaks of interest at the corresponding retention times. Transitions were optimized for the analysis of human plasma samples because healthy volunteers were exposed to Cl<sub>2</sub>BPA -d<sub>12</sub>.

To validate the analysis of rat plasma samples, using this method we performed a short validation to confirm inter-day precision and accuracy. For this purpose, QCs were prepared in rat plasma samples and analyzed with a calibration curve prepared in blank human plasma, as the quantity of blank rat plasma was limited. The back-calculated concentration for QCs prepared in rat plasma analyzed using this method should not exceed 15% and 20% for LLOQs.

#### **4.5.8 Method application**

Male Sprague–Dawley rats (~ 281 g) were obtained from Charles River Laboratories (Montreal, Canada). Sprague–Dawley rats were used for Cl<sub>2</sub>BPA exposure by intravenous (IV) route: dose 1:2.82 mg/kg ( $n = 10$ ) and dose 2:45.12 mg/kg ( $n = 10$ ). The animals were housed one per cage in temperature ( $22.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50.5 \pm 10\%$ ) controlled rooms under a 12-h light/dark cycle at animal house in Université de Montréal. Rats were acclimated to the

metabolism cage for four days: 1, 2, 4, and 8 h before use. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Testing (CDEA) at the Université de Montréal (protocol number:20-005). After dosing, blood samples were collected from the lateral vein of the tail at 7 different times: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 h. Within the hour following sampling, plasma was isolated by centrifuging samples for 10 min at 2200g at 4°C. All the samples were store at –20 °C before use and they were shipped by air in a cool box with ice packs and dry ice to keep them at –20 °C from Montreal to Poitiers. Upon reception, all samples were stored at –20 °C when they arrived at Inserm, CIC 1402, in Poitiers.

Human plasma samples were obtained in a clinical study conducted by the Clinical Investigation Center (CIC Inserm 1402, Poitiers) between April and October 2021. This clinical study was conducted in healthy female volunteers to evaluate the kinetics of Cl<sub>2</sub>BPA-d<sub>12</sub> in humans. Only female volunteers were included because the final objective of the study was to extrapolate a PBPK model to pregnant women. Either an oral dose (n = 6) or a cutaneous dose (n = 6) of 50 µg/kg Cl<sub>2</sub>BPA -d<sub>12</sub> was administered to each volunteer. The time-courses of Cl<sub>2</sub>BPA-d<sub>12</sub> and the glucuronide conjugate (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G-d<sub>12</sub>) in plasma were established by performing serial blood sampling using a catheter installed in the contralateral arm. Indeed, the other major metabolite (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S-d<sub>12</sub>) was not quantified in these samples because the corresponding standard was not available in the laboratory at the University of Poitiers. Blood samples were collected in heparin tubes at different time points (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, and 24 h) over 24 h following exposure (n = 12 samples per individual). Within the hour following sampling, plasma was isolated by centrifuging samples for 10 min at 2200g at 4 °C. The clinical trial was approved by the National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM) and the Protection of Persons Committee (PPC, 2020-A02116-33, IDRCB number) in France. This clinical study was registered on the ClinicalTrials. gov website with NCT04788810 identification. All the human samples were stored at –20 °C before use.

In this study, only metabolite concentrations measured in rats and humans at 1 and 2 h after dosing are presented to demonstrate the adequacy of the developed method.

## 4.6 Results

### 4.6.1 LC-MS/MS conditions and optimization

The samples were analyzed in negative mode with the ion spray voltage set at  $-4500$  V and source temperature at  $650^{\circ}\text{C}$ , curtain gas pressure was  $25.0$  psi, collision gas was set as high, ion source gas 1 pressure was  $35.0$  psi and ion source gas 2 was  $45.0$  psi. The specific mass spectrometer parameters (declustering potential, entrance potential, collision energy, and collision cell exit potential) are presented in Table 10.

Moreover, the chromatographic conditions were optimized, and a high peak resolution was obtained for each target analyte (see Figure 17). A higher peak shape and symmetry were achieved using the Kinetex C18 column in comparison to the Waters Acquity BEH C18 column (data not shown). The corresponding retention times for each compound analyzed under optimal chromatographic conditions are presented in Tableau 10.

Tableau 10. Descriptive table of MS/MS parameters of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-glucuronide-d<sub>12</sub>: retention time (min), precursor ions (m/z) and MS/MS optimization conditions (declustering potential, DP; entrance potential, EP; collision energy, CE; collision cell exit potential, CXP) for each analyte. The values for CE and CXP are presented for quantification and confirmation ions respectively.

Analyte	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Quantification ion (m/z)	Confirmation ion (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA -G	9.6	471.1	244.1	216.1	- 3 0	-10	-54/- 68	-13/- 25
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S	10.3	375.1	296.1	359.0	- 5 5	-10	-48/- 50	-31/- 37
<i>Internal standards</i>								
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G - d <sub>12</sub>	9.5	483.1	113.0	307.1	- 7 5	-10	-24/- 36	-13/- 15

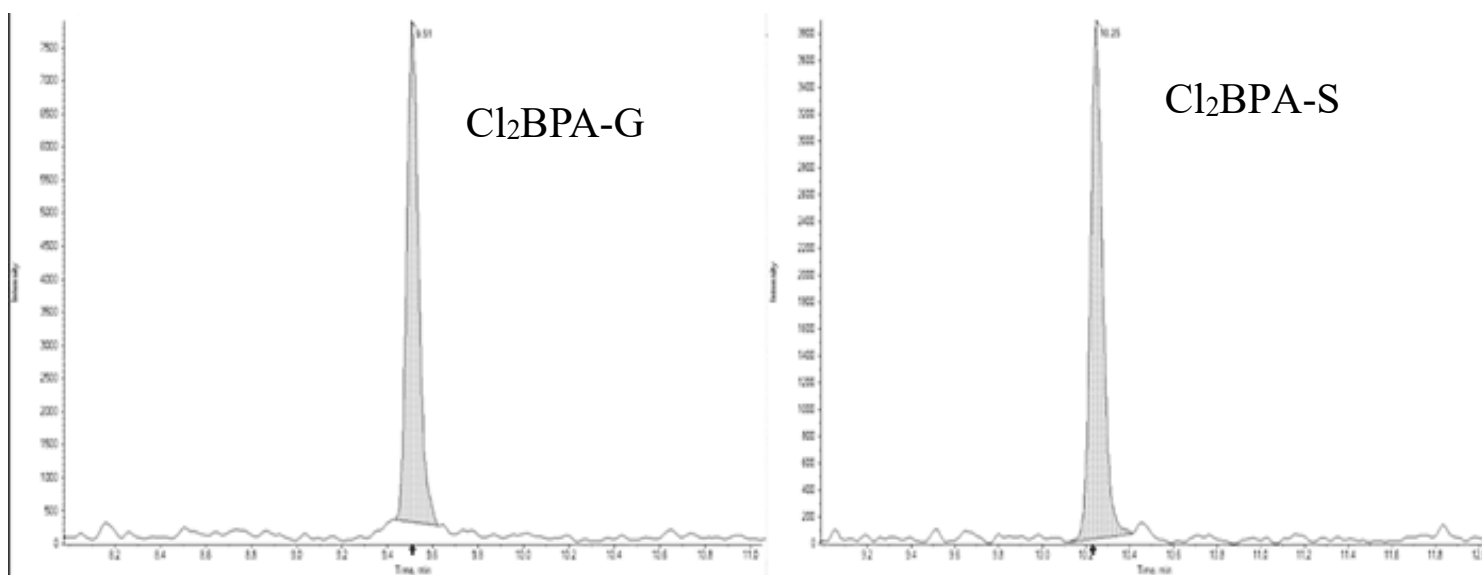


Figure 17. Examples of chromatograms obtained for medium quality control (0.391 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 6.25 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S) in human plasma samples.

## 4.6.2 Method validation

### 4.6.2.1 Selectivity

Analysis of blank plasma samples revealed that no significant peaks were observed for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S at the corresponding retention times (see Figure 18 in Supplementary materials). The absence of chromatographic peaks confirmed the selectivity of this method.

### 4.6.2.2 Precision and Trueness

The accuracy and precision of the method were demonstrated over the entire concentration range (Tableau 14 in supplementary material). The precision of the method was fully demonstrated, as CV did not exceed 6% for LLOQs and 9% for the rest according to bioanalytical validation guidelines. The limits of quantification corresponding to the lower standards of the calibration curves were validated at 0.006 ng/mL and 0.391 ng/mL for Cl<sub>2</sub>BPA-G and Cl<sub>2</sub>BPA-S, respectively. The trueness of the method ranged from 95 to 107% for LLOQs

and from 97 to 109% for other concentration levels in intra- and inter-day analyses (Tableau 14). At the LLOQ, good accuracy and precision were demonstrated (see Tableau 14), and peaks with adequate signal-to-noise ratios were obtained (see Figure 19 in the supplementary materials).

To validate the analysis of the rat plasma samples, we performed a short validation using this method. The accuracy and precision of the method in plasma rats were demonstrated over the entire range of concentrations (Table 15 in the supplementary materials). The precision of the method was fully demonstrated, as CV did not exceed 10% for LLOQs and 8% for the rest according to bioanalytical validation guidelines. The trueness of the method ranged from 100 to 102% for LLOQs and 102 to 107% for other concentration levels for the inter-day analysis (Table 15 in supplementary materials).

#### 4.6.2.3 Linearity and intercept

Linearity was demonstrated by the coefficient of correlation ( $r^2$ ), which was greater than 0.998 for the calibration curves prepared in blank human plasma (see Tableau 16 in supplementary materials). The back-calculated concentrations were within the 85-115% range for all standards; 80-120% for the LLOQ (data not shown).

#### 4.6.2.4 Recovery and matrix effect

The results concerning the matrix effect (ME) are reported in Tableau 17 in the supplementary materials and show low to moderate ME with CVs ranging from 12.4 to 42.8% using five different lots of plasma, corresponding to five different donors.



### 4.6.3 Method application

This method enables quantification of Cl<sub>2</sub>BPA conjugated forms, Cl<sub>2</sub>BPA-G and Cl<sub>2</sub>BPA-S, in human and rat plasma samples after administration through different routes of exposure. The measured concentrations after IV dosing in Sprague–Dawley rats and after cutaneous and oral dosing in humans are presented in Tableau 11 and Tableau 12 respectively.

The concentrations of Cl<sub>2</sub>BPA-G were assessed in rat and human plasma samples quantified at two different time points, 1 and 2 h, after dosing. Cl<sub>2</sub>BPA-G concentrations measured 1 and 2 h after dosing ranged from 748.77–18 234.17 ng/mL for rat samples, while for human samples, the concentrations ranged from 0.02–0.11 and 414.16–5 298.2 ng/mL for cutaneous and oral routes, respectively. These data show that large differences exist between human concentrations for the two exposure routes.

Tableau 11. 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S concentrations measured in Sprague-Dawley rat (n=2) for a 2.85 mg/kg IV dose at 2 different times.

Samples	3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G / 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S (ng/mL)	
	T1	T2
Time after dosing (hour)		
Rat #1	5 292.05 / 1.20	5 292.05 / 1.20
Rat #2	748.78 / 0.45	18 234.17 / 1.59

Tableau 12. 3,3'- Cl<sub>2</sub>BPA-G-d<sub>12</sub> concentrations measured in human samples (n=2) for a 0.05 mg/kg administered by cutaneous or oral route at 2 different times.

Samples	3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G-d <sub>12</sub> (ng/mL)	
	T1	T2
Time after dosing (hour)		
Subject #1 (cutaneous dosing)	ND	0.11
Subject #2 (cutaneous dosing)	0.02	0.05
Subject #3 (oral dosing)	4 253.47	5 298.20
Subject #4 (oral dosing)	3 384.10	414.16

## 4.7 Discussion and conclusion

For the first time, an HPLC-MS/MS method enabling the simultaneous determination of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA metabolites in rat and human plasma samples was developed and validated according to well-established bioanalytical validation guidelines.<sup>31</sup>

Metabolite measurements are important for toxicokinetic understanding of the *in vivo* disposition of chemicals and can be also used for human biomonitoring, as is the case for BPA. Metabolite concentrations of BPA have been frequently determined indirectly<sup>29,30</sup> using enzymatic deconjugation to form total BPA, that is, the sum of unconjugated and conjugated BPA. Metabolite concentrations can be indirectly obtained from the total BPA by subtracting unconjugated BPA. Recent data have shown that previous studies using indirect techniques requiring deconjugation underestimated the actual human levels of BPA owing to the variable efficiency of the deconjugation step. Although these latter findings have been challenged<sup>33</sup>, it is suggested that uncertainties in the deconjugation protocol may arise from insufficient enzyme quantity, wrong choice of enzymes, unfavorable hydrolysis conditions, or an overall suboptimal deconjugation protocol.<sup>33</sup> To avoid these drawbacks, we developed a direct method based on reference standards synthesized, purified, and characterized in our laboratory. The stability of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA conjugates in plasma was not directly assessed in this study, but previous data have shown that conjugated species of BPA and BPS are stable in biological matrices when stored frozen.<sup>39,41</sup> Furthermore, BPA metabolites, such as BPA-glucuronide, can be deconjugated *in vivo* by  $\beta$ -glucuronidase<sup>24</sup>, an enzyme involved in the degradation of complex carbohydrates and present not only in the intestines but also in the placenta and fetal liver, which could contribute to fetal exposure to unconjugated BPA.<sup>24,41</sup> It is possible that the same mechanisms exist for Cl<sub>x</sub>BPA, and direct quantification of the unconjugated form is an important route to explore their toxicity. Riu et al. demonstrated that the sulfate metabolite of Cl<sub>4</sub>BPA has estrogenic activity *in vitro*.<sup>42</sup> Therefore, further investigation is required to verify whether Cl<sub>2</sub>BPA metabolites lack estrogenic activity *in vitro*.

According to the results, this method is both sensitive and reliable. Linearity, repeatability, and reproducibility were demonstrated using calibration curves and QCs samples prepared from blank human plasma. The method is very sensitive to 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G, and its LLOQ value is close to the LLOQ validated for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA in plasma in the study by Cambien

et al. (2020). The LLOQ for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S was higher, but despite this difference, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S was detected in all analyzed samples, demonstrating the adequate sensitivity of our method for both metabolites.

For extraction, the method of Cambien et al. (2020) for Cl<sub>x</sub>BPA was not selected because it uses large amounts of solvent and is very time-consuming. The protein precipitation method was the preferred option for this study, as it is less expensive and more rapid for human and rat plasma analysis. Moreover, the latter requires a minimal solvent volume. Special attention was paid to matrix effects demonstrating low to moderate variability at low and high concentrations of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S for each lot of blank matrix used, suggesting that the simple protein precipitation method used in this study was efficient for sample purification while maintaining the performance of the method in terms of accuracy and precision, either in plasma or rat plasma.

Plasma was chosen as the biological matrix for assaying metabolites of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA because blood is the major body fluid that distributes exogenous pollutants throughout the body. Therefore, blood is considered the matrix of choice for toxicokinetic studies and is very important in human biomonitoring and health risk assessment. In this study, we targeted human plasma, a matrix available in all populations and commonly used in large-scale human biomonitoring, even though lower concentrations of micropollutants can be found in this matrix.<sup>34</sup> Moreover, the fraction of the dose excreted unchanged or as metabolites in the urine is currently unknown.

Quantification of metabolites is also important, insofar as it could help evaluate human exposure to Cl<sub>x</sub>BPA, as is the case for BPA, with several potential advantages, such as identifying the main route of exposure when the first-pass effect is present and understanding the inter-individual variability in metabolism<sup>35</sup>. Moreover, studies have shown that the monosulfonated form of tetrachloro-BPA remains biologically active<sup>42</sup>. For BPA and its metabolites, the detection rates for BPA-G in the reported study matrices ranged from 0%<sup>44</sup> to 100%<sup>45</sup> depending on the method used. BPA-G concentrations were comparatively higher than those of aglycone BPA in plasma.<sup>45</sup> Precisely, BPA-G was in the range 0.05 to 11.9 ng/mL in plasma compared to aglycone BPA in the range 0.01 to 0.59 ng/mL. BPA-S was below the detection limit in the adult plasma.<sup>13,45</sup>

The application of our analytical method in rat and human plasma was carried out with samples obtained from studies where pollutant exposure was known and controlled through IV for animals versus oral and cutaneous for humans by direct administration. This study reports the first *in vivo* measurement of the conjugated metabolites of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA. Nevertheless, these conjugated metabolites have already been identified *in vitro* in the incubation medium of rat and human hepatocyte suspensions.<sup>35</sup>

The concentrations of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S in human and rat plasma were measured at two different time points. In Sprague–Dawley rats, 3, 3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G was more abundant than 3, 3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S after IV administration. More precisely, a factor of 10 000 was present between Cl<sub>2</sub>BPA-G and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S in the rat plasma (see Tableau 11. For humans, a different pattern was observed, but only 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G-d<sub>12</sub> could be compared between routes of exposure. Indeed, there are many more 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G-d<sub>12</sub> in plasma with oral than cutaneous administration at the same dose. The doses used in animals were high doses administered intravenously, whereas the dose administered to human volunteers was an environmental dose. The corresponding concentrations of the parent compound (DCBPA) were in the nanogram to sub-nanogram per milliliter range after oral and cutaneous administration. However, the number of rat and human samples assessed here remains small, and further confirmation using larger sample sets is needed.

Interspecies differences and variable routes of administration may explain these different metabolic patterns. Interestingly, similar relative abundances of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G over 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S were found *in vitro* after incubation with rat and human hepatocytes<sup>35</sup>, suggesting that there were no major interspecies differences in hepatic metabolism.

## 4.8 Conclusion

In conclusion, we successfully developed and validated a sensitive method to determine the phase II metabolites of Cl<sub>2</sub>BPA in human and rat plasma samples. For the first time, we demonstrated the *in vivo* formation of these metabolites and their occurrence in the plasma samples of two different species. This method can be used for toxicokinetic studies in animals or humans to characterize and compare the metabolism of Cl<sub>2</sub>BPA *in vivo* after exposure through different routes. We also determined the proportion of glucuro- and sulfo-conjugates formed in comparison to the parent compound and the half-lives of these metabolites in this study. However, adjustments to this method are required to assess the occurrence of these metabolites in urine.

## **4.9 Contributors**

Conception or design of the work: NP, RG, AK, NV, PC, VM, MA

Data collection: RG, NP, AK, NV

Data analysis and interpretation: NP, RG, AK, NV

Drafting the article: NP, RG, AK, NV

Critical revision of the article: NV, SH, AD, VM, PC, MA

Final approval of the version to be published: all.

## **4.10 Acknowledgment**

We wish to thank Jeffrey Arsham, an American scientific translator, for his highly helpful reading of our original text.

## **4.11 Declaration of interest statement**

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

## **4.12 Funding**

This research project was funded by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (2018/1/230).

## 4.13 References

1. ANSES, Evaluation des risques du bisphenol A (BPA) pour la santé humaine. Bergman, Å., 2013. United Nations Environment Programme, World Health Organization. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 an assessment of the state of the science of endocrine disruptors. *WHO: UNEP, Geneva*. 2013.
2. Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y. Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*. 2001 Aug;44(5):973-9. doi: 10.1016/s0045-6535(00)00507-5. PMID: 11513431.
3. Gallart-Ayala H, Moyano E, and Galceran MT. On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A*. 2010;1217(21):3511-3518.
4. Takemura H, et al. In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 2005;207(Bo Li1 et al.):215-221.
5. Hu JY, Aizawa T, Ookubo S. Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol*. 2002;36(9):1980-1987.
6. Andra SS, Makris KC. Association between urinary levels of bisphenol A and its monochlorinated derivative and obesity. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2015;50(11):1169-1179.
7. Andra SS, et al. Preliminary evidence of the association between monochlorinated bisphenol A exposure and type II diabetes mellitus: A pilot study. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2015;50(Bo Li1 et al.):243-259.
8. Hu C, et al. Bisphenol A, Chlorinated derivatives of bisphenol A and occurrence of myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: Nested case-control studies in two European cohorts. *Environ Sci Technol*. 2019;53(16):9876-9883.
9. Kalyvas H, et al. Influence of household cleaning practices on the magnitude and variability of urinary monochlorinated bisphenol A. *Sci Total Environ*. 2014;490:254-261.



10. Zhou Y, et al. Ubiquitous occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A and nonylphenol in bleached food contacting papers and their implications for human exposure. *Environ Sci Technol*. 2015;49(12):7218-7226.
11. Kitamura S, et al. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(Bo Li1 et al.):554-559.
12. Nieuwenhuijsen M, Paustenbach D, Duarte-Davidson R. New developments in exposure assessment: the impact on the practice of health risk assessment and epidemiological studies. *Environ Int*. 2006;32(8):996-1009.
13. Liao C, Kannan K. Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol*. 2012;46(9):5003-5009.
14. Fernandez MF, et al. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol*. 2007;24(Bo Li1 et al.):259-264.
15. Cariot A, et al. Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta*. 2012;100:175-182.
16. Migeot V, et al. Bisphenol a and its chlorinated derivatives in human colostrum. *Environ Sci Technol*. 2013;47(23):13791-13797.
17. Li A, et al. Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China. *Sci Total Environ*. 2020;707:136100.
18. Del Olmo M, et al. Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;817:167-172.
19. Cambien G, et al. Simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human plasma: Development, validation and application of a UHPLC-MS/MS method. *Chemosphere*. 2020;242:125236.
20. Vela-Soria F, et al. A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC-MS/MS. *Anal Methods*, 2011, 3, 2073.

21. Jimenez-Diaz I, et al. Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(32):3363-3369.
22. Andra SS, et al. Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ Int.* 2015;85:352-379.
23. Heindel JJ, et al. Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology. *Reprod Toxicol.* 2017;68:34-48.
24. Schonfelder G, et al. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect.* 2002;110(11):703-707.
25. Somm E, et al. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect.* 2009;117(10):1549-1555.
26. Bosquiazzo VL, et al. Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus. *Biol Reprod.* 2010;82(Bo Li1 et al.):86-95.
27. Bromer JG, et al. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB J.* 2010;24(7):2273-2280.
28. Chen M, et al. Occurrence and maternal transfer of chlorinated bisphenol A and nonylphenol in pregnant women and their matching embryos. *Environ Sci Technol.* 2016;50(Bo Li1 et al.):970-977.
29. Grignon C, et al. Validation of a probe for assessing deconjugation of glucuronide and sulfate phase II metabolites assayed through LC-MS/MS in biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1061-1062:72-78.
30. Calafat AM, Koch HM; additional coauthors. BPA and risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020 Apr;8(Bo Li1 et al.):269-270. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30070-X. PMID: 32197109; PMCID: PMC7899191.
31. European Medicines Agency, E. Guideline on bioanalytical method of validation. *Sciences Medicines Health,* 2012:23.
32. Grignon C, et al. Ultrasensitive determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urine using a high-throughput UPLC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(9):2255-2263.

33. Dupuis A, Rabouan S, Migeot V, Venisse N. BPA and risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020 Apr;8(Bo Li1 et al.):270-271. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30069-3. PMID: 32197111.
34. Calafat, A.M., et al., Misuse of blood serum to assess exposure to bisphenol A and phthalates. *Breast Cancer Res*, 2013. **15**(5): p. 403.
35. Plattard N, et al. Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA) and interspecies differences between rats and humans. *Arch Toxicol.* Accepted, 2022.
36. Gerona R, Vom Saal FS, Hunt PA. BPA: Have flawed analytical techniques compromised risk assessments? *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(Bo Li1 et al.):11-13.
37. Glauser M, et al. Enzyme and acid deconjugation of plasma sulfated metanephries. *Clin Chim Acta.* 2014;430:125-128.
38. Sonker AK, et al. 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.* 2021;273:129624.
39. Ye X, et al. Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2007;17(6):567-572.
40. Ginsberg G, Rice DC. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect.* 2009;117(11):1639-1643.
41. Takahashi O, Oishi S. Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect.* 2000;108(10):931-935.
42. Riu A, et al. Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: The case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci.* 2011;122(Bo Li1 et al.):372-382.
43. Volkel, W., N. Bittner, and W. Dekant, Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(11): p. 1748-57.

44. Vandenberg, L.N., et al., A round robin approach to the analysis of bisphenol A (BPA) in human blood samples. *Environ Health*, 2014. **13**(Bo Li1 et al.): p. 25.
45. Andra, S.S., et al., Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: Exposure biomarker perspectives. *Sci Total Environ*, 2016. **572**: p. 770-781.

## 4.14 Supplementary materials

# Appendix 1

Compound	Molecular structure
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA -glucuronide	
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA -sulfate	

Tableau 13 : Chemical structure of 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA -glucuronide and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA -sulfate.

## Appendix 2

---

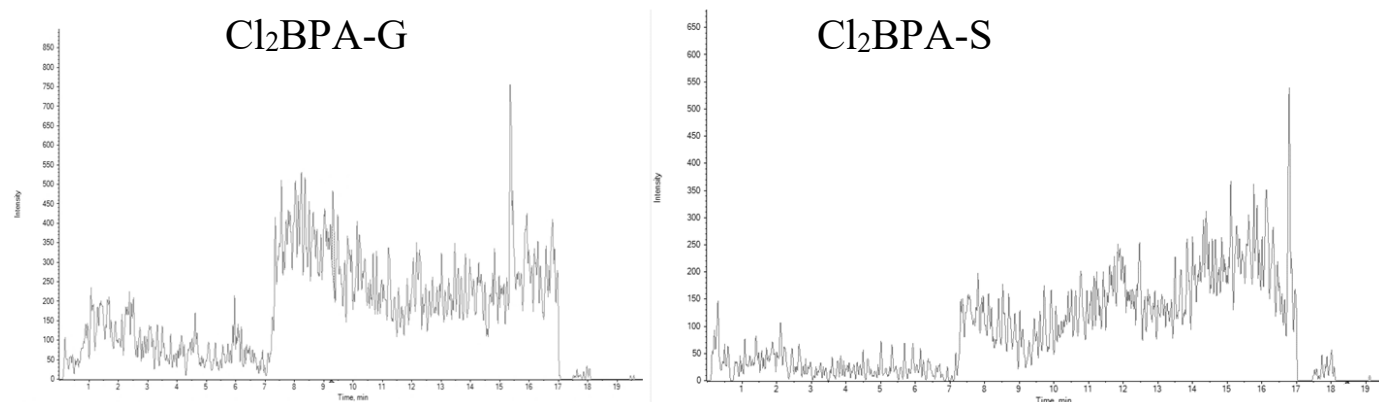


Figure 18 : Examples of chromatogram obtained for blank human plasma sample: 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA-G}$  and 3,3'- $\text{Cl}_2\text{BPA-S}$

## Appendix 3

---

Tableau 14. Intra and inter-day accuracy and precision for each analyte in human plasma samples at each level of QC (n=5)

Compound	Concentration of QC (ng/mL)	Accuracy (%)		Precision (%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G	0.006	106.7	105.7	4.4	3.6
	0.391	96.7	103.9	4.8	6.5
	25	98.8	98.8	5.2	4.3
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA -S	0.391	98.6	95.1	5.7	5.6
	6.25	96.8	104.4	8.7	6.7
	100	108.3	104.3	4.5	4.1

## Appendix 4

---

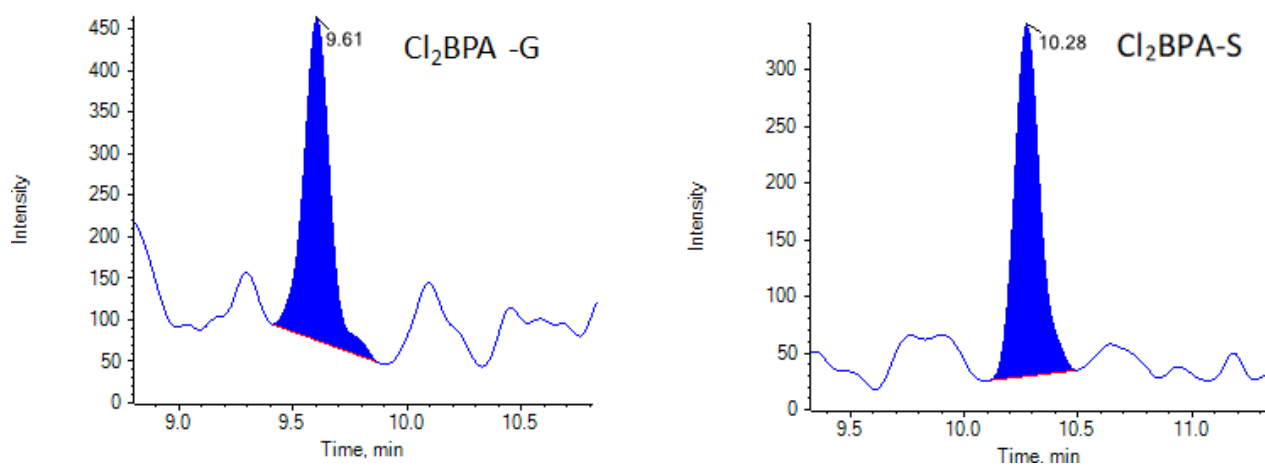


Figure 19: Examples of chromatograms corresponding to the lower limit of quantification (LLOQ): lowest standard prepared in blank human plasma at 0.006 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G and 0.391 ng/mL for 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S.

## Appendix 5

---

Compound	Concentration of QC (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)
		Inter-day	
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G	0.006	100.3	9.8
	0.391	103.1	7.9
	25	106.9	7.6
3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S	0.391	102.4	5.7
	6.25	101.6	4.9
	100	103.8	4.6

Tableau 15 : Quality control (QCs) prepared in Sprague-Dawley rat plasma (n =5) and analyzed with a human calibration curve



## Appendix 6

---

Compound	3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G	3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S
Slope (mean ± SD)	0.151 ± 0.024	0.006 ± 0.001
Correlation coefficient r <sup>2</sup> (mean ± SD)	0.998 ± 0.001	0.999 ± 0.001
Y-intercept (mean ± SD)	0.004 ± 0.005	0.001 ± 0.001

Tableau 16 : Mean (± SD) slope, correlation coefficient (r<sup>2</sup>) and y-intercept of calibration curves prepared with blank plasma samples (n = 5)

## Appendix 7

	3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-G		3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA-S	
	Low QC	High QC	Low QC	High QC
	0.01	25	0.39	100
IS normalized MF	0.63	0.27	0.25	0.05
	0.83	0.28	0.50	0.05
	0.76	0.30	0.70	0.03
	0.63	0.27	0.28	0.04
	1.14	0.21	0.42	0.06
	Mean ± SD	0.80 ± 0.21	0.27 ± 0.03	0.43 ± 0.18
CV (%)	26.18	12.38	42.78	26.62

Tableau 17 : Determination of matrix effect: IS-normalized MF, mean (+/- SD) and CV (%) in plasma samples at low and high concentration levels for each analyte (n =5)

## Chapitre 5 – Article 3

### **5 Article 3. Distribution of chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA) in plasma and tissues using physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK) for Sprague-Dawley rat**

**Distribution des dérivés chlorés du bisphénol A (Cl<sub>x</sub>BPA) dans le plasma et les tissus à l'aide d'un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) pour le rat Sprague-Dawley**

*Plattard.N<sup>a, b\*</sup>, Venisse.N<sup>b, c</sup>, Migeot.V<sup>b</sup>, Carato.P<sup>b</sup>, Badirou.K<sup>d</sup>, Dupuis.A<sup>b, c</sup>, Haddad.S<sup>a</sup>*

\*Auteur-ressource

<sup>a</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, CresP, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup> IHES Research Group, EBI CNRS 7267/INSERM CIC1402, University Hospital of Poitiers, University of Poitiers, 86021 Poitiers Cedex, France

<sup>c</sup> Biology-Pharmacy-Public Health Department, University Hospital of Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86201, Poitiers Cedex, France

<sup>d</sup> Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Poitiers, TSA 51115, 86073, Poitiers Cedex, France

Address correspondence to Noemie Plattard, department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, CresP, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

E-mail : [noemie.plattard@umontreal.ca](mailto:noemie.plattard@umontreal.ca)

L'article est en préparation et sera soumis dans la revue **Toxicology and Applied Pharmacology** (IF = 4.5, 2021).

## 5.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs

**Noémie Plattard:** L'étudiante a contribué à la conception de cette étude, ainsi qu'à l'établissement des méthodologies. L'étudiante a effectué et supervisé Kamal pour toutes les expériences en laboratoire. Elle a aussi procédé à l'analyse de tous les résultats ainsi qu'aux simulations des modèles PBPK. Elle a rédigé l'article et les corrections subséquentes.

**Nicolas Venisse:** Dr. Venisse est le chercheur principal du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à l'élaboration du projet de recherche, aux méthodes d'analyses en HPLC-MS/MS au laboratoire à Poitiers. Dr Venisse a aussi réalisé l'analyse des données et a contribué à la rédaction de cet article.

**Virginie Migeot :** Dr. Migeot fait partie intégrante du projet de recherche financé par l'ANSES et a aussi contribué à la rédaction de cet article.

**Pascal Carato :** Dr. Carato fait partie intégrante du projet de recherche financé par l'ANSES et a aussi contribué à la rédaction de cet article.

**Kamal Badirou :** L'étudiant en stage de maîtrise (Master 2, France) a effectué toutes les expérimentations en laboratoire afin de valider la méthode analytique. Il a aussi extrait les échantillons de plasma et de tissus de l'exposition animale. De plus, il a aussi contribué à l'interprétation des résultats.

**Antoine Dupuis:** Dr. Dupuis fait partie intégrante du projet de recherche financé par l'ANSES et a aussi contribué à la rédaction de cet article.

**Sami Haddad :** Dr. Haddad est le co-chercheur du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à l'élaboration du projet de recherche et a analysé les données de cet article. Dr. Haddad a aussi contribué à sa rédaction.

## 5.2 Résumé

Lors du traitement de l'eau potable par chloration, le BPA présent dans l'environnement peut réagir avec les molécules de chlore pour former des dérivés chlorés du Bisphénol A (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) ou Cl<sub>x</sub>BPA. Ces contaminants sont des perturbateurs endocriniens et des études épidémiologiques ont montré qu'ils sont associés à l'obésité, au diabète II et à l'infarctus du myocarde. L'objectif de cette étude était de développer un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) pour simuler la pharmacocinétique i.v. du Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat. Le modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA est composé de 7 compartiments tissulaires interconnectés avec des pools sanguins artériels et veineux. Il a été validé par une expérience *in vivo* sur 80 rats Sprague-Dawley. Le modèle calibré a prédit les concentrations mesurées de Cl<sub>x</sub>BPA dans le plasma, le cerveau et les muscles après l'administration de 4 et 40 mg/kg pour le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA ; 0,4 et 4 mg/kg pour le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA. Deux modèles PBPK ont été développés : un avec le ClBPA, le Cl<sub>2</sub>BPA et le Cl<sub>3</sub>BPA versus le Cl<sub>4</sub>BPA avec un modèle à diffusion limitée. Les coefficients de partage tissu/sang requis pour chaque Cl<sub>x</sub>BPA ont été prédits par l'algorithme de Poulin et al. (2012). Dans l'ensemble, le modèle a prédit avec succès les données sur le parcours plasmatique de 24 heures chez les rats, mais des différences dans les tissus ont persisté. Une grande concentration de Cl<sub>4</sub>BPA reste dans le plasma des rats à 24h, ce qui suggère une plus grande accumulation du composé parent et le Cl<sub>3</sub>BPA est fortement présent dans les muscles par rapport aux autres Cl<sub>x</sub>BPA. Le métabolisme extra hépatique a également été inclus dans le modèle. Il s'agit de la première étude à valider un modèle PBPK du Cl<sub>x</sub>BPA dans la littérature. La présente étude a permis d'intégrer avec succès les données *in vivo* sur la pharmacocinétique i.v. des Cl<sub>x</sub>BPA en utilisant le cadre d'un modèle physiologique et a identifié plusieurs lacunes dans les données de distribution qui devraient être traitées pour l'exposition humaine.

**Mots-clés** : Dérivés chlorés du BPA ; modélisation PBPK ; toxicocinétique ; modélisation pharmacocinétique ; évaluation du risque.

## 5.3 Abstract

During the treatment of drinking water by chlorination, BPA present in the environment can react with the chlorine molecules to form chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA) or Cl<sub>x</sub>BPA. These contaminants are endocrine disruptors and epidemiological studies have shown that there are associated with obesity, II diabetes and myocardial infarction. The objective of the present study was to develop a physiologically based pharmacokinetic model (PBPK) to simulate the i.v. pharmacokinetics of Cl<sub>x</sub>BPA in rat. The PBPK model for Cl<sub>x</sub>BPA consisted of 7 tissues compartments interconnected with arterial and venous blood pools. It was validated using *in vivo* experiment on 80 Sprague-Dawley rats. The calibrated model predicted the measured plasma, brain, and muscles concentrations of Cl<sub>x</sub>BPA after administration of 4 and 40 mg/kg for ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA: 0.4 and 4 mg/kg for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA. Two PBPK models were developed: one with ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA versus Cl<sub>4</sub>BPA with a diffusion-limited model. Tissue: blood partition coefficients required for each Cl<sub>x</sub>BPA were predicted by algorithm of Poulin et al. (2012). Overall, the model successfully predicted the 24-hour plasma time-course data in rats but differences in tissues persisted. A large concentration of Cl<sub>4</sub>BPA remains in rat plasma at 24h, suggesting greater accumulation of the parent compound and Cl<sub>3</sub>BPA is strongly found in muscles compared to other Cl<sub>x</sub>BPA. Therefore, extrahepatic metabolism was also included in the model. This is the first study to validate a PBPK model of Cl<sub>x</sub>BPA in the literature. The present study successfully integrated *in vivo* data on i.v. pharmacokinetics of Cl<sub>x</sub>BPA using a physiological model framework and identified several distribution data gaps that should be addressed for human exposure.

**Keywords:** Chlorinated derivatives of BPA; PBPK modeling; toxicokinetics; pharmacokinetic modeling; risk assessment

## 5.4 Introduction

Bisphenol A (BPA) is one of the most commonly produced chemicals in the world (Vogel, 2009), used as a monomer in the polymerization of polycarbonate and epoxy resins (ANSES, 2013), with >80% of the US, Canadian and European adults having detectable BPA levels in urine (Calafat et al., 2008; Lakind et al., 2012).

Upon chlorination in drinking water treatment, aqueous BPA can react with chlorine to form chlorination by-products named chlorinated derivatives of BPA (mono-, di-, tri- and tetra-chlorinated derivatives) or Cl<sub>x</sub>BPA (Fukazawa et al., 2001; Gallart-Ayala et al., 2010). Hypochlorite ions (ClO<sup>-</sup>) from sodium hypochlorite (NaOCl), used as a disinfectant, are responsible for the electrophilic attack of phenolic groups on the BPA molecule, acting as a precursor of the formation of Cl<sub>x</sub>BPA (Andra, Charisiadis, et al., 2015; Gallard et al., 2004; Hu et al., 2002; Liu et al., 2009). Chlorination is the most widely practiced water disinfection technique used in the world, but this treatment increases the presence of Cl<sub>x</sub>BPA, which can constitute a risk for public health.

These emerging pollutants have mainly been detected in aqueous media such as wastewater treatment plant (WWTPs) (Dorival-Garcia et al., 2012; Gallart-Ayala et al., 2010), sewage sludge (Song et al., 2014), sediments (Chang et al., 2014; Yuan et al., 2010), distribution pipes as well as in drinking water (Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015). Chlorinated derivatives of BPA began to be investigated over the last 20 years when there was already a considerable concern (Hu et al., 2002). Currently, *in vitro* studies have demonstrated adverse effects of Cl<sub>x</sub>BPA, such as disruption of the endocrine system (Mutou et al., 2006), estrogenicity (Kuruto-Niwa et al., 2005), genotoxicity (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b), and a disturbance in energy metabolism (Riu et al., 2014). They have an effect on estrogen receptors up to 100 times greater than bisphenol A and are also ligands for PPAR-γ receptors (Takemura et al., 2005). Moreover, epidemiological studies have shown that Cl<sub>x</sub>BPA is associated with obesity (Andra & Makris, 2015), type II diabetes (Andra, Kalyvas, et al., 2015) and myocardial infarction (Hu et al., 2019) thereby constituting a risk to human health.

Cl<sub>x</sub>BPA have also been found in several human biological matrices such as urine (Liao et al., 2012), adipose tissue (Fernandez et al., 2007), breast milk (Cariot et al., 2012), colostrum (Migeot et al., 2013), plasma (Cambien et al., 2020; Del Olmo et al., 2005; Li et al., 2020) and

placental tissue (Jimenez-Diaz et al., 2010; Vela-Soria et al., 2011) demonstrating that human is exposed to these compounds. Assessing human exposure to Cl<sub>x</sub>BPA is a major component of health risk assessment.

Currently, toxicokinetic data in animals or humans on Cl<sub>x</sub>BPA are rare in the literature except for scarce data for Cl<sub>4</sub>BPA (Riu et al., 2011b) and only one study investigated the values of metabolic constants (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, and intrinsic clearance) of all Cl<sub>x</sub>BPA (Plattard, N. et al., 2022) and identified the formation of phase II metabolites (Cl<sub>x</sub>BPA-G and Cl<sub>x</sub>BPA-S). The latter study also identified interspecies differences. Riu et al. (2011b) demonstrated that the sulfation of Cl<sub>4</sub>BPA did not eliminate its estrogenic activity, unlike what is observed with Bisphenol A (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b).

Although Cl<sub>x</sub>BPA have been found in various human biological matrices, their other toxicokinetic characteristics (partition coefficients, plasma protein binding, volume of distribution, etc.) remain unknown in the current literature. For this study, we aimed to determine for the first time, toxicokinetic parameters and develop a rat PBPK model for Cl<sub>x</sub>BPA.

A physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model integrates mechanistic data on absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) to predict the toxicokinetic of parent chemical or metabolite(s) in the exposed organism (Lipscomb et al., 2012). Therefore, PBPK model development is necessary to estimate complete toxicokinetic profiles of each Cl<sub>x</sub>BPA in rats and at the same time, reduce the use of animals to respect the 3R principle (reduction, replacement, and refinement). Parameters of the model were determined experimentally using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods. To validate the model in animals, an *in vivo* experiment in the Sprague-Dawley rat was carried out to determine the time course of Cl<sub>x</sub>BPA in plasma, and tissues (brain, muscles).



## 5.5 Materials and Methods

### 5.5.1 Chemicals and reagents

Sprague-Dawley rat whole blood (reference number IGRTSDWBK2E50ML) and plasma with K2 EDTA as anticoagulant (reference number IRTSDPLAK2E50ML) were purchased from Innovative research company (Novi, MI, USA). The whole blood was stored at 4°C and plasma was stored at -20°C until use.

Bisphenol A (BPA) was purchased from Sigma-Aldrich ® (St Louis, USA). Monochlorinated bisphenol A (> 99.8%), 3,3'-dichlorobisphenol A (>99.2%), trichlorobisphenol A (>97.5%) and tetrachlorobisphenol A (>99.8%) were synthesized and purified by our organic chemistry laboratory (HEDEX research group, CIC INSERM 1402) according to our published methods for parent compounds (Doumas et al., 2018). The deuterated analogue of dichlorobisphenol A (3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-d<sub>12</sub>) was purchased from @rtMolecule® (Poitiers, France). All chemicals and reagents for metabolism experiments are described in Plattard et al. (2022). Moreover, chemicals used for equilibrium dialysis experiments were phosphate-buffered Saline (PBS) prepared in the laboratory at pH = 7.4. Materials in glass or polypropylene were tested for their absence of BPA and ClxBPA contamination. Concerning chemicals for tissues extraction, MIX I (MgSO<sub>4</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>H citrate - 1.5 H<sub>2</sub>O, Na<sub>3</sub> Citrate - 2 H<sub>2</sub>O) and MIX VI (MgSO<sub>4</sub>, Diamino PSA (Primary Secondary Amine), C18 ec (Octadecyl modified silica phase, endcapped) were purchased from Machery-Nagel® (Hœrdt, France).

Solvents for high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (MS) solvents were of Optima LC-MS grade (Fischer Chemicals, Hampton, NH, USA). All other chemicals were of analytical grade.

## 5.5.2 Animals

Male Sprague-Dawley rats (approximately 281g) were obtained from Charles Rivers Laboratories (Montreal, Canada). The animals were housed one per cage in temperature ( $22.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50.5 \pm 10\%$ ) controlled rooms under a 12-h light/dark cycle at animal house in University of Montreal. Sprague-Dawley rats were acclimated to metabolism cage for four days: 1h, 2h, 4h and 8h before use. This study was approved by Ethics Committee for Animal Testing (CDEA) at University of Montreal. 80 Sprague-Dawley rats were used for Cl<sub>x</sub>BPA exposition by intravenous injection (iv). Animals were exposed to ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA (20 rats/substance for 2 doses) in glucose water with 20% of Alkamuls-EL620. For ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA: 4 and 40 mg/kg for doses were used and for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA, the doses were 0.4 and 4 mg/kg for dose 1 and 2 respectively. After dosing, blood samples were taken from the lateral vein of the tail at 7 different times: 0.25;0.5;1;2;4;8 and 24h. Then, the animals were sacrificed with euthanasia by CO<sub>2</sub>, and the brain and muscles were collected and washed with phosphate buffer (pH = 7.4). Plasma and tissues were stored in a glass container at -20°C at the University of Montreal. Tissues and plasma samples were shipped at University of Poitiers in a glass container at -20°C during the travel and were analyzed at the University of Poitiers at the HEDEX laboratory, CIC Inserm 1402 by HPLC-MS/MS. All the samples were stored at -20°C in University of Poitiers before analysis.

## 5.5.3 Extraction from plasma

Each plasma sample (200 µL) was spiked with 20 µL of IS. Then, the samples were spiked with 20 µL of Cl<sub>x</sub>BPA standard solution to obtain standard final concentrations ranging from 0.5 to 100 ng/mL for each Cl<sub>x</sub>BPA. Blank samples were prepared using plasma without the analyte of interest and an internal standard, and zero samples were plasma spiked with IS alone.

Five hundred microliters of acetonitrile were added, and samples were then vortex-mixed for 30 seconds and centrifuged at 3000 tr/min (1730 g) for 10 min. The upper organic layer (400 µL) was transferred into a clean glass tube and evaporated to dryness at 37°C under a gentle nitrogen stream. The dry residues were dissolved in 200 µL of LC-MS grade water, vortex-

mixed, and transferred into glass vials for injection. Finally, 20  $\mu\text{L}$  of the extract was injected into the UHPLC–MS/MS system.

#### **5.5.4 Extraction from tissues**

Each sample of tissues: brain and muscles (100 mg) were homogenized in a clean glass tube with 500  $\mu\text{L}$  of Optima LC/MS water using an Ultra-Turrax® (IKA® T18 Basic) and spiked with 50  $\mu\text{L}$  of internal standard (IS) working standard solution. Calibrant samples were prepared in blank tissue samples by spiking tissue homogenate with 50  $\mu\text{L}$  of spiking solutions to obtain final concentrations ranging from 100 ng/mL to 0.05 ng/mL for Cl<sub>x</sub>BPA. For blank and unknown samples, spiking solution was replaced by 50  $\mu\text{L}$  of pure methanol. For double-blank samples, spiking and IS solutions were replaced by 100  $\mu\text{L}$  of pure methanol. Then 500  $\mu\text{L}$  of acetonitrile were added to homogenates. Samples were vortex-mixed for 1 min and 100 mg of MIX I were added, vortex-mixed again for 1 min and centrifuged at 2330 $\times$ g for 5 min. The upper organic layer was transferred into a clean glass tube, 200 mg of MIX VI for all tissues were added, vortexed again for 30 s and then centrifuged at 2330 $\times$ g for 5 min. The upper organic layer was transferred into a clean glass-tube and evaporated to dryness at 37 °C under a gentle nitrogen stream. Dry residues were dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of a water/methanol (70/30, v/v) solution, vortex-mixed and transferred into glass vials for injection. Finally, 20  $\mu\text{L}$  of extract were injected into the LC–MS/MS system at University of Poitiers.

### 5.5.5 Model representation

The development of the PBPK model followed a four-stage approach: model representation, parameterization, simulation, and validation.

The PBPK model presented was adapted from the PBPK model for Bisphenol A of Yang et al. (2013) Yang. For simulating the pharmacokinetics of Cl<sub>x</sub>BPA, the rat was represented as a network of tissue compartment interconnected by arterial and venous blood pools separated by blood compartment (Figure 20). The model described a tissue network of 7 compartments: plasma, gonad, brain, fat, richly perfused tissue, muscles, and liver (Figure 20). Distribution of Cl<sub>x</sub>BPA into liver was initially described by Plattard et al. (2022), which was based on the rate constants of the phase II enzymes and with intrinsic clearance. A different PBPK model from the first three substances (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA) was developed versus Cl<sub>4</sub>BPA only because there is a limited diffusion in tissues (brain and muscles). An extra-hepatic metabolism was performed for these models where liver, tissues richly perfused, brain and muscles have extraction ratio to illustrate the metabolism in these tissues. For Cl<sub>4</sub>BPA, two cellular compartments were added to the model linked to the brain and muscle tissue compartments (see Figure 20). Distribution of Cl<sub>4</sub>BPA into tissues was described as extrahepatic metabolism process for liver, muscles, brain, and richly perfused tissues as three first substances. An intrinsic clearance was fitted for muscles and brain for metabolism and not an extraction ratio (E) as the first three contaminants.

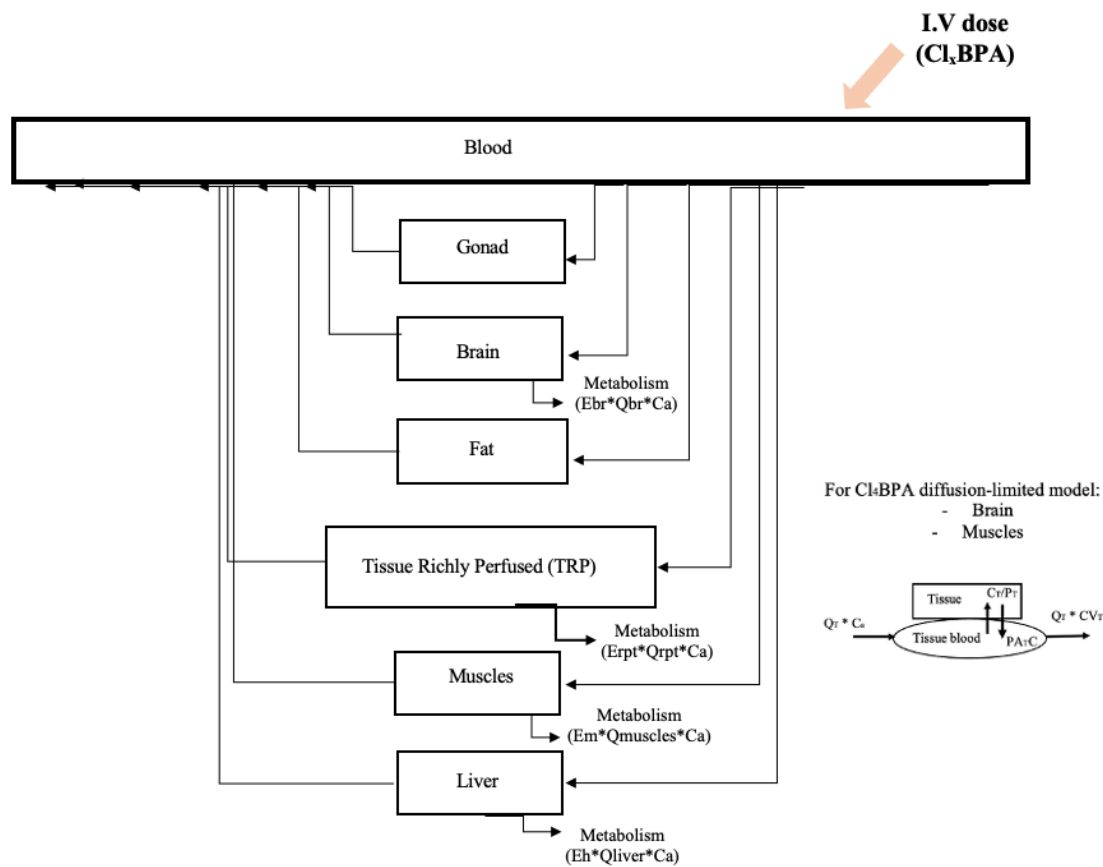


Figure 20. Conceptual representation of the physiologically based toxicokinetic model in Sprague-Dawley rats for Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA adapted from the PBPK model of BPA of Yang et al. (2013). Cl<sub>x</sub>BPA is given intravenously doses to adult's rats. For Cl<sub>4</sub>BPA, a diffusion-limited model was made for a better prediction of tissue concentrations.

E<sub>rpt</sub>, E<sub>m</sub>, E<sub>h</sub>, E<sub>br</sub> are extraction ratio for tissues; Q<sub>rpt</sub>, Q<sub>liver</sub>, Q<sub>muscles</sub>, Q<sub>br</sub> are tissues flow; Ca is the arterial blood concentration. For the diffusion-limited model of Cl<sub>4</sub>BPA: P<sub>A<sub>T</sub>C</sub> is the tissue permeability coefficient; C<sub>V<sub>t</sub></sub> is the vascular tissue concentration; P<sub>T</sub> is the tissue: blood partition coefficient.

## 5.5.6 Model parametrization

### 5.5.6.1 Physiological parameters

The physiological parameters for the PBPK model were obtained from different studies (see Tableau 25).

### 5.5.6.2 Physico-chemical parameters

To parametrize PBPK model in Sprague-Dawley rats for Cl<sub>x</sub>BPA, different methods were performed to find physico-chemical parameters as plasma protein binding *in vitro*, tissues: plasma partition coefficient *in silico*, and metabolic constants (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>, and intrinsic clearance) for each Cl<sub>x</sub>BPA in rats *in vitro*. All these methods were complementary. Then, to validate our model, we carried out an animal study with Sprague-Dawley rats at 2 different doses for each compound.

#### 5.5.6.2.1 Determination of plasma protein binding ( $F_{up}$ ), plasma: buffer and blood: plasma partition (BPR) coefficient

To identify plasma protein binding ( $F_{up}$ ), plasma: buffer partition coefficient of each Cl<sub>x</sub>BPA, a Rapid Equilibrium Dialysis (RED) (Waters et al., 2008; Ye et al., 2017) was performed. In a preliminary study, we first determined the period it takes to reach equilibrium and incubated each Cl<sub>x</sub>BPA (Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA) for that period. For experiments, the inserts were placed in wells at the level of the Teflon base plate. Each RED insert is separated by a semi-permeable membrane, with an approximately 8 kDa molecular weight cut-off threshold (MWCO). Therefore, each single-use insert is composed of two compartments (or chambers) side by side, one corresponding to the rat plasma samples (red chamber) and the other one to the physiological buffer (white chamber) for  $F_{up}$  and plasma: buffer PC.

The Teflon base plate, inserts, and all the other RED accessories were purchased from Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology) Inc. (Rockford, IL). For  $F_{up}$  and plasma: buffer partition coefficients, red chambers of the inserts were completed with plasma of Sprague-Dawley rat (50  $\mu$ L), physiological buffer (340  $\mu$ L) and Cl<sub>x</sub>BPA concentration for a total volume

equal to 400  $\mu\text{L}$ . Furthermore, 600  $\mu\text{L}$  of physiological buffer (PBS) were added in the white chamber. Five concentrations of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  ( $\text{Cl}_1\text{BPA}$ : 207,100,60,40 and 20 ppm;  $\text{Cl}_2\text{BPA}$ : 307,250,200,150 and 115.19 ppm;  $\text{Cl}_3\text{BPA}$ :305,250,200,150 and 62.8 ppm;  $\text{Cl}_4\text{BPA}$ : 607,500,400,300 and 207.8 ppm) were added in a small volume in red chamber (10  $\mu\text{L}$ ) to each vial. Following this, the Teflon base plate was placed in an orbital shaker (600 rpm) by Fisherbrand™ and incubated at 37°C for 27 hours (equilibrium largely achieved for all). At the end of the incubation, equilibrium was achieved between the two chambers and samples were collected in both compartments.

For all these parameters, after incubation, 100  $\mu\text{L}$  of samples for each chamber were stopped by adding 400  $\mu\text{L}$  of cold acetonitrile containing Bisphenol A (BPA) as internal standard with a final concentration of 0.25 ppm in eppendorfs. Samples were vortexed for 1 minute and put on ice for 30 minutes. After,  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  samples were centrifugated for 20 minutes at 4.6g at 25°C. Supernatant (400  $\mu\text{L}$ ) was withdrawn and put into a vial prior to analysis at -20°C by HPLC/FLD assay at Université de Montreal.

The determination of  $F_{\text{up}}$  and plasma: buffer partition coefficient was performed in triplicate. Standard curves for  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  were used to quantify the bound concentrations ( $C_{\text{bound}}$ ) found in the plasma chamber and free concentrations ( $C_{\text{u}}$ ) were identified and measured in the white chamber (PBS). Finally, the analysis of  $C_{\text{bound}}$  and  $C_{\text{u}}$  concentrations enabled us to calculate the plasma protein binding ( $F_{\text{up}}$ ) by dividing  $C_{\text{u}}/C_{\text{plasma}}$ .

$$C_{\text{plasma}} = \frac{(C_{\text{bound}} * (V_{\text{plasma}} + V_{\text{buffer}}) - (C_{\text{u}} * V_{\text{buffer}}))}{V_{\text{plasma}}}$$

Where:  $C_{\text{bound}}$  is the concentration analyzed into the red chamber (ppm),  $V_{\text{plasma}}$  corresponding to the volume of plasma into the red chamber ( $\mu\text{L}$ ),  $C_{\text{plasma}}$  is the concentration of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  in plasma,  $V_{\text{buffer}}$  is the buffer volume in the red side ( $\mu\text{L}$ ) and  $C_{\text{u}}$  is the concentration of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  unbound to plasma corresponding to the concentration analyzed in white chamber (ppm).

The partition coefficient plasma: buffer was calculated by dividing  $C_{\text{plasma}}/C_{\text{u}}$ . In addition, we used tissue: blood PCs by dividing tissue: plasma PC by BPR for PBPK models.

#### 5.5.6.2.2 Determination of tissues: plasma partition coefficients

$K_p$ , partition coefficients for tissues : plasma (gonad : plasma, brain : plasma, liver : plasma, adipose : plasma, muscles : plasma, richly tissues perfused : plasma and erythrocytes: plasma) were predicted *in silico* with equations of Poulin et al. (2012) for highly lipophilic compounds, based on the conceptual representation of the distribution of an organic compound in the biological matrix (the volume fraction equivalent of water in the  $F_{wm}$  matrix, the volume fraction equivalent of neutral lipids in the  $F_{nlm}$  matrix, the ionization term for the  $I_m$  matrix, etc) (Poulin et al., 2012).

$$K_p = \frac{(1+I_{wt}) \times F_{wt} + P_{nlw} \times F_{nlt}}{(1+I_{wp}) \times F_{wp} + P_{nlw} \times F_{nlp}}$$

Where  $F_{wt}$  and  $F_{wp}$  are the fractional volume of water equivalent in tissue and in plasma respectively,  $F_{nlt}$  and  $F_{nlp}$  are the fractional volume of neutral lipids equivalent in tissues and in plasma respectively, and finally,  $P_{nlw}$  is neutral lipids-water partition coefficient. All these parameter values are presented in Table 1 in supplementary data and the tissues: plasma partition coefficients are presented in Tableau 22. Values of  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  for each  $Cl_x$ BPA were calculated with a QSAR software (Chemaxon, Marvin Sketch, 22.11).

Moreover, values of  $I_{wt}$ , ionization term for water (aqueous) phase in tissue or extracellular water and  $I_{wp}$ , ionization term of plasma in tissue, were calculated for diprotic acid equation depend on the pH of the matrices (tissues or plasma) from Berezhkovskiy et al. (2011) (Berezhkovskiy, 2011) :

$$I_{wt, p} = 10^{pH-pK_{a1}} + 10^{pH-pK_{a2}} + 10^{2 \cdot pH - pK_{a1} - pK_{a2}}$$

Indeed, a method based on the compounds do not contain oxygen atoms in their molecular structure were used to calculate PC fat: plasma using the equation following:

$$\text{Log } P_{\text{vow}} = 1.0654 \times \text{log } P_{\text{ow}} - 0.232$$

All calculations of partition coefficients for this method were added in supplementary material.



BPR (Blood Plasma ratio) was determined by this equation:

$$\text{BPR} = \frac{\text{Pe} * (\text{Ve} + \text{Vpl})}{\text{Ve} + \text{Vpl}}$$

Where Pe is the PC erythrocytes: plasma, Ve and Vplasma is the volume of erythrocytes and plasma in rats presented in Tableau 28.

#### 5.5.6.3 Metabolic constants *in vitro*

The constants metabolic: Km, Vmax, and intrinsic clearance for each Cl<sub>x</sub>BPA were determined in a recent paper published by Plattard et al. (2022).

### 5.5.7 Quantification methods

#### 5.5.7.1 Cl<sub>x</sub>BPA with HPLC/FLD quantification for physico-chemical parameters

To analyze the samples of plasma protein binding (F<sub>up</sub>), tissues: plasma partition coefficients (PC) and blood: plasma ratio for Cl<sub>x</sub>BPA (Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA), an analytical method with an HPLC Agilent Technology 1100 series (Santa Clara, USA) using a fluorescence detector (FLD, G1321A) was developed at Université de Montréal. Samples were eluted by a Water (A) / Acetonitrile (B) (70:30, v/v) mobile phase solution at constant flow rate of 0.35 mL/min and using a Zorbax® Eclipse (LC18) chromatographic column (25 cm x 4.6 mm, 5 µm). The temperature of the column was set at 30°C and the pH was 7. The optimal wavelengths for excitation and emission are 237 and 330 nm respectively for all Cl<sub>x</sub>BPA. Gradient started at 70% of A and 30% of B and linearly decreased to 50% of A and B (0-1 min) and maintained to 42.8% of A and 57.20% of B (1-4 min); increased at 1% of A and 99% of B (4-4.5 min and 6.5-7 min); and finally, at 70% of A and 30% of B (7-9 min) to re-equilibrate the column. Moreover, retention times for Cl<sub>1</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA were 0.85,

1.24, 1.94 and 3.07 min respectively. Data and quantification were acquired with Agilent ChemStation® software.

#### 5.5.7.2 Cl<sub>x</sub>BPA with an HPLC-MS/MS quantification for rat tissues

To quantify Cl<sub>x</sub>BPA concentration in tissues of Sprague-Dawley rat samples, UHPLC-MS/MS assays were used. These methods were based on published papers by Venisse et al. (2019) (Venisse et al., 2019) and Cambien et al. (2020). For these methods, an UHPLC Shimadzu® Nexera X2 (Kyoto, Japan) pump was equipped with a Waters® Acquity CSH C18 (3.5 µm particle size, 2.1 × 100 mm, Milford, USA) column heated at 40 °C. Chromatographic separation was achieved using a binary mobile phase (water (A)/methanol (B)) delivered in the gradient mode at a flow rate of 350 µL·min<sup>-1</sup>. Gradient elution started at 30% of B (0–0.5 min); then linearly increased to 90% of B (0.5–7 min); then to 99% of B (7–7.5 min); maintained at 99% of B for 5 min (7.5–12.5 min); then decreased to 30% of B (12.5–13 min) and finally maintained at 30% of B for 2.5 min (13–15.5 min) for re-equilibration of the column.

Analyte quantification was performed with an API6500 + mass spectrometer from Sciex® (Concord, Canada) using an electrospray ionization (ESI) interface, operating in negative ionization mode. Ion source and MS/MS conditions were optimized with infusion of a 1 µg/mL solution of the individual analytes at 10 µL/min. For each compound multiple reaction monitoring mode (MRM) with two specific daughter fragment transitions for one parent precursor ion was used. The first was used for quantification while the second was used for confirmation. Dwell and cycle times were optimized using the Scheduled MRM® algorithm. Data were acquired with Analyst® software and quantification was obtained with MultiQuant® software.

### 5.5.8 Extrapolation *in vitro-in vivo* for metabolism

The study by Plattard et al. (2022) determined the *in vitro* metabolic constants:  $V_{max}$ ,  $K_m$ , and intrinsic clearance for each Cl<sub>x</sub>BPA. The initial assumption was that metabolism was restricted to the liver, so we performed an *in vitro-in vivo* extrapolation of Cl<sub>x</sub>BPA hepatic metabolism from the intrinsic clearances obtained in the metabolic assays in Chapter 3. Intrinsic clearance was first extrapolated according to the method of (Houston, 1994) as follows:

$$CL_{int \text{ in vivo}} = CL_{inh \text{ U}} \times \text{Hepatocellularity} \times \text{Liver weight} \quad (5)$$

Where values of  $CL_{inh \text{ U}}$  (mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) for Cl<sub>x</sub>BPA are in the study by Plattard et al. (2022), Hepatocellularity is the number of hepatocytes cells per gram liver in rats (135 millions/g liver) and the liver weight (grams) represented the average of values from this *in vivo* study with Sprague-Dawley rats.

After extrapolating the *in vitro* intrinsic clearance to *in vivo*, the hepatic clearance was calculated to determine the hepatic extraction ratio ( $E_h$ ) for each chlorinated BPA derivative with the equation of Poulin et al. (2012), as follows:

$$E_h = \frac{CL_h}{Q_h * BPR}$$

Where hepatic clearance ( $CL_h$ ) was calculated with the following equation from the article by (Poulin et al., 2015) as follows:

$$CL_h = \frac{Q_h * BPR * CL_{int \text{ in vivo}} * F_{up \text{ adjusted}}}{((Q_h * BPR) + CL_{int \text{ in vivo}} * F_{up \text{ adjusted}})}$$

Liver flow rate ( $Q_h$ ) is from the study by (Brown et al., 1997) and is presented in Tableau 28. BPR is the blood: plasma ratio that was obtained with an *in vitro* equilibrium dialysis experiment (results presented in supplementary data). The intrinsic *in vivo* clearance ( $CL_{int \text{ in vivo}}$ ) was obtained from the paper by Plattard et al. (2022). Moreover, the adjusted unbound fraction ( $F_{up\text{-adjusted}}$ ) accounts for additional processes that can potentially occur between the experimentally determined *in vitro* conditions used to estimate  $F_{up}$  and actual *in vivo* conditions.

Especially, namely the effect of the pH gradient on the fraction of unbound substance between the plasma and the intracellular compartment, and the albumin-facilitated uptake mechanism(s), which quantifies albumin uptake (Poulin et al., 2015).

*In vivo* intrinsic clearance results are presented in Supplementary Data in Table 3, but  $E_h$  and hepatic clearance values are presented in Tableau 29. Therefore, its values were then incorporated into the PBPK models of  $Cl_x$ BPA.

### 5.5.9 Model simulation and calibration

The series of mass balance differential equations representing the PBPK model of  $Cl_x$ BPA were solved using Simbiology, an application of MATLAB® software (2021b). The adequacy of the PBPK model was then verified by comparing predictions of unchanged  $Cl_x$ BPA concentrations in plasma, brain, and muscle between 0.5- and 24-hours post-dosing (intravenously) with experimental data obtained from an *in vivo* study in Sprague-Dawley rats ( $n = 80$  rats).

The experimental concentrations found in tissues (brain and muscle) were very low, so we first tried a diffusion limited PBPK model, but it was impossible to adequately simulate blood concentrations for  $Cl_1$ BPA,  $Cl_2$ BPA, and  $Cl_3$ BPA, which were vastly overestimated by the model, but it was more suitable for  $Cl_4$ BPA. For all  $Cl_x$ BPA, in addition to hepatic metabolism we then added extrahepatic metabolism in the following tissues: richly perfused tissues, brain and muscle to better fit the simulations to the experimental data. In the end, the last PBPK model with extrahepatic metabolism provided the best fit for all contaminants. Therefore, we extended the PBPK model to include extrahepatic organs (brain, muscle, richly perfused tissue, liver) with an extraction ratio for  $Cl_1$ BPA,  $Cl_2$ BPA, and  $Cl_3$ BPA.

However,  $Cl_4$ BPA behaved differently from the first three substances. Indeed, a PBPK model with limited diffusion is the best visual fit on tissue concentrations, but with extrahepatic metabolism in addition. For  $Cl_4$ BPA, extrahepatic metabolism only for muscle and brain is represented by intrinsic clearance for muscle ( $CL_{intm}$ ) and brain ( $CL_{intbr}$ ) whereas it is with

extraction ratio for richly perfused tissue ( $E_{rpt}$ ). With this extended model, plasma concentrations were described much more accurately than the predictions of the model with liver-restricted metabolism.

In addition, for ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, and Cl<sub>3</sub>BPA, variations in the extraction ratio of richly perfused tissue ( $E_{rpt}$ ) were first performed to fit the experimental plasma data to the predictions. Then, to obtain a better fit of the tissue data, variations of the muscle and brain extraction ratios ( $E_m$  and  $E_{br}$ ) were performed. Finally, after performing these variations on  $E_m$  and  $E_{br}$ , further variations were performed on  $E_{rpt}$  to maintain the lowest possible divergence between simulated and observed values of plasma concentrations.

For Cl<sub>4</sub>BPA, the adjustment on the experimental data was different. Indeed, the variations started with the extraction ratio of richly perfused tissues ( $E_{rpt}$ ) like the other substances, but then the areas of the coefficients of tissue permeability (PA<sub>brC</sub>, PA<sub>mC</sub>), then the intrinsic brain clearance (CL<sub>intbr</sub>) and the intrinsic muscle clearance (CL<sub>intm</sub>) were adjusted to fit the experimental data.

## 5.6 Results

### 5.6.1 Overview of the kinetic data from *in vivo* study

For experimental data point, the mean of plasma concentration of 10 Sprague-Dawley rats was taken to make the optimization of the PBPK model. After collecting and extracting blood and tissues from the Sprague-Dawley rat, HPLC-MS/MS measurements were performed, and the method of quantification has been previously described and reported in Tableau 18 to Tableau 21. Significant differences between substances were measured in plasma for the same dose. Indeed, at 4 mg/kg, 1.9 ng/mL of ClBPA (see Tableau 18) , 0.03 ng/mL of Cl<sub>2</sub>BPA (see Tableau 19), 0.6 ng/mL of Cl<sub>3</sub>BPA (see Tableau 20) and 35.8 ng/mL of Cl<sub>4</sub>BPA (see Tableau 21) remained at 24h. A large concentration of Cl<sub>4</sub>BPA remains in rat plasma at 24 h, suggesting greater accumulation of the parent compound and slower metabolism of this contaminant in the animal compared to other Cl<sub>x</sub>BPA. Indeed, the study by Plattard et al. (2022) showed that the

intrinsic clearance of Cl<sub>4</sub>BPA corresponds to the lowest clearance (0.039 mL/min/10<sup>6</sup> hepatocytes) compared to other Cl<sub>x</sub>BPA (Plattard, N. et al., 2022).

In addition, the plasma distribution of each substance at the beginning of administration (0.25h) is very different between each substance. Each Cl<sub>x</sub>BPA behaves differently but inter-individual differences are also present for each of the sampling times. Indeed, the standard deviations (SD) are sometimes very large for some concentrations at a certain time for each Cl<sub>x</sub>BPA (see Tableau 18 to Tableau 21). For the brain, the concentrations of each Cl<sub>x</sub>BPA at 24h for the same dose (4 mg/kg) are quite different except for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA. ClBPA has a concentration of 2.2 ng/g, which is seven times higher than the concentration of Cl<sub>2</sub>BPA (0.28 ng/g). However, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA have similar concentrations (5.5 and 4.7 ng/g respectively) (see Tableau 18 to Tableau 21).

Concerning muscles, at 24h for the same dose (4 mg/kg), Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA have the same concentrations (1.2 and 0.9 ng/g respectively) but large differences between ClBPA and Cl<sub>3</sub>BPA are found (6.2 and 110.3 ng/g respectively). Indeed, the concentrations of Cl<sub>3</sub>BPA in the muscles after 24h for the same dose are more than 20 times higher than the other Cl<sub>x</sub>BPA, which demonstrates a very high accumulation of this substance in the muscles of the rat (see Tableau 18 to Tableau 21).

Tableau 18 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for ClBPA provided by the *in vivo* study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 4 and 40 mg/kg.

Time (h)	Mean concentration $\pm$ SD (ng/mL)	
	Dose 1 (4 mg/kg)	Dose 2 (40 mg/kg)
<b>Plasma</b>		
0.25	5162.6 $\pm$ 3214.8	21 363.4 $\pm$ 5652.6
0.5	6821.6 $\pm$ 5786.9	19 899.8 $\pm$ 8545.4
1	7656.3 $\pm$ 6688.5	19 883.0 $\pm$ 8859.1
2	5287.0 $\pm$ 4824.5	18 598.5 $\pm$ 7788.5
4	631.5 $\pm$ 916.3	7950.6 $\pm$ 10 529.9
8	33.4 $\pm$ 29.0	11 920.1 $\pm$ 10 210.6
24	1.9 $\pm$ 1.3	57.9 $\pm$ 27.2
<b>Brain (ng/g)</b>		
4	164.2 $\pm$ 184.8	355.9 $\pm$ 86.2
24	2.2 $\pm$ 3.8	55.0 $\pm$ 63.8
<b>Muscles (ng/g)</b>		
4	159.1 $\pm$ 110.9	1 244.0 $\pm$ 806.9
24	6.2 $\pm$ 8.3	127.1 $\pm$ 141.6

Tableau 19 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for Cl<sub>2</sub>BPA provided by the *in vivo* study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 4 and 40 mg/kg.

Time (h)	Mean concentration $\pm$ SD (ng/mL)	
	Dose 1 (4 mg/kg)	Dose 2 (40 mg/kg)
<b>Plasma</b>		
0.25	73.6 $\pm$ 49.7	19.7 $\pm$ 40.6
0.5	41.1 $\pm$ 44.3	72.4 $\pm$ 141.7
1	8.0 $\pm$ 8.8	10.8 $\pm$ 17.9
2	12.4 $\pm$ 24.3	2.1 $\pm$ 1.5
4	14.5 $\pm$ 35.3	9.9 $\pm$ 10.3
8	1.4 $\pm$ 2.9	35.1 $\pm$ 69.7
24	0.03 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.8
<b>Brain (ng/g)</b>		
4	82.02 $\pm$ 16.6	323.5 $\pm$ 46.6
24	0.28 $\pm$ 0.09	14.9 $\pm$ 10.6
<b>Muscles (ng/g)</b>		
4	91.4 $\pm$ 61.2	319.2 $\pm$ 87.1
24	1.2 $\pm$ 0.8	13.05 $\pm$ 8.3

Tableau 20 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for Cl<sub>3</sub>BPA provided by the *in vivo* study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 0.4 and 4 mg/kg.

Mean concentration ± SD (ng/mL)		
Time (h)	Dose 1 (0.4 mg/kg)	Dose 2 (4 mg/kg)
<b>Plasma</b>		
0.25	183.8 ± 113.6	165.8 ± 369.8
0.5	269.4 ± 243.3	63.5 ± 0.5
1	198.1 ± 424.9	629.0 ± 1178.4
2	106.5 ± 172.1	186.8 ± 309.5
4	8.1 ± 16.8	287.6 ± 493.2
8	0.4 ± 0.2	6.2 ± 4.4
24	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.6
<b>Brain (ng/g)</b>		
4	0.43 ± 0.29	26.9 ± 30.7
24	0.09 ± 0.04	5.5 ± 8.2
<b>Muscles (ng/g)</b>		
4	5.4 ± 1.9	101.8 ± 89.4
24	5.1 ± 1.9	110.3 ± 219.2

Tableau 21 : Kinetic data in plasma, brain, and muscles for Cl<sub>4</sub>BPA provided by the *in vivo* study in Sprague-Dawley rat at 2 doses: 0.4 and 4 mg/kg.

Mean concentration ± SD (ng/mL)		
Time (h)	Dose 1 (0.4 mg/kg)	Dose 2 (4 mg/kg)
<b>Plasma</b>		
0.25	321.3 ± 2737.7	5365.9 ± 2718.3
0.5	578.8 ± 1018.4	7993.3 ± 4328.05
1	958.5 ± 1202.3	10 828.9 ± 4058.2
2	488.3 ± 657.7	7618.07 ± 3879.4
4	100.7 ± 75.4	1159.7 ± 1877.01
8	61.3 ± 27.7	132.8 ± 77.7
24	23.6 ± 29.1	35.8 ± 11.9
<b>Brain (ng/g)</b>		
4	18.2 ± 11.7	16.4 ± 14.9
24	0.8 ± 0.2	4.7 ± 9.3
<b>Muscles (ng/g)</b>		
4	37.1 ± 26.6	75.9 ± 102.7
24	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.6



## 5.6.2 Estimation of parameters

The rat plasma protein binding values ( $F_{up}$ ) for  $Cl_x$ BPA obtained with equilibrium dialysis are presented in Tableau 22. We observed that ClBPA,  $Cl_2$ BPA,  $Cl_3$ BPA and  $Cl_4$ BPA are highly bound to plasma proteins (93%, 96.1%, 97.9% and 99.5%) like Bisphenol A (95% approximately) (Teegarden et al., 2005). Moreover, the tissue: plasma partition coefficients for ClBPA,  $Cl_2$ BPA,  $Cl_3$ BPA and  $Cl_4$ BPA obtained with equations of Poulin et al. (2012) with a method based on the compounds do not contain oxygen atoms in their molecular structure are presented in Tableau 22.  $Cl_x$ BPA are most distributed in adipose tissue, brain, gonads, and liver and much less in muscles, and richly perfused tissues. Adipose: plasma is the highest of all ratios with values ranging from 163 to 208, followed by the brain: plasma ratio with values ranging from 6.67 to 6.74.

For PBPK modeling, the richly perfused tissues: plasma partition coefficient was assumed to be equal to kidney: plasma partition coefficient, presented in supplementary materials.

The volume of distribution at steady state ( $V_{dss}$ ) was calculated with the equation presented in Tableau 22 and  $Cl_x$ BPA have a high  $V_{dss}$ : 2,84;3,01;3.29 and 3.45 L respectively for ClBPA,  $Cl_2$ BPA,  $Cl_3$ BPA and  $Cl_4$ BPA. A large volume of distribution means that these contaminants are widely distributed in the tissues and especially in the storage compartments such as the adipose tissue. The brain may also be a storage compartment due to the high brain: plasma partition coefficient.

Tableau 22 : Plasma protein binding ( $F_{up}$ ) and in silico tissues/serum distribution ratios in Sprague-Dawley rats (Poulin et al., 2012; Waters et al., 2008; Ye et al., 2017).

	C1BPA	Cl <sub>2</sub> BPA	Cl <sub>3</sub> BPA	Cl <sub>4</sub> BPA
<b>Plasma protein binding</b>				
$F_{up}$ <i>in vitro</i> (%) <sup>a</sup>	6.96	3.88	2.15	0.49
<b>Tissues : plasma partition coefficient</b>				
In silico using equations of Poulin et al. (2012)				
Adipose	163.36	182.05	195.61	207.93
Brain	6.74	6.77	6.76	6.67
Liver	3.59	3.61	3.60	3.56
Muscles	2.10	2.11	2.10	2.08
Richly perfused tissue (RPT)	3.35	3.37	3.36	3.32
Gonads	3.82	3.84	3.83	3.78
Erythrocytes	0.38	0.37	0.37	0.37

<sup>a</sup> Obtained with an equilibrium dialysis experiment (*in vitro*)

### 5.6.3 Model calibration

#### 5.6.3.1 Simulation of plasma concentrations for Cl<sub>x</sub>BPA

With all the above parameter estimates (i.e., partition coefficients, metabolic rate constants, and plasma protein binding) ((Plattard, N. et al., 2022) and Tableau 22), the adequacy of the PBPK model calibration is substance-specific. Indeed, for C1BPA (see Figure 21), a large underestimation of the concentrations between 0 and 6h is observed compared to the experimental data but simulates very well after 24h for both doses (4 and 40 mg/kg) (see Figure 21). It was difficult to fully understand the beginning of the curve because it is possible that a biological mechanism was involved.

For Cl<sub>2</sub>BPA, for the first i.v. dose (4 mg/kg), the predicted concentration (PBPK model) is overestimated especially for 24h compared to experimental data. For the second dose (40 mg/kg), only the time points at 8h and 24h corresponded to the experimental data but the beginning of the curve is better predicted than ClBPA (see Figure 22).

The Cl<sub>3</sub>BPA represents the best simulation for both doses compared to the other 3 contaminants (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA). However, for both doses (0.4 and 4 mg/kg), the time point 24h is adequately simulated by the PBPK model compared to an underestimation at 0.25 to 4h (see Figure 23).

Finally, for the last Cl<sub>x</sub>BPA: Cl<sub>4</sub>BPA, the first dose (0.4 mg/kg) have a good prediction for all time points. For the second dose (4 mg/kg), there is an underestimation of plasma concentrations for predicted curve compared to experimental data at the beginning of the curve (0.25-4h) whereas the end of kinetic curve, there is an overestimation for the 8 and 24h time points (see Figure 24).

For the same dose (4 mg/kg) for all Cl<sub>x</sub>BPA, we observed that at 24h, there is much more Cl<sub>4</sub>BPA remaining in the plasma than for the other substances.

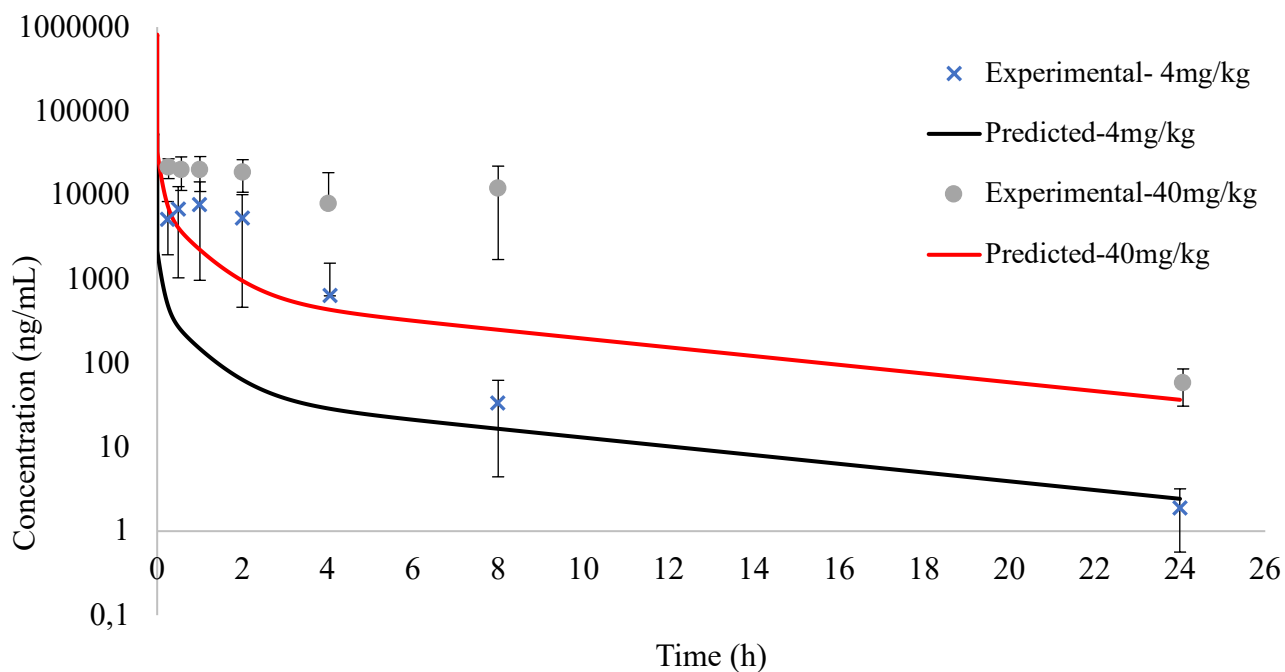


Figure 21 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for CIBPA for 4 and 40 mg/kg during 24h

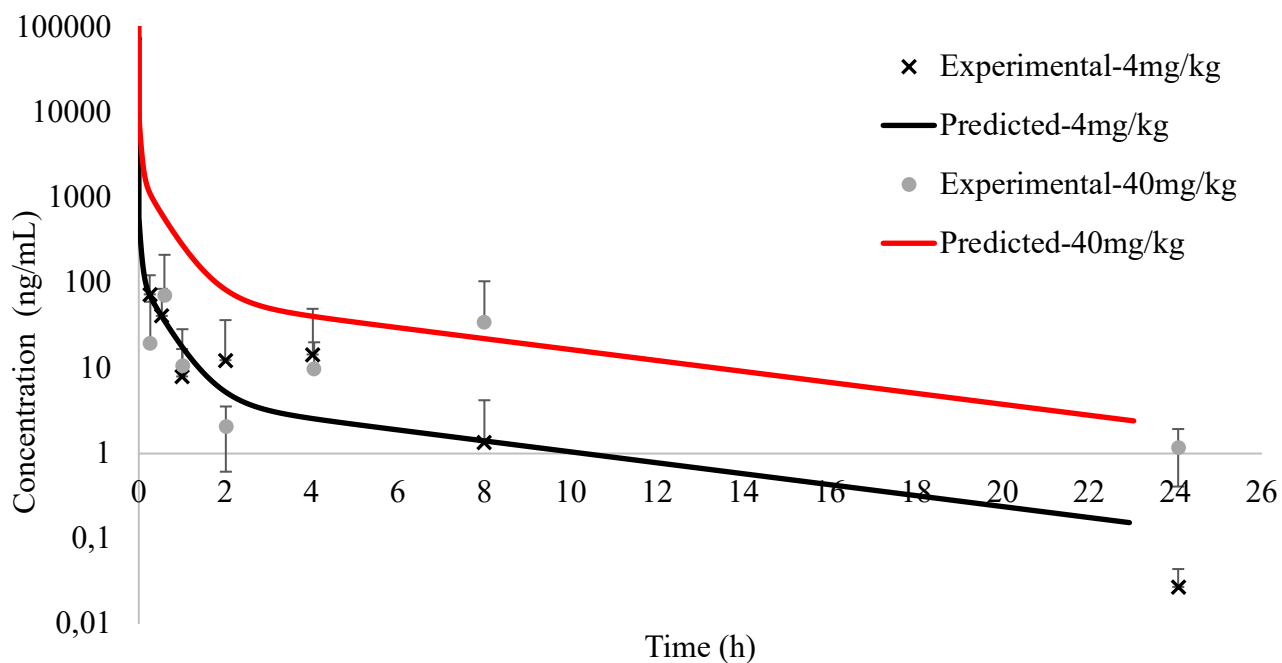


Figure 22 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for Cl<sub>2</sub>BPA at 4 and 40 mg/kg during 24h

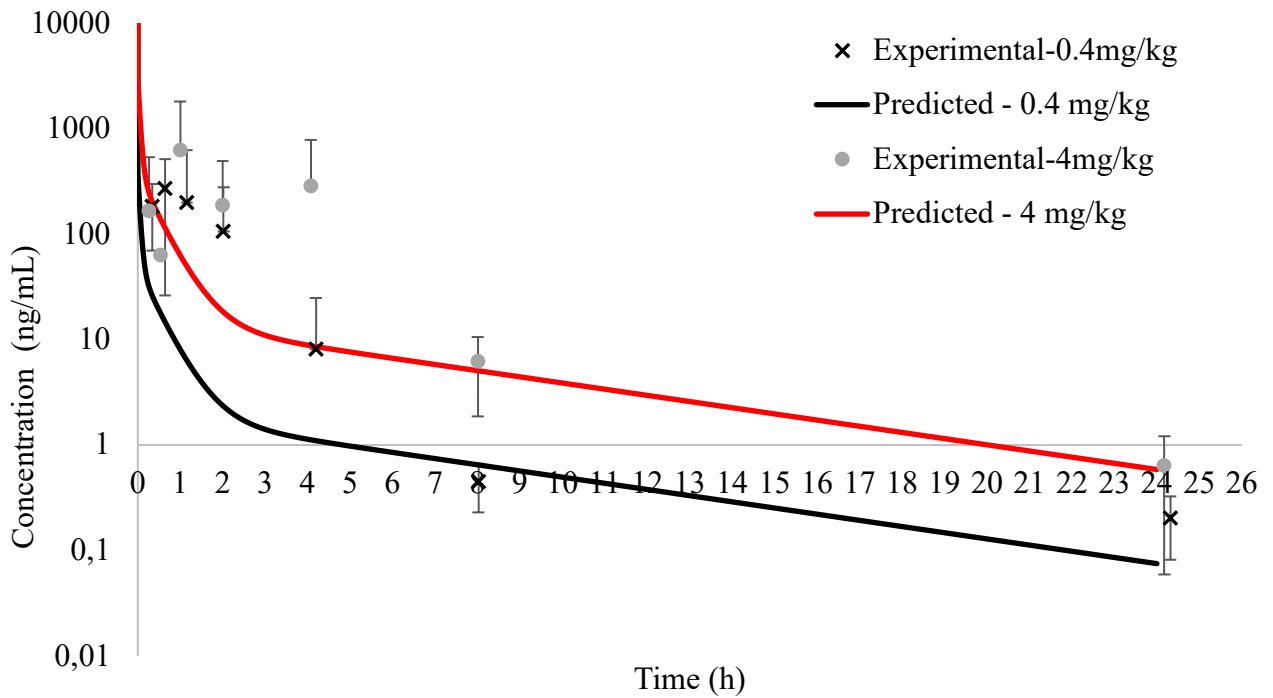


Figure 23 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for Cl<sub>3</sub>BPA at 0.4 and 4 mg/kg during 24h

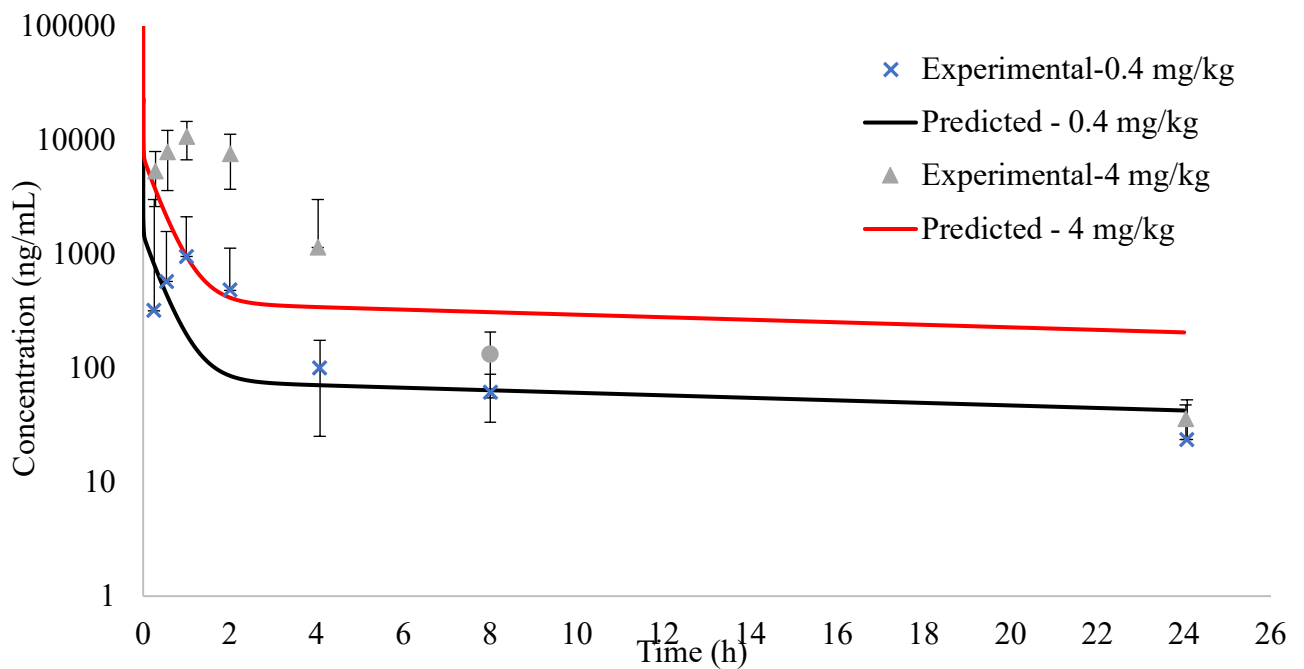


Figure 24 : Time-profile in log-scale of plasma concentration for Cl<sub>4</sub>BPA at 0.4 and 4 mg/kg during 24h

### 5.6.3.2 Simulation of brain concentrations for Cl<sub>x</sub>BPA

After euthanasia by CO<sub>2</sub>, we have collected different tissues such as brain and muscles at two different times: 4 and 24h for each Cl<sub>x</sub>BPA (see Tableau 18 to Tableau 21).

Firstly, for monochlorinated BPA (ClBPA), the predicted concentrations with PBPK model are slightly overestimated at 24h for both doses. However, the highest dose at 4h, the prediction curve is overestimated compared to the experimental point whereas a good prediction is presented at the lowest dose for the same time in the brain (see Figure 25).

For Cl<sub>2</sub>BPA, the predicted concentrations of both doses are adequately estimated at 24h but an overestimation at 40 mg/kg is observed whereas an underestimation is presented at the lowest dose (see Figure 26). Moreover, the predicted curve for Cl<sub>3</sub>BPA is overestimated for the lowest dose at 4h but for the highest dose, an underestimation is present for all time points. At 24h, the prediction curve is adequately simulated for the lowest dose (see Figure 27).

Finally, for Cl<sub>4</sub>BPA, the predicted concentrations of both doses are adequately estimated at 4h and 24h (see Figure 28).

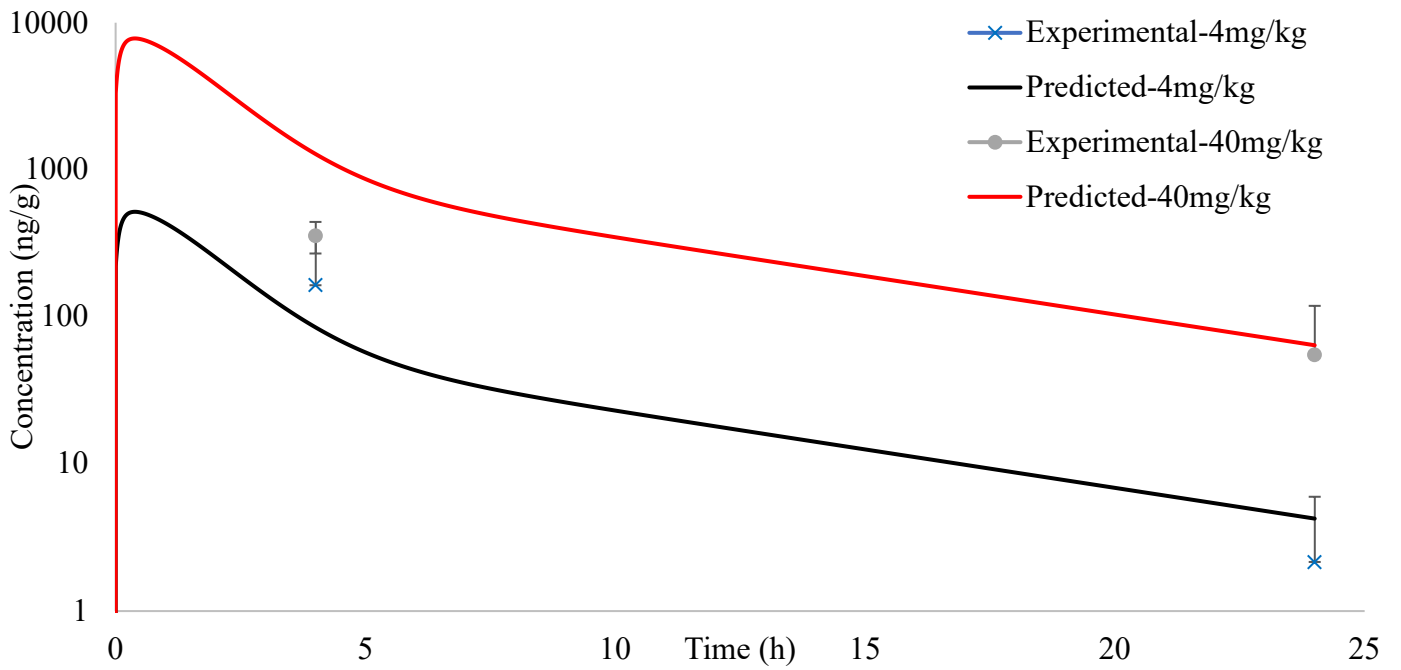


Figure 25 : Time-profile in log-scale of brain concentration for CIBPA for 4 and 40 mg/kg during 24h

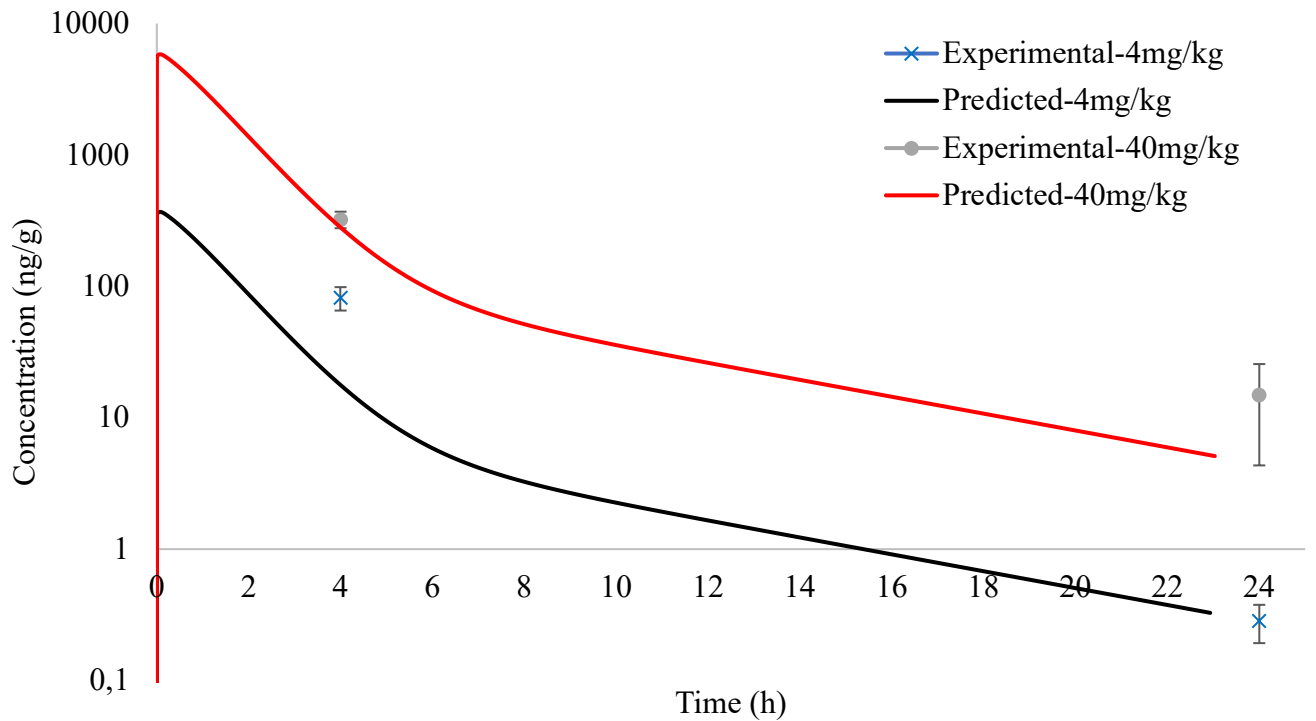


Figure 26 : Time-profile in log-scale of brain concentration for Cl<sub>2</sub>BPA for 4 and 40 mg/kg during 24h

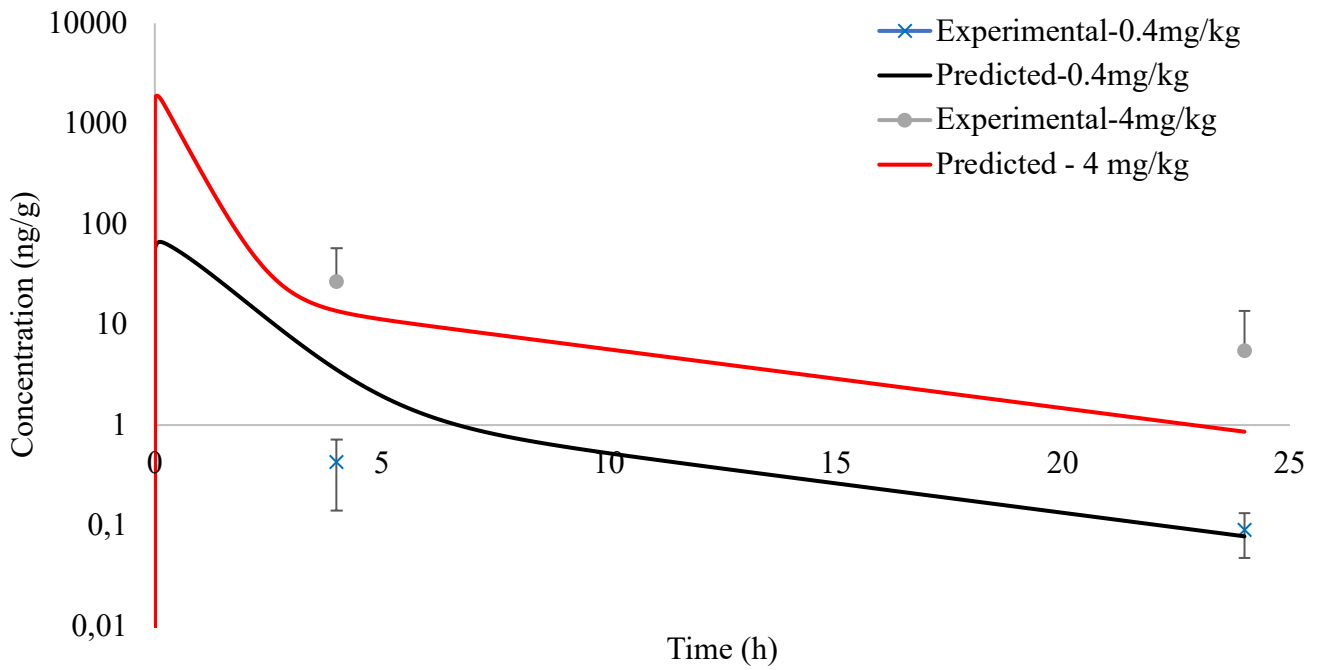


Figure 27 : Time-profile in log-scale of brain concentration for Cl<sub>3</sub>BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h

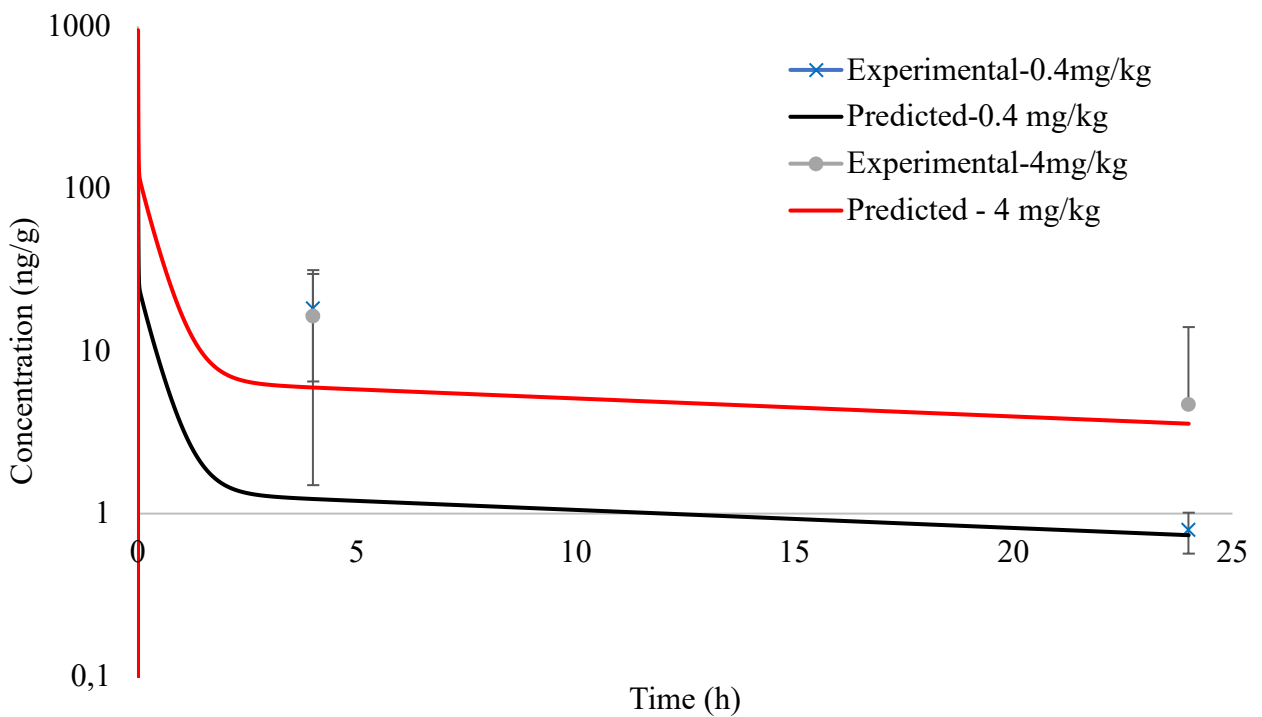


Figure 28 : Time-profile in log-scale of brain concentration for Cl<sub>4</sub>BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h



### 5.6.3.3 Simulation of muscles concentrations for Cl<sub>x</sub>BPA

Firstly, for ClBPA, the muscles concentrations are adequately simulated for both doses at 4h but an underestimation is present at 24h compared to the experimental data (see Figure 29). Indeed, for Cl<sub>2</sub>BPA, the prediction curve is underestimated for all time points for both doses compared to the experimental data (see Figure 30).

For Cl<sub>3</sub>BPA, one of the rats was removed from the average of the concentrations because it appeared to be incorrect compared to the other rats. An analytical problem must have occurred. Moreover, the predicted curve is underestimated with a factor of 100 for 24h for 0.4 mg/kg and at 4h, another underestimation for the same dose is observed. Moreover, for 4 mg/kg at 4h, the muscles concentrations are adequately estimated by the PBPK model but at 24h, there is an underestimation compared to experimental data (see Figure 31).

Finally, for Cl<sub>4</sub>BPA, an underestimation is present between the predicted and experimental values of differences for the two doses (0.4 and 4 mg/kg) but only at 4h (see Figure 32). The concentration of Cl<sub>4</sub>BPA was the more complicated substance to fit adequately with the PBPK diffusion-limited model. Further investigation needs to be conducted on this model to refine it and to best simulate measured vs predicted concentrations in tissues.

Concerning the concentration between Cl<sub>x</sub>BPA, for the same dose (4 mg/kg), we observed that at 24h, there is much more ClBPA remaining in the muscles than for the other substances.

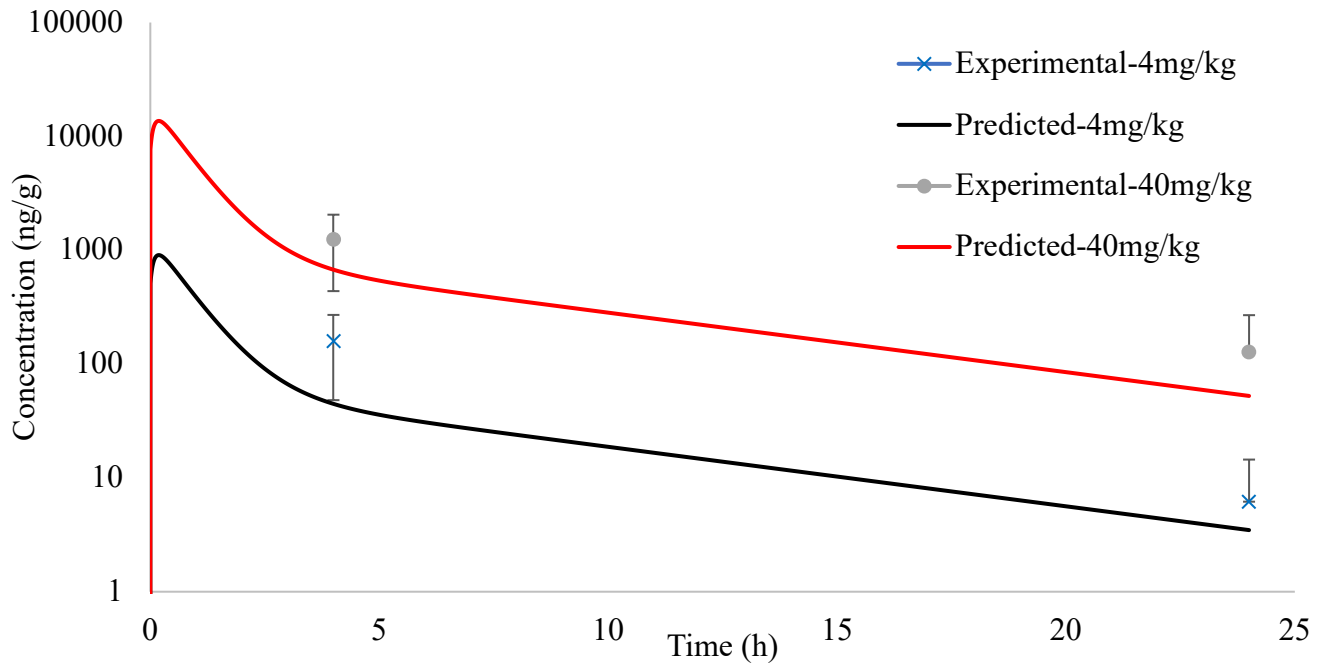


Figure 29 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for ClBPA for 4 and 40 mg/kg during 24h

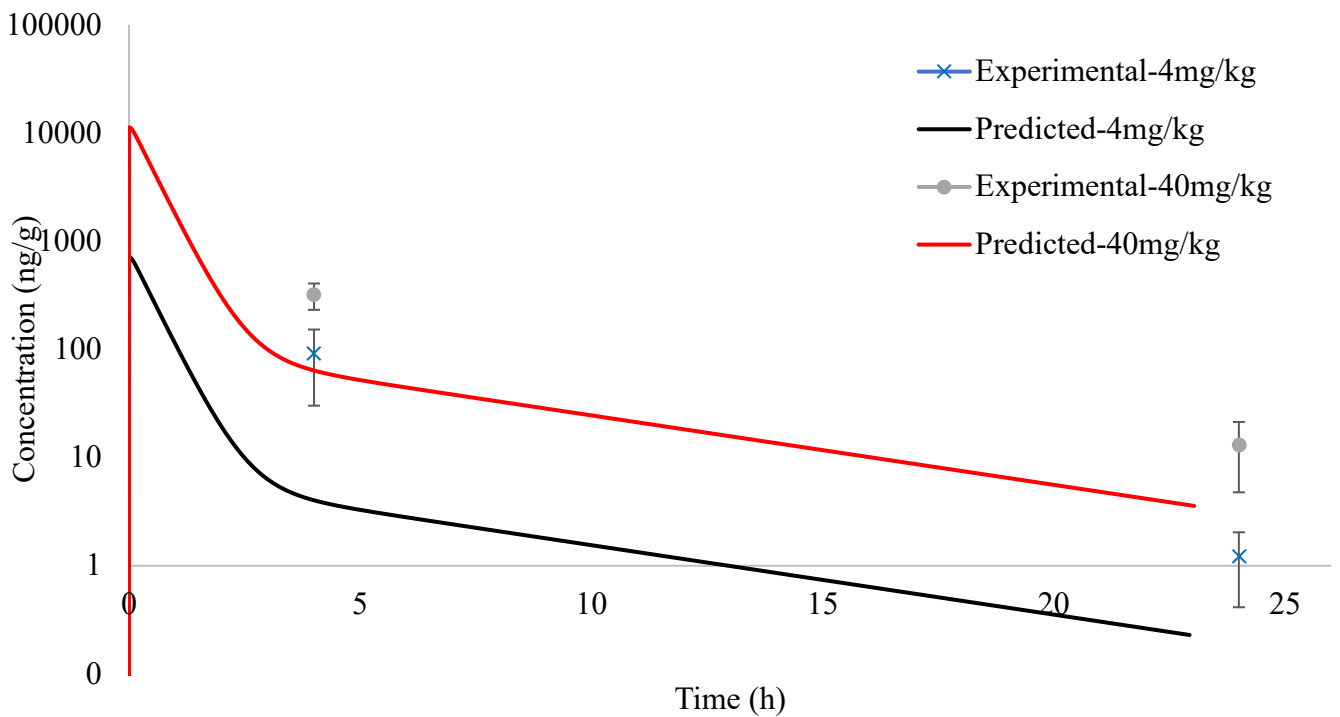


Figure 30 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for Cl<sub>2</sub>BPA for 4 and 40 mg/kg during 24h

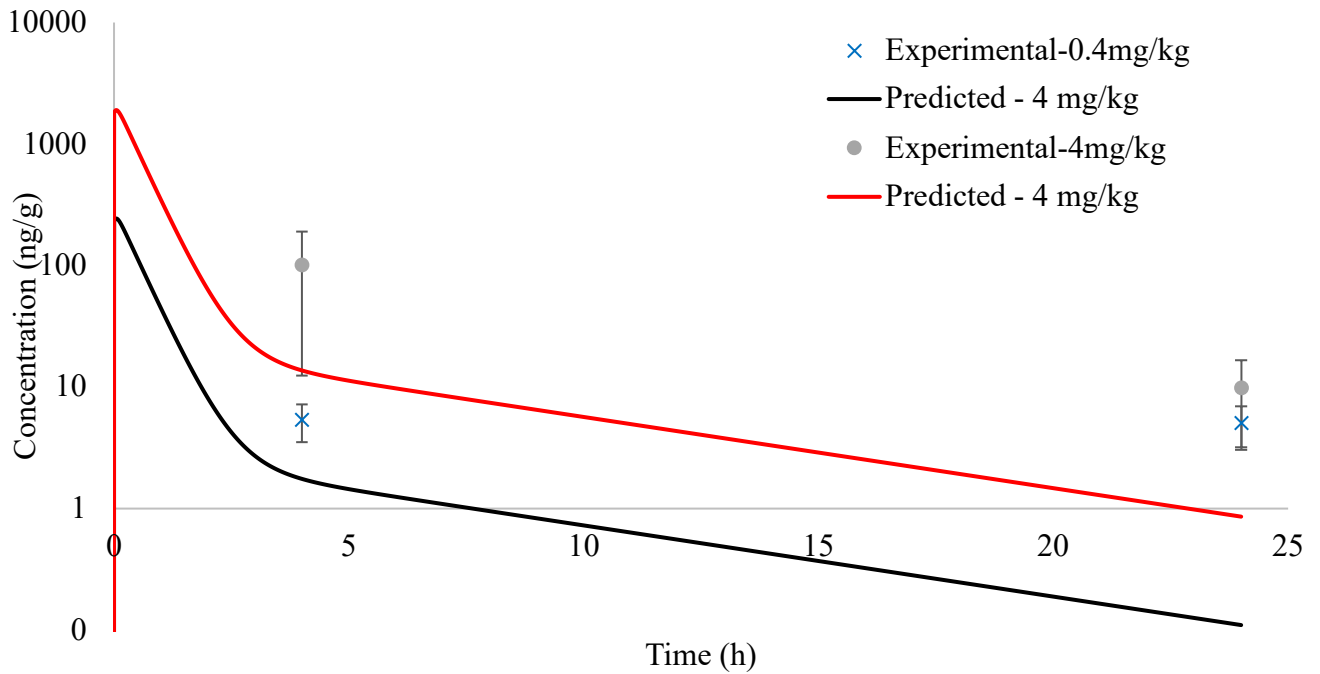


Figure 31 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for Cl<sub>3</sub>BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h

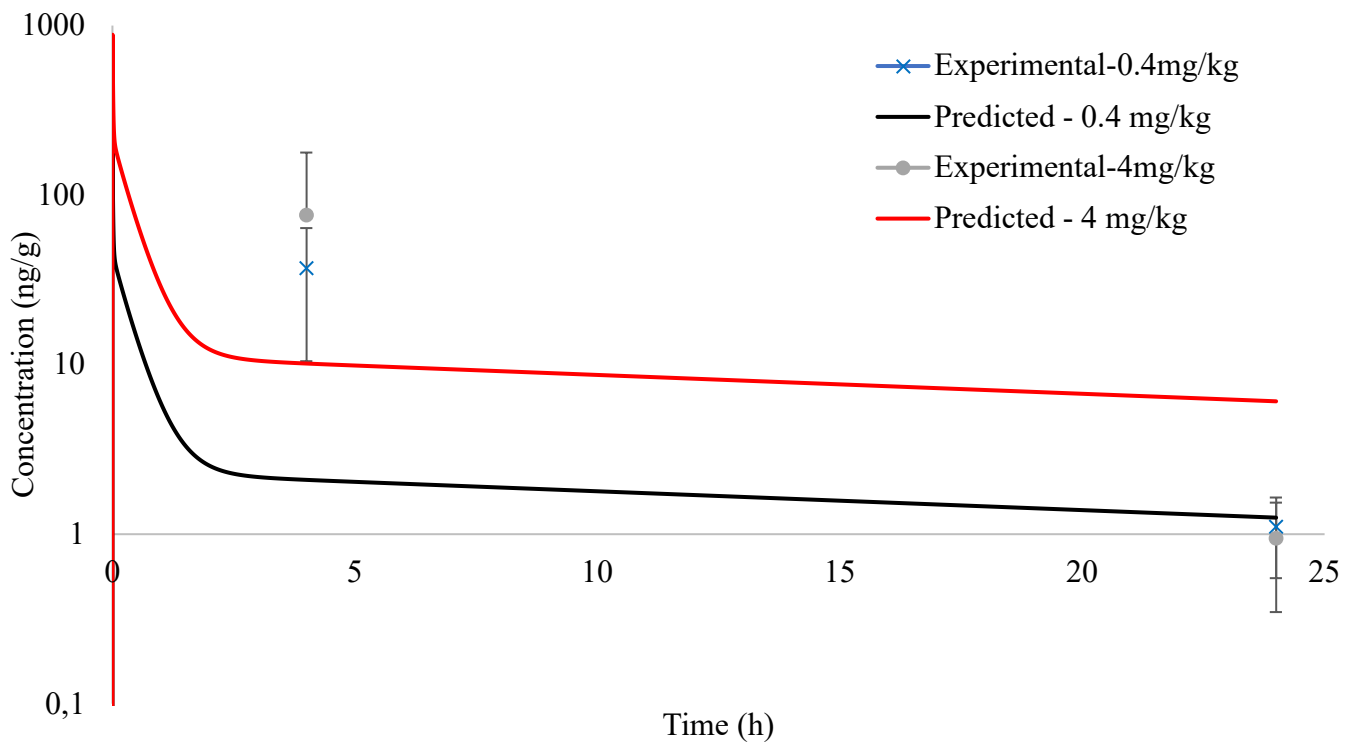


Figure 32 : Time-profile in log-scale of muscles concentration for Cl<sub>4</sub>BPA for 0.4 and 4 mg/kg during 24h

## 5.7 Discussion

Chlorinated derivatives of BPA ( $\text{Cl}_x\text{BPA}$ ) are emerging pollutants with endocrine-disrupting effects found *in vitro* (Mutou et al., 2006). The toxicokinetic parameters, previously rarely found in the literature, were for the first time estimated in this paper in order to use them to develop a PBPK model to predict plasma and tissue concentrations for each  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ .

$\text{Cl}_x\text{BPA}$  are strongly bound to plasma proteins like Bisphenol A in rats (Teeguarden et al., 2005). This high affinity of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  to plasma proteins is important in the distribution of the parent form. Indeed, theoretically only the bound form acts as a reserve that does not cross membranes while the unbound form (0.5 to 7% for  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ ) can be active because it can reach its membrane or intracellular target (Derendorf et al., 2019). Consequently, the fraction of a toxicant bound to plasma proteins is not immediately available for distribution into the extravascular space or filtration by the kidneys. In fact, several endocrine disruptors have a large affinity for plasma proteins (Teeguarden et al., 2005) and phthalates (Dominguez-Romero et al., 2019) which can interact daily with chlorinated derivatives of Bisphenol A.

$\text{Cl}_x\text{BPA}$  have a low concentration in the plasma, excepted for  $\text{Cl}_4\text{BPA}$  but these results corresponded to the study by Plattard et al. (2022) where  $\text{Cl}_4\text{BPA}$  has the lowest intrinsic clearance than other  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  (Plattard, N. et al., 2022). Moreover, these pollutants showed a distribution volume severalfold greater than the body weight (2.84-3.45 L), which means that tissue distribution of these substances is significant. However, after intravenous exposure to different doses in Sprague-Dawley rats: the concentrations of these contaminants found in the tissues are lower than expected based on simple partitioning only and vary considerably among rats of the same exposure groups and across substances. Indeed, for example, the brain: plasma partition coefficient of  $\text{Cl}_2\text{BPA}$  and  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  are high and have the same value (6.77 and 6.76 respectively, see Tableau 22), but the measured concentration in brain at 24h for the same i.v. dose (4 mg/kg) is 20 time higher for  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  than  $\text{Cl}_2\text{BPA}$  (0.08 versus 5.5 ng/g, see Tableau 18 to Tableau 21).

For the brain, the measured concentrations of each Cl<sub>x</sub>BPA at 24h for the same dose (4 mg/kg) are quite different from each other except for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA. ClBPA has a concentration of 2.2 ng/g, which is eight times higher than the concentration of Cl<sub>2</sub>BPA (0.28 ng/g). However, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA have similar concentrations (5.5 and 4.7 ng/g respectively) (see Tableau 18 to Tableau 21).

For muscles, at the same dose (4 mg/kg) at 24h, the experimental concentrations of Cl<sub>3</sub>BPA in the muscles are more than 20 times higher than the other Cl<sub>x</sub>BPA, which demonstrates a very high accumulation of this substance in the muscles of the rat. The extraction ratio of ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, and Cl<sub>3</sub>BPA for muscles is equal to zero, which means that this organ has not effectively removed the substances in muscles, but it was necessary to describe elimination in muscle for Cl<sub>4</sub>BPA to better estimate the observed levels, which was not the case for the other substances. Indeed, there is a low muscle: plasma partition coefficients (2.10, 2.11 and 2.10 respectively Tableau 22) and a low concentration after 24h, which means that Cl<sub>x</sub>BPA are poorly distributed in muscles in rat.

Using estimated brain: plasma partition coefficients (6.67 to 6.74, Tableau 22), simple perfusion limited distribution led to concentrations that were much higher than observed after 24 h. An elimination in the tissue was needed to simulate adequately the observed concentrations. This addition of extrahepatic elimination (i.e., in brain, and richly perfused tissues) was necessary to describe the observed plasma clearances that were greater than liver blood flow. Hence, these results suggest that the strong distribution in the adipose tissues that was estimated with the partition coefficient (see Tableau 22), allowed to describe the rapid decrease in plasma concentrations in the distribution phase following the injection. Indeed, a high adipose tissue: plasma partition coefficient was predicted (163.36 to 207.93, see Tableau 22), suggesting that a large accumulation in adipose tissue is present in rat.

PBPK models are useful tools for predicting tissues and plasma of chemicals, which can improve the scientific basis toxicological risk assessments (Lipscomb et al., 2012). Additionally, this model provides a single framework for the integration of various pharmacokinetic data sets from several different sources. The diffusion-limited PBPK model did not appear to fit the

experimental data for the first three substances, despite the low tissue concentrations. Only Cl<sub>4</sub>BPA fitted better with this type of model. Moreover, for ClBPA, the predicted plasma curve for the two doses does not correspond to the experimental data for the beginning of the curve, which may suggest an enterohepatic recirculation for ClBPA between 0 and 4h but it remains to be verified. Moreover, underpredictions of muscles concentrations for Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA could be corrected by increasing muscles: plasma partition coefficients, and possibly adjusting the elimination rate for Cl<sub>4</sub>BPA, which would mean that Cl<sub>2</sub>BPA would be much more distributed in muscle.

Indeed, tissue: plasma partition coefficients were predicted with an *in-silico* method, plasma protein binding with an equilibrium dialysis, metabolic constants with hepatocytes *in vitro*, and visual fit for other parameters (i.e., extrahepatic elimination constants and permeability constants) in PBPK model directly. The method to calculate partition coefficients tissues: plasma for Cl<sub>x</sub>BPA was based on Poulin *and* Haddad. (2012) using the method for molecules without oxygen even though the contaminant structure contained oxygen but after testing several partition coefficient calculation methods, it was the best fit with the Cl<sub>x</sub>BPA distribution phase. This *in silico* calculation method for Cl<sub>x</sub>BPA used for the PBPK models of this article is the same method used for dioxins or TCDD which are also very lipophilic substances but also very persistent in the body and the environment (Poulin et al., 2012).

The creation of two separate models (i.e., one for the first three substances and one for Cl<sub>4</sub>BPA) was necessary. Indeed, Cl<sub>4</sub>BPA's distribution seemed to behave as a diffusion-limited in certain tissues, and the more simplistic perfusion limited PBPK model was inadequate to achieve adequate simulations of observed plasma and tissue kinetics. ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA have the same sources of exposure while Cl<sub>4</sub>BPA has another source of exposure. Indeed, Cl<sub>4</sub>BPA is a flame retardant, which has been rarely studied in the literature (Plattard et al., 2021). In Sprague-Dawley rat, Cl<sub>4</sub>BPA has the longest half-life than the other three contaminants. Indeed, after 24 hours of exposure, there is some parent substance remaining in the plasma, brain, and muscles, which is reflected into the lowest intrinsic clearance of Cl<sub>x</sub>BPA (Plattard, N. et al., 2022) but the extrahepatic metabolism must also be considered in half-life time. The extrahepatic metabolism is much lower than for other substances.

Extrahepatic metabolism is also found for Bisphenol A and Bisphenol S (BPS). Indeed, metabolic activities through UDP-glucuronosyltransferase (UGT) for BPA are mainly distributed in the liver but are also observed at substantial levels in the kidney and testis (Yokota et al., 1999). In the study by Yokota et al. (1999), substantial UGT activities towards BPA were also observed in kidney and testis, neither of which contains UGT2B1.

This indicates that in the kidney and testis, which is the target organ of estrogenic toxins, BPA glucuronidation is catalyzed by one or more isoforms other than UGT2B1. Regarding BPS, the study by Sonker et al. (2021) demonstrate that the observed clearance is greater than rat hepatic blood flow, indicating the probability of extrahepatic clearance (Sonker et al., 2021). It has been previously reported that BPS undergoes glucuroconjugation via UGT isoforms such as UGT1A9 and UGT2B7, which are primarily found in the kidney, implying the possibility of extrahepatic metabolism (Skledar.D; et al., 2014). Moreover, the brain contains cytochromes P450 that may play a role in contaminant metabolism, but the extent of brain contribution to metabolism remains very limited in humans (Rivett et al., 1982).

Cl<sub>4</sub>BPA has been identified as a priority chemical substance for risk assessment and Cl<sub>3</sub>BPA is also considered of concern for toxicity and their burden of exposure is uncertain (Pellizzari et al., 2019). PBPK models are helpful tools to assess exposure. The PBPK models that we have developed in this article for Cl<sub>x</sub>BPA are a first attempt to understand to the toxicokinetics of these endocrine disruptors in animals. Indeed, this initial PBPK model of Cl<sub>x</sub>BPA was calibrated as best as possible with data from a single *in vivo* experiment in Sprague-Dawley rats. A great variability in the kinetics in the first 8 h post administration was observed and with available mechanistic information of these compounds it was difficult to adequately describe this period in plasma kinetics. It appears that other toxicokinetic mechanisms are involved and should be investigated and characterized in order to better capture this variability in the model. The mechanisms that are likely involved are enterohepatic recirculation, or the implication of transporters such as observed with BPA (Feng et al., 2019; Mazur et al., 2012). The toxicokinetic data produced in this work are unique and therefore limited, but this work helps in pointing out some toxicokinetic particularities and to hypothesize the implication of transporters. New data may provide additional guidance to refine this PBPK model to better understand the plasma and tissue kinetics of individual Cl<sub>x</sub>BPA, and additional toxicokinetic data are warranted to validate

the PBPK models. Additionally, human exposures have also been recently performed by our team and the data should help confirm if similar mechanisms are also occurring in this species. Modeling of Cl<sub>x</sub>BPA kinetic is at an early stage compared to PBPK modeling of BPA, there are plenty of kinetic data for BPA (Calafat et al., 2008; Fisher et al., 2011; Teeguarden et al., 2015; Teeguarden et al., 2005; Thayer et al., 2015; Volkel et al., 2002) and numerous iterations of PBPK models have been proposed for rats in the literature (Lin et al., 2020; Shin et al., 2004; Teeguarden et al., 2005; Yang et al., 2013). Ultimately, these PBPK models when refined and validated will be extrapolated to humans in order to help in the exposure and risk assessment of Cl<sub>x</sub>BPA by using available biomonitoring data.

Finally, toxic reactions due to a cocktail effect of environmental contaminants may occur if a toxicant with a high degree of protein binding is displaced from plasma proteins by another chemical, thereby increasing the free fraction of Cl<sub>x</sub>BPA in plasma. Indeed, it is important to consider the current exposure environment because humans are not only exposed to Cl<sub>x</sub>BPA, but to a multitude of chemicals on a daily basis (drinking water, indoor air, outdoor air, food, cosmetics, hygiene products, etc.).



## 5.8 Conclusion

In conclusion, this is the first time in the literature that a PBPK model for Cl<sub>x</sub>BPA was developed and validated with *in vivo* experiment for Sprague-Dawley rat. The experimental data was challenging to simulate with a single PBPK model framework, so two models were developed and calibrated on plasma and tissue kinetic data. The simulations of both PBPK models are sometimes overestimated or underestimated either for the plasma or tissue kinetics of each Cl<sub>x</sub>BPA. The experimental data collected for these substances are difficult to fit with standard PBPK models as they presented important inter-individual variabilities, which constitutes a limitation of our PBPK models.

This paper provides new knowledge on the toxicokinetics Cl<sub>x</sub>BPA and constitutes an initial step towards defining the parameters explaining their distribution and elimination in plasma and tissues in rat. The study demonstrated that these substances have a high affinity to plasma proteins, a high clearance rates with extrahepatic metabolism, and a high volume of distribution with very high affinity to adipose tissue.

Further studies are warranted to examine the toxicokinetics of chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA) after exposure via other routes of administration such as oral ingestion via tap water and inhalation especially for Cl<sub>4</sub>BPA. Indeed, it is possible that when used as a flame retardant, Cl<sub>4</sub>BPA could find its way into indoor dust, as observed with TBBPA (Abdallah et al., 2008; Geens et al., 2009; Wang et al., 2015; Wu et al., 2016). The distribution of Cl<sub>x</sub>BPA may therefore be significantly different depending on the exposure route considering that the main exposure route in humans is drinking water ingestion (Andra, Charisiadis, et al., 2015; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015). Studies that would confirm and quantify the extrahepatic metabolism in both species would also be important to better understand the differences that may exist between them. Moreover, an extrapolation of the PBPK model in humans could be developed in order to compare the toxicokinetic profiles in two species. It is presently important to better understand the mammalian toxicokinetic mechanisms of chlorinated derivatives of BPA for public health.

Tableau 23 : Physiological model parameters for adults Sprague-Dawley rats

Parameters	Values	References
Body weight, BW (kg)	0.281	Experimental data from <i>in vivo</i> experiments
Cardiac output, QCC (L/h/kg <sup>0.75</sup> )	15	(Rodriguez et al., 2007)
Cardiac output (L/h)	5.86	Calculated as QCC*BW <sup>0.74</sup>
<b>Blood flows (fraction of plasma cardiac output, %QCC)</b>		
Fat (QfC)	0.07 <sup>b</sup>	(Mirfazaelian et al., 2006) (Rodriguez et al., 2007)
Liver (QlC) (%QCC)	0.18 <sup>b, c</sup>	(Brown et al., 1997)
Brain (QbrC)	0.0020	(Mirfazaelian et al., 2006; Stulcova, 1977)
Gonads (QgoC)	0.01	(Campbell, 2009)
Muscles (QmC)	0.16	Calculated as 0.24-QfC-QgoC
Richly perfused tissues (QrC)	0.56	Calculated as 0.76-QlC-QbrC
<b>Tissue volumes (%BW)</b>		
Plasma (VplC)	0.0312 <sup>a, b</sup>	(Loccisano et al., 2012)
Fat (VfC)	0.0761 <sup>b</sup>	
Liver (VIC)	0.041 <sup>b</sup>	(Mirfazaelian et al., 2007)
Brain (VbrC)	0.0057	
Gonads (VgoC)	0.0027	
Erythrocytes (VeC)	0.0367	
Muscles (VmC)	0.6212	Calculated as 0.70-VfC-VgoC
Richly perfused tissues (Vr)	0.1521	Calculated as 0.23-VlC-VbrC-VplC <sup>d</sup>
GI lumen (Vgc2C), L/Kg)	0.032	(Clewel, R. A. et al., 2008)
<b>Blood volume fraction (%BW)</b>		
Brain (VbrB)	0.03	(Brown et al., 1997)
Muscles (VmB)	0.04	

<sup>a</sup> Rat adult value used for pups.

<sup>b</sup> Parameters determined to be sensitive with absolute normalized sensitivity coefficients greater than 0.1 following i.v. administration.

<sup>c</sup> Parameters determined to be sensitive with absolute normalized sensitivity coefficients greater than 0.1 following oral administration.

<sup>d</sup> Assuming bone volume is 7% of body weight.

Tableau 24 : Chemical specific model parameters for Sprague-Dawley rat

Parameters	C1BPA	Cl <sub>2</sub> BPA	Cl <sub>3</sub> BPA	Cl <sub>4</sub> BPA	References
<b>Physico-chemicals parameters</b>					
Molecular weight (g/mol)	262.74	297.18	331.63	366.07	From (Doumas et al., 2018)
LogPow	4.35	5.03	5.52	6.01	
pKa <sub>1</sub>	9.87	8.69	8.13	6.87	Calculated with Chemaxon, Marvin Sketch, 22.11
pKa <sub>2</sub>	8.59	7.95	6.63	6.04	
<b>Hepatic metabolism</b>					
Hepatocellularity (10 <sup>6</sup> hepatocytes/g liver)			135		From (Houston, 1994)
Liver weight (g)			13.646		Calculated <i>in vivo</i> (average values)
E <sub>h</sub>	0.81	0.77	0.16	0.01	Calculated as CL <sub>h</sub> /Q <sub>h</sub> *BPR
CL <sub>h</sub> (L/h)	1.33	1.34	0.85	0.06	Calculated with equation of (Poulin et al., 2012, 2015) and results of (Plattard, N. et al., 2022) / Supplementary data
<b>Extraction ratio for tissues</b>					
E <sub>br</sub>	0.65	0.60	0.8	-	Visual fit
E <sub>m</sub>	0	0	0	-	
E <sub>rpt</sub>	0	0.9	0.9	0	
CL <sub>intm</sub> (L/h)				10	
CL <sub>intbr</sub> (L/h)				10	
<b>Excretion and biliary excretion</b>					
Urinary excretion (CL <sub>urineC</sub> , L/h/kg <sup>0.25</sup> )			0		Put at 0
<b>Permeability area coefficient (for Cl<sub>4</sub>BPA)</b>					
PA <sub>brC</sub>	-	-	-	1	Visual fit
PA <sub>mC</sub>	-	-	-	0.5	
<b>Volume of distribution</b>					
V <sub>dss</sub> (L)	2.84	3.01	3.29	3.45	Calculated with : V <sub>blood</sub> + Σ(V <sub>tissue</sub> * P <sub>Ctissues:plasma</sub> <i>in silico</i> )

All parameters in this table were determined to be sensitive with absolute normalized sensitivity coefficients greater than 0.1 following i.v. administration in adults.

## **5.10 Acknowledgment**

We wish to thank Jeffrey Arsham, an American scientific translator, for his highly helpful reading of our original text. I also thank to Alec Robitaille, a trainee in the laboratory of Dr. Sami Haddad for his participation in the development of the quantification method of Cl<sub>x</sub>BPA in HPLC/FLD. Even if the rats don't have a voice, all of the authors honor the rats by thanking them for their participation in the experiments.

## **5.11 Declaration of interest statement**

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

## **5.12 Funding**

This research project was funded by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES (2018/1/230).

## 5.13 References

- Abdallah, M. A., Harrad, S., & Covaci, A. (2008). Hexabromocyclododecanes and tetrabromobisphenol-A in indoor air and dust in Birmingham, U.K: implications for human exposure. *Environ Sci Technol*, 42(18), 6855-6861. doi:10.1021/es801110a
- Andra, S. S., Charisiadis, P., Arora, M., van Vliet-Ostaptchouk, J. V., & Makris, K. C. (2015). Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ Int*, 85, 352-379. doi:10.1016/j.envint.2015.09.011
- Andra, S. S., Kalyvas, H., Andrianou, X. D., Charisiadis, P., Christophi, C. A., & Makris, K. C. (2015). Preliminary evidence of the association between monochlorinated bisphenol A exposure and type II diabetes mellitus: A pilot study. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 50(3), 243-259. doi:10.1080/10934529.2015.981111
- Andra, S. S., & Makris, K. C. (2015). Association between urinary levels of bisphenol A and its monochlorinated derivative and obesity. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 50(11), 1169-1179. doi:10.1080/10934529.2015.1047674
- ANSES. (2013). Evaluation des risques du bisphenol A (BPA) pour la santé humaine. Bergman, Å., 2013. United Nations Environment Programme, World Health Organization. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012 an Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors. WHO: UNEP, Geneva.
- Berezhkovskiy, L. M. (2011). The corrected traditional equations for calculation of hepatic clearance that account for the difference in drug ionization in extracellular and intracellular tissue water and the corresponding corrected PBPK equation. *J Pharm Sci*, 100(3), 1167-1183. doi:10.1002/jps.22324
- Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., & Beliles, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*, 13(4), 407-484. doi:10.1177/074823379701300401
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*, 116(1), 39-44. doi:10.1289/ehp.10753
- Cambien, G., Venisse, N., Migeot, V., Rabouan, S., Belmouaz, M., Binson, G., . . . Dupuis, A. (2020). Simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human plasma: Development, validation and application of a UHPLC-MS/MS method. *Chemosphere*, 242, 125236. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125236
- Campbell, A. (2009). Development of PBPK model of molinate and molinate sulfoxide in rats and humans. *Regul Toxicol Pharmacol*, 53(3), 195-204. doi:10.1016/j.yrtph.2009.01.003
- Cariot, A., Dupuis, A., Albouy-Llaty, M., Legube, B., Rabouan, S., & Migeot, V. (2012). Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta*, 100, 175-182. doi:10.1016/j.talanta.2012.08.034
- Chang, B. V., Liu, J. H., & Liao, C. S. (2014). Aerobic degradation of bisphenol-A and its derivatives in river sediment. *Environ Technol*, 35(1-4), 416-424. doi:10.1080/09593330.2013.831111

- Clewell, R. A., Kremer, J. J., Williams, C. C., Campbell, J. L., Jr., Andersen, M. E., & Borghoff, S. J. (2008). Tissue exposures to free and glucuronidated monobutylphthalate in the pregnant and fetal rat following exposure to di-n-butylphthalate: evaluation with a PBPK model. *Toxicol Sci*, *103*(2), 241-259. doi:10.1093/toxsci/kfn054
- Del Olmo, M., Zafra-Gomez, A., Suarez, B., Gonzalez-Casado, A., Taoufiki, J., & Vilchez, J. L. (2005). Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *Volume 817*, 167-172. doi:doi: 10.1016/j.jchromb.2004.11.059
- Dominguez-Romero, E., & Scheringer, M. (2019). A review of phthalate pharmacokinetics in human and rat: what factors drive phthalate distribution and partitioning? *Drug Metab Rev*, *51*(3), 314-329. doi:10.1080/03602532.2019.1620762
- Dorival-Garcia, N., Zafra-Gomez, A., Navalon, A., & Vilchez, J. L. (2012). Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *J Chromatogr A*, *1253*, 1-10. doi:10.1016/j.chroma.2012.06.079
- Doumas, M., Rouillon, S., Venisse, N., Nadeau, C., Pierre Eugene, P., Farce, A., . . . Carato, P. (2018). Chlorinated and brominated bisphenol A derivatives: Synthesis, characterization and determination in water samples. *Chemosphere*, *213*, 434-442. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.061
- Fan, Z., Hu, J., An, W., & Yang, M. (2013). Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds. *Environ Sci Technol*, *47*(19), 10841-10850. doi:10.1021/es401504a
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufiki, J., Navalon, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., . . . Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol*, *24*(2), 259-264. doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.007
- Fukazawa, H., Hoshino, K., Shiozawa, T., Matsushita, H., & Terao, Y. (2001). Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*, *44*(5), 973-979. doi:10.1016/s0045-6535(00)00507-5
- Gallard, H., Leclercq, A., & Croue, J. P. (2004). Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere*, *56*(5), 465-473. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.03.001
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2010). On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A*, *1217*(21), 3511-3518. doi:10.1016/j.chroma.2010.03.028
- Geens, T., Roosens, L., Neels, H., & Covaci, A. (2009). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*, *76*(6), 755-760. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.024
- Houston, J. B. (1994). Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol*, *47*(9), 1469-1479. doi:10.1016/0006-2952(94)90520-7
- Hu, C., Schottker, B., Venisse, N., Limousi, F., Saulnier, P. J., Albouy-Llaty, M., . . . Hadjadj, S. (2019). Bisphenol A, Chlorinated Derivatives of Bisphenol A and Occurrence of Myocardial Infarction in Patients with Type 2 Diabetes: Nested Case-Control Studies in Two European Cohorts. *Environ Sci Technol*, *53*(16), 9876-9883. doi:10.1021/acs.est.9b02963

- Hu, J. Y., Aizawa, T., & Ookubo, S. (2002). Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol*, 36(9), 1980-1987. doi:10.1021/es011177b
- Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalon, A., Fernandez, M. F., . . . Vilchez, J. L. (2010). Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(32), 3363-3369. doi:10.1016/j.jchromb.2010.10.021
- Kosaka, K., Hayashida, T., Terasaki, M., Asami, M., Yamada, T., Itoh, M., & Akiba, M. (2012). Elution of bisphenol A and its chlorination by-products from lined pipes in water supply process. *Water Supply, Volume 12*(Issue 6), 791-798. doi:<https://doi.org/10.2166/ws.2012.055>
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., & Terao, Y. (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol*, 19(1), 121-130. doi:10.1016/j.etap.2004.05.009
- Lakind, J. S., Levesque, J., Dumas, P., Bryan, S., Clarke, J., & Naiman, D. Q. (2012). Comparing United States and Canadian population exposures from National Biomonitoring Surveys: bisphenol A intake as a case study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 22(3), 219-226. doi:10.1038/jes.2012.1
- Li, A., Zhuang, T., Shi, W., Liang, Y., Liao, C., Song, M., & Jiang, G. (2020). Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China. *Sci Total Environ*, 707, 136100. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136100
- Li, C., Wang, Z., Yang, Y. J., Liu, J., Mao, X., & Zhang, Y. (2015). Transformation of bisphenol A in water distribution systems: a pilot-scale study. *Chemosphere*, 125, 86-93. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.047
- Liao, C., & Kannan, K. (2012). Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol*, 46(9), 5003-5009. doi:10.1021/es300115a
- Lipscomb, J. C., Haddad, S., Poet, T., & Krishnan, K. (2012). PHYSIOLOGICALLY-BASED PHARMACOKINETIC (PBPK) MODELS IN TOXICITY TESTING AND RISK ASSESSMENT. In L. B. a. S. S. B. Media. (Ed.), *New Technologies for Toxicity Testing*.
- Liu, H., Zhao, H., Quan, X., Zhang, Y., & Chen, S. (2009). Formation of chlorinated intermediate from bisphenol A in surface saline water under simulated solar light irradiation. *Environ Sci Technol*, 43(20), 7712-7717. doi:10.1021/es900811c
- Loccisano, A. E., Campbell, J. L., Jr., Butenhoff, J. L., Andersen, M. E., & Clewell, H. J., 3rd. (2012). Comparison and evaluation of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model. *Reprod Toxicol*, 33(4), 452-467. doi:10.1016/j.reprotox.2011.04.006
- Migeot, V., Dupuis, A., Cariot, A., Albouy-Llaty, M., Pierre, F., & Rabouan, S. (2013). Bisphenol a and its chlorinated derivatives in human colostrum. *Environ Sci Technol*, 47(23), 13791-13797. doi:10.1021/es403071a
- Mirfazaelian, A., & Fisher, J. W. (2007). Organ growth functions in maturing male Sprague-Dawley rats based on a collective database. *J Toxicol Environ Health A*, 70(12), 1052-1063. doi:10.1080/15287390601172106

- Mirfazaelian, A., Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., Tornero-Velez, R., Bruckner, J. V., & Fisher, J. W. (2006). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for deltamethrin in the adult male Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci*, *93*(2), 432-442. doi:10.1093/toxsci/kfl056
- Mutou, Y., Ibuki, Y., Terao, Y., Kojima, S., & Goto, R. (2006). Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol a after exposure to ultraviolet B. *Biol Pharm Bull*, *29*(10), 2116-2119. doi:10.1248/bpb.29.2116
- Pellizzari, E. D., Woodruff, T. J., Boyles, R. R., Kannan, K., Beamer, P. I., Buckley, J. P., . . . Bennett, D. H. (2019). Identifying and Prioritizing Chemicals with Uncertain Burden of Exposure: Opportunities for Biomonitoring and Health-Related Research. *Environ Health Perspect*, *127*(12), 126001. doi:10.1289/EHP5133
- Plattard, N., Dupuis, A., Migeot, V., Haddad, S., & Venisse, N. (2021). An overview of the literature on emerging pollutants: Chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA). *Environ Int*, *153*, 106547. doi:10.1016/j.envint.2021.106547
- Plattard, N., Venisse, N., Carato, P., Dupuis, A., & Haddad, S. (2022). Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of bisphenol A (ClxBPA) and interspecies differences between rats and humans. *Arch Toxicol*. doi:10.1007/s00204-021-03217-7
- Plattard, N., Venisse, N., Carato, P., Dupuis, A., & Haddad, S. (2022). Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA) and interspecies differences between rats and humans. *Arch Toxicol*, *accepted*.
- Poulin, P., & Haddad, S. (2012). Advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue-composition-based model as a mechanistic animal alternative method. *J Pharm Sci*, *101*(6), 2250-2261. doi:10.1002/jps.23090
- Poulin, P., & Haddad, S. (2015). Albumin and Uptake of Drugs in Cells: Additional Validation Exercises of a Recently Published Equation that Quantifies the Albumin-Facilitated Uptake Mechanism(s) in Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling Research. *J Pharm Sci*, *104*(12), 4448-4458. doi:10.1002/jps.24676
- Riu, A., Grimaldi, M., le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., . . . Balaguer, P. (2011a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, *119*(9), 1227-1232. doi:10.1289/ehp.1003328
- Riu, A., le Maire, A., Grimaldi, M., Audebert, M., Hillenweck, A., Bourguet, W., . . . Zalko, D. (2011b). Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci*, *122*(2), 372-382. doi:10.1093/toxsci/kfr132
- Riu, A., McCollum, C. W., Pinto, C. L., Grimaldi, M., Hillenweck, A., Perdu, E., . . . Gustafsson, J. A. (2014). Halogenated bisphenol-A analogs act as obesogens in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Toxicol Sci*, *139*(1), 48-58. doi:10.1093/toxsci/kfu036
- Rodriguez, C. E., Mahle, D. A., Gearhart, J. M., Mattie, D. R., Lipscomb, J. C., Cook, R. S., & Barton, H. A. (2007). Predicting age-appropriate pharmacokinetics of six volatile organic compounds in the rat utilizing physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicol Sci*, *98*(1), 43-56. doi:10.1093/toxsci/kfm082
- Song, S., Song, M., Zeng, L., Wang, T., Liu, R., Ruan, T., & Jiang, G. (2014). Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environ Pollut*, *186*, 14-19. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.023



- Stulcova, B. (1977). Postnatal development of cardiac output distribution measured by radioactive microspheres in rats. *Biol Neonate*, 32(3-4), 119-124. doi:10.1159/000241004
- Takemura, H., Ma, J., Sayama, K., Terao, Y., Zhu, B. T., & Shimoi, K. (2005). In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology*, 207(2), 215-221. doi:10.1016/j.tox.2004.09.015
- Teeguarden, J. G., Waechter, J. M., Jr., Clewell, H. J., 3rd, Covington, T. R., & Barton, H. A. (2005). Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci*, 85(2), 823-838. doi:10.1093/toxsci/kfi135
- Vela-Soria, F., Jimenez-Diaz, I., Rodriguez-Gomez, R., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Fernandez, M. F., . . . Navalon, A. (2011). A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC-MS/MS. *Analytical Methods*(9). doi:10.1039/c1ay05162h
- Venisse, N., Cambien, G., Robin, J., Rouillon, S., Nadeau, C., Charles, T., . . . Dupuis, A. (2019). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in adipose tissue. *Talanta*, 204, 145-152. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.103
- Vogel, S. A. (2009). The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health*, 99 Suppl 3, S559-566. doi:10.2105/AJPH.2008.159228
- Wang, W., Abualnaja, K. O., Asimakopoulos, A. G., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., . . . 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. doi:10.1016/j.envint.2015.06.015
- Waters, N. J., Jones, R., Williams, G., & Sohal, B. (2008). Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *J Pharm Sci*, 97(10), 4586-4595. doi:10.1002/jps.21317
- Wu, Y., Li, Y., Kang, D., Wang, J., Zhang, Y., Du, D., . . . Dong, Q. (2016). Tetrabromobisphenol A and heavy metal exposure via dust ingestion in an e-waste recycling region in Southeast China. *Sci Total Environ*, 541, 356-364. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.038
- Yang, X., Doerge, D.R., Fisher, J.W., 2013. Prediction and evaluation of route dependent dosimetry of BPA in rats at different life stages using a physiologically based pharmacokinetic model. *Toxicol Appl Pharmacol* 270, 45-59.
- Ye, Z., Zetterberg, C., & Gao, H. (2017). Automation of plasma protein binding assay using rapid equilibrium dialysis device and Tecan workstation. *J Pharm Biomed Anal*, 140, 210-214. doi:10.1016/j.jpba.2017.03.019
- Yuan, S. Y., Li, H. T., Huang, H. W., & Chang, B. V. (2010). Biodegradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment and the microbial community changes. *J Environ Sci Health B*, 45(5), 360-365. doi:10.1080/03601231003799820

## 5.14 Supplementary materials

### ANNEXE 1

Tableau 25 : Physiological Input Parameters Used in the Tissue-Composition-Based Models for rats from Rodgers and Rowland (2005), Poulin and Krishnan (1996a,b) (Poulin et al., 1996a, 1996b; Rodgers.T, 2005)

<b>Rat Tissue Composition</b>						
Residual-Blood-Adjusted Fractional Total Tissue Volume						
Neutral lipids equivalent						
	Water equivalent ( $F_{wm}$ ) <sup>a</sup>	Neutral lipids	Neutral phospholipids	Neutral lipid as lipoproteins <sup>c</sup>	Total neutral lipids equivalent ( $F_{nlt}$ or $F_{nlp}$ ) <sup>d</sup>	Tissue water
Adipose	0.145	0.853	0.0016	0.0002091	0.8537	0.144
Brain	0.754	0.0391	0.0015	0.0001275	0.0397	0.753
Liver	0.659	0.0135	0.0238	0.0004947	0.0211	0.642
Muscle	0.731	0.0100	0.0072	0.0001785	0.0123	0.726
Richly perfused tissues <sup>b</sup>	0.689	0.0121	0.0240	0.0004182	0.01972	0.672
Gonads	0.791	0.019	0.0116	0.0004335	0.0225	0.783
Plasma	0.963	0.0015	0.0043	0.00306	0.0059	0.96
Blood cells	0.841	0.0013	0.0029	0	0.0019	0.84

<sup>a</sup> Water equivalent was set to equal to the content of water in addition to 70% of the content of neutral phospholipids.

<sup>b</sup> All the values for richly perfused tissues was take from kidneys values.

<sup>c</sup> Hypothesized that neutral lipid as lipoproteins for human are the same for rats

<sup>d</sup> Total neutral lipids equivalent was set to equal to the content of neutral lipids and neutral lipid as lipoproteins in addition to 30% of the content of neutral phospholipids.

## ANNEXE 2

---

### Validation of i.v. doses

Theoretical doses for Cl<sub>x</sub>BPA: 4 and 40 mg/kg for Cl<sub>1</sub>BPA and Cl<sub>2</sub>BPA; 0.4 and 4 mg/kg for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA were analyzed to verify if these doses corresponded to the theory. The Tableau 26 represents the actual values of different Cl<sub>x</sub>BPA doses in rats obtained with a HPLC-MS/MS method at the University of Poitiers. These values correspond approximately to the values calculated before intravenous injection in rats: 0.82 to 7.18 ng/mL instead of 0.4 and 4 ng/mL for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA; 2.01 to 45.12 ng/mL instead of 4 and 40 ng/mL for Cl<sub>1</sub>BPA and Cl<sub>2</sub>BPA (see Tableau 26).

Tableau 26 : Cl<sub>x</sub>BPA doses analyzed for Sprague-Dawley rats by HPLC-MS/MS

<b>i.v. doses (mg/kg)</b>	<b>Dose 1</b>	<b>Dose 2</b>
C1BPA	2.01	30.32
Cl <sub>2</sub> BPA	2.85	45.12
Cl <sub>3</sub> BPA	0.92	7.18
Cl <sub>4</sub> BPA	0.82	3.99

## ANNEXE 3

Tableau 27 : Chemical specific model parameters for Sprague-Dawley rat to obtain hepatic clearance for all Cl<sub>x</sub>BPA (L/h)

Parameters	C1BPA	C2BPA	C3BPA	C4BPA	References
<i>Chemical parameters</i>					
Fup adjusted	0.47	0.30	0.11	0.01	Calculated with equations of (Poulin et al., 2015)
BPR (Blood plasma ratio)	1.55	1.64	5.07	6.28	Obtained <i>in vitro</i> with an equilibrium dialysis
Intrinsic clearance <i>in vivo</i> , CL <sub>int</sub> (L/h)	14.92	20.02	9.50	4.30	From (Plattard, N. et al., 2022)
CL <sub>h</sub> (L/h)	1.33	1.34	0.85	0.06	Calculated with (Poulin et al., 2012, 2015)
E <sub>h</sub>	0.81	0.77	0.16	0.009	Calculated with (Poulin et al., 2012, 2015)

The equation from (Poulin et al., 2012, 2015) to calculate the hepatic clearance (L/h) is :

$$CLh = \frac{Qh * BPR * CL_{int} \text{ in vivo} * Fup \text{ adjusted}}{((Qh * BPR) + CL_{int} \text{ in vivo} * Fup \text{ adjusted})}$$

$$Eh = \frac{CLh}{Qh * BPR}$$

## ANNEXE 4

---

Model equations in Simbiology (Matlab 2021a) for Cl<sub>x</sub>BPA :

### DOSING

- $IVD1 = (IVDOSE1 * BW * nmole\_mmole) / MW$
- $IVD2 = (IVDOSE2 * BW * nmole\_mmole) / MW$
- $IVRate = IVDose.IVdose / Time\_Infusion$

### BLOOD

- $Blood.Cv = \frac{(Qf * Fat.Cv + Qm * Muscle.Cv + Qbr * Brain.Cv + Qgo * Gonad.Cv + Qr * RPT.Cv + Ql * Liver.Cv + IVRate)}{Qc}$
- $Blood.Ca = Blood.Cv$
- $Blood.Cp = Blood.Cv / BPR$
- $Vblood = (Vpl + Ve) - VtissB$
- $ng\_ml.Cp = Blood.Cv / BPR * MW / mL\_L$
- $VtissB = VfB + VIB + VrB + VmB + VbrB + VgoB$
- $Vpl = VplC * BW$

Where:

Vpl = Plasma volume

VtissB = volume of blood tissue

For Cl<sub>4</sub>BPA (diffusion-limited model):

All is the same expect for Blood.Cv :

- $Blood.Cv = \frac{(Qf * Fat.Cv + Qm * Muscle.C + Qbr * Brain.C + Qgo * Gonad.Cv + Qr * RPT.Cv + Ql * Liver.Cv + IVRate)}{Qc}$

## METABOLITES

- $\text{Metabolites.C} = \text{Metabolites.A}/V_{\text{met}}$
- $d(\text{Metabolites.A})/dt = (\text{Eh\_invitro} * \text{Ca} * \text{Ql}) + (\text{Ef} * \text{Ca} * \text{Qf}) + (\text{Em} * \text{Ca} * \text{Qm}) + (\text{Eb} * \text{Ca} * \text{Qbr}) + (\text{Ego} * \text{Qgo} * \text{Ca}) + (\text{Erpt} * \text{Ca} * \text{Qr})$

For Cl<sub>4</sub>BPA (diffusion-limited model):

All is the same expect for equation  $d(\text{Metabolites.A})/dt$  :

- $d(\text{Metabolites.A})/dt = (\text{Eh\_invitro} * \text{Ca} * \text{Ql}) + (\text{Ef} * \text{Ca} * \text{Qf}) + (\text{Muscles\_cells.C} * \text{CLintm}) + (\text{Brain\_cells.C} * \text{CLintbr}) + (\text{Ego} * \text{Qgo} * \text{Ca}) + (\text{Erpt} * \text{Ca} * \text{Qr})$

## FAT

- $\text{Fat.C} = \text{Fat.A}/V_f$
- $\text{Fat.Cv} = \text{Fat.C}/P_f$
- $V_f = V_{fC} * B_W$
- $Q_f = Q_{fC} * Q_c$
- $\text{Fat.C} = \text{Fat.A} / V_f$
- $P_{fB} = P_f/B_{PR}$
- $\text{Fat.Cv} = \text{Fat.C} / P_f$
- $d(\text{Fat.A})/dt = (Q_f * \text{Ca}) - (Q_f * \text{Fat.Cv}) - (\text{Ef} * \text{Ca} * Q_f)$

## BRAIN

- $\text{Brain.C} = \text{brain.A}/V_f$
- $V_{br} = V_{brC} * B_W$
- $V_{brB} = V_{brBC} * V_{br}$
- $Q_{br} = Q_{brC} * Q_c$
- $P_{brB} = P_{br} / B_{PR}$
- $\text{Brain.Cv} = \text{Brain.C}/P_{br}$
- $\text{Brain.C} = \text{Brain.A}/V_{br}$
- $d(\text{Brain.A})/dt = (Q_{br} * \text{Ca}) - (Q_{br} * \text{Brain.Cv}) - (\text{Eb} * \text{Ca} * Q_{br})$

For Cl<sub>4</sub>BPA diffusion-limited model only :

- $P_{Abr} = P_{AbrC} * V_{br}$
- $\text{Brain.Cbrtot} = (\text{Brain\_blood.A} + \text{Brain\_cells.A})/V_{br}$
- $\text{Brain\_cells.C} = \text{Brain\_cells.A}/(V_{br} - V_{brB})$

- $d(\text{Brain\_cells.A})/dt = -(\text{Brain\_cells.C} * \text{CLintbr}) + (\text{PAbr} * \text{Brain.C}) - ((\text{PAbr} * \text{Brain\_cells.C}) / \text{Pbrb})$
- $d(\text{Brain\_blood.A})/dt = (\text{Qbr} * \text{Ca}) - (\text{Qbr} * \text{Brain\_blood.C}) - (\text{PAbr} * \text{Brain\_blood.C}) + ((\text{PAbr} * \text{Brain\_cells.C}) / \text{Pbrb})$

## LIVER

- $\text{Plb} = \text{Pl} / \text{BPR}$
- $\text{Vl} = \text{VIC} * \text{BW}$
- $\text{VlB} = \text{VIBC} * \text{Vl}$
- $\text{Ql} = \text{QlC} * \text{Qc}$
- $\text{Liver.C} = \text{Liver.A} / \text{Vf}$
- $\text{Liver.Cv} = \text{Liver.C} / \text{Pl}$
- $\text{Eh} = (\text{Blood.Ca} - \text{Liver.Cv}) / \text{Blood.Ca}$
- $d(\text{Liver.A})/dt = (\text{Ql} * \text{Ca}) - (\text{Vmaxbile} * \text{Liver.C} / (\text{Kmbile} + \text{Liver.C})) - (\text{Eh\_invitro} * \text{Ca} * \text{Ql}) + (\text{Ql} * \text{Liver.Cv})$

## GONADS

- $\text{Pgob} = \text{Pgo} / \text{BPR}$
- $\text{Vgo} = \text{VgoC} * \text{BW}$
- $\text{VgoB} = \text{VgoBC} * \text{Vgo}$
- $\text{Qgo} = \text{QgoC} * \text{Qc}$
- $\text{Gonad.C} = \text{Gonad.A} / \text{Vgo}$
- $\text{Gonad.Cv} = \text{Gonad.C} / \text{Pgo}$
- $d(\text{Gonad.A})/dt = (\text{Qgo} * \text{Ca}) - (\text{Qgo} * \text{Gonad.Cv}) - (\text{Ego} * \text{Qgo} * \text{Ca})$

## MUSCLES

- $\text{Pmb} = \text{Pm} / \text{BPR}$
- $\text{Vm} = (\text{VmC} - \text{VfC} - \text{VgoC}) * \text{BW}$
- $\text{VmB} = \text{VmBC} * \text{Vm}$
- $\text{Qm} = (\text{QmC} - \text{QfC} - \text{QgoC}) * \text{Qc}$
- $\text{Muscle.C} = \text{Muscle.A} / \text{Vm}$
- $\text{Muscle.Cv} = \text{Muscle.C} / \text{Pm}$
- $d(\text{Muscle.A})/dt = (\text{Qm} * \text{Ca}) - (\text{Qm} * \text{Muscle.Cv}) - (\text{Em} * \text{Qm} * \text{Ca})$

For Cl<sub>4</sub>BPA diffusion-limited model only :

- $P_{Am} = P_{AmC} * V_m$
- $Muscle.C_{mtot} = (Muscle.A + Muscle\_cells.A) / V_m$
- $Muscle\_cells.C = Muscles\_cells.A / (V_m - V_{mB})$
- $d(Muscle\_cells.A) / dt = -(Muscle\_cells.C * CL_{int}) + (P_{Am} * Muscle.C) - ((P_{Am} * Muscle\_cells.C) / P_{mb})$

For Cl<sub>4</sub>BPA (diffusion-limited model):

All is the same expect for equation  $d(Muscle.A / dt)$  :

- $D(Muscle.A / dt) = (Q_m * Ca) - (Q_m * Muscle.C) - (P_{Am} * Muscle.C) + ((P_{Am} * Muscle\_cells.C) / P_{mb})$

### Richly Perfused Tissues (RPT)

- $Pr_b = Pr / BPR$
- $V_r = (V_rC - V_{brC} - V_{plC}) * BW$
- $V_rB = V_rBC * V_r$
- $Q_r = (Q_rC - Q_{lC} - Q_{brC}) * Q_c$
- $RPT.C = RPT.A / V_r$
- $RPT.C_v = RPT.C / Pr$
- $d(RPT.A / dt) = (Q_r * Ca) - (Q_r * RPT.C_v) - (Erpt * Q_r * Ca)$

### URINE

- $CL_{urine} = CL_{urineC} * BW^{0.74}$
- $V_{maxbile} = V_{maxbileC} * BW^{0.74}$



- Plattard N, Venisse N, Carato P, Dupuis A, Haddad S. Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA) and interspecies differences between rats and humans. *Arch Toxicol*. 2022 Mar;96(3):783-792. doi: 10.1007/s00204-021-03217-7. Epub 2022 Jan 24. PMID: 35072755.
- Poulin, P., & Haddad, S. (2012). Advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue-composition-based model as a mechanistic animal alternative method. *J Pharm Sci*, 101(6), 2250-2261. doi:10.1002/jps.23090
- Poulin, P., & Haddad, S. (2015). Albumin and Uptake of Drugs in Cells: Additional Validation Exercises of a Recently Published Equation that Quantifies the Albumin-Facilitated Uptake Mechanism(s) in Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling Research. *J Pharm Sci*, 104(12), 4448-4458. doi:10.1002/jps.24676
- Poulin, P., & Krishnan, K. (1996a). A mechanistic algorithm for predicting blood:air partition coefficients of organic chemicals with the consideration of reversible binding in hemoglobin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 131-137. doi:10.1006/taap.1996.0016
- Poulin, P., & Krishnan, K. (1996b). A tissue composition-based algorithm for predicting tissue:air partition coefficients of organic chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 126-130. doi:10.1006/taap.1996.0015
- Rodgers, T. R. M. (2005). Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling 2: Predicting the Tissue Distribution of Acids, Very Weak Bases, Neutrals and Zwitterions. *Wiley InterScience*, VOL.95. doi:DOI 10.1002/jps.20502

# **Chapitre 6 – Intégration et synthèse**

## **6 Discussion Générale**

## 6.1 Lien entre les trois articles de la thèse

Cette thèse avait pour objectif d'étudier le métabolisme et la toxicocinétique des Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat et l'humain. Les travaux de cette thèse ont tout d'abord permis de déterminer les constantes métaboliques dans le foie de chaque Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) chez l'animal et l'humain à l'aide d'expériences *in vitro* avec des hépatocytes chez ces deux espèces (article 1, chapitre 3). Nos travaux ont aussi pu détecter la présence de métabolites de phase II pour les Cl<sub>x</sub>BPA dans les surnageants d'hépatocytes. Ensuite, ces travaux ont conduit à élaborer une méthode analytique des métabolites du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA par HPLC-MS/MS. Cette méthode a été validée à l'aide d'échantillons de plasma de rat et d'humain provenant de l'exposition animale effectuée à l'Université de Montréal, et de l'étude clinique réalisée à Poitiers au CIC Inserm 1402, confirmant la présence de ces métabolites conjugués *in vivo*.

Après avoir déterminé les constantes métaboliques de chaque Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat et l'humain, nous avons été capables d'obtenir d'autres données notamment physico-chimiques pour paramétrer et développer un modèle PBPK. Une première version de modèles PBPK va permettre de générer des hypothèses sur les mécanismes physiologiques en jeu concernant la cinétique plasmatique et tissulaire des Cl<sub>x</sub>BPA.

L'objectif final de cette thèse était donc de construire et valider un modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat en déterminant tout d'abord leurs paramètres physico-chimiques et biochimiques à l'aide de plusieurs méthodes complémentaires (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*). En effet, l'approche de modélisation PBPK a été choisie car elle permet de prédire des concentrations plasmatiques et tissulaires sur la base de paramètres physiologiques, physicochimiques et biochimiques, ce qui donne au modèle une base mécaniste et facilite ainsi les extrapolations de l'animal à l'humain. Un des problèmes majeurs pour prédire les concentrations plasmatiques et tissulaires de nouvelles substances à l'aide de modèles PBPK est de déterminer la valeur des paramètres comme les coefficients de partage, l'affinité aux protéines plasmatiques et les constantes métaboliques (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>, Clairance intrinsèque). Nous avons pu déterminer tous ces paramètres chez l'animal lors de cette thèse alors qu'ils étaient auparavant inconnus. Finalement, ces modèles PBPK chez le rat ont été calibrés grâce à une exposition *in vivo* sur des rats Sprague-Dawley (n = 80) afin de prédire le devenir de ces contaminants émergents dans le plasma, le cerveau et les muscles du rat.

## 6.2 Approche méthodologique du projet de thèse

Cette thèse est une cotutelle de doctorat qui a été effectuée entre deux pays (France et Canada) avec des équipes complémentaires pour les méthodes utilisées. En effet, l'équipe canadienne du laboratoire d'inhalation et de modélisation toxicocinétique des xénobiotiques à l'Université de Montréal avait toutes les ressources nécessaires pour le développement du modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA. Le laboratoire du Dr. Sami Haddad a accès à une licence institutionnelle de tous les produits de Mathworks dont les logiciels de simulation MATLAB et Simbiology. Dr. Sami Haddad a aussi un laboratoire humide pour faire des expérimentations *in vitro* de cinétique enzymatique (incubateur-agitateurs), de dialyse à l'équilibre (RED Device), et d'analyses chimiques (HPLC/FLD).

De plus, le paramétrage du modèle PBPK (coefficients de partage, fraction liée aux protéines plasmatiques et constantes métaboliques) a été effectué à partir de données *in silico* (coefficients de partage), puis *in vitro* (fraction liée aux protéines plasmatiques, constantes métaboliques) chez l'animal et chez l'humain. Les expérimentations *in vitro* et *in vivo* chez l'animal et les extrapolations correspondantes ont été conduites à l'Université de Montréal qui a déjà mené ce type d'études notamment sur le Bisphénol A (Bounakta et al., 2018).

L'équipe HEDEX du Centre d'Investigation Clinique (CIC) INSERM 1402 à l'Université de Poitiers possède quant à elle, les méthodes analytiques nécessaires pour les analyses et l'obtention de données toxicocinétiques. L'équipe HEDEX possède en effet une plateforme analytique, dont un appareil LC-MS/MS de dernière génération et de haute sensibilité (API 6500+ Qtrap) qui permet le dosage de traces de polluants (ng/mL) dans les milieux biologiques. De plus, l'équipe du CIC INSERM 1402 possède une expérience dans la gestion d'études cliniques notamment pour l'étude du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA chez des volontaires sains par voie orale et cutanée, qui avait pour but de mieux comprendre la toxicocinétique de ce composé chez l'humain mais plus spécifiquement chez la femme. En effet, le projet initial était d'extrapoler le modèle PBPK animal à l'humain, puis à la femme enceinte.

Dans un premier temps, pour réaliser un modèle PBPK, les paramètres physico-chimiques tels que les PC tissus : plasma, l'affinité aux protéines plasmatiques, et les paramètres biochimiques, notamment les constantes métaboliques, doivent être connus, ce qui n'était pas le

cas pour les Cl<sub>x</sub>BPA. Dans le premier article de cette thèse (article 1, chapitre 3), des expériences *in vitro* ont été réalisées afin de déterminer les constantes métaboliques de chaque Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) : la constante de Michaelis (K<sub>m</sub>), la vitesse maximale de réaction (V<sub>max</sub>) et la clairance intrinsèque (CL<sub>int</sub>) qui représente l'activité métabolique du foie. Ces expériences *in vitro* pour estimer les constantes métaboliques ont été réalisées avec des hépatocytes de rats Sprague-Dawley et d'humains en suspension à l'aide de la méthode précédemment décrite par Verner et al. (2010). De plus, la fraction non liée dans le milieu d'incubation (FU<sub>inc</sub>) de chaque Cl<sub>x</sub>BPA a été mesurée expérimentalement en utilisant la méthode de dialyse à l'équilibre. Ce paramètre nous a permis de comparer les clairances intrinsèques non liées versus les clairances liées au milieu d'incubation pour chaque dérivé chloré et les comparer ensuite par espèce et par substance. Dans ce premier article, après avoir estimé les constantes métaboliques des Cl<sub>x</sub>BPA, des analyses ont été réalisées au laboratoire de l'axe HEDEX à Poitiers afin de mesurer les proportions relatives des principaux métabolites des Cl<sub>x</sub>BPA. En effet, comme le BPA, les métabolites les plus prépondérants des Cl<sub>x</sub>BPA sont supposément de phase II également : le Cl<sub>x</sub>BPA-glucuronide et le Cl<sub>x</sub>BPA-sulfate. Cependant, ce ne sont que les aires de pics des deux transitions (G1 et G2 pour les Cl<sub>x</sub>BPA-glucuronide et S1 et S2 pour les Cl<sub>x</sub>BPA-sulfate) des surnageants d'hépatocytes provenant des expériences de métabolisme qui ont été mesurées par HPLC-MS/MS en raison d'une pureté insuffisante des standards analytiques. La mesure des aires du pic des principaux métabolites des Cl<sub>x</sub>BPA a été faite avec une méthode ciblée intégrant les transitions des Cl<sub>x</sub>BPA-glucuronide et Cl<sub>x</sub>BPA-sulfate qui avaient été déterminées lors d'une étude précédente faite par le groupe HEDEX à Poitiers.

Pour l'article 2 (chapitre 4), afin de mieux caractériser le métabolisme et comparer une cinétique prédite versus mesurée expérimentalement des principaux métabolites de ces contaminants émergents dans un modèle PBPK, il a été nécessaire de développer une méthode analytique pour l'un des Cl<sub>x</sub>BPA dans le plasma par HPLC-MS/MS car elle était inexistante dans la littérature. Le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA a été choisi dans le développement de cette méthode car c'est le dérivé chloré le plus retrouvé dans les matrices biologiques humaines (Plattard et al., 2021). Par ailleurs, des problèmes de synthèse ont limité le nombre de métabolites pouvant être quantifiés.

Deux méthodes sont disponibles pour déterminer les concentrations des métabolites de phase II : une méthode indirecte utilisant la déconjugaison enzymatique couramment utilisée en raison de sa commodité, et une méthode de quantification directe nécessitant de disposer de composés standards. Par exemple, la mesure indirecte des formes conjuguées du BPA nécessite de mesurer le BPA total après hydrolyse enzymatique par la  $\beta$ -glucuronidase et la sulfatase à 37°C pendant plusieurs heures (Grignon et al., 2017). La méthode indirecte présente quelques inconvénients dus à un rendement variable de déconjugaison pouvant conduire à une sous-estimation de l'exposition réelle de l'humain aux composés environnementaux comme cela a été démontré avec le BPA par Gerona et al. (2020). Par conséquent, la méthode directe a été privilégiée ici pour le développement de la méthode dans le plasma des métabolites. La méthode analytique a été validée conformément aux directives de l'EMA (European Medicines Agency, 2012). Les paramètres de validation comprenaient la sélectivité, la précision, la justesse, la linéarité et l'effet de matrice (EM). La linéarité des courbes d'étalonnage en sept points allant de 0,006 à 25 ng/mL pour le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G et de 0,391 à 100 ng/mL pour le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S a été évaluée. La pente, l'intercept et le coefficient de détermination ( $r^2$ ) ont été obtenus avec un facteur de pondération de 1/x. Cette méthode de pondération est une régression linéaire pondérée où x est la concentration et y le rapport du signal de l'analyte sur l'étalon interne.

Pour valider l'application de la méthode de dosage des métabolites du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA dans le plasma animal et humain, des échantillons prélevés à 2 temps post-dose (1h et 2h) ont été sélectionnés, provenant les uns d'une exposition animale effectuée chez des rats Sprague-Dawley à l'animalerie de l'Université de Montréal et les autres d'une étude clinique chez des volontaires sains de sexe féminin menée au CIC Inserm 1402 à Poitiers.

Enfin, après avoir déterminé les constantes métaboliques des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal et l'humain, des modèles PBPK ont été développés et calibrés chez le rat Sprague-Dawley. Dans de tels modèles, beaucoup d'informations sur la substance sont requises contrairement à un modèle toxicocinétique classique. Cependant, un modèle PBPK permet de mieux comprendre les processus physiologiques et biochimiques de l'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) et nous en avons besoin pour les Cl<sub>x</sub>BPA car leur toxicocinétique était inconnue dans la littérature à ce jour. Pour la construction du modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA, nous

nous sommes basés sur le modèle avec 7 compartiments du BPA élaboré chez le rat à différents stades de la vie (Yang et al., 2013). Cependant, deux modèles PBPK ont dû être calibrés : un pour le ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA et Cl<sub>3</sub>BPA et l'autre uniquement pour le Cl<sub>4</sub>BPA car une distribution limitée par la diffusion est présente pour certains tissus chez le rat pour cette dernière substance. Même si dans l'article 1, les paramètres biochimiques (c.-à-d., les constantes métaboliques hépatiques) de chaque contaminant ont été déterminés, les paramètres physico-chimiques comme l'affinité aux protéines plasmatiques et les PC tissus : plasma n'étaient pas connus dans la littérature. La fraction non liée aux protéines plasmatiques ( $F_{up}$ ) a donc été déterminée avec des expériences *in vitro* s'appuyant sur la méthode de la dialyse à l'équilibre (Waters et al., 2008) tandis que les PC tissus :plasma ont été déterminés *in silico*. En effet, la méthode de Poulin et al. (2012) utilisant la représentation conceptuelle de la distribution d'un composé organique dans une matrice biologique (l'équivalent de la fraction volumique de l'eau dans la matrice  $F_{wm}$ , l'équivalent de la fraction volumique des lipides neutres dans la matrice  $F_{nlm}$ , le terme d'ionisation pour la matrice  $I_m$ , etc.) (Poulin et al., 2012) a été utilisée pour la détermination des PC tissus : plasma. Cette méthode très utilisée dans la littérature a été développée pour des substances très lipophiles ( $\log P_{ow} > 4$ ), ce qui est le cas des Cl<sub>x</sub>BPA. Après avoir déterminé tous les paramètres du modèle PBPK qui étaient alors inconnus dans la littérature pour ces contaminants émergents, les deux modèles PBPK ont été développés avec l'application Simbiology de Matlab et ensuite validés grâce une étude *in vivo* sur des rats Sprague-Dawley (n= 80).

L'article 3 (Chapitre 5) permet ainsi d'englober les informations contenues dans l'article 1 puisque les paramètres biochimiques sont d'une importance capitale pour comprendre la toxicocinétique des Cl<sub>x</sub>BPA. Cet article est une contribution importante dans le domaine de la toxicologie car c'est le premier article à avoir validé et calibré des modèles PBPK pour connaître la distribution plasmatique et tissulaire (cerveau et muscles) des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal. Les différentes méthodes utilisées pour les trois articles (chapitres 3, 4, et 5) sont complémentaires puisqu'elles ont permis de mieux comprendre le profil cinétique aussi bien dans le plasma que dans les tissus de ces polluants émergents.

## 6.3 Principaux résultats novateurs de cette thèse

Comparée à la revue de littérature résumée en annexe 1 qui a été publiée dans *Environment International* et qui représente mon premier article publié, les résultats de ce doctorat apportent des informations très utiles permettant d'améliorer les processus d'évaluation de risque toxicologique pour ces polluants émergents que sont les Cl<sub>x</sub>BPA que ce soit chez le rat ou l'humain.

Dans les travaux résumés dans l'article 1 (Chapitre 3), les constantes métaboliques de chaque Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA et Cl<sub>4</sub>BPA) ont été déterminées à l'aide d'essais métaboliques avec des hépatocytes de rat et d'humain. Deux articles avaient été publiés dans la littérature concernant le métabolisme du Cl<sub>4</sub>BPA (Riu et al., 2011b; Riu et al., 2014). L'étude de Riu et al. (2014) a démontré chez le poisson zèbre que le Cl<sub>4</sub>BPA est principalement métabolisé en sulfoconjugués tandis qu'une autre étude du même auteur a démontré que le Cl<sub>4</sub>BPA est complètement métabolisé en dérivé glucuro (14%) et sulfoconjugués (86%) après 24h en effectuant des tests métaboliques sur des cellules de cancer du foie humain (HepG2) (Riu et al., 2011b). Cependant, ces études ni aucune autre étude n'ont déterminé les constantes métaboliques (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, Clairance intrinsèque) du Cl<sub>4</sub>BPA ni des autres dérivés chlorés. Les résultats de nos travaux présentés dans l'article 1 (Chapitre 3) de cette thèse ont révélé que les constantes métaboliques des Cl<sub>x</sub>BPA peuvent varier considérablement en fonction des substances et des espèces (rat vs humain). En effet, alors que le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA présentent des clairances intrinsèques non liées (CL<sub>intU</sub>) similaires dans les milieux d'incubation des rats, les valeurs pour le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA sont très différentes (3.11 et 0.68 mL/min/10<sup>6</sup> hépatocytes respectivement). Contrairement au rat, les résultats obtenus chez l'humain sont très différents puisque le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA présentent des clairances intrinsèques non liées (CL<sub>intU</sub>) similaires, alors que le ClBPA et le Cl<sub>2</sub>BPA divergent (0.35 et 1.36 mL/min/10<sup>6</sup> hépatocytes respectivement). Chez ces deux espèces, le Cl<sub>2</sub>BPA et le Cl<sub>3</sub>BPA ont des clairances intrinsèques (CL<sub>int</sub>) relativement similaires. Cependant, le ClBPA est très différent du Cl<sub>4</sub>BPA que ce soit chez le rat ou l'humain. De plus, ces travaux ont également montré que la chloration a un impact sur la clairance intrinsèque hépatique des Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat et l'humain. En effet, pour les hépatocytes humains, les résultats indiquent que plus la molécule de Cl<sub>x</sub>BPA comporte



des atomes de chlore, plus les valeurs de clairance intrinsèque non liée ( $CL_{intU}$ ) sont élevées ( $Cl_4BPA > Cl_3BPA > Cl_2BPA > ClBPA$ ), ce qui se traduit par une biotransformation hépatique plus importante selon le degré de chloration. Des analyses des principaux métabolites (phase II) présents dans les surnageants d'hépatocytes des  $Cl_xBPA$  ont été réalisées par HPLC-MS/MS afin de comparer les aires de pics du sulfoconjugué et du glucuroconjugué chez le rat vs l'humain. Les résultats de ces analyses ont montré que la quantité de  $ClBPA-G$  chez le rat est quatre fois supérieure à celle des humains, tandis que le  $ClBPA-S$  n'est pas détecté chez le rat mais présent chez l'humain. Pour le  $Cl_2BPA$ , le signal pour le  $Cl_2BPA-G$  est similaire entre le rat et l'humain mais il y a environ trois fois plus de  $Cl_2BPA-S$  chez le rat que chez l'humain. Enfin, le rat forme approximativement quatre fois plus de  $Cl_4BPA-G$  que les humains, alors que les sulfoconjugués du  $Cl_4BPA$  n'ont été détectés que chez le rat. En outre, à l'exception de la proportion de  $Cl_2BPA-G$ , qui est la même chez le rat et l'humain, tous les autres métabolites diffèrent entre ces deux espèces. Les travaux présentés à l'article 1 (Chapitre 3) ont donc démontré qu'il existe des différences interespèces significatives que ce soit pour la mesure du métabolisme dans le foie à travers les constantes métaboliques estimées ( $K_m$ ,  $V_{max}$ , Clairance intrinsèque) ou les proportions des principaux métabolites des  $Cl_xBPA$ . Cependant, des études supplémentaires devront être menées car d'autres métabolites pourraient être formés lors d'une exposition aux  $Cl_xBPA$ .

Les travaux de l'article 2 (Chapitre 4) représentent la première méthode directe d'analyse par HPLC-MS/MS qui permet de quantifier les métabolites du 3,3'- $Cl_2BPA$  à partir des composés standards synthétisés au laboratoire de chimie organique de l'Université de Poitiers. En effet, la méthode indirecte utilisant la déconjugaison enzymatique est la plus couramment utilisée en raison de sa commodité pour déterminer les concentrations des métabolites de phase II dans des matrices biologiques (Grignon et al., 2017). Aucune méthode directe de dosage des métabolites n'avait encore été développée et validée, ce qui constitue un résultat novateur de cette thèse.

D'après les résultats, la méthode est sensible et fiable. La linéarité, la répétabilité et la reproductibilité ont été démontrées avec des courbes d'étalonnage et des contrôles qualités (QC) préparés dans du plasma humain vierge. La méthode est très sensible pour le 3,3'- $Cl_2BPA-G$ , et

sa limite de quantification (LLOQ) est proche de celle validée pour le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA dans le plasma dans l'étude de Cambien et al. (2020) même si cette étude portait sur le composé parent. La limite de quantification (LLOQ) pour le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S était plus élevée mais malgré cette différence, le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S a été quantifié dans tous les échantillons analysés de l'étude clinique humaine et animale démontrant la sensibilité adéquate de notre méthode pour les deux métabolites.

L'application de notre méthode analytique dans le plasma de rat et d'humain a été réalisée avec des échantillons obtenus à partir d'études où l'exposition au polluant était connue et contrôlée par voie intraveineuse (IV) pour les animaux et par voie orale ou cutanée pour les humains par une administration directe. Cette étude rapporte donc la première mesure *in vivo* des métabolites conjugués du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA.

Des abondances relatives différentes de 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-G par rapport au 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA-S ont été mesurées *in vitro* à partir d'incubations d'hépatocytes de rat et d'humain trouvées dans l'article 1 (Chapitre 3), ce qui suggère des différences interespèces majeures dans le métabolisme hépatique pour cette substance. Dans l'article 2, des différences liées aux voies d'administration pourraient aussi expliquer les différences observées entre le rat et l'humain. La méthode analytique présentée dans l'article 2 (chapitre 4) peut donc être utilisée pour des études de toxicocinétique chez l'animal et l'humain et pourrait aussi être utilisée dans un contexte de biosurveillance des Cl<sub>x</sub>BPA, sous réserve d'une sensibilité suffisante.

Les résultats de l'article 1 (Chapitre 3) ont permis de paramétrer le modèle PBPK qui a besoin de données sur la substance étudiée notamment ses constantes métaboliques. Les travaux de l'article 3 (Chapitre 5) représentent le premier modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK) des Cl<sub>x</sub>BPA chez le rat, permettant ainsi de prédire les concentrations plasmatiques et tissulaires pour ces polluants émergents.

Après avoir déterminé les constantes métaboliques (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, clairance intrinsèque) dans l'article 1 (Chapitre 3), des expériences *in vitro* utilisant la dialyse à l'équilibre pour calculer l'affinité aux protéines plasmatiques (F<sub>up</sub>) de chaque Cl<sub>x</sub>BPA ont tout d'abord été réalisées. Ces résultats ont montré que les Cl<sub>x</sub>BPA sont fortement liés aux protéines

plasmatiques (voir Tableau 22 de l'article 3) comme le Bisphénol A chez le rat (Teeguarden et al., 2005). Cette forte affinité des Cl<sub>x</sub>BPA aux protéines plasmatiques est importante dans la distribution de la forme parent dans un organisme vivant. En effet, la forme liée agit comme une réserve qui ne traverse pas les membranes alors que la forme non liée (0,5 à 7% pour les Cl<sub>x</sub>BPA) peut être active car elle peut atteindre sa cible membranaire ou intracellulaire. Par conséquent, la fraction d'un toxique liée aux protéines plasmatiques n'est pas immédiatement disponible pour la distribution dans l'espace extravasculaire ou la filtration par les reins.

L'estimation des PC tissus : plasma en utilisant les équations de Poulin et al. (2012), montrent que le PC tissu adipeux : plasma est le plus élevé de tous les coefficients avec des valeurs comprises entre 163 et 208. Le PC cerveau : plasma est le deuxième plus élevé après le tissu adipeux avec des PC cerveau : plasma compris entre 6.67 et 6.74. Les Cl<sub>x</sub>BPA sont donc plus distribués dans le tissu adipeux, le cerveau, et le foie et beaucoup moins dans les muscles, et les tissus richement perfusés.

En outre, ces modèles PBPK permettent de mieux comprendre la distribution de chaque Cl<sub>x</sub>BPA dans le plasma et les tissus (cerveau et muscles) en utilisant des simulations cinétiques chez l'animal jusqu'à 24 heures. Les Cl<sub>x</sub>BPA ont montré un volume de distribution estimé (*in silico* : 2.48-3.45 L) plusieurs fois supérieur au poids corporel du rat, ce qui signifie que la distribution tissulaire de ces substances est importante. Les Cl<sub>x</sub>BPA se retrouvent donc principalement dans les tissus et restent moins dans le plasma, à l'exception du Cl<sub>4</sub>BPA en accord avec l'étude de Plattard et al. (2022) dans laquelle le Cl<sub>4</sub>BPA a la clairance intrinsèque la plus faible par rapport aux autres composés (Plattard, N. et al., 2022).

De plus, après exposition intraveineuse (IV) à différentes doses chez des rats Sprague-Dawley, les Cl<sub>x</sub>BPA se comportent différemment dans les tissus étudiés. En effet, pour le cerveau, les concentrations expérimentales de chaque Cl<sub>x</sub>BPA à 24h pour la même dose (4 mg/kg) sont assez différentes sauf pour le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA. Le Cl<sub>1</sub>BPA a une concentration de 2.2 ng/g, ce qui est huit fois plus élevé que la concentration du Cl<sub>2</sub>BPA (0.28 ng/g). En revanche, le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA ont des concentrations similaires (4.7 et 5.5 ng/g respectivement) (voir Tableau 18 à Tableau 21).

Les concentrations expérimentales du Cl<sub>3</sub>BPA retrouvées dans les muscles après 24h à 4 mg/kg sont plus de 20 fois supérieures à celles des autres Cl<sub>x</sub>BPA à 4 mg/kg à 24h, ce qui démontre une plus forte présence de cette substance dans les muscles du rat. De plus, le ratio d'extraction ( $E_m$ ) du ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA et Cl<sub>3</sub>BPA pour les muscles est égal à zéro, ce qui signifie que la substance n'est pas bien éliminée des muscles. Il y a donc une accumulation de Cl<sub>x</sub>BPA dans les muscles, mais ce phénomène devra être étudié dans des recherches futures.

En utilisant des PC cerveau : plasma estimés (6.67 à 6.74, Tableau 22), une simple distribution limitée par la perfusion a conduit à des concentrations beaucoup plus élevées que celles observées après 24h *in vivo*. Enfin, des PC tissu adipeux : plasmas élevés ont été prédits (163.36 à 207.93, voir Tableau 22), ce qui suggère qu'une accumulation importante dans le tissu adipeux est présente chez le rat.

La création d'une structure de modèle distincte pour les trois premières substances par rapport au modèle du Cl<sub>4</sub>BPA a été nécessaire. En effet, une distribution limitée par la diffusion dans les tissus (cerveau et muscles) a dû être décrite pour simuler la cinétique du Cl<sub>4</sub>BPA car un modèle PBPK simplement avec une distribution limitée par la perfusion n'était pas adéquat pour prédire les données expérimentales. Chez le rat, le Cl<sub>4</sub>BPA a une demi-vie plus longue que les trois autres contaminants. En effet, après 24 heures d'exposition, il reste de la substance mère dans le plasma, le cerveau et les muscles, ce qui correspond à la plus faible clairance intrinsèque des Cl<sub>x</sub>BPA déterminée dans l'article 1 (Chapitre 3) contrairement à l'humain.

Dans l'ensemble, les deux structures de modèles PBPK ont permis de prédire les données sur l'évolution de la cinétique plasmatique sur 24h chez le rat mais présentent les limites suivantes. Les Cl<sub>x</sub>BPA ont montré un métabolisme extrahépatique. De plus, pour le ClBPA, la courbe plasmatique prédite pour les deux doses ne s'ajuste pas aux données expérimentales pour le début de la courbe, ce qui suggère peut-être une recirculation entérohépatique pour le ClBPA entre 0 et 4h qui reste à vérifier. Ce même mécanisme est également présent avant 8h pour les autres Cl<sub>x</sub>BPA, ce qui suggère une recirculation entérohépatique ou la présence potentielle de transporteurs dans les intestins comme c'est le cas pour le BPA (Feng et al., 2019; Mazur et al., 2012).

Les courbes musculaires prédites pour le Cl<sub>2</sub>BPA, le Cl<sub>3</sub>BPA et le Cl<sub>4</sub>BPA pourraient être améliorées en augmentant le PC muscles : plasma pour obtenir un meilleur ajustement avec les données expérimentales, ce qui signifierait que le Cl<sub>2</sub>BPA serait beaucoup plus distribué dans les muscles.

Ces travaux constituent ainsi la première étude qui a développé et calibré un modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA dans la littérature. Elle a permis d'intégrer les données *in vivo* sur la pharmacocinétique intraveineuse des Cl<sub>x</sub>BPA en utilisant une exposition animale chez le rat Sprague-Dawley (n = 80 rats) et les modèles PBPK ont permis de prédire la cinétique plasmatique et tissulaire des Cl<sub>x</sub>BPA. Enfin, ces modèles ont permis d'émettre des hypothèses expliquant la cinétique de ces contaminants émergents notamment au niveau de la distribution et du métabolisme.

## 6.4 Limites des travaux de la thèse

Certaines limites liées aux méthodes utilisées dans cette thèse ne sauraient être ignorées. Premièrement, dans l'article 1 (Chapitre 3), nous avons initialement supposé que les voies métaboliques et les principaux métabolites formés étaient similaires au BPA et, par conséquent, nous n'avons analysé que les métabolites de phase II. Les taux de métabolisme ont été estimés en mesurant le taux de disparition de la concentration du composé parent dans les échantillons et la formation de métabolites de phase II a été identifiée par un dosage ciblé par HPLC-MS/MS. À l'exception de la quantité de Cl<sub>2</sub>BPA-G, qui est la même chez les rats et les humains, tous les autres métabolites diffèrent entre ces deux espèces. Au vu des différences intrinsèques de clairance, il est possible qu'il existe non seulement d'autres métabolites de phase II, mais aussi d'autres voies métaboliques, y compris une voie oxydative, la formation de glutathion, la méthylation ou une possible formation de disulfate sur les deux -OH de la molécule de Cl<sub>x</sub>BPA mais une confirmation est nécessaire. Une méthode de spectrométrie de masse non ciblée serait envisagée à cet effet avec un instrument HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) comme un Orbitrap LC-MS.

Bien que les aires de pics de ces métabolites aient été analysées dans les surnageants des essais métaboliques, l'étendue de l'activité de sulfatation et d'autres voies métaboliques possibles des Cl<sub>x</sub>BPA chez l'humain reste inconnue et doit être étudiée de manière plus approfondie. En outre, il resterait encore à vérifier que la principale voie métabolique des Cl<sub>x</sub>BPA soit la glucuronidation, un processus de détoxification dans la plupart des cas.

Deuxièmement, dans l'article 2 (chapitre 4), le nombre d'échantillons de rats et d'humains auxquels la méthode a été appliquée reste faible. De plus, l'application de notre méthode d'analyse dans le plasma de rat et d'humain a été réalisée avec des échantillons obtenus à partir d'études où l'exposition au polluant était connue et contrôlée par voie intraveineuse pour l'animal et par voie orale et cutanée pour l'humain par une administration directe. Notre méthode pourrait être appliquée à des échantillons plasmatiques provenant de la population générale. Dans l'étude de Cambien et al. (2020), sur 10 échantillons de patients, le 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA dans le plasma humain n'était présent que dans trois échantillons. Ceci peut s'expliquer par le fait que la concentration plasmatique de 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA dans la population générale reste très faible (0.006 ng/mL, 1/10 dans Cambien et al. (2020)). Notre méthode analytique des métabolites du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA pourrait être appliquée dans une étude pilote dans la population générale sur un plus grand effectif pour vérifier qu'ils sont bien retrouvés dans le plasma.

Troisièmement, dans l'article 3 (chapitre 5), les incertitudes possibles sur les valeurs des paramètres d'entrées de nos modèles PBPK n'ont pas été prises en compte, faute de données disponibles sur ces incertitudes. En effet, les PC tissus : plasma ont été déterminés *in silico* via les équations de l'article de Poulin et al. (2012) avec une méthode sans oxygène sur la molécule bien que les Cl<sub>x</sub>BPA en possèdent dans leur structure moléculaire. Cette méthode constitue donc une limite puisque pour valider les valeurs des PC tissus : plasma *in silico*, des expériences *in vitro* grâce à une dialyse à l'équilibre pourraient être effectuées par la suite pour les comparer aux valeurs prédites. L'estimation *in silico* de l'affinité aux protéines plasmatiques ( $F_{up}$ ) a quant à elle été confirmée par des expériences de dialyses à l'équilibre. Nous avons comparé les valeurs mesurées à celles prédites par un modèle QSPR (Gastroplus) afin de démontrer que la méthode d'estimation est adéquate pour ce type de molécules.

Les paramètres physiologiques chez le rat (Volume des tissus, débits tissulaires et cardiaque, etc...) dans cette étude ne prennent pas en compte les variabilités interindividuelles, ce qui est une limite de nos modèles PBPK. En effet, les données obtenues montrent que la variabilité est importante. La variabilité interindividuelle dans les valeurs physiologiques et dans les paramètres métaboliques pourrait expliquer une partie des différences entre individus. On peut imaginer que cela pourrait affecter les profils cinétiques simulés sur 24h chez le rat. Ces paramètres reposent aussi sur la connaissance à un temps donné de la physiologie et peuvent ne pas prendre en compte certains facteurs (alimentation, vitesse de biotransformation, hydratation, etc...) importants dans l'élaboration de profils cinétiques. Des simulations de Monte Carlo pourraient être effectuées afin de prendre en compte les variabilités et l'incertitude des paramètres d'entrée du modèle PBPK.

Finalement, ce premier modèle PBPK des Cl<sub>x</sub>BPA a été calibré avec une expérience *in vivo* chez le rat Sprague-Dawley. D'autres données seront nécessaires pour valider ce modèle PBPK chez le rat. En effet, avant 8h pour les cinétiques plasmatiques, il semblerait que d'autres mécanismes toxicocinétiques entrent en jeu notamment mais sans s'y limiter, une recirculation entérohépatique, ou l'implication de transporteurs comme c'est le cas pour le BPA (Braniste et al., 2010; Feng et al., 2019; Mazur et al., 2012). À ce jour, ce ne sont que des données parcellaires de cinétique qui sont disponibles chez l'animal. Pour bien valider un modèle PBPK, davantage de données chez le rat sont nécessaires mais à partir de celles disponibles on peut déjà investiguer plus loin et émettre certaines hypothèses. De nouvelles données pourraient permettre de confirmer la présence des mécanismes additionnels et de les caractériser ainsi que d'affiner ce modèle PBPK afin de mieux décrire les cinétiques plasmatiques et tissulaires de chaque Cl<sub>x</sub>BPA. De plus, des expositions humaines ont été faites et pourront confirmer que ces observations ont aussi lieu dans cette espèce.

Contrairement aux Cl<sub>x</sub>BPA, la cinétique plasmatique et tissulaire du BPA a été amplement étudiée et de nombreux modèles PBPK chez le rat ont été proposés avant d'atteindre la forme actuelle validée (Lin et al., 2020; Shin et al., 2004; Teegarden et al., 2005; Yang et al., 2013). Les Cl<sub>x</sub>BPA sont des substances émergentes et nécessiteront plus d'investigations

mécanistiques et toxicocinétiques pour avoir des modèles PBPK qui décriront et prédiront avec fiabilité leur cinétique.

## 6.5 Perspectives de recherche découlant du projet doctoral

Plusieurs perspectives de recherche découlent de cette thèse. En effet, ce projet doctoral pourrait par la suite permettre de mieux comprendre certains mécanismes cinétiques dans le plasma ou les tissus des Cl<sub>x</sub>BPA. D'après les résultats de ce projet de recherche, une possibilité d'un cycle entérohépatique pour tous les Cl<sub>x</sub>BPA ou la présence de transporteurs chez l'animal restent à explorer ; la possibilité d'une diffusion limitée dans les tissus pour le Cl<sub>4</sub>BPA est aussi à approfondir ; ou encore compte-tenu de la forte liaison aux protéines plasmatiques (>95%), de possibles interactions avec d'autres perturbateurs endocriniens, augmentant le risque d'effets indésirables avec d'autres composés fortement liés. En effet, plusieurs perturbateurs endocriniens ont une grande affinité pour les protéines plasmatiques, notamment le Bisphénol A (Teeguarden et al., 2005) et les phtalates (Dominguez-Romero et al., 2019) qui peuvent interagir quotidiennement avec les Cl<sub>x</sub>BPA. En particulier, une augmentation des effets des Cl<sub>x</sub>BPA due à un effet cocktail de contaminants environnementaux peut se produire si plusieurs toxiques ayant un haut degré de liaison aux protéines rentrent en compétition, augmentant ainsi la fraction libre des Cl<sub>x</sub>BPA dans le plasma.

De plus, les PC tissus : plasma seraient aussi à mesurer *in vitro* à l'aide d'une dialyse à l'équilibre afin de vérifier si la méthode de calcul *in silico* que nous avons utilisée pour les modèles PBPK est valide pour ces substances.

L'estimation de l'exposition des Cl<sub>x</sub>BPA a été mesurée à l'aide d'expériences *in vivo* chez l'animal mais d'autres études *in vivo* pourraient être envisagées pour quantifier l'exposition tissulaire au cours du temps des composés parents dans d'autres tissus que ceux étudiés ici (reins, intestin ou dans des fractions sous-cellulaires de ces tissus) afin de déterminer si une biotransformation est présente dans ceux-ci. En effet, un métabolisme extrahépatique a été



ajouté pour les Cl<sub>x</sub>BPA dans les modèles PBPK mais ce point reste cependant à vérifier dans des études futures sur différents tissus (cerveau, tissus richement perfusés : reins, intestins, gonades), sachant que du métabolisme extrahépatique est également présent pour le BPA et le bisphénol S (BPS) (Sonker et al., 2021). Ceci pourrait être réalisé avec des fractions sous-cellulaires de ces tissus (microsomes, cytosol ou fraction S9).

Les activités métaboliques à travers l'UDP-glucuronyltransférase (UGT) pour le BPA sont principalement distribuées dans le foie mais sont également observées à des niveaux substantiels dans les reins et les testicules (Yokota et al., 1999). Concernant le BPS, l'étude de Sonker et al. (2021) démontre que la clairance observée est supérieure au débit sanguin hépatique du rat, ce qui indique la probabilité d'une clairance extrahépatique (Sonker et al., 2021). Le BPS pourrait donc ne pas être uniquement métabolisé par le foie chez le rat et cette clairance extrahépatique pourrait être impliquée dans son métabolisme global. De plus, il a été signalé précédemment que le BPS subit une glucuroconjugaison par l'intermédiaire d'isoformes UGT telles que UGT1A9 et UGT2B7, qui se trouvent principalement dans les reins, ce qui impliquerait la possibilité d'un métabolisme extrahépatique (Skledar.D; et al., 2014). Enfin, le cerveau contient des cytochromes P450 pouvant jouer un rôle dans le métabolisme de contaminants mais l'ampleur de la contribution du cerveau au métabolisme reste très limitée chez l'humain et reste à vérifier pour de prochaines études sur les Cl<sub>x</sub>BPA (Rivett et al., 1982)

D'autres perspectives de recherche découlent de cette thèse et concerne l'exposition humaine aux Cl<sub>x</sub>BPA. En effet, une étude clinique chez l'humain a été réalisée au CIC Inserm 1402 à Poitiers ayant pour but de connaître la toxicocinétique du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA chez l'humain avec une dose de 0.05 mg/kg. Des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués à des temps différents jusqu'à 24h afin de déterminer le profil cinétique dans deux matrices biologiques différentes et calculer leurs paramètres toxicocinétiques (AUC, C<sub>max</sub>, temps de demi-vie, etc...). Le dernier article (article 3, chapitre 5) de cette thèse présente un modèle PBPK chez le rat mais une extrapolation du modèle animal- humain pourrait être envisagée par la suite afin de simuler le profil cinétique pour les quatre Cl<sub>x</sub>BPA chez l'humain après administration par voie orale et sous-cutané. En effet, il pourra être rajouté au modèle PBPK humain le compartiment

peau et les deux voies d'administration. Cette extrapolation pourra être validée avec l'étude clinique humaine.

De plus, afin de diminuer les incertitudes concernant les PC tissus : plasma chez l'humain, des expériences *in vitro* pour chacun des principaux tissus (tissus adipeux, foie, cerveau, muscles, gonades) pourraient être envisagées à l'aide de dialyse à l'équilibre afin de les comparer aux PC prédits.

Enfin, les mesures d'urine, d'eau de consommation courante et de colostrum du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse, déjà disponibles, de la cohorte EDDS (Endocrine Disruptors Deux-Sèvres, cohorte de 132 femmes enceintes, 2012-2013, (Albouy-Llaty et al., 2021; Albouy-Llaty et al., 2015)) pourraient permettre de valider le modèle PBPK chez la femme enceinte en extrapolant à partir de celui de l'humain. Une comparaison entre les données du modèle PBPK et les mesures de biosurveillance (urine et colostrum) de la cohorte EDDS pourrait valider ce modèle. En effet, il serait important de décrire l'exposition des femmes enceintes et du fœtus aux Cl<sub>x</sub>BPA, car ce sont des populations vulnérables pour lesquelles les effets de ces polluants émergents peuvent présenter le plus de risques pour la santé. Ce modèle permettra d'estimer l'exposition journalière de la mère et aidera aussi à estimer la contribution des différentes voies d'exposition à ces polluants d'origine hydrique : orale et cutanée.

## **Chapitre 7 – Conclusion**

### **7 Portée de ce projet doctoral et conclusion**

## 7.1 Portée de ce projet doctoral

La portée de ce projet doctoral concerne les autorités de santé publique et les régulateurs ou évaluateurs de risque en santé environnementale qui s'intéressent aux perturbateurs endocriniens se retrouvant principalement dans l'eau potable, mais aussi utilisés comme retardateur de flamme (Cl<sub>4</sub>BPA). Dans le domaine de la toxicologie, les résultats de cette thèse auront un impact assuré dans l'analyse du risque de ces substances émergentes que sont les Cl<sub>x</sub>BPA chez l'animal et l'humain puisque les constantes métaboliques, ainsi que les profils cinétiques animaux pour le plasma, le cerveau et les muscles ont été déterminés. À travers ces différents résultats, les autorités de santé publique pourront y puiser des informations pertinentes sur le devenir de ces contaminants émergents chez l'animal.

Au niveau de la santé publique, la population mondiale est continuellement exposée à ces substances via l'eau potable mais le risque demeure inconnu. En effet, la chloration de l'eau à l'aide de différents types de chlore (principalement le chlore gazeux, l'hypochlorite de sodium et l'hypochlorite de calcium) reste la méthode la plus utilisée au monde car elle est efficace, fiable et économique. Cependant, le cas des Cl<sub>x</sub>BPA s'additionne aux problèmes déjà présents des sous-produits de la chloration de l'eau et pourrait illustrer un problème sanitaire majeur puisqu'ils ont déjà été associés à l'infarctus du myocarde, et au diabète de type II (Andra, Kalyvas, et al., 2015; Hu et al., 2019). De plus, il est possible qu'une synergie ou une additivité entre plusieurs contaminants dont les Cl<sub>x</sub>BPA soit présente, exposant la population à un cocktail de produits chimiques dont le risque pour la santé d'un individu tout au long de sa vie reste inconnu. Pour les principaux sous-produits de la chloration présents dans l'eau : THM, HAA et chlorites, il existe des valeurs indicatives pour l'eau du robinet dans différents pays mais il n'existe actuellement aucune réglementation concernant le seuil de toxicité des Cl<sub>x</sub>BPA dans l'eau potable, que ce soit en Europe, aux Etats-Unis ou au Canada, ce qui représente une lacune de la réglementation.

Enfin, plus largement, pour la société, quels que soient les produits chimiques utilisés ou les techniques utilisées pour le processus de traitement de l'eau, le risque de sous-produits indésirables existe. Le type de traitement de l'eau potable (ozonation, dioxyde de chlore, hypochlorite de sodium) devient alors un choix politique, pour lequel les organisations

environnementales et la recherche jouent un rôle très important dans la prise de décision en santé publique.

## 7.2 Conclusion

Cette recherche doctorale a contribué à l'avancement des connaissances en matière d'évaluation du risque en santé environnementale sur des perturbateurs endocriniens très peu présents dans la littérature. En effet, cette étude a permis de caractériser les constantes métaboliques de chaque Cl<sub>x</sub>BPA en les comparant entre substances et entre espèces (rat et humain). Ces données sont précieuses pour l'évaluation de la toxicité de ces substances dans un organisme vivant. Ensuite, la méthode analytique développée pour les métabolites du 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA pourra être adaptée à tous les autres composés afin d'utiliser les métabolites des Cl<sub>x</sub>BPA comme potentiels biomarqueurs d'exposition pour des études de biosurveillance populationnelle. Aucune étude au Canada contrairement à la France n'a encore analysé ces contaminants émergents dans l'eau potable, ce qui représente un risque pour la santé publique.

Cette étude doctorale a permis de prédire les premières cinétiques plasmatiques et tissulaires (cerveau et muscles) chez le rat à l'aide de deux modèles PBPK. Puis, ces modèles prédictifs ont été comparés à des données expérimentales *in vivo* chez le rat Sprague-Dawley. Grâce à ces nouvelles données, nous avons pu démontrer que du métabolisme extrahépatique existe pour ces contaminants, et que chaque Cl<sub>x</sub>BPA se distribue différemment selon la matrice biologique, ce qui représente un apport majeur de cette thèse.

Cependant, des recherches supplémentaires doivent être menées sur la présence d'autres voies métaboliques des Cl<sub>x</sub>BPA, l'existence d'un cycle entérohépatique et de la présence de transporteurs pouvant expliquer les débuts des courbes cinétiques plasmatiques pour tous les composés, ainsi que sur la validation des PC *in vitro*. Pour finir, cette thèse a permis de mieux comprendre la toxicocinétique de ces perturbateurs endocriniens encore très peu connus dans la littérature pour permettre l'analyse du risque lié à l'exposition des Cl<sub>x</sub>BPA. Ce projet doctoral pourra aussi mener par la suite à des études toxicocinétiques chez l'humain, la femme enceinte et le nourrisson en extrapolant le modèle PBPK animal.

## Références bibliographiques

- Abdallah, M. A., Harrad, S., & Covaci, A. (2008). Hexabromocyclododecanes and tetrabromobisphenol-A in indoor air and dust in Birmingham, U.K: implications for human exposure. *Environ Sci Technol*, 42(18), 6855-6861. doi:10.1021/es801110a
- Agus, E., & Sedlak, D. L. (2010). Formation and fate of chlorination by-products in reverse osmosis desalination systems. *Water Res*, 44(5), 1616-1626. doi:10.1016/j.watres.2009.11.015
- Albouy-Llaty, M., Deshayes-Morgand, C., Venisse, N., Rouillon, S., Pierre Eugene, P., Rabouan, S., . . . Migeot, V. (2021). Determinants of Bisphenol A and its Chlorinated Derivatives' Concentrations in Colostrum: the EDDS Cohort Study. *Exposure and Health*. doi:<https://doi.org/10.1007/s12403-021-00405-9>
- Albouy-Llaty, M., Dupuis, A., Grignon, C., Strezlec, S., Pierre, F., Rabouan, S., & Migeot, V. (2015). Estimating drinking-water ingestion and dermal contact with water in a French population of pregnant women: the EDDS cohort study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 25(3), 308-316. doi:10.1038/jes.2014.48
- Andersen, M. E., Clewell, H. J., 3rd, Gargas, M. L., Smith, F. A., & Reitz, R. H. (1987). Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride. *Toxicol Appl Pharmacol*, 87(2), 185-205. doi:10.1016/0041-008x(87)90281-x
- 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.062
- Andra, S. S., Charisiadis, P., Arora, M., van Vliet-Ostapchouk, J. V., & Makris, K. C. (2015). Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ Int*, 85, 352-379. doi:10.1016/j.envint.2015.09.011
- Andra, S. S., Kalyvas, H., Andrianou, X. D., Charisiadis, P., Christophi, C. A., & Makris, K. C. (2015). Preliminary evidence of the association between monochlorinated bisphenol A exposure and type II diabetes mellitus: A pilot study. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 50(3), 243-259. doi:10.1080/10934529.2015.981111
- Andra, S. S., & Makris, K. C. (2015). Association between urinary levels of bisphenol A and its monochlorinated derivative and obesity. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 50(11), 1169-1179. doi:10.1080/10934529.2015.1047674
- Andrianou, X. D., Gangler, S., Piciu, A., Charisiadis, P., Zira, C., Aristidou, K., . . . Makris, K. C. (2016). Human Exposures to Bisphenol A, Bisphenol F and Chlorinated Bisphenol A Derivatives and Thyroid Function. *PLoS One*, 11(10), e0155237. doi:10.1371/journal.pone.0155237
- ANSES. (2013). Evaluation des risques du bisphenol A (BPA) pour la santé humaine. Bergman, Å., 2013. United Nations Environment Programme, World Health Organization. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012 an Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors. WHO: UNEP, Geneva.

- Attina, T. M., Hauser, R., Sathyanarayana, S., Hunt, P. A., Bourguignon, J. P., Myers, J. P., . . . Trasande, L. (2016). Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: a population-based disease burden and cost analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *4*(12), 996-1003. doi:10.1016/S2213-8587(16)30275-3
- Ayanda, O. S., Olutona, G. O., Olumayede, E. G., Akintayo, C. O., & Ximba, B. J. (2016). Phenols, flame retardants and phthalates in water and wastewater - a global problem. *Water Sci Technol*, *74*(5), 1025-1038. doi:10.2166/wst.2016.314
- Bacle, A., Dupuis, A., Belmouaz, M., Bauwens, M., Cambien, G., Venisse, N., . . . Ayraud-Thevenot, S. (2019). Overexposure to Bisphenol A and Its Chlorinated Derivatives of Patients with End-Stage Renal Disease during Online Hemodiafiltration. *Biomolecules*, *9*(9). doi:10.3390/biom9090403
- Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E. B., Ponnampalam, A. P., & Mitchell, M. D. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, *202*(4), 393 e391-397. doi:10.1016/j.ajog.2010.01.025
- Becerra-Herrera, M., Miranda, V., & Richter, P. (2020). Rapid Determination of Parabens in Water Samples by Ultra-high Performance Liquid Chromatography Coupled to Time of Flight Mass Spectrometry. *Anal Sci*, *36*(6), 675-679. doi:10.2116/analsci.19P409
- Bellona, C., Drewes, J. E., Xu, P., & Amy, G. (2004). Factors affecting the rejection of organic solutes during NF/RO treatment--a literature review. *Water Res*, *38*(12), 2795-2809. doi:10.1016/j.watres.2004.03.034
- Berezhkovskiy, L. M. (2011). The corrected traditional equations for calculation of hepatic clearance that account for the difference in drug ionization in extracellular and intracellular tissue water and the corresponding corrected PBPK equation. *J Pharm Sci*, *100*(3), 1167-1183. doi:10.1002/jps.22324
- Bosquiazzo, V. L., Varayoud, J., Munoz-de-Toro, M., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2010). Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus. *Biol Reprod*, *82*(1), 86-95. doi:10.1095/biolreprod.109.078543
- Bounakta, S., Bteich, M., Mantha, M., Poulin, P., & Haddad, S. (2018). Predictions of bisphenol A hepatic clearance in the isolated perfused rat liver (IPRL): impact of albumin binding and of co-administration with naproxen. *Xenobiotica*, *48*(2), 135-147. doi:10.1080/00498254.2017.1294276
- Bourgin, M., Bichon, E., Antignac, J. P., Monteau, F., Leroy, G., Barritaud, L., . . . Le Bizec, B. (2013). Chlorination of bisphenol A: non-targeted screening for the identification of transformation products and assessment of estrogenicity in generated water. *Chemosphere*, *93*(11), 2814-2822. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.080
- Bramini, M., Alberini, G., Colombo, E., Chiacchiaretta, M., DiFrancesco, M. L., Maya-Vetencourt, J. F., . . . Cesca, F. (2018). Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *12*, 12. doi:<https://dx.doi.org/10.3389/fnsys.2018.00012>



- Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L., & Taylor, H. S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB J*, *24*(7), 2273-2280. doi:10.1096/fj.09-140533
- Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., & Beliles, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*, *13*(4), 407-484. doi:10.1177/074823379701300401
- Calafat, A. M., Koch, H. M., & additional, c. (2020). BPA and risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *8*(4), 269-270. doi:10.1016/S2213-8587(20)30070-X
- Calafat, A. M., Koch, H. M., Swan, S. H., Hauser, R., Goldman, L. R., Lanphear, B. P., . . . Wolff, M. S. (2013). Misuse of blood serum to assess exposure to bisphenol A and phthalates. *Breast Cancer Res*, *15*(5), 403. doi:10.1186/bcr3494
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*, *116*(1), 39-44. doi:10.1289/ehp.10753
- Cambien, G., Venisse, N., Migeot, V., Rabouan, S., Belmouaz, M., Binson, G., . . . Dupuis, A. (2020). Simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human plasma: Development, validation and application of a UHPLC-MS/MS method. *Chemosphere*, *242*, 125236. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125236
- Campbell, A. (2009). Development of PBPK model of molinate and molinate sulfoxide in rats and humans. *Regul Toxicol Pharmacol*, *53*(3), 195-204. doi:10.1016/j.yrtph.2009.01.003
- Canada, H. (2006). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Technical Document - Trihalomethanes.
- Canada, S. (2021). *Partage des tâches domestiques : faire équipe pendant la pandémie de COVID-19*. Retrieved from <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/45-28-0001/2020001/article/00081-fra.htm>
- Cant, A., Albouy-Llaty, M., Venisse, N., Grignon, C., Fabrice, P., & Migeot, V. (2016). Comparison of colostrum versus urine as biomarkers of pregnant women exposure to chlorinated derivatives of Bisphenol A. *2nd international Conference in Human biomonitoring*.
- Cariot, A., Dupuis, A., Albouy-Llaty, M., Legube, B., Rabouan, S., & Migeot, V. (2012). Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. *Talanta*, *100*, 175-182. doi:10.1016/j.talanta.2012.08.034
- Chang, B. V., Liu, J. H., & Liao, C. S. (2014). Aerobic degradation of bisphenol-A and its derivatives in river sediment. *Environ Technol*, *35*(1-4), 416-424. doi:10.1080/09593330.2013.831111
- Chen, M., Fan, Z., Zhao, F., Gao, F., Mu, D., Zhou, Y., . . . Hu, J. (2016). Occurrence and Maternal Transfer of Chlorinated Bisphenol A and Nonylphenol in Pregnant Women and Their Matching Embryos. *Environ Sci Technol*, *50*(2), 970-977. doi:10.1021/acs.est.5b04130

- Chu, S., Haffner, G. D., & Letcher, R. J. (2005). Simultaneous determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, bisphenol A and other halogenated analogues in sediment and sludge by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, *1097*(1-2), 25-32. doi:10.1016/j.chroma.2005.08.007
- Clewell, R. A., Kremer, J. J., Williams, C. C., Campbell, J. L., Jr., Andersen, M. E., & Borghoff, S. J. (2008). Tissue exposures to free and glucuronidated monobutylphthalate in the pregnant and fetal rat following exposure to di-n-butylphthalate: evaluation with a PBPK model. *Toxicol Sci*, *103*(2), 241-259. doi:10.1093/toxsci/kfn054
- Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, *101*(5), 378-384. doi:10.1289/ehp.93101378
- Couri, D., Abdel-Rahman, M. S., & Bull, R. J. (1982). Toxicological effects of chlorine dioxide, chlorite and chlorate. *Environ Health Perspect*, *46*, 13-17. doi:10.1289/ehp.824613
- Del Olmo, M., Zafra-Gomez, A., Suarez, B., Gonzalez-Casado, A., Taoufik, J., & Vilchez, J. L. (2005). Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, Volume 817*, 167-172. doi:10.1016/j.jchromb.2004.11.059
- Derendorf, H., & Schmidt, S. (2019). *Rowland and Tozer's Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications* (W. K. H. e. é. j. 2019) Ed.).
- Dodson, R. E., Nishioka, M., Standley, L. J., Perovich, L. J., Brody, J. G., & Rudel, R. A. (2012). Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environ Health Perspect*, *120*(7), 935-943. doi:10.1289/ehp.1104052
- Dominguez-Romero, E., & Scherlinger, M. (2019). A review of phthalate pharmacokinetics in human and rat: what factors drive phthalate distribution and partitioning? *Drug Metab Rev*, *51*(3), 314-329. doi:10.1080/03602532.2019.1620762
- Domoradzki, J. Y., Pottenger, L. H., Thornton, C. M., Hansen, S. C., Card, T. L., Markham, D. A., . . . Waechter, J. M., Jr. (2003). Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-monoglucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicol Sci*, *76*(1), 21-34. doi:10.1093/toxsci/kfg206
- Dorival-Garcia, N., Zafra-Gomez, A., Navalon, A., & Vilchez, J. L. (2012). Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *J Chromatogr A*, *1253*, 1-10. doi:10.1016/j.chroma.2012.06.079
- Doumas, M., Rouillon, S., Venisse, N., Nadeau, C., Pierre Eugene, P., Farce, A., . . . Carato, P. (2018). Chlorinated and brominated bisphenol A derivatives: Synthesis, characterization and determination in water samples. *Chemosphere*, *213*, 434-442. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.061

- Dupuis, A., Migeot, V., Cariot, A., Albouy-Llaty, M., Legube, B., & Rabouan, S. (2012). Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int*, 19(9), 4193-4205. doi:10.1007/s11356-012-0972-3
- EFSA. (2016). Review of non-monotonic dose-responses of substances for human risk assessment. External Scientific Report. Online : <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1027>.
- EPA. (2006). National Primary Drinking Water Regulations : Stage 2 Disinfectants and Disinfection By-products Rule. Federal Register 71 (2), 387-493.
- EPA, A. (2000). Toxicological Review of Chlorine Dioxide and Chlorite, In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/636/R-00/007.
- EPA, U. (1998). National primary drinking water regulations : disinfectants and disinfection byproducts;final rule, Fed. Reg. 63. 69390-69476.
- EPA, U. (2018). 2,2',6,6'-Tetrachlorobisphenol A 79-95-8 | DTXSID3021770. Retrieved from [https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID3021770#exec\\_sum](https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID3021770#exec_sum)
- EU. (2020). Endocrine Disruptors List. <https://edlists.org/the-ed-lists>.
- European Medicines Agency, E. (2012). Guideline on bioanalytical method of validation. *Sciences Medicines Health*, p.23.
- Fan, Z., Hu, J., An, W., & Yang, M. (2013). Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds. *Environ Sci Technol*, 47(19), 10841-10850. doi:10.1021/es401504a
- Feinberg, A. P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 447(7143), 433-440. doi:10.1038/nature05919
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufik, J., Navalon, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., . . . Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol*, 24(2), 259-264. doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.007
- Fisher, J. W., Yang, X., Mehta, D., Housand, C., & Lin, Z. (2020). Fundamentals of physiologically based pharmacokinetic modeling. Dans J.W. Fisher, J.M. Gearhart, Z. Lin (Eds.). Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling. Methods and Applications in Toxicology in Toxicology and Risk Assessment. *Academic Press, India, Chennai*, pp.57-80.
- Fukazawa, H., Hoshino, K., Shiozawa, T., Matsushita, H., & Terao, Y. (2001). Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*, 44(5), 973-979. doi:10.1016/s0045-6535(00)00507-5
- Gallard, H., Leclercq, A., & Croue, J. P. (2004). Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere*, 56(5), 465-473. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.03.001

- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2010). On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A*, *1217*(21), 3511-3518. doi:10.1016/j.chroma.2010.03.028
- Ganiev, I. M., Suvorkina, S., & Kabal Nova, N. (2003). Reaction of chlorine dioxide with phenol. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, *52*, 1123-1128.
- Geens, T., Roosens, L., Neels, H., & Covaci, A. (2009). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*, *76*(6), 755-760. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.024
- Gerona, R., Vom Saal, F. S., & Hunt, P. A. (2020). BPA: have flawed analytical techniques compromised risk assessments? *Lancet Diabetes Endocrinol*, *8*(1), 11-13. doi:10.1016/S2213-8587(19)30381-X
- Ginsberg, G., & Rice, D. C. (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect*, *117*(11), 1639-1643. doi:10.1289/ehp.0901010
- Glauser, M., Metrailler, M., Gerber-Lemaire, S., Centeno, C., Seghezzi, C., Dunand, M., . . . Grouzmann, E. (2014). Enzyme and acid deconjugation of plasma sulfated metanephries. *Clin Chim Acta*, *430*, 125-128. doi:10.1016/j.cca.2013.12.044
- Gouukon, Y., Yasuda, M. T., Yasukawa, H., & Terasaki, M. (2020). Occurrence and AhR activity of brominated parabens in the Kitakami River, North Japan. *Chemosphere*, *249*, 126152. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126152
- Grignon, C., Dupuis, A., Albouy-Llaty, M., Condylis, M., Barrier, L., Carato, P., . . . Venisse, N. (2017). Validation of a probe for assessing deconjugation of glucuronide and sulfate phase II metabolites assayed through LC-MS/MS in biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *1061-1062*, 72-78. doi:10.1016/j.jchromb.2017.07.013
- Grignon, C., Venisse, N., Rouillon, S., Brunet, B., Bacle, A., Thevenot, S., . . . Dupuis, A. (2016). Ultrasensitive determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urine using a high-throughput UPLC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem*, *408*(9), 2255-2263. doi:10.1007/s00216-015-9288-8
- Haddad, S., Poulin, P., & Krishnan, K. (2000). Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue:blood partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere*, *40*(8), 839-843. doi:10.1016/s0045-6535(99)00279-9
- Haddad, S., Tardif, G. C., & Tardif, R. (2006). Development of physiologically based toxicokinetic models for improving the human indoor exposure assessment to water contaminants: trichloroethylene and trihalomethanes. *J Toxicol Environ Health A*, *69*(23), 2095-2136. doi:10.1080/15287390600631789
- Hakk, H., Larsen, G., Bergman, A., & Orn, U. (2000). Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats. *Xenobiotica*, *30*(9), 881-890. doi:10.1080/004982500433309

- Heindel, J. J., Skalla, L. A., Joubert, B. R., Dilworth, C. H., & Gray, K. A. (2017). Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology. *Reprod Toxicol*, 68, 34-48. doi:10.1016/j.reprotox.2016.11.011
- Houston, J. B. (1994). Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol*, 47(9), 1469-1479. doi:10.1016/0006-2952(94)90520-7
- Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR et al. (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
- Hu, C., Schottker, B., Venisse, N., Limousi, F., Saulnier, P. J., Albouy-Llaty, M., . . . Hadjadj, S. (2019). Bisphenol A, Chlorinated Derivatives of Bisphenol A and Occurrence of Myocardial Infarction in Patients with Type 2 Diabetes: Nested Case-Control Studies in Two European Cohorts. *Environ Sci Technol*, 53(16), 9876-9883. doi:10.1021/acs.est.9b02963
- Hu, J. Y., Aizawa, T., & Ookubo, S. (2002). Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol*, 36(9), 1980-1987. doi:10.1021/es011177b
- Huang, Q., Liu, W., Peng, P., & Huang, W. (2013). Reductive dechlorination of tetrachlorobisphenol A by Pd/Fe bimetallic catalysts. *J Hazard Mater*, 262, 634-641. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.09.015
- IARC. (1987). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs. *International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, vols. 1-42*.
- Janesick, A., & Blumberg, B. (2011a). Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 93(1), 34-50. doi:10.1002/bdrc.20197
- Janesick, A., & Blumberg, B. (2011b). Minireview: PPARgamma as the target of obesogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(1-2), 4-8. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.01.005
- Janesick, A., & Blumberg, B. (2012). Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. *Int J Androl*, 35(3), 437-448. doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01247.x
- Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalon, A., Fernandez, M. F., . . . Vilchez, J. L. (2010). Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(32), 3363-3369. doi:10.1016/j.jchromb.2010.10.021
- Kahn, L. G., Philippat, C., Nakayama, S. F., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8(8), 703-718. doi:10.1016/S2213-8587(20)30129-7
- Kalyvas, H., Andra, S. S., Charisiadis, P., Karaolis, C., & Makris, K. C. (2014). Influence of household cleaning practices on the magnitude and variability of urinary monochlorinated bisphenol A. *Sci Total Environ*, 490, 254-261. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.072

- Kassotis, C. D., Vandenberg, L. N., Demeneix, B. A., Porta, M., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8(8), 719-730. doi:10.1016/S2213-8587(20)30128-5
- Kato, K., Wong, L. Y., Jia, L. T., Kuklennyik, Z., & Calafat, A. M. (2011). Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: 1999-2008. *Environ Sci Technol*, 45(19), 8037-8045. doi:10.1021/es1043613
- Kim, Y. H., Kim, C. S., Park, S., Han, S. Y., Pyo, M. Y., & Yang, M. (2003). Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun*, 312(2), 441-448. doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.135
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., & Fujimoto, N. (2002). Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(1), 554-559. doi:10.1016/S0006-291X(02)00262-0
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., . . . Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol Sci*, 84(2), 249-259. doi:10.1093/toxsci/kfi074
- Kosaka, K., Hayashida, T., Terasaki, M., Asami, M., Yamada, T., Itoh, M., & Akiba, M. (2012). Elution of bisphenol A and its chlorination by-products from lined pipes in water supply process. *Water Supply, Volume 12*(Issue 6), 791-798. doi:<https://doi.org/10.2166/ws.2012.055>
- Kurebayashi, H., Okudaira, K., & Ohno, Y. (2010). Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett*, 198(2), 210-215. doi:10.1016/j.toxlet.2010.06.017
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., & Terao, Y. (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol*, 19(1), 121-130. doi:10.1016/j.etap.2004.05.009
- Kuruto-Niwa, R., Terao, Y., & Nozawa, R. (2002). Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol*, 12(1), 27-35. doi:10.1016/s1382-6689(02)00011-x
- Lakind, J. S., Levesque, J., Dumas, P., Bryan, S., Clarke, J., & Naiman, D. Q. (2012). Comparing United States and Canadian population exposures from National Biomonitoring Surveys: bisphenol A intake as a case study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 22(3), 219-226. doi:10.1038/jes.2012.1
- Lan, J., Shen, Z., Gao, W., & Liu, A. (2019). Occurrence of bisphenol-A and its brominated derivatives in tributary and estuary of Xiaoqing River adjacent to Bohai Sea, China. *Mar Pollut Bull*, 149, 110551. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110551
- Lei, B., Tang, Q., Sun, S., Zhang, X., Huang, Y., & Xu, L. (2021). Insight into the mechanism of tetrachlorobisphenol A (TCBPA)-induced proliferation of breast cancer cells by GPER-mediated signaling pathways. *Environ Pollut*, 275, 116636. doi:10.1016/j.envpol.2021.116636

- Lei, B., Xu, J., Peng, W., Wen, Y., Zeng, X., Yu, Z., . . . Chen, T. (2017). In vitro profiling of toxicity and endocrine disrupting effects of bisphenol analogues by employing MCF-7 cells and two-hybrid yeast bioassay. *Environ Toxicol*, *32*(1), 278-289. doi:10.1002/tox.22234
- Li, A., Zhuang, T., Shi, W., Liang, Y., Liao, C., Song, M., & Jiang, G. (2020). Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China. *Sci Total Environ*, *707*, 136100. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136100
- Li, C., Wang, Z., Yang, Y. J., Liu, J., Mao, X., & Zhang, Y. (2015). Transformation of bisphenol A in water distribution systems: a pilot-scale study. *Chemosphere*, *125*, 86-93. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.047
- Liao, C., & Kannan, K. (2012). Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol*, *46*(9), 5003-5009. doi:10.1021/es300115a
- 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*(19), 4655-4662. doi:10.1021/jf400445n
- Lipscomb, J. C., Haddad, S., Poet, T., & Krishnan, K. (2012). PHYSIOLOGICALLY-BASED PHARMACOKINETIC (PBPK) MODELS IN TOXICITY TESTING AND RISK ASSESSMENT. In L. B. a. S. S. B. Media. (Ed.), *New Technologies for Toxicity Testing*.
- Liu, H., Zhao, H., Quan, X., Zhang, Y., & Chen, S. (2009). Formation of chlorinated intermediate from bisphenol A in surface saline water under simulated solar light irradiation. *Environ Sci Technol*, *43*(20), 7712-7717. doi:10.1021/es900811c
- Loccisano, A. E., Campbell, J. L., Jr., Butenhoff, J. L., Andersen, M. E., & Clewell, H. J., 3rd. (2012). Comparison and evaluation of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model. *Reprod Toxicol*, *33*(4), 452-467. doi:10.1016/j.reprotox.2011.04.006
- Mascolo, G., Locaputo, V., & Mininni, G. (2010). New perspective on the determination of flame retardants in sewage sludge by using ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry with different ion sources. *J Chromatogr A*, *1217*(27), 4601-4611. doi:10.1016/j.chroma.2010.05.003
- Masschelein, W. (1979). Chlorine Dioxide: Chemistry and Environmental Impact of Oxychlorine Compounds. *Ann Arbor Publishers*, 450 pp.
- Migeot, V., Dupuis, A., Cariot, A., Albouy-Llaty, M., Pierre, F., & Rabouan, S. (2013). Bisphenol a and its chlorinated derivatives in human colostrum. *Environ Sci Technol*, *47*(23), 13791-13797. doi:10.1021/es403071a
- Mirfazaelian, A., & Fisher, J. W. (2007). Organ growth functions in maturing male Sprague-Dawley rats based on a collective database. *J Toxicol Environ Health A*, *70*(12), 1052-1063. doi:10.1080/15287390601172106
- Mirfazaelian, A., Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., Tornero-Velez, R., Bruckner, J. V., & Fisher, J. W. (2006). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for

deltamethrin in the adult male Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci*, 93(2), 432-442. doi:10.1093/toxsci/kfl056

Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J. M., Real, M., Fernandez, M. F., . . . Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272(1), 127-136. doi:10.1016/j.taap.2013.05.015

Mutou, Y., Ibuki, Y., Terao, Y., Kojima, S., & Goto, R. (2006). Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol a after exposure to ultraviolet B. *Biol Pharm Bull*, 29(10), 2116-2119. doi:10.1248/bpb.29.2116

Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boehler, M., & Welshons, W. V. (1997). Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*, 105(1), 70-76. doi:10.1289/ehp.9710570

Nieuwenhuijsen, M., Paustenbach, D., & Duarte-Davidson, R. (2006). New developments in exposure assessment: the impact on the practice of health risk assessment and epidemiological studies. *Environ Int*, 32(8), 996-1009. doi:10.1016/j.envint.2006.06.015

Niu, Y., Wang, B., Yang, R., Wu, Y., Zhao, Y., Li, C., . . . Shao, B. (2021). Bisphenol Analogues and Their Chlorinated Derivatives in Breast Milk in China: Occurrence and Exposure Assessment. *J Agric Food Chem*, 69(4), 1391-1397. doi:10.1021/acs.jafc.0c06938

Olsen, C. M., Meussen-Elholm, E. T., Samuelsen, M., Holme, J. A., & Hongslo, J. K. (2003). Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacol Toxicol*, 92(4), 180-188. doi:10.1034/j.1600-0773.2003.920408.x

OMS. (1996). Chlorite in : Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, World Health Organization. . Volume 2.

Pellizzari, E. D., Woodruff, T. J., Boyles, R. R., Kannan, K., Beamer, P. I., Buckley, J. P., . . . Bennett, D. H. (2019). Identifying and Prioritizing Chemicals with Uncertain Burden of Exposure: Opportunities for Biomonitoring and Health-Related Research. *Environ Health Perspect*, 127(12), 126001. doi:10.1289/EHP5133

Plattard, N., Dupuis, A., Migeot, V., Haddad, S., & Venisse, N. (2021). An overview of the literature on emerging pollutants: Chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA). *Environ Int*, 153, 106547. doi:10.1016/j.envint.2021.106547

Plattard, N., Venisse, N., Carato, P., Dupuis, A., & Haddad, S. (2022). Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of bisphenol A (ClxBPA) and interspecies differences between rats and humans. *Arch Toxicol*. doi:10.1007/s00204-021-03217-7

Plattard N, Venisse N, Carato P, Dupuis A, Haddad S. Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of bisphenol A (ClxBPA) and interspecies differences between rats and humans.



Arch Toxicol. 2022 Mar;96(3):783-792. doi: 10.1007/s00204-021-03217-7. Epub 2022 Jan 24. PMID: 35072755.

Poulin, P., & Haddad, S. (2012). Advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue-composition-based model as a mechanistic animal alternative method. *J Pharm Sci*, 101(6), 2250-2261. doi:10.1002/jps.23090

Poulin, P., & Haddad, S. (2015). Albumin and Uptake of Drugs in Cells: Additional Validation Exercises of a Recently Published Equation that Quantifies the Albumin-Facilitated Uptake Mechanism(s) in Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling Research. *J Pharm Sci*, 104(12), 4448-4458. doi:10.1002/jps.24676

Poulin, P., & Krishnan, K. (1996a). A mechanistic algorithm for predicting blood:air partition coefficients of organic chemicals with the consideration of reversible binding in hemoglobin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 131-137. doi:10.1006/taap.1996.0016

Poulin, P., & Krishnan, K. (1996b). A tissue composition-based algorithm for predicting tissue:air partition coefficients of organic chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 126-130. doi:10.1006/taap.1996.0015

Qian, Y., Jia, X., Ding, T., Yang, M., Yang, B., & Li, J. (2021). Occurrence and removal of bisphenol analogues in wastewater treatment plants and activated sludge bioreactor. *Sci Total Environ*, 758, 143606. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143606

Qingdong, X., Guangming, Z., & Li, W. (2006). Study on subchronic toxicity of chlorine dioxide and by-products in water. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 41(7), 1347-1353. doi:10.1080/10934520600657016

Ramal-Sanchez, M., Valbonetti, L., Tsikis, G., Dubuisson, F., Blache, M. C., Labas, V., . . . Bernabo, N. (2019). Graphene oxide: A glimmer of hope for Assisted Reproductive Technology. *Carbon*, 150, 518-530. doi:10.1016/j.carbon.2019.05.055

Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., & Demarini, D. M. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat Res*, 636(1-3), 178-242. doi:10.1016/j.mrrev.2007.09.001

Riu, A., Grimaldi, M., le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., . . . Balaguer, P. (2011a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 119(9), 1227-1232. doi:10.1289/ehp.1003328

Riu, A., le Maire, A., Grimaldi, M., Audebert, M., Hillenweck, A., Bourguet, W., . . . Zalko, D. (2011b). Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci*, 122(2), 372-382. doi:10.1093/toxsci/kfr132

Riu, A., McCollum, C. W., Pinto, C. L., Grimaldi, M., Hillenweck, A., Perdu, E., . . . Gustafsson, J. A. (2014). Halogenated bisphenol-A analogs act as obesogens in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Toxicol Sci*, 139(1), 48-58. doi:10.1093/toxsci/kfu036

- Rivas, A., Lacroix, M., Olea-Serrano, F., Laios, I., Leclercq, G., & Olea, N. (2002). Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82(1), 45-53. doi:10.1016/s0960-0760(02)00146-2
- Rivett, A. J., Eddy, B. J., & Roth, J. A. (1982). Contribution of sulfate conjugation, deamination, and O-methylation to metabolism of dopamine and norepinephrine in human brain. *J Neurochem*, 39(4), 1009-1016. doi:10.1111/j.1471-4159.1982.tb11490.x
- Rodgers, T. R. M. (2005). Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling 2: Predicting the Tissue Distribution of Acids, Very Weak Bases, Neutrals and Zwitterions. *Wiley InterScience*, VOL.95. doi:DOI 10.1002/jps.20502
- Rodriguez, C. E., Mahle, D. A., Gearhart, J. M., Mattie, D. R., Lipscomb, J. C., Cook, R. S., & Barton, H. A. (2007). Predicting age-appropriate pharmacokinetics of six volatile organic compounds in the rat utilizing physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicol Sci*, 98(1), 43-56. doi:10.1093/toxsci/kfm082
- Rodriguez-Gomez, R., Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., & Navalon, A. (2014). A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure. *Talanta*, 130, 561-570. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.047
- Rodriguez-Gomez, R., Zafra-Gomez, A., Camino-Sanchez, F. J., Ballesteros, O., & Navalon, A. (2014). Gas chromatography and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk after stir-bar sorptive extraction. *J Chromatogr A*, 1349, 69-79. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.100
- Rook, J. J. (1974). Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *J. Water Treat. Exam.*
- Rouillon, S., El Ouazzani, H., Hardouin, J. B., Enjalbert, L., Rabouan, S., Migeot, V., & Albouy-Llaty, M. (2020). How to Educate Pregnant Women about Endocrine Disruptors? *Int J Environ Res Public Health*, 17(6). doi:10.3390/ijerph17062156
- Sasaki, K., & Terasaki, M. (2018). Estrogen agonistic/antagonistic activity of brominated parabens. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(21), 21257-21266. doi:10.1007/s11356-018-2600-3
- Schauer, U. M., Volkel, W., & Dekant, W. (2006). Toxicokinetics of tetrabromobisphenol a in humans and rats after oral administration. *Toxicol Sci*, 91(1), 49-58. doi:10.1093/toxsci/kfj132
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, 110(11), A703-707. doi:10.1289/ehp.110-1241091
- Sharma, R. P., Schuhmacher, M., & Kumar, V. (2018). The development of a pregnancy PBPK Model for Bisphenol A and its evaluation with the available biomonitoring data. *Sci Total Environ*, 624, 55-68. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.023

- Skledar.D.; Troberg.J.; Lavdas.J.; Masic.L, & Finel.M. (2014). Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica*, 511-519. doi:10.3109/00498254.2014.999140. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25547628.
- Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C., & Fennell, T. R. (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 168(3), 225-234. doi:10.1006/taap.2000.9051
- Somm, E., Schwitzgebel, V. M., Toulotte, A., Cederroth, C. R., Combescure, C., Nef, S., . . . Huppi, P. S. (2009). Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect*, 117(10), 1549-1555. doi:10.1289/ehp.11342
- Song, S., Song, M., Zeng, L., Wang, T., Liu, R., Ruan, T., & Jiang, G. (2014). Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environ Pollut*, 186, 14-19. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.023
- Sonker, A. K., Bhatia, 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. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.129624
- Sorlini, S., Gialdini, F., Biasibetti, M., & Collivignarelli, C. (2014). Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. *Water Res*, 54, 44-52. doi:10.1016/j.watres.2014.01.038
- Stulcova, B. (1977). Postnatal development of cardiac output distribution measured by radioactive microspheres in rats. *Biol Neonate*, 32(3-4), 119-124. doi:10.1159/000241004
- Swedenborg, E., Ruegg, J., Makela, S., & Pongratz, I. (2009). Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol*, 43(1), 1-10. doi:10.1677/JME-08-0132
- Takahashi, O., & Oishi, S. (2000). Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect*, 108(10), 931-935. doi:10.1289/ehp.00108931
- Takemura, H., Ma, J., Sayama, K., Terao, Y., Zhu, B. T., & Shimoi, K. (2005). In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology*, 207(2), 215-221. doi:10.1016/j.tox.2004.09.015
- Takigami, H., Suzuki, G., Hirai, Y., & Sakai, S. (2009). Brominated flame retardants and other polyhalogenated compounds in indoor air and dust from two houses in Japan. *Chemosphere*, 76(2), 270-277. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.006
- Teeguarden, J. G., Waechter, J. M., Jr., Clewell, H. J., 3rd, Covington, T. R., & Barton, H. A. (2005). Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci*, 85(2), 823-838. doi:10.1093/toxsci/kfi135

- Terasaki, M., Kosaka, K., Kunikane, S., Makino, M., & Shiraishi, F. (2011). Assessment of thyroid hormone activity of halogenated bisphenol A using a yeast two-hybrid assay. *Chemosphere*, *84*(10), 1527-1530. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.04.045
- Tian, J., Ji, Z., Wang, F., Song, M., & Li, H. (2017). The Toxic Effects of Tetrachlorobisphenol A in *Saccharomyces cerevisiae* Cells via Metabolic Interference. *Sci Rep*, *7*(1), 2655. doi:10.1038/s41598-017-02939-y
- Trasande, L., Zoeller, R. T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J. P., . . . Heindel, J. J. (2015). Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European union. *J Clin Endocrinol Metab*, *100*(4), 1245-1255. doi:10.1210/jc.2014-4324
- Trasande, L., Zoeller, R. T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J. P., . . . Heindel, J. J. (2016). Burden of disease and costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union: an updated analysis. *Andrology*, *4*(4), 565-572. doi:10.1111/andr.12178
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*, *2*(4), 236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879
- Vandenberg, L. N., Gerona, R. R., Kannan, K., Taylor, J. A., van Breemen, R. B., Dickenson, C. A., . . . Woodruff, T. J. (2014). A round robin approach to the analysis of bisphenol A (BPA) in human blood samples. *Environ Health*, *13*(1), 25. doi:10.1186/1476-069X-13-25
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, *24*(2), 139-177. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- Vandentorren, S., Bois, C., Pirus, C., Sarter, H., Salines, G., Leridon, H., & Elfe, t. (2009). Rationales, design and recruitment for the Elfe longitudinal study. *BMC Pediatr*, *9*, 58. doi:10.1186/1471-2431-9-58
- Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Camino-Sanchez, F. J., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, L., & Narvalon, A. (2015). Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Microchemical Journal*, *Volume 118*, 32-39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.07.018>
- Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, L., & Navalon, A. (2014). UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. *Anal Bioanal Chem*, *406*(15), 3773-3785. doi:10.1007/s00216-014-7785-9
- Vela-Soria, F., Jimenez-Diaz, I., Rodriguez-Gomez, R., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Fernandez, M. F., . . . Navalon, A. (2011). A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC-MS/MS. *Analytical Methods*(9). doi:10.1039/c1ay05162h
- Venisse, N., Cambien, G., Robin, J., Rouillon, S., Nadeau, C., Charles, T., . . . Dupuis, A. (2019). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of

- bisphenol A and its chlorinated derivatives in adipose tissue. *Talanta*, 204, 145-152. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.103
- Venisse, N., Grignon, C., Brunet, B., Thevenot, S., Bacle, A., Migeot, V., & Dupuis, A. (2014). Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC-MS/MS method. *Talanta*, 125, 284-292. doi:10.1016/j.talanta.2014.02.064
- Verner, M. A., Ayotte, P., Muckle, G., Charbonneau, M., & Haddad, S. (2009). A physiologically based pharmacokinetic model for the assessment of infant exposure to persistent organic pollutants in epidemiologic studies. *Environ Health Perspect*, 117(3), 481-487. doi:10.1289/ehp.0800047
- Vogel, S. A. (2009). The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health*, 99 Suppl 3, S559-566. doi:10.2105/AJPH.2008.159228
- Volkel, 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(11), 1748-1757. doi:10.1124/dmd.105.005454
- Volkel, W., Colnot, T., Csanady, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, 15(10), 1281-1287. doi:10.1021/tx025548t
- Volkel, W., Kiranoglu, M., & Fromme, H. (2008). Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett*, 179(3), 155-162. doi:10.1016/j.toxlet.2008.05.002
- Wan, D., Wang, H., Pozdnyakov, I. P., Wang, C., Su, J., Zhang, Y., . . . Chen, Y. (2020). Formation and enhanced photodegradation of chlorinated derivatives of bisphenol A in wastewater treatment plant effluent. *Water Res*, 184, 116002. doi:10.1016/j.watres.2020.116002
- Wang, W., Abualnaja, K. O., Asimakopoulos, A. G., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., . . . 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. doi:10.1016/j.envint.2015.06.015
- Wang, Y., Zhang, W., Li, A., & Song, M. (2021). Tetrachlorobisphenol A induced immunosuppression and uterine injury in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 207, 111527. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111527
- Waters, N. J., Jones, R., Williams, G., & Sohal, B. (2008). Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *J Pharm Sci*, 97(10), 4586-4595. doi:10.1002/jps.21317
- Wu, Y., Li, Y., Kang, D., Wang, J., Zhang, Y., Du, D., . . . Dong, Q. (2016). Tetrabromobisphenol A and heavy metal exposure via dust ingestion in an e-waste recycling region in Southeast China. *Sci Total Environ*, 541, 356-364. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.038

- Yamamoto, T., & Yasuhara, A. (2002). Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere*, *46*(8), 1215-1223. doi:10.1016/s0045-6535(01)00198-9
- Yamauchi, K., Ishihara, A., Fukazawa, H., & Terao, Y. (2003). Competitive interactions of chlorinated phenol compounds with 3,3',5-triiodothyronine binding to transthyretin: detection of possible thyroid-disrupting chemicals in environmental waste water. *Toxicol Appl Pharmacol*, *187*(2), 110-117. doi:10.1016/s0041-008x(02)00045-5
- Yang, X., Doerge, D. R., & Fisher, J. W. (2013). Prediction and evaluation of route dependent dosimetry of BPA in rats at different life stages using a physiologically based pharmacokinetic model. *Toxicol Appl Pharmacol*, *270*(1), 45-59. doi:10.1016/j.taap.2013.03.022
- Yang, Y., Guan, J., Yin, J., Shao, B., & Li, H. (2014). Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*, *112*, 481-486. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.004
- Ye, X., Bishop, A. M., Reidy, J. A., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2007). Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, *17*(6), 567-572. doi:10.1038/sj.jes.7500566
- Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2005). Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, *383*(4), 638-644. doi:10.1007/s00216-005-0019-4
- Ye, Z., Zetterberg, C., & Gao, H. (2017). Automation of plasma protein binding assay using rapid equilibrium dialysis device and Tecan workstation. *J Pharm Biomed Anal*, *140*, 210-214. doi:10.1016/j.jpba.2017.03.019
- Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S., & Yuasa, A. (1999). Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*, *340* ( Pt 2), 405-409. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333482>
- Yu, Y., Yu, Z., Chen, H., Han, Y., Xiang, M., Chen, X., . . . Wang, Z. (2019). Tetrabromobisphenol A: Disposition, kinetics and toxicity in animals and humans. *Environ Pollut*, *253*, 909-917. doi:10.1016/j.envpol.2019.07.067
- Yuan, S. Y., Li, H. T., Huang, H. W., & Chang, B. V. (2010). Biodegradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment and the microbial community changes. *J Environ Sci Health B*, *45*(5), 360-365. doi:10.1080/03601231003799820
- Zhang, X., Zhang, Y., Ji, Z., Wang, F., Zhang, L., Song, M., & Li, H. (2020). Oxidative damage mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to tetrachlorobisphenol A. *Environ Toxicol Pharmacol*, *80*, 103507. doi:10.1016/j.etap.2020.103507
- Zhao, C., Tang, Z., Chung, A. C. K., Wang, H., & Cai, Z. (2019). Metabolic perturbation, proliferation and reactive oxygen species jointly contribute to cytotoxicity of human breast

cancer cell induced by tetrabromo and tetrachloro bisphenol A. *Ecotoxicol Environ Saf*, 170, 495-501. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.12.018

Zheng, S., Shi, J., Zhang, J., Yang, Y., Hu, J., & Shao, B. (2018). Identification of the disinfection byproducts of bisphenol S and the disrupting effect on peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) induced by chlorination. *Water Res*, 132, 167-176. doi:10.1016/j.watres.2017.12.071

Zheng, S., Shi, J. C., Hu, J. Y., Hu, W. X., Zhang, J., & Shao, B. (2016). Chlorination of bisphenol F and the estrogenic and peroxisome proliferator-activated receptor gamma effects of its disinfection byproducts. *Water Res*, 107, 1-10. doi:10.1016/j.watres.2016.10.048

Zhou, Y., Chen, M., Zhao, F., Mu, D., Zhang, Z., & Hu, J. (2015). Ubiquitous occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A and nonylphenol in bleached food contacting papers and their implications for human exposure. *Environ Sci Technol*, 49(12), 7218-7226. doi:10.1021/acs.est.5b00831

## 8 Annexe 1

---

### **An overview of the literature on emerging pollutants: Chlorinated derivatives of bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA)**

**Un aperçu de la littérature sur les polluants émergents : les dérivés  
chlorés du bisphénol A (Cl<sub>x</sub>BPA)**

*Plattard.N<sup>a, b</sup>, Dupuis.A<sup>b, c</sup>, Migeot.V<sup>b</sup>, Haddad.S<sup>a</sup>, Venisse.N<sup>b, c\*</sup>*

<sup>a</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, CresP,  
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup> INSERM CIC1402, CHU Poitiers, Université de Poitiers, HEDEX Research Group, 86021,  
Poitiers Cedex, France

<sup>c</sup> Biology-Pharmacy-Public Health Department, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86201,  
Poitiers Cedex, France

\*Auteur-ressource

L'article a été soumis à la revue **Environnement international** (IF = 9.621, 2021) le 20 janvier  
2021. Il a été publié en ligne le 05 avril 2021.

**Plattard N.**, Dupuis A, Migeot V, Haddad S, Venisse N. An overview of the literature on  
emerging pollutants : Chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl<sub>x</sub>BPA). Environ Int. 2021 Aug;  
153:106547. Doi: [10.1016/j.envint.2021.106547](https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106547). Epub 2021 Apr 5. PMID: 33831741.



## 8.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs

**Noémie Plattard:** L'étudiante a contribué à l'écriture de cette revue de littérature, ainsi que les corrections subséquentes.

**Antoine Dupuis:** Dr. Dupuis fait partie intégrante du projet de recherche financé par l'ANSES et a aussi contribué à la rédaction de cet article.

**Virginie Migeot :** Dr Migeot a contribué à la rédaction de ce manuscrit.

**Sami Haddad :** Dr. Haddad est le co-chercheur du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à l'élaboration du projet de recherche et a aussi contribué à sa rédaction.

**Nicolas Venisse:** Dr. Venisse est le chercheur principal du projet de recherche financé par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à la rédaction de cet article.

## 8.2 Résumé

Le bisphénol A (BPA) est un contaminant ubiquitaire ayant des effets de perturbation endocrinienne chez les mammifères. Lors du traitement par chloration de l'eau potable, le BPA aqueux peut réagir avec le chlore pour former des dérivés chlorés du BPA (dérivés mono, di, tri et tétra-chlorés) ou Cl<sub>x</sub>BPA. L'objectif de cette étude est de résumer et de présenter l'état des connaissances sur l'évaluation des risques toxicologiques du Cl<sub>x</sub>BPA pour l'humain.

Une recherche sur les Cl<sub>x</sub>BPA dans la base de données PubMed a été réalisée à partir des études publiées entre 2002 et 2021. Quarante-neuf études sur les dérivés chlorés du BPA ont été trouvées. Les informations disponibles sur leurs sources et niveaux d'exposition, leurs effets, leurs mécanismes d'action possibles et leurs données toxicocinétiques ont été extraites et présentées. Les Cl<sub>x</sub>BPA ont été essentiellement détectés dans les milieux aqueux environnementaux. Des études toxicologiques et épidémiologiques ont démontré que les Cl<sub>x</sub>BPA ont également des capacités de perturbation endocrinienne. Ces polluants émergents ont été retrouvés dans l'urine, le sérum, le lait maternel, les tissus adipeux et placentaires humains et peuvent constituer un risque pour la santé humaine. Cependant, les données toxicocinétiques *in vitro* et *in vivo* sur le Cl<sub>x</sub>BPA sont rares et ne permettent pas de caractériser la cinétique de disposition de ces composés. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leurs risques pour la santé, en particulier chez les populations vulnérables. Certains procédés de chloration de l'eau sont particulièrement dangereux, et il est important d'évaluer leurs sous-produits de chloration dans une perspective de santé publique.

**Mots clés:** Dérivés chlorés du BPA, analyse du risque, revue de littérature, perturbateurs endocriniens, toxicologie.

## 8.3 Abstract

*Context:* Bisphenol A (BPA) is a ubiquitous contaminant with endocrine-disrupting effects in mammals. During chlorination treatment of drinking water, aqueous BPA can react with chlorine to form chlorinated derivatives of BPA (mono, di, tri and tetra-chlorinated derivatives) or Cl<sub>x</sub>BPA. *Objective:* The aim of this study is to summarize and present the state of knowledge on human toxicological risk assessment of Cl<sub>x</sub>BPA. *Materials and Methods:* A search on Cl<sub>x</sub>BPA in the PubMed database was performed based on studies published between 2002 and 2021. Forty-nine studies on chlorinated derivatives of BPA were found. Available information on their sources and levels of exposure, their effects, their possible mechanisms of action and their toxicokinetics data was extracted and presented. *Results:* Cl<sub>x</sub>BPA have been essentially detected in environmental aqueous media. There is evidence in toxicological and epidemiological studies that Cl<sub>x</sub>BPA also have endocrine-disrupting capabilities. These emerging pollutants have been found in human urine, serum, breast milk, adipose and placental tissue and can constitute a risk to human health. However, *in vitro*, and *in vivo* toxicokinetic data on Cl<sub>x</sub>BPA are scarce and do not allow characterization of the disposition kinetics of these compounds. *Conclusion:* More research to assess their health risks, specifically in vulnerable populations, is needed. Some water chlorination processes are particularly hazardous, and it is important to evaluate their chlorination by-products from a public health perspective.

**Keywords:** Derivatives chlorinated of BPA, risk assessment, literature review, endocrine disrupting chemicals, toxicology.

## 8.4 Introduction

A wide variety of chemicals are constantly being introduced into our environment. The toxicological consequences of exposure to these compounds and their impact on the health of the population are a growing concern. It is now widely accepted that the occurrence of certain chronic diseases is the result of a complex interaction between environmental and genetic factors (Feinberg, 2007). Among these chemicals, the class of endocrine disruptors (EDs) is of particular concern. The term endocrine disruptor applies to compounds that can affect the endogenous hormones, or associated systems, responsible for transmitting a signal from one cell to another. There are approximately 900 chemicals that have been identified as endocrine disruptors by the European Union in three different lists: list I (Substances identified as endocrine disruptors at EU level), list II (Substances under evaluation for endocrine disruption under EU legislation) and list III (substances considered, by the evaluating national authority to have endocrine-disrupting properties) (EU, 2020). Exposure to endocrine disruptors has been associated with health problems in humans, including infertility, diabetes and brain development disorders and constitute a major risk for human health (Kahn et al., 2020). In addition to causing health problems, endocrine disruptors have a strong impact on state economies. More precisely, the economic burdens linked to endocrine disruptors have been estimated at 163 billion € in the EU and 340 billion \$ in the USA, annually (Attina et al., 2016; Kassotis et al., 2020; Trasande et al., 2015; Trasande et al., 2016).

Currently, endocrine disruptors remain present in our daily lives (cosmetics, food, water, personal care products, laptop, sofa, etc) despite regulations and policies aimed at reducing them. They constitute a particular concern for vulnerable populations (mainly pregnant women and infants mainly) (Kassotis et al., 2020). According to the Developmental Origins of Health and Disease (DoHaD) hypothesis, there exist windows of susceptibility during which the development of a tissue can be modified by environmental factors (Heindel et al., 2017). Even at low doses, exposure to endocrine disruptors during the susceptibility period can cause dysfunctions and diseases that will appear later in life (Heindel et al., 2017). Large numbers and quantities of endocrine disruptors have been released into the environment since World War II (Colborn et al., 1993). Currently,

exposure to environmental chemicals including some endocrine disruptors is life-long and has been found in human urine, serum, and tissue (Calafat et al., 2008; Dodson et al., 2012; Kato et al., 2011). Various measurements reflect contact with endocrine disruptors through food, water, skin absorption, and from atmosphere.

Presently, our water is contaminated by a multitude of chemicals including BPA, an additive widely used in the manufacture of polycarbonate and epoxy resin plastics. BPA is a ubiquitous contaminant in the environment, found in tap water (Dupuis et al., 2012; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015; Zhou et al., 2015) and it can react with a multitude of substances in water such as hypochlorite ions ( $\text{ClO}^-$ ) from sodium hypochlorite ( $\text{NaOCl}$ ) which are often added to tap water as a disinfectant (Fukazawa et al., 2001; Gallart-Ayala et al., 2010). They are also used to remove lignin (a component of wood), for pulp thinning and as a bleaching agent in paper production (Zhou et al., 2015). An emerging group of contaminants that form primarily in water pose a risk to the human population: the chlorinated derivatives of BPA or  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  ( $\text{ClBPA}$ ,  $3,3'\text{-Cl}_2\text{BPA}$ ,  $3,5\text{-Cl}_2\text{BPA}$ ,  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  and  $\text{Cl}_4\text{BPA}$ ). Hypochlorite ions ( $\text{ClO}^-$ ) are responsible for the electrophilic attack of phenolic groups on the BPA molecule, acting as a precursor to the formation of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  as presented in Figure 33 (Andra, Charisiadis, et al., 2015; Gallard et al., 2004; Hu et al., 2002; Liu et al., 2009). The formation pathway with chlorine-substitution reaction presented in Figure 33 was originally proposed by Hu. *J et al.* (2002). Moreover,  $\text{Cl}_3\text{BPA}$  and  $\text{Cl}_4\text{BPA}$  have been identified as chemical priorities because their burden of exposure is uncertain, especially  $\text{Cl}_4\text{BPA}$ , which has been unsystematically found in human bio- monitoring studies when used as a flame retardant, just after TBBPA (Pellizzari et al., 2019).  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  have been detected in various aqueous media (Chang et al., 2014; Dorival-Garcia et al., 2012; Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013; Gallart-Ayala et al., 2010; Li et al., 2015; Song et al., 2014; Yuan et al., 2010). Moreover,  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  are also found in human biological matrices (Cambien et al., 2020; Fernandez et al., 2007; Li et al., 2020; Migeot et al., 2013; Niu et al., 2021; Venisse et al., 2014). The study of these emerging pollutants is therefore very important to understand how we are exposed, and to consequently prevent the populations most sensitive to endocrine disruptors from being exposed.

The objective of this study is to provide an overview of the scientific literature using the PubMed database on these emerging pollutants, the chlorinated derivatives of BPA ( $\text{Cl}_x\text{BPA}$ ). The toxic effects, their possible mechanisms of action, their sources, and levels of exposure, as well as the scarce information available on the toxicokinetics of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  are highlighted in this article.

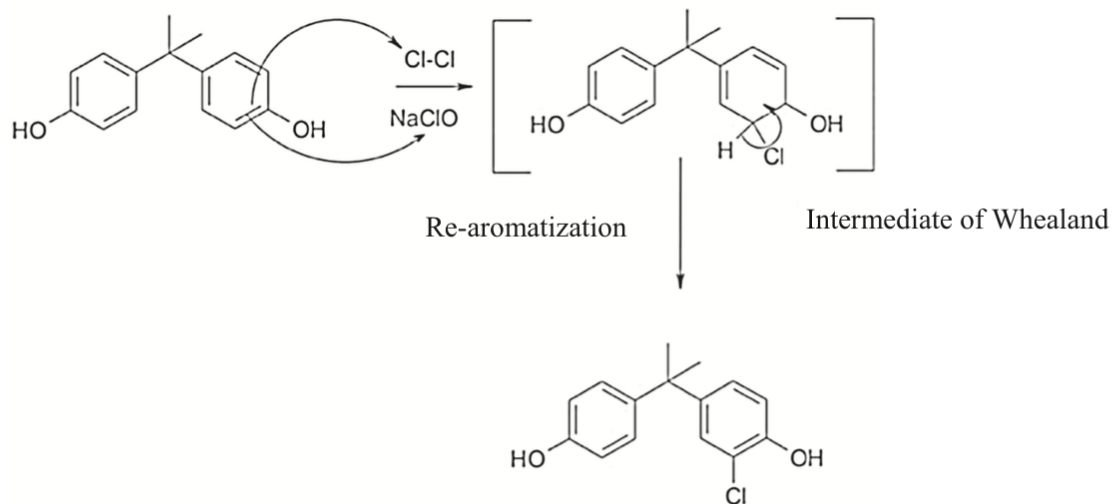


Figure 33. Reaction between BPA and sodium hypochlorite ( $\text{NaOCl}$ ) (Hu et al., 2002)

## 8.5 Literature search

Articles for this review were searched in PubMed and selected according to the chart reported in Figure 34.

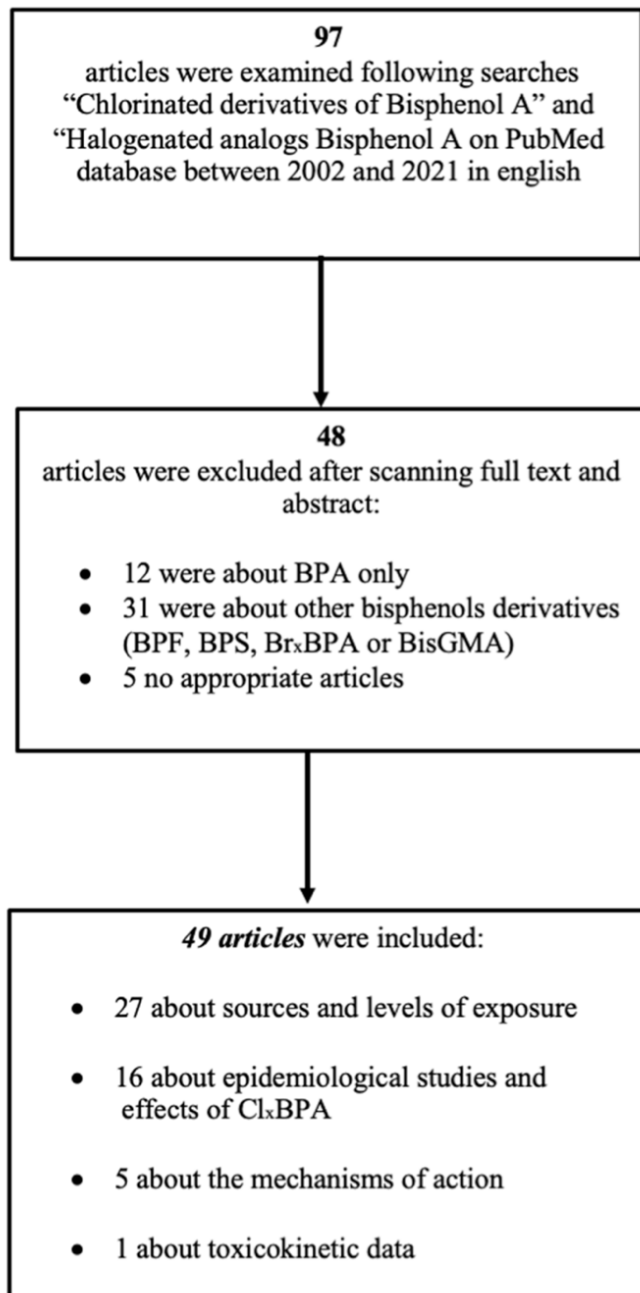


Figure 34. Search strategy that shows the various steps of selection, identification, and inclusion/exclusion until the final list.

## 8.6 Levels and sources of exposure to Cl<sub>x</sub>BPA

### 8.6.1 Sources of exposure to Cl<sub>x</sub>BPA

Chlorinated derivatives of BPA (see Figure 35) have been detected in different aqueous media such as wastewater treatment plant (WWTPs) (Dorival-Garcia et al., 2012; Gallart-Ayala et al., 2010), sewage sludge (Song et al., 2014), sediments (Chang et al., 2014; Yuan et al., 2010), distribution pipes as well as in drinking water (Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015).

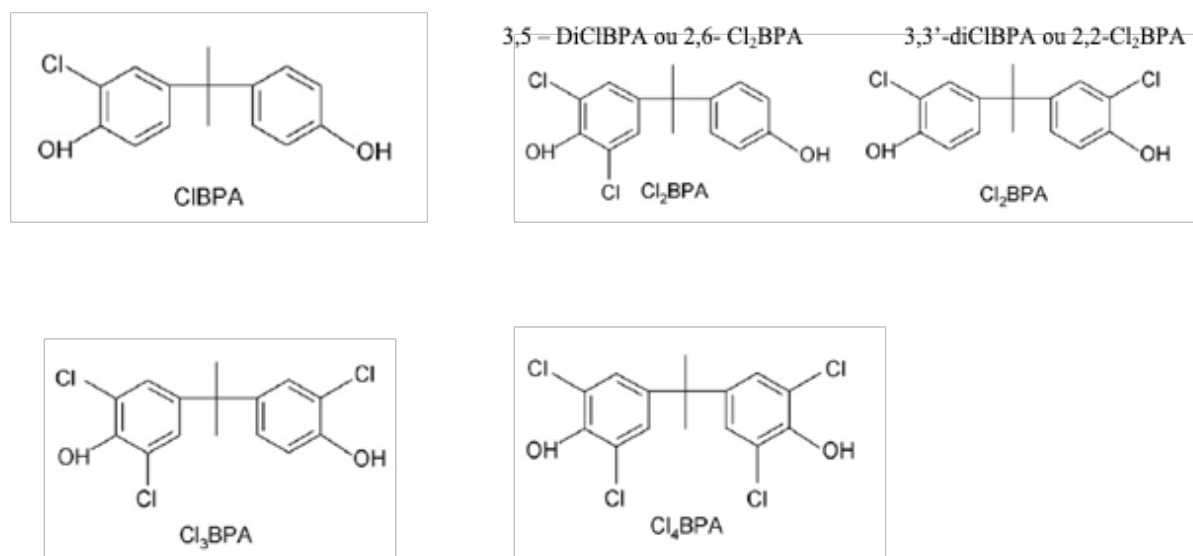


Figure 35. Molecular structures of ClBPA, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA, 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA

Cl<sub>x</sub>BPA have been detected in wastewater from wastepaper recycling plants in Japan, in which ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA were found (Fukazawa et al., 2001). Furthermore, while Cl<sub>4</sub>BPA was frequently (57.7%) detected in sewage sludge in China at a median concentration of 0.29 ng/g (Fukazawa et al., 2001), a recent study by Qian.Y *et al.* (2021) did not find any Cl<sub>4</sub>BPA in wastewater or sludge from WWTPs in Shenzhen, China (Qian et al., 2021). Fukazawa *et al.* (2001) showed that ClBPA degrades much faster than the other three Cl<sub>x</sub>BPA in the final effluents of eight paper manufacturing plants (Fukazawa et al., 2001). Compared to Cl<sub>2</sub>BPA



which is biodegraded very slowly, BPA and ClBPA have been shown to be rapidly biodegraded, i.e., more than 50% disappear after one day (Fukazawa et al., 2001). The differences in Cl<sub>x</sub>BPA detected in the effluents of these plants may be explained by the different pulping processes used and the treatments applied to wastewater (Fukazawa et al., 2001). Moreover, Wan.D *et al.* (2020) added Cl<sub>x</sub>BPA to an effluent organic matter solution (EfOM) under simulated sunlight to observe the environmental fate of Cl<sub>x</sub>BPAs in WWTP effluent and to demonstrate the photodegradation of these emerging pollutants. The authors suggest that photodegradation is an important pathway for the removal and detoxication of Cl<sub>x</sub>BPA from effluents and in the receiving of natural waters under sunlight. A high degree of chlorination facilitates photodegradation (Wan et al., 2020).

In general, there is very limited scientific literature on the degradation products of Cl<sub>x</sub>BPA in drinking water. However, two studies by Yamamoto et al. (2002) and Bourgin et al. (2013) have shown that after the formation of Cl<sub>4</sub>BPA, the last Cl<sub>x</sub>BPA formed, the isopropylidene chain of this compound is attacked by hypochlorite ion, and then cleaved to form 2,4,6-trichlorophenol (T<sub>3</sub>CP) and C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bourgin et al., 2013; Yamamoto et al., 2002). Then, these two degradation products are transformed into two distinct molecules: one by dehydration and the other by methylation but the authors have yet to determine what drives these transformations (Yamamoto et al., 2002). At present, they have not demonstrated any potential toxicity of the degradation products of Cl<sub>x</sub>BPA. Their experiments were conducted *in vitro* and presence of the degradation products in environmental media was not reported.

High concentrations of BPA and Cl<sub>x</sub>BPA are generally found in drinking water treatment plants near major cities in China (Fan et al., 2013). Among the four chlorinated derivatives of BPA quantified in tap water, mono-chlorinated BPA (ClBPA) had the highest detection rate (100%) and the highest concentration (maximum: 26.7 ng/L) compared to Cl<sub>2</sub>BPA (98%, 6.3 ng/L), Cl<sub>3</sub>BPA (60%, 7.7 ng/L), and Cl<sub>4</sub>BPA (50%, 4.9 ng/L) (Fan et al., 2013). Similarly, Doumas.M, *et al.*, (2018) have found comparable concentrations and detection rates (85.71% detected for ClBPA, 66.67% for Cl<sub>2</sub>BPA, 76.19% for Cl<sub>3</sub>BPA and 61.90% for Cl<sub>4</sub>BPA) in tap water in women's homes (n = 21) in the BREDI cohort (Breast Endocrine Disruptors Investigation) in France (Doumas et al., 2018). Finally, Cl<sub>x</sub>BPA are all present in drinking

water, which is the primary route of exposure for these emerging substances (Andra, Charisiadis, et al., 2015; Kosaka et al., 2012; Li et al., 2015). Contamination through dermal contact during domestic use (shower, bath, etc.) and swimming pool could also be a relevant route of exposure, but it has yet to be studied. Furthermore, Kalyvas *et al.* (2014) found no association between urinary ClBPA, and personal hygiene activities assessed by questionnaire, but additional studies are required for confirmation (Kalyvas et al., 2014).

Cl<sub>x</sub>BPA have also been found in medical water used for hemodialysis. A recent study demonstrated that patients suffering from end-stage renal disease (ESRD) treated by online hemodiafiltration (OL-HDF) have a risk of overexposure to both BPA and to Cl<sub>x</sub>BPA provided by intravenous infusion of replacement fluid (Bacle et al., 2019). Using OL-HDF, large amounts of BPA and Cl<sub>x</sub>BPA are directly available for systemic exposure and while the risk for these chronically ill patients is unknown, it remains concerning. Patients treated for years at a rate of 3 to 4 sessions per week on average are thereby chronically exposed to the BPA transmitted by medical devices as well as the BPA and Cl<sub>x</sub>BPA in water (about 170 L for a session), which constitutes a risk for this vulnerable population (Bacle et al., 2019). Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA were most frequently detected in water samples collected at the entrance of the water purification,  $15.30 \pm 13.00$  ng/L and  $1.90 \pm 2.30$  ng/L on average, respectively. ClBPA and Cl<sub>3</sub>BPA were also detected, but most often at a level below LOQ. These results demonstrate that dialysis water must be considered as an important source of exposure to endocrine disruptors.

Cl<sub>x</sub>BPA were also detected in food contact papers (FCPs) in which they had detection frequencies of 41% for ClBPA, 24% for Cl<sub>2</sub>BPA (mixture of 2,6-Cl<sub>2</sub>BPA and 2,2'-Cl<sub>2</sub>BPA, 1/0.25 (v/v), 11% for Cl<sub>3</sub>BPA, and 11% for Cl<sub>4</sub>BPA (Zhou et al., 2015). However, ClBPA was pre-dominant with a mean concentration of  $0.016 \pm 0.044$  ng/g, followed by Cl<sub>2</sub>BPA with a mean concentration of  $0.0063 \pm 0.020$  ng/g (Zhou et al., 2015). Regarding food contact papers (FCPs), Zhou et al. (2015) compared bleached and unbleached paper to determine whether the same detection frequencies were always present. Almost no Cl<sub>x</sub>BPA (<10% of Cl<sub>x</sub>BPA) was found in unbleached paper.

Cl<sub>x</sub>BPA present in some bleached coffee filters and food packages can migrate into food and beverages. Zhou *et al.* (2015) have shown that Cl<sub>x</sub>BPA were found at higher concentrations in bleached FCPs in comparison to unbleached FCPs and that the concentration level is related to the initial BPA concentration and depends on paper bleaching processes. The maximum concentration of BPA that migrated from a coffee filter to a cup of coffee (150 ml) was 100 ± 14 ng /L (Zhou et al., 2015). Furthermore, chlorinated derivatives of BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) could migrate from coffee filters into coffee solutions with migration proportion of 47 ± 1.4% for ClBPA, while other Cl<sub>x</sub>BPA were not found compared to BPA (71 ± 10%) (Zhou et al., 2015).

In conclusion, these results show that the use of coffee filters or other FCPs could significantly increase human exposure to Cl<sub>x</sub>BPA from food products and that migration of these substances from coffee filters could be an important route of human exposure. These findings are particularly important for people who consume large amounts of coffee (Zhou et al., 2015). Residual BPA is often found in household cleaning and personal care products (Dodson et al., 2012; Liao et al., 2013). A major source for the dermal and inhalation route of exposure is the use of cleaning products that could act as a precursor to the formation of Cl<sub>x</sub>BPA in contact with chlorinated tap water such as dishwasher detergents, bleach or scouring powders, cleaning products containing sodium hypochlorite (Kalyvas et al., 2014). In the study by Kalyvas *et al.* (2014) exposure to ClBPA was more common among women (1.35 times more than men), who did the dishes by hand, as well as household chores in general.

For tetrachlorobisphenol A (Cl<sub>4</sub>BPA), the sources of exposure are very different from other Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA) because this substance is used as halogenated flame-retardant (Tian et al., 2017; Zhao et al., 2019) while the other Cl<sub>x</sub>BPA are not. It is also used as an additive in plastics, building materials and synthetic textiles (Kitamura et al., 2002; Molina-Molina et al., 2013). In addition, some countries such as China use it as an antibacterial agent. However, halogenated organic compounds, including Cl<sub>4</sub>BPA, which are released from flame retardant materials can contaminate soil, water, sediments, and other environmental media, thereby entering the human body, animals, plants, and other biological media (Chang et al., 2014; Chu et al., 2005; Yuan et al., 2010). Long-term accumulation of Cl<sub>4</sub>BPA may reach toxic

concentrations due to biomagnification of the food chain and could also have adverse effects on wildlife and human life due to its persistence, lipophilic characteristics, and bioaccumulation (Huang et al., 2013; Mascolo et al., 2010). Moreover, Cl<sub>4</sub>BPA is not readily biodegradable under the same conditions as ClBPA and BPA (Fukazawa et al., 2001).

No studies have documented the presence of Cl<sub>4</sub>BPA in indoor dust. However, another halogenated BPA, tetrabromobisphenol A (TBBPA), has been found in indoor dust at very high concentrations (3435 ng/g) in Chinese houses near electronic waste centers (Wu et al., 2016), Belgium (0.85–1480 ng/g), Japan (490–520 ng/g) and the United Kingdom (<1–382 ng/g) (Abdallah et al., 2008; Geens et al., 2009; Takigami et al., 2009). It should be noted that TBBPA is the most widely used halogenated flame retardant in the world, accounting for 60% of the global flame-retardant market (Wang et al., 2015). However, the exposure data for tetrachlorobisphenol A (Cl<sub>4</sub>BPA) do not reflect a second source of exposure as a flame retardant. It is possible that Cl<sub>4</sub>BPA is not sufficiently used in this application to allow observations of observe higher concentrations compared to other Cl<sub>x</sub>BPA in different human biological matrices. In addition, one can hypothesize that despite its higher lipophilicity, Cl<sub>4</sub>BPA does not accumulate in the body despite its higher lipophilicity (Doumas et al., 2018).

Finally, it has been hypothesized that free chlorine atoms or chloroform in air could react with BPA, leading to the formation of Cl<sub>x</sub>BPA and subsequent exposures, but this has yet to be demonstrated experimentally (Kalyvas et al., 2014). Figure 36 represents a conceptual diagram of exposure to Cl<sub>x</sub>BPA, which summarizes the sources of exposure to these emerging pollutants.

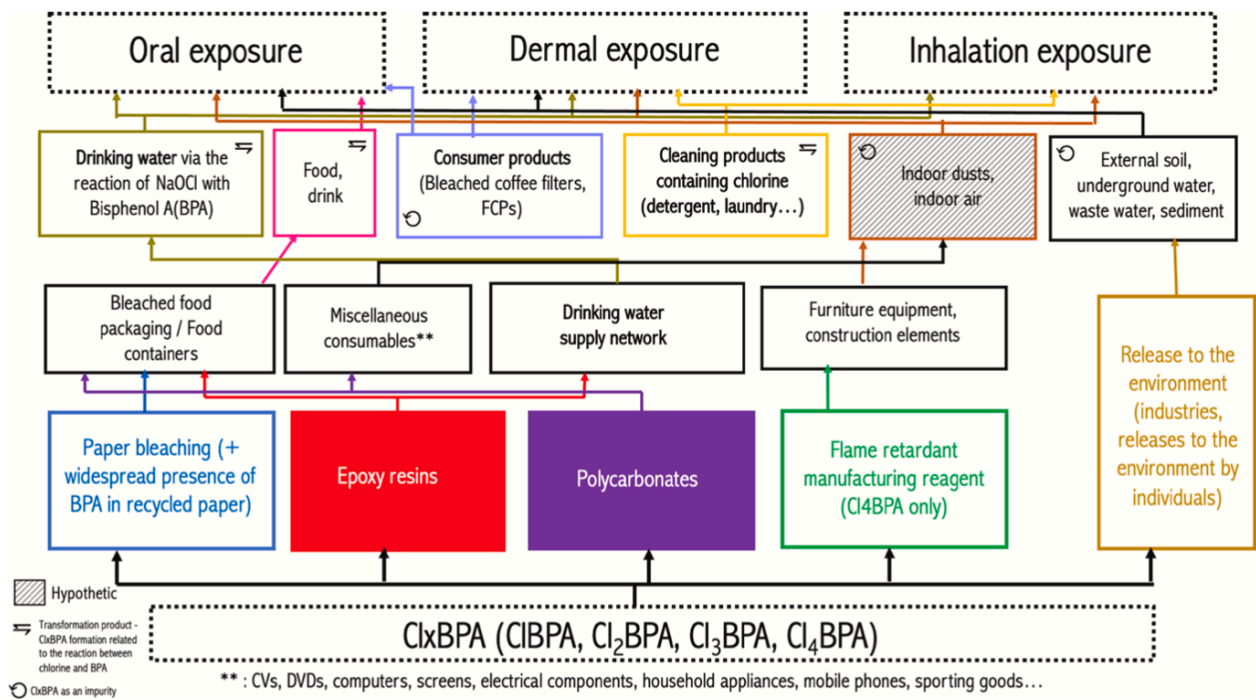


Figure 36. Conceptual diagram of exposure to chlorinated derivatives of BPA (Cl<sub>x</sub>BPA)

## 8.6.2 Exposure levels

In this subsection, we focus on human exposure of public health concern by evaluating the health risks of these emerging pollutants. Knowledge on exposure pathways is important, but it also matters to determine whether the exposure levels of Cl<sub>x</sub>BPA present a risk to human health. For that purpose, Tableau 28 describes the available data on exposure levels in human tissues and matrices. Earlier exposure data and the analytical methods developed for Cl<sub>x</sub>BPA determination in human matrices, were previously reviewed by Andra *et al.* (2016).

Cl<sub>x</sub>BPA were found in different tissues and body fluids in the general population. However, some compounds are present in greater quantities in certain human matrices than in others. This is notably the case for Cl<sub>2</sub>BPA (mix of two forms: 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA and 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA), which has been detected more frequently in biological media than the other chlorinated derivatives. Indeed, studies have reported detection rates of Cl<sub>2</sub>BPA in biological samples of 80% in adipose tissue as opposed to approximatively 20% for ClBPA and Cl<sub>3</sub>BPA and 0% of Cl<sub>4</sub>BPA (Fernandez *et al.*, 2007). However, a recent study (Venisse *et al.*, 2019) has revealed different detection rates in breast adipose tissue samples obtained from women having undergone breast surgery, except for Cl<sub>3</sub>BPA (20%), as for the others, the authors found 0% of Cl<sub>2</sub>BPA (<LOD), 40% of ClBPA and 60% of Cl<sub>4</sub>BPA. In serum, Cambien *et al.* (2020) found more ClBPA with a 40% detection rate as opposed to 20% for Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA, 0% for Cl<sub>4</sub>BPA, while the study by Li *et al.* (2020) found 29.3% of Cl<sub>4</sub>BPA in pregnant women in China.

As regards placental tissue, the two studies by Vela-Soria *et al.* (2011, 2015) did not find any Cl<sub>x</sub>BPA while Jimenez-Diaz *et al.* (2010) detected 51% of ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA, 49% of Cl<sub>3</sub>BPA and 0% of Cl<sub>4</sub>BPA. In breast milk, Cariot *et al.* (2012) found 100% of Cl<sub>2</sub>BPA compared to ClBPA (0%) and Cl<sub>3</sub>BPA (33%) and the study by Rodriguez-Gomez *et al.* (2014) detected primarily Cl<sub>2</sub>BPA (20%) and practically no ClBPA, Cl<sub>3</sub>BPA or Cl<sub>4</sub>BPA. A recent study by Niu.Y *et al.* (2021) confirmed that Cl<sub>2</sub>BPA is the principal chlorinated derivatives found in breast milk (Niu *et al.*, 2021). Moreover, in colostrum, the first secretion from the

mammary glands after giving birth, Migeot et al. (2013) found that Cl<sub>2</sub>BPA (mix of two forms: 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA and 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA) is the most frequently detected (100%) (See Tableau 28).

In urines, ClBPA is the most frequently detected Cl<sub>x</sub>BPA in all relevant studies. Kalyvas et al. (2014) detected the compound, which was the only one they studied, in 90% of their samples, while Venisse et al. (2014) detected ClBPA in 60% of samples vs 40% for Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA. Meanwhile, Liao *et al.* (2012) observed the same detection rate for ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA and Cl<sub>3</sub>BPA (20%) whereas 3 studies (Liao et al., 2012; Venisse et al., 2014; Yang et al., 2014) did not find any Cl<sub>4</sub>BPA in urine.

Moreover, significant differences in exposure to Cl<sub>x</sub>BPA were found between two cohort studies: SURDIAGENE (Bramini et al.) and ESTHER (Germany) (Hu et al., 2019) from a 1 to 9% detection rate in Germany versus 18 to 33% in France (Hu et al., 2019). Water chlorination processes differ; France uses mainly sodium hypochlorite, while Germany uses chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>), which may explain the observed differences in detection rates. As a disinfectant, chlorine dioxide does not produce any chlorinated derivatives in reaction with the phenols (including BPA), whereas chlorine does (Ganiev et al., 2003; Masschelein, 1979).

Pellizzari *et al.* (2019) mention Cl<sub>4</sub>BPA as a priority substance on which biomonitoring studies should be conducted to better understand its exposure. Furthermore, the presence of Cl<sub>x</sub>BPA has been confirmed in the vulnerable population constituted by pregnant women in different biological matrices (serum, placenta, and colostrum/breast milk). Finally, several studies have indicated that the four Cl<sub>x</sub>BPA (ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA) show accumulation and higher detection rates in lipid-rich tissues (Migeot et al., 2013).

Tableau 28 : Exposure levels of chlorinated derivatives of BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) in human tissue and matrices

References	Human tissue or matrices	Country and study date	Cl <sub>x</sub> BPA analyzed	N	Population type (population, age, BMI)	Detection rates of Cl <sub>x</sub> BPA	LOD/LOQ (ng/mL)
(Cambien et al., 2020) (a) (Li et al., 2020) (b)	Serum	(a) France, n.a (b) China, 2016	CIBPA, (a), Cl <sub>2</sub> BPA (a), Cl <sub>3</sub> BPA, (a) Cl <sub>4</sub> BPA (a, b)	(a) N=10 (b) N = 181	(a) Patients suffering from end stage renal disease, n.a, n. a (b) Pregnant women, older than 18 years old, n. a	(a) 40% CIBPA; 20% Cl <sub>2</sub> BPA; 20% Cl <sub>3</sub> BPA and 0% Cl <sub>4</sub> BPA (b) 29,3% of Cl <sub>4</sub> BPA	(a) LOQ =0.005 for CIBPA, Cl <sub>2</sub> BPA and Cl <sub>3</sub> BPA; 0.02 for Cl <sub>4</sub> BPA (b) 0.001/ 0.002
(Liao et al., 2012)(c); (Yang et al., 2014) (d); (Kalyvas et al., 2014) (e); (Vela-Soria et al., 2014b)(f); (Venisse et al., 2014)(g) (Hu et al., 2019) (h)	Urine	(c) USA, 2011 (d) China, 2013 (e) Cyprus, 2012 (f) Spain, n.a (g) France, n. a (h) Germany and France, 2002	CIBPA (c, e, f, g, h) Cl <sub>2</sub> BPA: mix of 2 forms (c,f,g,h) Cl <sub>3</sub> BPA (c, f, g, h) Cl <sub>4</sub> BPA (d, f, g, h)	(c) N = 31 (d) N = 94 (e) N = 224 (f) N = 20 (g) N = 10 (h) N=126 (Germany) and N= 166 (France)	(c) Healthy volunteers, 11-66 years, n.a (d) Adults, 26-84 years, n.a (e) Adults, 51 years (17), 26 kg.m <sup>-2</sup> (f) Male and female volunteers, n.a, n.a (g) Donors, n.a, n. a (h) Patients with T2D or developed myocardial infarction	(c) 16,1% CIBPA, 19.4% 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA, 19.4% Cl <sub>3</sub> BPA (d) 0% Cl <sub>4</sub> BPA (e) 90% CIBPA (f) 0% of all Cl <sub>x</sub> BPA (g) 60% CIBPA, 40%: 3,5-Cl <sub>2</sub> BPA, Cl <sub>3</sub> BPA, Cl <sub>4</sub> BPA, 20% 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA (h) Germany: 1% CIBPA, 4% Cl <sub>2</sub> BPA, 9% Cl <sub>3</sub> BPA, 4% Cl <sub>4</sub> BPA vs in France: 18% CIBPA, 20% Cl <sub>2</sub> BPA, 24% Cl <sub>3</sub> BPA and 33% Cl <sub>4</sub> BPA	(c) 0.02 / 0.05 for all Cl <sub>x</sub> BPA (d) 0.01 / 0.03 (e) 0.032 / 0.108 (f) 0.03 / 0.1 for all Cl <sub>x</sub> BPA (g) 0.014 / 0.05 for CIBPA and Cl <sub>4</sub> BPA; 0.009/0.05 for Cl <sub>2</sub> BPA; 0.018/0.05 for Cl <sub>3</sub> BPA (h) 0.025 / 0.05 for all Cl <sub>x</sub> BPA
(Vela-Soria et al., 2015)(i), (Vela-Soria et al., 2011)(j); (Jimenez-Diaz et al., 2010)(k)	Placental tissue	(i) Spain, n.a (j) Spain, n.a (k) Spain, n. a	CIBPA; Cl <sub>2</sub> BPA; Cl <sub>3</sub> BPA; Cl <sub>4</sub> BPA (h, i, j)	(i) N = 10 (j) N = 50 (k) N = 49	(i) Volunteers, n.a, n.a (j) Volunteers, n.a, n.a (k) Females, n.a, n. a	(i) 0% all Cl <sub>x</sub> BPA (j) 0% all Cl <sub>x</sub> BPA (k) 51% CIBPA and Cl <sub>2</sub> BPA, 49% Cl <sub>3</sub> BPA, 0% Cl <sub>4</sub> BPA	(i) 0.1 / 0.3 for all Cl <sub>x</sub> BPA (j) 0.3/1.0 for CIBPA and Cl <sub>2</sub> BPA; 0.4/1.4 for Cl <sub>3</sub> BPA and 0.6/2.0 for Cl <sub>4</sub> BPA (k) Same as (j)



References	Human tissue or matrices	Country and study date	Cl <sub>x</sub> BPA analyzed	N	Population type (population, age, BMI)	Detection rates of Cl <sub>x</sub> BPA	LOD/LOQ (ng/mL)
(Cariot et al., 2012) (l) ; (Rodriguez-Gomez, Zafra-Gomez, et al., 2014)(m), (Rodriguez-Gomez, Jimenez-Diaz, et al., 2014)(n),(Niu et al., 2021) (o)	Maternal milk	(l) France, n.a, (m) Spain, n.a (n) Spain, n. a (o) China, 2014	C1BPA; Cl <sub>2</sub> BPA mix of 2 forms; Cl <sub>3</sub> BPA (except o); Cl <sub>4</sub> BPA (except l)	(l) N=3 (m) N=10 (n) N=10 (o) N=181	(l) Females, n.a, n.a (m) Females, n.a, n.a (n) Healthy women, n.a, n. a (o) Healthy women, 25-35 years old, 18.5 < BMI < 25	(l) 0% C1BPA, 100% Cl <sub>2</sub> BPA 33% Cl <sub>3</sub> BPA (m) 0% for C1BPA, Cl <sub>3</sub> BPA and Cl <sub>4</sub> BPA, 20% for Cl <sub>2</sub> BPA (n) 0% for all Cl <sub>x</sub> BPA (o) 3.3% C1BPA, 17.1% Cl <sub>2</sub> BPA and 1.7% Cl <sub>4</sub> BPA	(l) 0.01/0.4 C1BPA, 0.05/0.4 for Cl <sub>2</sub> BPA and Cl <sub>3</sub> BPA;0.04/0.4 for Cl <sub>4</sub> BPA (m) 0.04/0.12 for all Cl <sub>x</sub> BPA (n) 0.1/0.2 C1BPA, 0.1/0.3 Cl <sub>2</sub> BPA, 0.2/0.5 Cl <sub>3</sub> BPA and 0.3/1.0 Cl <sub>4</sub> BPA (LC) (o) 0.001/0.003 C1BPA, 0.002/0.005 Cl <sub>2</sub> BPA and Cl <sub>4</sub> BPA
(Migeot et al., 2013) (p)	Colostrum	(p) France, n. a	C1BPA; 3,3'- Cl <sub>2</sub> BPA; 3,5- Cl <sub>2</sub> BPA; Cl <sub>3</sub> BPA (p)	(p) N=21	(p) Females, 33 years, 22.1 kg.m <sup>-2</sup>	(p) 0% for C1BPA,100% 3,5- Cl <sub>2</sub> BPA, 52% 3,3'- Cl <sub>2</sub> BPA, 19% Cl <sub>3</sub> BPA	(p) 0.01/0.40 C1BPA, 0.05/0.4 Cl <sub>2</sub> BPA and Cl <sub>3</sub> BPA, 0.04/0.4 Cl <sub>4</sub> BPA
(Fernandez et al., 2007) (q) (Venisse et al., 2019) (r)	Adipose tissue	(q) Spain, n.a (r) France, n. a	C1BPA; Cl <sub>2</sub> BPA: mix of 2 forms; Cl <sub>3</sub> BPA; Cl <sub>4</sub> BPA (q,r)	(q) N= 20 (r) N =5	(q) Adult females, 59.7 years, 31.9 kg.m <sup>-2</sup> (r) Women receiving breast surgery for breast lesions, n.a, n. a	(q) 15% C1BPA, 80% Cl <sub>2</sub> BPA, 20% Cl <sub>3</sub> BPA, 0% Cl <sub>4</sub> BPA (r) 40% C1BPA, 0% Cl <sub>2</sub> BPA, 40% Cl <sub>3</sub> BPA and 60% Cl <sub>4</sub> BPA	(q) 0.5 / n.a C1BPA and Cl <sub>2</sub> BPA, 2.7 / n.a Cl <sub>3</sub> BPA, 3.0/n.a Cl <sub>4</sub> BPA (r) 0.05/0.0125 for all Cl <sub>x</sub> BPA

n.a = data not available

## 8.7 Toxic effects of chlorinated derivatives of BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) reported in the literature

There is evidence in toxicological and epidemiological studies that chlorinated derivatives of BPA have endocrine-disrupting capabilities.

### 8.7.1 *In vitro* and *in vivo* studies

Toxicological studies in animal and cell cultures have revealed adverse effects of Cl<sub>x</sub>BPA: such as disruption of the endocrine system (Mutou et al., 2006), estrogenicity (Kuruto-Niwa et al., 2005; Kuruto-Niwa et al., 2002), genotoxicity (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b) and disturbed energy metabolism (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2014).

Cl<sub>x</sub>BPA are also PPAR- $\gamma$  receptor ligands that may be involved in metabolic effects (Riu et al., 2011b). They have a binding affinity with receptors activated by peroxisome proliferators 10 to 100 times higher than BPA (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b), of which the dysfunction has been associated with the onset of obesity and type 2 diabetes (TD2M) *in vivo* in humans (Somm et al., 2009; Swedenborg et al., 2009).

Several studies demonstrated that the thyroid hormonal system also seems to be a potential target. The study by Yamauchi.K *et al.* (2003) demonstrated in chicken and bullfrog transthyretin that triiodothyronine (T3) has a higher affinity for the chlorinated derivatives of BPA than BPA and the relative potency of the chlorinated derivatives was dependent upon the degree of chlorination (Yamauchi et al., 2003). Moreover, in a two-hybrid assay in yeast on a rat liver S9 preparation (Kitamura et al., 2002; Terasaki et al., 2011), Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA were shown to increase thyroid hormone activities but inhibit triiodothyronine (T3) binding compared to Cl<sub>2</sub>BPA, ClBPA and BPA.

Additionally, Cl<sub>4</sub>BPA exposure induces cell damage through promotion of intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation using *Saccharomyces cerevisiae* as a model and in terms of subsequent related cytotoxicity (Zhang et al., 2020).

Cl<sub>4</sub>BPA has been shown to induce lipid accumulation *in vitro* (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b). Studies on the magnification of zebra- fish exposed to halogenated BPA during the early development phase revealed induction of obesity at a later stage of life (Riu et al., 2014), thereby supporting the theory of late obesity due to exposure to xenobiotics (i.e., obesogens) early in an individual's life (Janesick et al., 2011a, 2011b, 2012).

Moreover, a recent study by Wang.Y *et al.* (2021) demonstrated that Cl<sub>4</sub>BPA affect the immune system *in vivo*. In this study, BALB/c mice were exposed to Cl<sub>4</sub>BPA by gavage with a dose of 5 or 50 mg/kg/day for 14 days. Authors showed that Cl<sub>4</sub>BPA can induce immunosuppression in mice by increasing the secretion of inflammation-related cytokines and reducing the ratio of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes to regulatory T cells. Cl<sub>x</sub>BPA have been shown to have affinities to estrogen receptors up to 100 times greater than BPA. This toxicological property was first suggested by Hu *et al.* (2002) using a mixture of Cl<sub>x</sub>BPA in solution with a yeast two-hybrid assay (Hu et al., 2002). Estrogenic activity of each Cl<sub>x</sub>BPA has since been demonstrated (Takemura et al., 2005). The same authors demonstrated that in ovariectomized (OVX) rats, exposure to 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA and ClBPA increased uterine wet weight in the same manner as BPA (Takemura et al., 2005). In addition, in their *in vivo* experiments, BPA, ClBPA and 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA significantly increased the surface area of the uterine endometrium at a dose of 100 mg/kg/day. Interestingly, pathologic edema was observed in the uterus of Cl<sub>4</sub>BPA-treated in over 80% of female mice after 14 days of exposure (Wang et al., 2021).

### 8.7.2 Epidemiological studies

Fernandez *et al.* (2007) studied the role of chlorinated derivatives of BPA in the adipose tissue of obese women in a limited Spanish population (n = 20) (BMI = 31.9 ± 11.5 kg/m<sup>2</sup>). Among the different Cl<sub>x</sub>BPA, Cl<sub>2</sub>BPA is the most frequently (16/20, 80%) found in women's adipose tissue, followed by BPA (55%), ClBPA (15%) and Cl<sub>3</sub>BPA (10%).

Moreover, Cl<sub>2</sub>BPA constitutes 94.6% of all Cl<sub>x</sub>BPA. The study suggests that there is a possible association between the presence of Cl<sub>x</sub>BPA in adipose tissue and the occurrence of obesity, but the sample size (n = 20) is too small to reach conclusions.

A cross-sectional epidemiological study by Andra *et al.* (2015) in Cyprus on a population of 223 people shows a clearly strong correlation between urinary levels of ClBPA and body mass index (OR = 2.34 with 95% confidence interval, CI: 1.10, 5.10; P = 0.027). Further epidemiological studies are required to confirm the possible obesogenic effects of the monochlorinated derivative.

The same team performed another epidemiological study involving 151 participants (greater than 18 years old), including 20 diagnosed with diabetes mellitus type II (T2DM) and 131 non-diabetic adults. The researchers found a positive association between urinary ClBPA concentrations and onset of type II diabetes mellitus (OR = 3.29 with 95% confidence interval, CI: 1.10, 11.4; P < 0.05) (Andra, Kalyvas, et al., 2015). Although a relationship between exposure to ClBPA and T2DM has been demonstrated, there is currently no epidemiological study assessing other Cl<sub>x</sub>BPA.

In a French case-control study nested in a cohort of diabetic patients (SURDIAGENE), Hu *et al.*, (2019) showed a strong association between exposure to Cl<sub>x</sub>BPA and the occurrence of myocardial infarction (18 to 32% detection in urines, OR = 14.15 (2.77–72.40)). This association was not confirmed in the German cohort (ESTHER) whose patients had much lower exposure levels to Cl<sub>x</sub>BPA (1 to 9% in their urine, OR = 0.17 (0.02–1.23)).

Moreover, in a case-control study of 212 participants, Andrianou *et al.* (2016) demonstrated no association between exposure to ClBPA, 3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA, 3,5-Cl<sub>2</sub>BPA and thyroid functions unlike BPA. More epidemiologic studies are required to confirm that exposure to Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA is associated with thyroid function as suggested by *in vitro* studies (Kitamura *et al.*, 2002; Terasaki *et al.*, 2011).

All epidemiological studies conducted on Cl<sub>x</sub>BPA have been summarized in Tableau 29.

Tableau 29 : Epidemiological studies of chlorinated derivatives of BPA (Cl<sub>x</sub>BPA)

Categories	Study	Study type	Country	N	Population type (age, BMI)	Cl <sub>x</sub> BPA concentrations (ng/g) and detections (%)	Results
<b>Obesity</b>	(Andra & Makris, 2015)	Cross-sectional	Cyprus	223	Adult men and women, two groups of BMI: normal BMI (25 kg/m <sup>2</sup> , n =97) and above normal BMI (> 25 kg/m <sup>2</sup> , n = 126)	CIBPA: > 4.68 ng. g <sup>-1</sup> , 63% with above normal BMI	Positive association between urinary level of CIBPA and obesity (OR = 2.34)
<b>Thyroid function</b>	(Andrianou et al., 2016)	Case-control	Romania and Cyprus	212	Adult women, 47 to 52 years old, 25 kg/m <sup>2</sup> to 27 kg/m <sup>2</sup> ,	CIBPA; 3,3'-Cl <sub>2</sub> BPA; 3,5-Cl <sub>2</sub> BPA were measured. No differences in concentrations between cases and control	No association between Cl <sub>x</sub> BPA (CIBPA and Cl <sub>2</sub> BPA only) exposure and thyroid function
<b>Type II diabete mellitus (TD2M)</b>	(Andra, Kalyvas, et al., 2015)	Cross-sectional	Cyprus	151	20 adults with TD2M (64 years old, 30 kg/m <sup>2</sup> ) and 131 non-diabetics (44 years old, 25 kg/m <sup>2</sup> )	CIBPA with creatinine adjusted urinary concentration: 92 ng/g for non-diabetics while 191 ng/g for diabetics	Positive association between urinary CIBPA concentration and onset of diabetes type II (OR = 3.29)
<b>Myocardial infarction (MI)</b>	(Hu et al., 2019)	Case-control nested in 2 cohorts	France and Germany	292	Males, 65-70 years old, 29 kg/m <sup>2</sup> , diabetic patients	SURDIAGENE cohort : 18 to 32%. ESTHER cohort (Germany): 1 to 9%.	Very strongly associated with MI in the French cohort (OR = 14.15) but not replicated in ESTHER cohort (OR = 0.17)

## 8.8 Possible mechanisms of action of chlorinated derivatives of BPA

While the mechanisms of action of these chlorinated derivatives are not well-known, it has been established that the four Cl<sub>x</sub>BPA exert estrogenic effects on MCF-7 cells, promote cell proliferation and increase the synthesis and secretion of specific proteins at concentrations of 1 μM and higher (Rivas et al., 2002). Moreover, it has been shown *in vitro* that BPA and Cl<sub>4</sub>BPA exhibit an affinity for the estrogen receptor and express a proliferative potential in the human breast cancer cell line MCF-7 (Olsen et al., 2003). There exist similarities to BPA:

- BPA and its chlorinated derivatives are active in competing with 17β- estradiol, a sexual hormone, in their binding to human ER<sub>α</sub> and ER<sub>β</sub> proteins. Takemura.H *et al.* (2005) demonstrated that ClBPA and 3,3'- Cl<sub>2</sub>BPA compete more effectively for ER<sub>α</sub> binding than BPA (IC<sub>50</sub> values of  $2.48 \times 10^{-5}$ ,  $1.28 \times 10^{-5}$ , and  $1.08 \times 10^{-4}$  M, respectively). They have activity similar to BPA in competing for binding to ER<sub>β</sub> (IC<sub>50</sub> values of  $1.43 \times 10^{-5}$ ,  $1.87 \times 10^{-5}$ , and  $2.59 \times 10^{-5}$  M, respectively) (See Tableau 30).

Tableau 30 : The IC<sub>50</sub> values of the competitive binding of 17 $\beta$ -estradiol, BPA and chlorinated BPA to human ER $\alpha$  and ER $\beta$  (Adapted from (Takemura et al., 2005)).

Chemical	IC <sub>50</sub> (M)	
	ER $\alpha$	ER $\beta$
<b>BPA</b>	1.08x10 <sup>-4</sup>	2.59x10 <sup>-5</sup>
<b>3-CIBPA</b>	2.48x10 <sup>-5</sup>	1.43x10 <sup>-5</sup>
<b>3,3'-Cl<sub>2</sub>BPA</b>	1.28x10 <sup>-5</sup>	1.87x10 <sup>-5</sup>
<b>17<math>\beta</math>-estradiol</b>	1.15x10 <sup>-8</sup>	1.13x10 <sup>-8</sup>

- Cl<sub>x</sub>BPA are ligands for PPAR- $\gamma$  receptors which induce adipogenesis via their nuclear receptors (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b). The functional and structural data presented in the study by Riu *et al.* (2011a) demonstrate that halogenated BPA can activate PPAR- $\gamma$  and retinoid receptors (RXR) via direct interactions characterized by binding affinities 10 to 100 times greater than other proposed PPAR- $\gamma$  disruptors. Moreover, it activates these same receptors in Zebra fish and xenopus laevis for Cl<sub>4</sub>BPA (Riu et al., 2011a). All these metabolic dysfunctions lead to lipid accumulation (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2014).

## 8.9 Toxicokinetics of chlorinated derivatives of BPA reported in the literature (ADME)

Few toxicokinetic data in animals or humans on Cl<sub>x</sub>BPA are available in the literature. The pathways of metabolism and/or detoxification, the extent of tissue distribution, and the percent elimination from the body remain mostly unknown. Cl<sub>x</sub>BPA are lipophilic compounds whose logP<sub>ow</sub> is greater than 4 (i.e., values span from 4.4 to 6.4). As expected, the more chlorine is added to the molecule, the more lipophilic it becomes: Cl<sub>4</sub>BPA > Cl<sub>3</sub>BPA > Cl<sub>2</sub>BPA > ClBPA (Supplementary Tables S1 and S2) (Doumas et al., 2018).

### 8.9.1 Absorption

#### 8.9.1.1 Orally

Human biomonitoring studies suggest that oral absorption by ingestion of drinking water is present, but these data do not allow for the determination of the bioavailability or absorption constant of the chlorinated derivatives of BPA. No data are available regarding the rate and extent of absorption through oral route. These compounds present higher lipophilic properties than BPA which may favor their passive diffusion through the intestinal barrier. BPA is rapidly absorbed in humans (Volkel et al., 2002) and a similar pattern of absorption is expected with Cl<sub>x</sub>BPA.

Dust ingestion is an important route of human exposure to TBBPA (Wang et al., 2015), which could hypothetically be a route of exposure to tetrachlorobisphenol A (Cl<sub>4</sub>BPA).

#### 8.9.1.2 By dermal route

A cross-sectional study has demonstrated that urinary ClBPA was significantly correlated with age and daily time spent cleaning with chlorinated tap water (Kalyvas et al., 2014) suggesting that the main routes of exposure for households' products that come into contact with chlorinated water are dermal and pulmonary. The frequency and duration of



household cleaning activities must therefore be taken into consideration in order to better assess Cl<sub>x</sub>BPA exposure. On the other hand, none of the exposures related to individual or cumulative hygiene and leisure activities such as showering, bathing, and swimming in pools have been significantly associated with urinary ClBPA (Kalyvas et al., 2014). These observations with ClBPA remain to be confirmed with other Cl<sub>x</sub>BPA. Unfortunately, no information on skin permeability or bioavailability is currently available. Lastly, addition of chlorine atoms to the BPA molecule increases the lipophilicity of BPA chlorine derivatives, which could increase the dermal absorption rates of Cl<sub>x</sub>BPA, though this remains to be assessed.

#### 8.9.1.3 By inhalation

It is possible that when used as a flame retardant, Cl<sub>4</sub>BPA could find its way into indoor dust, as observed with TBBPA (Abdallah et al., 2008; Geens et al., 2009; Wang et al., 2015; Wu et al., 2016), but no studies have conclusively shown this; until new data are obtained demonstrating the presence of Cl<sub>x</sub>BPA in air, this route of exposure remains purely hypothetical.

### 8.9.2 Distribution

As mentioned above, Cl<sub>x</sub>BPA have been found in several human biological matrices such as urine (Liao et al., 2012), adipose tissue (Fernandez et al., 2007), breast milk (Cariot et al., 2012), colostrum (Migeot et al., 2013), plasma (Cambien et al., 2020; Del Olmo et al., 2005; Li et al., 2020) and placental tissue (Jimenez-Diaz et al., 2010; Vela-Soria et al., 2011).

Log P values suggest that these substances could accumulate in adipose tissue (Haddad et al., 2000). Different Cl<sub>x</sub>BPA are more lipophilic than BPA (Migeot et al., 2013), so it is plausible that Cl<sub>x</sub>BPA compounds accumulate more in lipid containing matrices, such as breast milk and adipose tissue, rather than in urine or blood (Andra, Charisiadis, et al., 2015). In fact, data show that both forms of Cl<sub>2</sub>BPA were detected in 20–100% of the breast milk samples studied (Cariot et al., 2012; Migeot et al., 2013) and in 80% of adipose tissue samples and in

approximately 20% of samples for ClBPA and Cl<sub>3</sub>BPA and 0% of samples for Cl<sub>4</sub>BPA (Fernandez et al., 2007), compared to 0–40% detection in urine (Liao et al., 2012; Vela-Soria et al., 2014; Venisse et al., 2014). Moreover, Venisse *et al.* (2019) found Cl<sub>x</sub>BPA in breast fat samples from women with cancerous, boundary or benign lesions. In 5 samples from women with breast cancer, the concentrations of ClBPA, Cl<sub>2</sub>BPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA were on average 0.0295 ng/mL (2/5), <LOD (0/5), 0.013 ng/mL (2/5) and 0.021 ng/mL (3/5) respectively. ClBPA and Cl<sub>4</sub>BPA are the two compounds predominantly found in breast fat: 40 and 60% respectively. The distribution of Cl<sub>x</sub>BPA remains unknown, despite their having more lipophilicity than BPA. Moreover, parallels can be drawn with the distribution of BPA, which is found in all tissues, mainly in the liver and kidneys (ANSES, 2013). Cl<sub>x</sub>BPA are found in placental tissue (Jimenez-Diaz et al., 2010; Vela-Soria et al., 2011), and these substances cross the placental barrier, as does BPA.

A study has demonstrated the maternal transfer of Cl<sub>x</sub>BPA from mother to fetus by analyzing these substances in the decidua (tissue corresponding to the pregnant woman) and the first chorion (chorionic villi), corresponding to the fetus of 25 pregnant women (Chen et al., 2016). Chen *et al.* (2016) found ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA (mixture of the two forms) in most of these cells (76% and 72% respectively in the decidua; 80% and 72% respectively in the first chorion). Moreover, because the tissue-plasma partition coefficient is an important parameter for toxicokinetic data, Chen *et al.* (2016) assessed the decidua-plasma and chorionic villi-plasma partition coefficient for ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA (mix of two forms) but not for Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA due to their low detection frequency in these matrices. Decidua-plasma partition coefficient was estimated at 17.4 and 3.79 for ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA respectively. For chorionic villi-plasma partition coefficient, it was estimated at 25.2 and 4.94 for ClBPA and Cl<sub>2</sub>BPA respectively. These values of the partition coefficients also show that ClBPA is more widely distributed in tissues of pregnant women (decidua and chorionic villi) than Cl<sub>2</sub>BPA (Chen et al., 2016).

Another distribution parameter that is unknown for all Cl<sub>x</sub>BPA is the extent of binding to plasma proteins. The measurement of unbound fraction in plasma ( $F_{up}$ ) would greatly help to estimate the ability of these substances to distribute outside the vascular compartment to other tissues. In fact, it has been found in the literature that BPA is very highly bound to plasma

proteins in rodents and humans. The bound portion represents 90–95% and the free portion, which is biologically active, between 5 and 10% of total BPA (Nagel et al., 1997; Teeguarden et al., 2005). Cl<sub>x</sub>BPA could quite possibly have plasma protein binding in at least the same range as BPA.

### 8.9.3 Metabolism

Information on the metabolism of Cl<sub>x</sub>BPA is very scarce and few *in vivo* or *in vitro* experiments with hepatocytes or microsomes have been performed. While no data on the metabolic fate of the mono-, di- or tri- chloro form of the Cl<sub>x</sub>BPA are available, in all the species studied the major metabolic pathway for BPA is BPA glucuronconjugation (Volkel et al., 2002).

On the other hand, some data are available for Cl<sub>4</sub>BPA. In zebrafish, Cl<sub>4</sub>BPA is mostly metabolized to sulfoconjugates (Riu et al., 2014). Riu *et al.* (2011) have performed metabolic assays of Cl<sub>4</sub>BPA in HepG2 cells showing that Cl<sub>4</sub>BPA was completely metabolized into the glucuro- and sulfo-derivatives after 24-hour incubation, in proportions of 14% and 86% respectively. Moreover, they demonstrated that Cl<sub>4</sub>BPA sulfation, did not eliminate this estrogenic activity, unlike what is observed with BPA (Riu et al., 2011a; Riu et al., 2011b). The extent of sulfoconjugation *in vivo* in human and its activity remain unknown and should be further investigated. A similar metabolite profile was found for the brominated equivalent of Cl<sub>4</sub>BPA: in rats, the major metabolite of TBBPA in plasma and urine was TBBPA-sulfate (Hakk et al., 2000; Schauer et al., 2006). In human plasma, TBBPA-glucuronide was present at detectable concentrations in all blood samples while TBBPA-sulfate was only detected in blood samples from two humans (Schauer et al., 2006). TBBPA- glucuronide was the first metabolite detected in urine while TBBPA- sulfate was below the LOD after oral administration (0.1 mg TBBPA/ kg) (Schauer et al., 2006; Yu et al., 2019).

Moreover, as has been found that in decidua and chorionic villi (Chen et al., 2016), Cl<sub>x</sub>BPA could be transferred to the fetus, but we do not know whether the fetus is able to metabolize these emerging contaminants. Indeed, it is possible that Cl<sub>x</sub>BPA resembles the

metabolism of BPA in the placenta, and it is known that cumulative exposures to unconjugated BPA are greater in the fetus (Schonfelder et al., 2002; Takahashi et al., 2000). Using a placental ex vivo model, Balakrishnan *et al.* (2010) found high unconjugated BPA concentrations (27% of unconjugated BPA) in the fetal compartment suggesting that placental glucuronyltransferase or sulfotransferase enzymes do not efficiently convert BPA into its conjugated form. This could also be explained by ongoing deconjugation in the placenta and fetus, which prevents free BPA from decreasing as rapidly as in the maternal system (Ginsberg et al., 2009).

Limited glucuronidation activity has been demonstrated in human fetal liver (Domoradzki et al., 2003). The majority of UGT enzymes are expressed only after birth, with a full complement expressed at 3 months of age, although at reduced levels compared to adults. Unconjugated BPA is therefore more present in the fetus compared to conjugated BPA, which can accumulate in the fetus and thereby induce biological effects. An analogy can be made for fetal metabolism of Cl<sub>x</sub>BPA, but this remains to be verified.

#### 8.9.4 Excretion

Although four studies have demonstrated the presence of Cl<sub>x</sub>BPA in urine (Grignon et al., 2016; Liao et al., 2012; Vela-Soria et al., 2014; Venisse et al., 2014) excretion data on Cl<sub>x</sub>BPA are available only for humans (urine but not feces) and not in animals. That said, it is possible that the excretion of Cl<sub>x</sub>BPA is similar to BPA since Cl<sub>x</sub>BPA has a structure similar to the original substance. Venisse *et al.* (2014) detected Cl<sub>x</sub>BPA in urine in 10 human samples but at very low concentrations. ClBPA, Cl<sub>3</sub>BPA and Cl<sub>4</sub>BPA have been found in 3/10 samples at 132.3 pg/mL, 287 pg/mL, and 667.7 pg/mL on average, respectively. The two forms of Cl<sub>2</sub>BPA were the most frequently found: 2/10 at 83 pg/mL. The results of Grignon *et al.* (2016) were similar to those of Venisse *et al.* (2014). We know that elimination of BPA and its metabolites (mainly BPA- glucuronide) occurs in different ways depending on the species studied, particularly between humans and rodents. Excretion of conjugated BPA is done by biliary/fecal elimination in rats and via urine in humans (Volkel et al., 2002). This would prevent

enterohepatic recirculation in humans, unlike rats, in whom intestinal  $\beta$ - glucuronidases could break down the excreted conjugate and release BPA for systemic reabsorption (Ginsberg et al., 2009). Furthermore, several studies have shown limited excretion in breast milk for BPA (Vandenberg et al., 2007). Few studies (Cariot et al., 2012; Migeot et al., 2013; Rodriguez-Gomez, Jimenez-Diaz, et al., 2014; Rodriguez-Gomez, Zafra-Gomez, et al., 2014) have found Cl<sub>x</sub>BPA in breast milk as well as in colostrum, which would therefore be an elimination route for these substances.

In conclusion, Cl<sub>x</sub>BPA excretion can have several pathways such as urinary excretion; even at very low concentrations in humans, they have been detected in this matrix. However, biliary, or fecal excretion of Cl<sub>x</sub>BPA is still unknown in animals and humans for these emerging pollutants and cannot be excluded. These pollutants are also eliminated through breast milk, which constitutes a potential risk for the infant since the effects of Cl<sub>x</sub>BPA on the development of the infant remain unknown.

## 8.10 Discussion and conclusion

Chlorinated derivatives of BPA (Cl<sub>x</sub>BPA) are emerging pollutants with endocrine-disrupting effects (Mutou et al., 2006) found in humans. Cl<sub>x</sub>BPA have not been yet officially classified as endocrine disruptors in Europe (EU, 2020). Information on toxicological properties for Cl<sub>4</sub>BPA is more abundant than for other congeners, and this congener shows endocrine-disrupting properties. Cl<sub>4</sub>BPA also displays developmental and reproductive toxicity Pellizzari (Pellizzari et al., 2019). Indeed, in the USA, Cl<sub>4</sub>BPA has been identified as a potential endocrine disruptor since it possesses significant estrogen and androgen receptor activity EPA (EPA, 2018). Moreover, epidemiological studies have shown that Cl<sub>x</sub>BPA is associated with obesity (Andra & Makris, 2015), type II diabetes (Andra, Kalyvas, et al., 2015) and myocardial infarction (Hu et al., 2019), thereby constituting a risk to human health. However, these epidemiological studies are mostly cross-sectional (3/4), and despite a large number of participants, they are discontinuous (disease and exposure factor are determined at the same time) that do not allow the temporal sequence of events to be established. In addition, there may be many confounding factors in cross-sectional studies (related to risk factors: age, sex,

tobacco). Therefore, it is necessary to develop longitudinal studies to follow fetus exposure in utero until adulthood when a health problem appears, as in the ELFE study (Vandentorren et al., 2009). Longitudinal studies will make it possible to associate exposure to endocrine disruptors with potential disease in adulthood.

Cl<sub>x</sub>BPA have been found in pregnant women and may cross the placental barrier to exert their potential toxicity on the fetus. Susceptibility to fetuses and infants could present a major risk with effects that could arise later in life according to the Developmental Origins of Health and Disease (DoHaD) hypothesis (Heindel et al., 2017). Indeed, pregnant women are exposed daily to the cocktail effect of contaminants in different exposure media (air, food, drinking water, soil, etc.) and the different environmental exposures could impact the development of the fetus/infant (Heindel et al., 2017). This sub-population constitutes the target group for epidemiological studies to validate the relationship between exposure and health effects in adulthood (Rouillon et al., 2020). Indeed, a study entitled PREVED (Pregnancy, Prevention, Endocrine Disruptors) demonstrates that the more pregnant women have information on environmental exposure to endocrine disruptors, the more their behavioral measures evolve and change, which will limit their exposure to many hormone disruptors (Rouillon et al., 2020).

For this vulnerable population, distribution of Cl<sub>x</sub>BPA in fetuses represents an unknown risk that should be assessed. For that purpose, studies investigating the relationships between fetal exposure and sub-sequent child health, based for example on metabolic status and obesity, are warranted.

For that purpose, accurate exposure assessment of the fetus is needed and can be estimated from mother's measurement using a physiologically based pharmacokinetic model (PBPK). Indeed, a PBPK model is a very good tool to integrate toxicokinetic data obtained by different methods (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) describing the entire absorption, distribution, metabolism, and elimination (ADME) process and predicting the time-course of parent chemical and metabolite(s) in human organism (Lipscomb et al., 2012). Furthermore, a PBPK model can describe the transfer of these emerging pollutants to the fetus and thereby estimate fetal exposure during each pregnancy trimester (Sharma et al., 2018; Verner et al., 2009). Unfortunately, no

PBPK model of Cl<sub>x</sub>BPA in pregnant women currently exists in the literature, and as described in this article review, most of the specific toxicokinetic parameters required to parameterize such models are not available and need to be experimentally determined. Furthermore, knowledge of toxicokinetic properties will help to determine adequate biomarkers of exposure; active moieties or metabolites measured either in urine or in plasma.

Water chlorination using various types of chlorine (mainly chlorine gas, sodium hypochlorite and calcium hypochlorite), remains the most widely used method in the world, insofar as it is efficient, reliable, and economical. The case of Cl<sub>x</sub>BPA illustrates the major health issue related to chlorination by-products formed during water disinfection procedures. Trihalomethanes (THMs) (Rook, 1974) and haloacetic acids (HAA) (EPA, 1998) were the first chlorinated by-products detected in water more than 40 and 20 years ago, respectively. THMs and HAA are carcinogenic and genotoxic (Richardson et al., 2007) and exposure to these compounds has been linked to bladder and colorectal cancer in humans (IARC, 1987). Formation of other concerning chlorination by-products is expected due to ubiquitous contamination of our environment (especially water) by contaminants including endocrine disruptors such as BPA and its analogues, parabens, phthalates, etc (Ayanda et al., 2016; Becerra-Herrera et al., 2020; Lan et al., 2019). The formation of chlorinated derivatives of bisphenol S and bisphenol F has been identified and their potential as agonists of PPAR-gamma receptors has been demonstrated (Zheng et al., 2018; Zheng et al., 2016). Similarly, halogenated (chlorinated and also brominated) parabens found in water have shown estrogenic and increased AhR activity (Gouukon et al., 2020; Sasaki et al., 2018).

The world population may be differentially exposed to Cl<sub>x</sub>BPA according to different water chlorination processes. Indeed, Hu *et al.*, (2019) have shown that Cl<sub>x</sub>BPA were less frequently detected in the urine of the German in comparison to the French population, 8% vs 24%, respectively. Differences in exposure were probably related to different water disinfection methods in the two countries. Some countries use water disinfection methods that do not generate chlorination by-products. This is notably the case in Germany, which uses chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>), a disinfectant that does not produce any chlorine derivatives in reaction with phenols (including BPA), unlike chlorine (Ganiev et al., 2003; Masschelein, 1979). However,

chlorine dioxide is considerably more expensive and while it does not produce halogenated by-products, it decomposes in chlorite ( $\text{ClO}_2^-$ ) and chlorate ( $\text{ClO}_3^-$ ) (EPA, 2000; Qingdong et al., 2006; Sorlini et al., 2014) which can be harmful to human health (Couri et al., 1982). pH and chlorine concentrations have also been shown to influence the formation of  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  (Gallard et al., 2004).

Despite presumably high environmental standards, the global population is exposed to a chemical cocktail effect through which the risk to an individual's health throughout his or her life remains unknown. For the major chlorination by-products found in water: THM, HAA and chlorites, there exist tap water guideline values in different countries (Canada, 2006; EPA, 2006; OMS, 1996); however, there are currently no regulations regarding the toxicity threshold for  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  in drinking water in either Europe, the US or Canada and this represents a public health concern.  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  are found in smaller quantities than other major chlorination by-products, in the nanogram range for  $\text{Cl}_x\text{BPA}$  (Doumas et al., 2018; Fan et al., 2013) and in the microgram range for THMs, HAAs or chlorites (EPA, 2006). As these emerging substances have been shown to be endocrine disruptors (Mutou et al., 2006), we now know that they can be associated with a non-monotonic dose-response relationship, i.e., they could have a toxic effect at very low doses, which makes it even more difficult to determine reference values in drinking water (EFSA, 2016). This pattern of dose-response relationship has rendered significantly more complex the decisions of policy makers for risk prevention of endocrine disruptors.

To avoid water chlorination by-products, a reverse osmosis process could be added after the chlorination process to purify the water from any other substances such as THM, HAA, chlorites or in our case,  $\text{Cl}_x\text{BPA}$ . However, studies have shown that even with reverse osmosis and despite purification, chlorination by-products remain in water (Agus et al., 2010; Bellona et al., 2004). Regardless of the chemicals or techniques used for water treatment process, the risk of undesirable by-products exists. Drinking water treatment then becomes a political choice, in which environmental organizations play a very important role in public health. Drinking water treatment should be a democratic and informed choice so that citizens, scientists, and politicians can consider the risks associated with chlorination by-products and choose the least harmful to human health.



To conclude, Cl<sub>x</sub>BPA are emerging substances presenting an environmental health issue, and more broadly, a potential public health problem contributing to increasing environmental pollution. It is necessary to perform a complete risk analysis including the study of the toxicokinetics (ADME) of these substances since drinking water is a vital resource for humans which means that and exposure to Cl<sub>x</sub>BPA occurs on a continuous basis.

## **8.11 Funding**

This project was funded by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (2018/1/ 230)

## **8.12 Acknowledgment**

We wish to thank Jeffrey Arsham, an American scientific translator, for his highly helpful reading of our original text.

## 8.13 References

- Abdallah, M. A., Harrad, S., & Covaci, A. (2008). Hexabromocyclododecanes and tetrabromobisphenol-A in indoor air and dust in Birmingham, U.K: implications for human exposure. *Environ Sci Technol*, 42(18), 6855-6861. doi:10.1021/es801110a
- Agus, E., & Sedlak, D. L. (2010). Formation and fate of chlorination by-products in reverse osmosis desalination systems. *Water Res*, 44(5), 1616-1626. doi:10.1016/j.watres.2009.11.015
- Albouy-Llaty, M., Deshayes-Morgand, C., Venisse, N., Rouillon, S., Pierre Eugene, P., Rabouan, S., . . . Migeot, V. (2021). Determinants of Bisphenol A and its Chlorinated Derivatives' Concentrations in Colostrum: the EDDS Cohort Study. *Exposure and Health*. doi:<https://doi.org/10.1007/s12403-021-00405-9>
- Albouy-Llaty, M., Dupuis, A., Grignon, C., Strezlec, S., Pierre, F., Rabouan, S., & Migeot, V. (2015). Estimating drinking-water ingestion and dermal contact with water in a French population of pregnant women: the EDDS cohort study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 25(3), 308-316. doi:10.1038/jes.2014.48
- Andersen, M. E., Clewell, H. J., 3rd, Gargas, M. L., Smith, F. A., & Reitz, R. H. (1987). Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride. *Toxicol Appl Pharmacol*, 87(2), 185-205. doi:10.1016/0041-008x(87)90281-x
- Andra, S. S., Charisiadis, P., Arora, M., van Vliet-Ostaptchouk, J. V., & Makris, K. C. (2015). Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ Int*, 85, 352-379. doi:10.1016/j.envint.2015.09.011
- Andra, S. S., Kalyvas, H., Andrianou, X. D., Charisiadis, P., Christophi, C. A., & Makris, K. C. (2015). Preliminary evidence of the association between monochlorinated bisphenol A exposure and type II diabetes mellitus: A pilot study. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 50(3), 243-259. doi:10.1080/10934529.2015.981111
- Andra, S. S., & Makris, K. C. (2015). Association between urinary levels of bisphenol A and its monochlorinated derivative and obesity. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 50(11), 1169-1179. doi:10.1080/10934529.2015.1047674
- Andrianou, X. D., Gangler, S., Piciu, A., Charisiadis, P., Zira, C., Aristidou, K., . . . Makris, K. C. (2016). Human Exposures to Bisphenol A, Bisphenol F and Chlorinated Bisphenol A Derivatives and Thyroid Function. *PLoS One*, 11(10), e0155237. doi:10.1371/journal.pone.0155237
- ANSES. (2013). Evaluation des risques du bisphenol A (BPA) pour la santé humaine. Bergman, Å., 2013. United Nations Environment Programme, World Health Organization. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012 an Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors. WHO: UNEP, Geneva.
- Attina, T. M., Hauser, R., Sathyanarayana, S., Hunt, P. A., Bourguignon, J. P., Myers, J. P., . . . Trasande, L. (2016). Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: a population-based disease burden and cost analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 4(12), 996-1003. doi:10.1016/S2213-8587(16)30275-3
- Ayanda, O. S., Olutona, G. O., Olumayede, E. G., Akintayo, C. O., & Ximba, B. J. (2016). Phenols, flame retardants and phthalates in water and wastewater - a global problem. *Water Sci Technol*, 74(5), 1025-1038. doi:10.2166/wst.2016.314

- Bacle, A., Dupuis, A., Belmouaz, M., Bauwens, M., Cambien, G., Venisse, N., . . . Ayraud-Thevenot, S. (2019). Overexposure to Bisphenol A and Its Chlorinated Derivatives of Patients with End-Stage Renal Disease during Online Hemodiafiltration. *Biomolecules*, *9*(9). doi:10.3390/biom9090403
- Becerra-Herrera, M., Miranda, V., & Richter, P. (2020). Rapid Determination of Parabens in Water Samples by Ultra-high Performance Liquid Chromatography Coupled to Time of Flight Mass Spectrometry. *Anal Sci*, *36*(6), 675-679. doi:10.2116/analsci.19P409
- Bellona, C., Drewes, J. E., Xu, P., & Amy, G. (2004). Factors affecting the rejection of organic solutes during NF/RO treatment--a literature review. *Water Res*, *38*(12), 2795-2809. doi:10.1016/j.watres.2004.03.034
- Berezhkovskiy, L. M. (2011). The corrected traditional equations for calculation of hepatic clearance that account for the difference in drug ionization in extracellular and intracellular tissue water and the corresponding corrected PBPK equation. *J Pharm Sci*, *100*(3), 1167-1183. doi:10.1002/jps.22324
- Bo Lil, Jianzhong Yang<sup>1</sup>, Qing Huang<sup>1</sup>, Yi Zhang<sup>1</sup>, Cheng Peng<sup>1</sup>, Yujie Zhang<sup>1</sup>, Yao He<sup>1,3</sup>, Jiye Shi<sup>1,4</sup>, & Wenxin Li<sup>1</sup>, J. H. a. C. F. (2013). Biodistribution and pulmonary toxicity of intratracheally instilled graphene oxide in mice. *NPG Asia Materials*, *5*.
- Bounakta, S., Bteich, M., Mantha, M., Poulin, P., & Haddad, S. (2018). Predictions of bisphenol A hepatic clearance in the isolated perfused rat liver (IPRL): impact of albumin binding and of co-administration with naproxen. *Xenobiotica*, *48*(2), 135-147. doi:10.1080/00498254.2017.1294276
- Bourgin, M., Bichon, E., Antignac, J. P., Monteau, F., Leroy, G., Barritaud, L., . . . Le Bizec, B. (2013). Chlorination of bisphenol A: non-targeted screening for the identification of transformation products and assessment of estrogenicity in generated water. *Chemosphere*, *93*(11), 2814-2822. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.080
- Bramini, M., Alberini, G., Colombo, E., Chiacchiaretta, M., DiFrancesco, M. L., Maya-Vetencourt, J. F., . . . Cesca, F. (2018). Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *12*, 12. doi:<https://dx.doi.org/10.3389/fnsys.2018.00012>
- Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E., Polizzi, A., Buisson-Brenac, C., Leveque, M., . . . Houdeau, E. (2010). Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(1), 448-453. doi:10.1073/pnas.0907697107
- Brochot, C., Willemin, M-E, & Zeman, F. La modélisation toxico/pharmacocinétique à fondement physiologique : son rôle en évaluation du risque et en pharmacologie. In.
- Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., & Beliles, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*, *13*(4), 407-484. doi:10.1177/074823379701300401
- Buscher, B., Laakso, S., Mascher, H., Pusecker, K., Doig, M., Dillen, L., . . . Timmerman, P. (2014). Bioanalysis for plasma protein binding studies in drug discovery and drug development: views and recommendations of the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis*, *6*(5), 673-682. doi:10.4155/bio.13.338
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*, *116*(1), 39-44. doi:10.1289/ehp.10753
- Cambien, G., Venisse, N., Migeot, V., Rabouan, S., Belmouaz, M., Binson, G., . . . Dupuis, A. (2020). Simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human

plasma: Development, validation and application of a UHPLC-MS/MS method. *Chemosphere*, 242, 125236. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125236

Campbell, A. (2009). Development of PBPK model of molinate and molinate sulfoxide in rats and humans. *Regul Toxicol Pharmacol*, 53(3), 195-204. doi:10.1016/j.yrtph.2009.01.003

Canada, H. (2006). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Technical Document - Trihalomethanes.

Canada, S. (2021). *Partage des tâches domestiques : faire équipe pendant la pandémie de COVID-19*. Retrieved from <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/45-28-0001/2020001/article/00081-fra.htm>

Cant, A., Albouy-Llaty, M., Venisse, N., Grignon, C., Fabrice, P., & Migeot, V. (2016). Comparison of colostrum versus urine as biomarkers of pregnant women exposure to chlorinated derivatives of Bisphenol A. *2nd international Conference in Human biomonitoring*.

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

Chang, B. V., Liu, J. H., & Liao, C. S. (2014). Aerobic degradation of bisphenol-A and its derivatives in river sediment. *Environ Technol*, 35(1-4), 416-424. doi:10.1080/09593330.2013.831111

Chen, M., Fan, Z., Zhao, F., Gao, F., Mu, D., Zhou, Y., . . . Hu, J. (2016). Occurrence and Maternal Transfer of Chlorinated Bisphenol A and Nonylphenol in Pregnant Women and Their Matching Embryos. *Environ Sci Technol*, 50(2), 970-977. doi:10.1021/acs.est.5b04130

Chu, S., Haffner, G. D., & Letcher, R. J. (2005). Simultaneous determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, bisphenol A and other halogenated analogues in sediment and sludge by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1097(1-2), 25-32. doi:10.1016/j.chroma.2005.08.007

Clewell, H. J., Tan, Y. M., Campbell, J. L., & Andersen, M. E. (2008). Quantitative interpretation of human biomonitoring data. *Toxicol Appl Pharmacol*, 231(1), 122-133. doi:10.1016/j.taap.2008.04.021

Clewell, R. A., Kremer, J. J., Williams, C. C., Campbell, J. L., Jr., Andersen, M. E., & Borghoff, S. J. (2008). Tissue exposures to free and glucuronidated monobutylphthalate in the pregnant and fetal rat following exposure to di-n-butylphthalate: evaluation with a PBPK model. *Toxicol Sci*, 103(2), 241-259. doi:10.1093/toxsci/kfn054

Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101(5), 378-384. doi:10.1289/ehp.93101378

Corbel, T., Gayraud, V., Puel, S., Lacroix, M. Z., Berrebi, A., Gil, S., . . . Picard-Hagen, N. (2014). Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reprod Toxicol*, 47, 51-58. doi:10.1016/j.reprotox.2014.06.001

Couri, D., Abdel-Rahman, M. S., & Bull, R. J. (1982). Toxicological effects of chlorine dioxide, chlorite and chlorate. *Environ Health Perspect*, 46, 13-17. doi:10.1289/ehp.824613

Del Olmo, M., Zafra-Gomez, A., Suarez, B., Gonzalez-Casado, A., Taoufiki, J., & Vilchez, J. L. (2005). Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, Volume 817*, 167-172. doi:doi:10.1016/j.jchromb.2004.11.059

Derendorf, H., & Schmidt, S. (2019). *Rowland and Tozer's Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications* (W. K. H. e. é. j. 2019) Ed.).

Dodson, R. E., Nishioka, M., Standley, L. J., Perovich, L. J., Brody, J. G., & Rudel, R. A. (2012). Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environ Health Perspect*, 120(7), 935-943. doi:10.1289/ehp.1104052

Dominguez-Romero, E., & Scheringer, M. (2019). A review of phthalate pharmacokinetics in human and rat: what factors drive phthalate distribution and partitioning? *Drug Metab Rev*, 51(3), 314-329. doi:10.1080/03602532.2019.1620762

Domoradzki, J. Y., Pottenger, L. H., Thornton, C. M., Hansen, S. C., Card, T. L., Markham, D. A., . . . Waechter, J. M., Jr. (2003). Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-mono-glucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicol Sci*, 76(1), 21-34. doi:10.1093/toxsci/kfg206

Dorival-Garcia, N., Zafra-Gomez, A., Navalon, A., & Vilchez, J. L. (2012). Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *J Chromatogr A*, 1253, 1-10. doi:10.1016/j.chroma.2012.06.079

Doumas, M., Rouillon, S., Venisse, N., Nadeau, C., Pierre Eugene, P., Farce, A., . . . Carato, P. (2018). Chlorinated and brominated bisphenol A derivatives: Synthesis, characterization and determination in water samples. *Chemosphere*, 213, 434-442. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.061

Dupuis, A., Migeot, V., Cariot, A., Albouy-Llaty, M., Legube, B., & Rabouan, S. (2012). Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int*, 19(9), 4193-4205. doi:10.1007/s11356-012-0972-3

EFSA. (2016). Review of non-monotonic dose-responses of substances for human risk assessment. External Scientific Report. Online : <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1027>.

EPA. (2006). National Primary Drinking Water Regulations : Stage 2 Disinfectants and Disinfection By-products Rule. Federal Register 71 (2), 387-493.

EPA, A. (2000). Toxicological Review of Chlorine Dioxide and Chlorite, In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/636/R-00/007.

EPA, U. (1998). National primary drinking water regulations : disinfectants and disinfection byproducts; final rule, Fed. Reg. 63. 69390-69476.

EPA, U. (2018). 2,2',6,6'-Tetrachlorobisphenol A 79-95-8 | DTXSID3021770. Retrieved from [https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID3021770#exec\\_sum](https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID3021770#exec_sum)

EU. (2020). Endocrine Disruptors List. <https://edlists.org/the-ed-lists>.

European Medicines Agency, E. (2012). Guideline on bioanalytical method of validation. *Sciences Medicines Health*, p.23.

Fan, Z., Hu, J., An, W., & Yang, M. (2013). Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds. *Environ Sci Technol*, 47(19), 10841-10850. doi:10.1021/es401504a

Feinberg, A. P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 447(7143), 433-440. doi:10.1038/nature05919

Feng, L., Chen, S., Zhang, L., Qu, W., & Chen, Z. (2019). Bisphenol A increases intestinal permeability through disrupting intestinal barrier function in mice. *Environ Pollut*, 254(Pt A), 112960. doi:10.1016/j.envpol.2019.112960

Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufik, J., Navalon, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., . . . Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol*, 24(2), 259-264. doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.007

Fisher, J. W., Twaddle, N. C., Vanlandingham, M., & Doerge, D. R. (2011). Pharmacokinetic modeling: prediction and evaluation of route dependent dosimetry of bisphenol A in monkeys with extrapolation to humans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 257(1), 122-136. doi:10.1016/j.taap.2011.08.026

Fisher, J. W., Yang, X., Mehta, D., Housand, C., & Lin, Z. (2020). Fundamentals of physiologically based pharmacokinetic modeling. Dans J.W. Fisher, J.M. Gearhart, Z. Lin (Eds.). *Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling. Methods and Applications in Toxicology in Toxicology and Risk Assessment. Academic Press, India, Chennai*, pp.57-80.

Fukazawa, H., Hoshino, K., Shiozawa, T., Matsushita, H., & Terao, Y. (2001). Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*, 44(5), 973-979. doi:10.1016/s0045-6535(00)00507-5

Gallard, H., Leclercq, A., & Croue, J. P. (2004). Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere*, 56(5), 465-473. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.03.001

Gallart-Ayala, H., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2010). On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A*, 1217(21), 3511-3518. doi:10.1016/j.chroma.2010.03.028

Ganiev, I. M., Suvorkina, S., & Kabal Nova, N. (2003). Reaction of chlorine dioxide with phenol. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, 52, 1123-1128.

Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P. L., Servien, R., Viguie, C., Puel, S., . . . 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(1), 15330. doi:10.1038/s41598-017-15646-5

Geens, T., Roosens, L., Neels, H., & Covaci, A. (2009). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*, 76(6), 755-760. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.024

Ginsberg, G., & Rice, D. C. (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect*, 117(11), 1639-1643. doi:10.1289/ehp.0901010

Gouukon, Y., Yasuda, M. T., Yasukawa, H., & Terasaki, M. (2020). Occurrence and AhR activity of brominated parabens in the Kitakami River, North Japan. *Chemosphere*, 249, 126152. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126152

Grignon, C., Dupuis, A., Albouy-Llaty, M., Condylis, M., Barrier, L., Carato, P., . . . Venisse, N. (2017). Validation of a probe for assessing deconjugation of glucuronide and sulfate phase II metabolites assayed through LC-MS/MS in biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1061-1062, 72-78. doi:10.1016/j.jchromb.2017.07.013

Grignon, C., Venisse, N., Rouillon, S., Brunet, B., Bacle, A., Thevenot, S., . . . Dupuis, A. (2016). Ultrasensitive determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urine using a high-throughput UPLC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem*, 408(9), 2255-2263. doi:10.1007/s00216-015-9288-8

Haddad, S., Poulin, P., & Krishnan, K. (2000). Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue: blood partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere*, 40(8), 839-843. doi:10.1016/s0045-6535(99)00279-9

Haddad, S., Tardif, G. C., & Tardif, R. (2006). Development of physiologically based toxicokinetic models for improving the human indoor exposure assessment to water contaminants: trichloroethylene and trihalomethanes. *J Toxicol Environ Health A*, 69(23), 2095-2136. doi:10.1080/15287390600631789

Hakk, H., Larsen, G., Bergman, A., & Orn, U. (2000). Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats. *Xenobiotica*, 30(9), 881-890. doi:10.1080/004982500433309

Heindel, J. J., Skalla, L. A., Joubert, B. R., Dilworth, C. H., & Gray, K. A. (2017). Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology. *Reprod Toxicol*, 68, 34-48. doi:10.1016/j.reprotox.2016.11.011

Houston, J. B. (1994). Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol*, 47(9), 1469-1479. doi:10.1016/0006-2952(94)90520-7

Hu, C., Schottker, B., Venisse, N., Limousi, F., Saulnier, P. J., Albouy-Llaty, M., . . . Hadjadj, S. (2019). Bisphenol A, Chlorinated Derivatives of Bisphenol A and Occurrence of Myocardial Infarction in Patients with Type 2 Diabetes: Nested Case-Control Studies in Two European Cohorts. *Environ Sci Technol*, 53(16), 9876-9883. doi:10.1021/acs.est.9b02963

Hu, J. Y., Aizawa, T., & Ookubo, S. (2002). Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol*, 36(9), 1980-1987. doi:10.1021/es011177b

Huang, Q., Liu, W., Peng, P., & Huang, W. (2013). Reductive dechlorination of tetrachlorobisphenol A by Pd/Fe bimetallic catalysts. *J Hazard Mater*, 262, 634-641. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.09.015

IARC. (1987). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs. *International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, vols. 1-42*.

Janesick, A., & Blumberg, B. (2011a). Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 93(1), 34-50. doi:10.1002/bdrc.20197

Janesick, A., & Blumberg, B. (2011b). Minireview: PPARgamma as the target of obesogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(1-2), 4-8. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.01.005

Janesick, A., & Blumberg, B. (2012). Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. *Int J Androl*, 35(3), 437-448. doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01247.x

Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalon, A., Fernandez, M. F., . . . Vilchez, J. L. (2010). Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(32), 3363-3369. doi:10.1016/j.jchromb.2010.10.021

Kahn, L. G., Philippat, C., Nakayama, S. F., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8(8), 703-718. doi:10.1016/S2213-8587(20)30129-7

Kalyvas, H., Andra, S. S., Charisiadis, P., Karaolis, C., & Makris, K. C. (2014). Influence of household cleaning practices on the magnitude and variability of urinary monochlorinated bisphenol A. *Sci Total Environ*, 490, 254-261. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.072



- Kassotis, C. D., Vandenberg, L. N., Demeneix, B. A., Porta, M., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8(8), 719-730. doi:10.1016/S2213-8587(20)30128-5
- Kato, K., Wong, L. Y., Jia, L. T., Kuklennyik, Z., & Calafat, A. M. (2011). Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: 1999-2008. *Environ Sci Technol*, 45(19), 8037-8045. doi:10.1021/es1043613
- Kim, Y. H., Kim, C. S., Park, S., Han, S. Y., Pyo, M. Y., & Yang, M. (2003). Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun*, 312(2), 441-448. doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.135
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., & Fujimoto, N. (2002). Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(1), 554-559. doi:10.1016/S0006-291X(02)00262-0
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., . . . Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol Sci*, 84(2), 249-259. doi:10.1093/toxsci/kfi074
- Kosaka, K., Hayashida, T., Terasaki, M., Asami, M., Yamada, T., Itoh, M., & Akiba, M. (2012). Elution of bisphenol A and its chlorination by-products from lined pipes in water supply process. *Water Supply, Volume 12*(Issue 6), 791-798. doi:<https://doi.org/10.2166/ws.2012.055>
- Kurebayashi, H., Okudaira, K., & Ohno, Y. (2010). Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett*, 198(2), 210-215. doi:10.1016/j.toxlet.2010.06.017
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., & Terao, Y. (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol*, 19(1), 121-130. doi:10.1016/j.etap.2004.05.009
- Kuruto-Niwa, R., Terao, Y., & Nozawa, R. (2002). Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol*, 12(1), 27-35. doi:10.1016/s1382-6689(02)00011-x
- Lakind, J. S., Levesque, J., Dumas, P., Bryan, S., Clarke, J., & Naiman, D. Q. (2012). Comparing United States and Canadian population exposures from National Biomonitoring Surveys: bisphenol A intake as a case study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 22(3), 219-226. doi:10.1038/jes.2012.1
- Lan, J., Shen, Z., Gao, W., & Liu, A. (2019). Occurrence of bisphenol-A and its brominated derivatives in tributary and estuary of Xiaoqing River adjacent to Bohai Sea, China. *Mar Pollut Bull*, 149, 110551. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110551
- Lei, B., Tang, Q., Sun, S., Zhang, X., Huang, Y., & Xu, L. (2021). Insight into the mechanism of tetrachlorobisphenol A (TCBPA)-induced proliferation of breast cancer cells by GPER-mediated signaling pathways. *Environ Pollut*, 275, 116636. doi:10.1016/j.envpol.2021.116636
- Lei, B., Xu, J., Peng, W., Wen, Y., Zeng, X., Yu, Z., . . . Chen, T. (2017). In vitro profiling of toxicity and endocrine disrupting effects of bisphenol analogues by employing MCF-7 cells and two-hybrid yeast bioassay. *Environ Toxicol*, 32(1), 278-289. doi:10.1002/tox.22234
- Li, A., Zhuang, T., Shi, W., Liang, Y., Liao, C., Song, M., & Jiang, G. (2020). Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China. *Sci Total Environ*, 707, 136100. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136100
- Li, C., Wang, Z., Yang, Y. J., Liu, J., Mao, X., & Zhang, Y. (2015). Transformation of bisphenol A in water distribution systems: a pilot-scale study. *Chemosphere*, 125, 86-93. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.047



- Liao, C., & Kannan, K. (2012). Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol*, 46(9), 5003-5009. doi:10.1021/es300115a
- 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(19), 4655-4662. doi:10.1021/jf400445n
- Lin, Y. J., & Lin, Z. (2020). In vitro-in silico-based probabilistic risk assessment of combined exposure to bisphenol A and its analogues by integrating ToxCast high-throughput in vitro assays with in vitro to in vivo extrapolation (IVIVE) via physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling. *J Hazard Mater*, 399, 122856. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122856
- Lipscomb, J. C., Haddad, S., Poet, T., & Krishnan, K. (2012). PHYSIOLOGICALLY-BASED PHARMACOKINETIC (PBPK) MODELS IN TOXICITY TESTING AND RISK ASSESSMENT. In L. B. a. S. S. B. Media. (Ed.), *New Technologies for Toxicity Testing*.
- Liu, H., Zhao, H., Quan, X., Zhang, Y., & Chen, S. (2009). Formation of chlorinated intermediate from bisphenol A in surface saline water under simulated solar light irradiation. *Environ Sci Technol*, 43(20), 7712-7717. doi:10.1021/es900811c
- Loccisano, A. E., Campbell, J. L., Jr., Butenhoff, J. L., Andersen, M. E., & Clewell, H. J., 3rd. (2012). Comparison and evaluation of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model. *Reprod Toxicol*, 33(4), 452-467. doi:10.1016/j.reprotox.2011.04.006
- Mascolo, G., Locaputo, V., & Mininni, G. (2010). New perspective on the determination of flame retardants in sewage sludge by using ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry with different ion sources. *J Chromatogr A*, 1217(27), 4601-4611. doi:10.1016/j.chroma.2010.05.003
- Masschelein, W. (1979). Chlorine Dioxide: Chemistry and Environmental Impact of Oxychlorine Compounds. *Ann Arbor Publishers*, 450 pp.
- Mazur, C. S., Marchitti, S. A., Dimova, M., Kenneke, J. F., Lumen, A., & Fisher, J. (2012). Human and rat ABC transporter efflux of bisphenol a and bisphenol a glucuronide: interspecies comparison and implications for pharmacokinetic assessment. *Toxicol Sci*, 128(2), 317-325. doi:10.1093/toxsci/kfs167
- Migeot, V., Dupuis, A., Cariot, A., Albouy-Llaty, M., Pierre, F., & Rabouan, S. (2013). Bisphenol a and its chlorinated derivatives in human colostrum. *Environ Sci Technol*, 47(23), 13791-13797. doi:10.1021/es403071a
- Mirfazaelian, A., & Fisher, J. W. (2007). Organ growth functions in maturing male Sprague-Dawley rats based on a collective database. *J Toxicol Environ Health A*, 70(12), 1052-1063. doi:10.1080/15287390601172106
- Mirfazaelian, A., Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., Tornero-Velez, R., Bruckner, J. V., & Fisher, J. W. (2006). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for deltamethrin in the adult male Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci*, 93(2), 432-442. doi:10.1093/toxsci/kfl056
- Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J. M., Real, M., Fernandez, M. F., . . . Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272(1), 127-136. doi:10.1016/j.taap.2013.05.015

Mutou, Y., Ibuki, Y., Terao, Y., Kojima, S., & Goto, R. (2006). Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol a after exposure to ultraviolet B. *Biol Pharm Bull*, 29(10), 2116-2119. doi:10.1248/bpb.29.2116

Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M., & Welshons, W. V. (1997). Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*, 105(1), 70-76. doi:10.1289/ehp.9710570

Niu, Y., Wang, B., Yang, R., Wu, Y., Zhao, Y., Li, C., . . . Shao, B. (2021). Bisphenol Analogues and Their Chlorinated Derivatives in Breast Milk in China: Occurrence and Exposure Assessment. *J Agric Food Chem*, 69(4), 1391-1397. doi:10.1021/acs.jafc.0c06938

Olsen, C. M., Meussen-Elholm, E. T., Samuelsen, M., Holme, J. A., & Hongso, J. K. (2003). Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacol Toxicol*, 92(4), 180-188. doi:10.1034/j.1600-0773.2003.920408.x

OMS. (1996). Chlorite in : Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, World Health Organization. . Volume 2.

Patterson, T. A., Twaddle, N. C., Roegge, C. S., Callicott, R. J., Fisher, J. W., & Doerge, D. R. (2013). Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*, 267(1), 41-48. doi:10.1016/j.taap.2012.12.006

Pellizzari, E. D., Woodruff, T. J., Boyles, R. R., Kannan, K., Beamer, P. I., Buckley, J. P., . . . Bennett, D. H. (2019). Identifying and Prioritizing Chemicals with Uncertain Burden of Exposure: Opportunities for Biomonitoring and Health-Related Research. *Environ Health Perspect*, 127(12), 126001. doi:10.1289/EHP5133

Plattard, N., Dupuis, A., Migeot, V., Haddad, S., & Venisse, N. (2021). An overview of the literature on emerging pollutants: Chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA). *Environ Int*, 153, 106547. doi:10.1016/j.envint.2021.106547

Plattard, N., Venisse, N., Carato, P., Dupuis, A., & Haddad, S. (2022). Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of bisphenol A (ClxBPA) and interspecies differences between rats and humans. *Arch Toxicol*. doi:10.1007/s00204-021-03217-7

Plattard, N., Venisse, N., Carato, P., Dupuis, A., & Haddad, S. (2022). Hepatic metabolism of chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA) and interspecies differences between rats and humans. *Arch Toxicol*, *accepted*.

Poulin, P., & Haddad, S. (2012). Advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue-composition-based model as a mechanistic animal alternative method. *J Pharm Sci*, 101(6), 2250-2261. doi:10.1002/jps.23090

Poulin, P., & Haddad, S. (2015). Albumin and Uptake of Drugs in Cells: Additional Validation Exercises of a Recently Published Equation that Quantifies the Albumin-Facilitated Uptake Mechanism(s) in Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling Research. *J Pharm Sci*, 104(12), 4448-4458. doi:10.1002/jps.24676

Poulin, P., & Haddad, S. (2021). A New Guidance for the Prediction of Hepatic Clearance in the Early Drug Discovery and Development from the in Vitro-to-in Vivo Extrapolation Method and an Approach for Exploring Whether an Albumin-Mediated Hepatic Uptake Phenomenon

Could be Present Under in Vivo Conditions. *J Pharm Sci*, 110(7), 2841-2858. doi:10.1016/j.xphs.2021.04.002

Poulin, P., & Krishnan, K. (1996a). A mechanistic algorithm for predicting blood:air partition coefficients of organic chemicals with the consideration of reversible binding in hemoglobin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 131-137. doi:10.1006/taap.1996.0016

Poulin, P., & Krishnan, K. (1996b). A tissue composition-based algorithm for predicting tissue:air partition coefficients of organic chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 126-130. doi:10.1006/taap.1996.0015

Qian, Y., Jia, X., Ding, T., Yang, M., Yang, B., & Li, J. (2021). Occurrence and removal of bisphenol analogues in wastewater treatment plants and activated sludge bioreactor. *Sci Total Environ*, 758, 143606. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143606

Qingdong, X., Guangming, Z., & Li, W. (2006). Study on subchronic toxicity of chlorine dioxide and by-products in water. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 41(7), 1347-1353. doi:10.1080/10934520600657016

Ramal-Sanchez, M., Valbonetti, L., Tsikis, G., Dubuisson, F., Blache, M. C., Labas, V., . . . Bernabo, N. (2019). Graphene oxide: A glimmer of hope for Assisted Reproductive Technology. *Carbon*, 150, 518-530. doi:10.1016/j.carbon.2019.05.055

Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., & Demarini, D. M. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat Res*, 636(1-3), 178-242. doi:10.1016/j.mrrev.2007.09.001

Riu, A., Grimaldi, M., le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., . . . Balaguer, P. (2011a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 119(9), 1227-1232. doi:10.1289/ehp.1003328

Riu, A., le Maire, A., Grimaldi, M., Audebert, M., Hillenweck, A., Bourguet, W., . . . Zalko, D. (2011b). Characterization of novel ligands of ERalpha, Erbeta, and PPARgamma: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci*, 122(2), 372-382. doi:10.1093/toxsci/kfr132

Riu, A., McCollum, C. W., Pinto, C. L., Grimaldi, M., Hillenweck, A., Perdu, E., . . . Gustafsson, J. A. (2014). Halogenated bisphenol-A analogs act as obesogens in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Toxicol Sci*, 139(1), 48-58. doi:10.1093/toxsci/kfu036

Rivas, A., Lacroix, M., Olea-Serrano, F., Laios, I., Leclercq, G., & Olea, N. (2002). Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82(1), 45-53. doi:10.1016/s0960-0760(02)00146-2

Rivett, A. J., Eddy, B. J., & Roth, J. A. (1982). Contribution of sulfate conjugation, deamination, and O-methylation to metabolism of dopamine and norepinephrine in human brain. *J Neurochem*, 39(4), 1009-1016. doi:10.1111/j.1471-4159.1982.tb11490.x

Rodgers, T. R. M. (2005). Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling 2: Predicting the Tissue Distribution of Acids, Very Weak Bases, Neutrals and Zwitterions. *Wiley InterScience*, VOL.95. doi:DOI 10.1002/jps.20502

Rodriguez, C. E., Mahle, D. A., Gearhart, J. M., Mattie, D. R., Lipscomb, J. C., Cook, R. S., & Barton, H. A. (2007). Predicting age-appropriate pharmacokinetics of six volatile organic compounds in the rat utilizing physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicol Sci*, 98(1), 43-56. doi:10.1093/toxsci/kfm082

- Rodriguez-Gomez, R., Jimenez-Diaz, I., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., & Navalon, A. (2014). A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure. *Talanta*, *130*, 561-570. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.047
- Rodriguez-Gomez, R., Zafra-Gomez, A., Camino-Sanchez, F. J., Ballesteros, O., & Navalon, A. (2014). Gas chromatography and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk after stir-bar sorptive extraction. *J Chromatogr A*, *1349*, 69-79. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.100
- Rook, J. J. (1974). Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *J. Water Treat. Exam.*
- Rouillon, S., El Ouazzani, H., Hardouin, J. B., Enjalbert, L., Rabouan, S., Migeot, V., & Albouy-Llaty, M. (2020). How to Educate Pregnant Women about Endocrine Disruptors? *Int J Environ Res Public Health*, *17*(6). doi:10.3390/ijerph17062156
- Sasaki, K., & Terasaki, M. (2018). Estrogen agonistic/antagonistic activity of brominated parabens. *Environ Sci Pollut Res Int*, *25*(21), 21257-21266. doi:10.1007/s11356-018-2600-3
- Schauer, U. M., Volkel, W., & Dekant, W. (2006). Toxicokinetics of tetrabromobisphenol a in humans and rats after oral administration. *Toxicol Sci*, *91*(1), 49-58. doi:10.1093/toxsci/kfj132
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, *110*(11), A703-707. doi:10.1289/ehp.110-1241091
- Sharma, R. P., Schuhmacher, M., & Kumar, V. (2018). The development of a pregnancy PBPK Model for Bisphenol A and its evaluation with the available biomonitoring data. *Sci Total Environ*, *624*, 55-68. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.023
- Shin, B. S., Kim, C. H., Jun, Y. S., Kim, D. H., Lee, B. M., Yoon, C. H., . . . Yoo, S. D. (2004). Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *J Toxicol Environ Health A*, *67*(23-24), 1971-1985. doi:10.1080/15287390490514615
- Skledar, D., Troberg, J., Lavdas, J., Masic, L., & Finel, M. (2014). Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica*, 511-519. doi:10.3109/00498254.2014.999140. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25547628.
- Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C., & Fennell, T. R. (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, *168*(3), 225-234. doi:10.1006/taap.2000.9051
- Somm, E., Schwitzgebel, V. M., Toulotte, A., Cederroth, C. R., Combescure, C., Nef, S., . . . Huppi, P. S. (2009). Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect*, *117*(10), 1549-1555. doi:10.1289/ehp.11342
- Song, S., Song, M., Zeng, L., Wang, T., Liu, R., Ruan, T., & Jiang, G. (2014). Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environ Pollut*, *186*, 14-19. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.023
- 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. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.129624

- Sorlini, S., Gialdini, F., Biasibetti, M., & Collivignarelli, C. (2014). Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. *Water Res*, *54*, 44-52. doi:10.1016/j.watres.2014.01.038
- Stulcova, B. (1977). Postnatal development of cardiac output distribution measured by radioactive microspheres in rats. *Biol Neonate*, *32*(3-4), 119-124. doi:10.1159/000241004
- Swedenborg, E., Ruegg, J., Makela, S., & Pongratz, I. (2009). Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol*, *43*(1), 1-10. doi:10.1677/JME-08-0132
- Takahashi, O., & Oishi, S. (2000). Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect*, *108*(10), 931-935. doi:10.1289/ehp.00108931
- Takemura, H., Ma, J., Sayama, K., Terao, Y., Zhu, B. T., & Shimoi, K. (2005). In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology*, *207*(2), 215-221. doi:10.1016/j.tox.2004.09.015
- Takigami, H., Suzuki, G., Hirai, Y., & Sakai, S. (2009). Brominated flame retardants and other polyhalogenated compounds in indoor air and dust from two houses in Japan. *Chemosphere*, *76*(2), 270-277. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.006
- Tan, Y. M., Liao, K. H., & Clewell, H. J., 3rd. (2007). Reverse dosimetry: interpreting trihalomethanes biomonitoring data using physiologically based pharmacokinetic modeling. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, *17*(7), 591-603. doi:10.1038/sj.jes.7500540
- Teeguarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Yang, X., Fisher, J. W., Seryak, L. M., & Doerge, D. R. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol Appl Pharmacol*, *288*(2), 131-142. doi:10.1016/j.taap.2015.01.009
- Teeguarden, J. G., Waechter, J. M., Jr., Clewell, H. J., 3rd, Covington, T. R., & Barton, H. A. (2005). Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci*, *85*(2), 823-838. doi:10.1093/toxsci/kfi135
- Terasaki, M., Kosaka, K., Kunikane, S., Makino, M., & Shiraishi, F. (2011). Assessment of thyroid hormone activity of halogenated bisphenol A using a yeast two-hybrid assay. *Chemosphere*, *84*(10), 1527-1530. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.04.045
- Thayer, K. A., Doerge, D. R., Hunt, D., Schurman, S. H., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., . . . Birnbaum, L. S. (2015). Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ Int*, *83*, 107-115. doi:10.1016/j.envint.2015.06.008
- Tian, J., Ji, Z., Wang, F., Song, M., & Li, H. (2017). The Toxic Effects of Tetrachlorobisphenol A in *Saccharomyces cerevisiae* Cells via Metabolic Interference. *Sci Rep*, *7*(1), 2655. doi:10.1038/s41598-017-02939-y
- Trasande, L., Zoeller, R. T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J. P., . . . Heindel, J. J. (2015). Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European union. *J Clin Endocrinol Metab*, *100*(4), 1245-1255. doi:10.1210/jc.2014-4324
- Trasande, L., Zoeller, R. T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J. P., . . . Heindel, J. J. (2016). Burden of disease and costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union: an updated analysis. *Andrology*, *4*(4), 565-572. doi:10.1111/andr.12178
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*, *2*(4), 236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879

- van Liempd, S., Morrison, D., Sysmans, L., Nelis, P., & Mortishire-Smith, R. (2011). Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. *J Lab Autom*, *16*(1), 56-67. doi:10.1016/j.jala.2010.06.002
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, *24*(2), 139-177. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- Vandentorren, S., Bois, C., Pirus, C., Sarter, H., Salines, G., Leridon, H., & Elfe, t. (2009). Rationales, design and recruitment for the Elfe longitudinal study. *BMC Pediatr*, *9*, 58. doi:10.1186/1471-2431-9-58
- Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Camino-Sanchez, F. J., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, L., & Narvalon, A. (2015). Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Microchemical Journal, Volume 118*, 32-39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.07.018>
- Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, L., & Navalon, A. (2014). UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. *Anal Bioanal Chem*, *406*(15), 3773-3785. doi:10.1007/s00216-014-7785-9
- Vela-Soria, F., Jimenez-Diaz, I., Rodriguez-Gomez, R., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Fernandez, M. F., . . . Navalon, A. (2011). A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC-MS/MS. *Analytical Methods*(9). doi:10.1039/c1ay05162h
- Venisse, N., Cambien, G., Robin, J., Rouillon, S., Nadeau, C., Charles, T., . . . Dupuis, A. (2019). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in adipose tissue. *Talanta*, *204*, 145-152. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.103
- Venisse, N., Grignon, C., Brunet, B., Thevenot, S., Bacle, A., Migeot, V., & Dupuis, A. (2014). Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC-MS/MS method. *Talanta*, *125*, 284-292. doi:10.1016/j.talanta.2014.02.064
- Verner, M. A., Ayotte, P., Muckle, G., Charbonneau, M., & Haddad, S. (2009). A physiologically based pharmacokinetic model for the assessment of infant exposure to persistent organic pollutants in epidemiologic studies. *Environ Health Perspect*, *117*(3), 481-487. doi:10.1289/ehp.0800047
- Vogel, S. A. (2009). The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health*, *99 Suppl 3*, S559-566. doi:10.2105/AJPH.2008.159228
- Volkel, 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*(11), 1748-1757. doi:10.1124/dmd.105.005454
- Volkel, W., Colnot, T., Csanady, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, *15*(10), 1281-1287. doi:10.1021/tx025548t
- Volkel, W., Kiranoglu, M., & Fromme, H. (2008). Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett*, *179*(3), 155-162. doi:10.1016/j.toxlet.2008.05.002
- Vom Saal, F. S., VandeVoort, C. A., Taylor, J. A., Welshons, W. V., Toutain, P. L., & Hunt, P. A. (2014). Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure

via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reprod Toxicol*, 45, 105-116. doi:10.1016/j.reprotox.2014.01.007

Wan, D., Wang, H., Pozdnyakov, I. P., Wang, C., Su, J., Zhang, Y., . . . Chen, Y. (2020). Formation and enhanced photodegradation of chlorinated derivatives of bisphenol A in wastewater treatment plant effluent. *Water Res*, 184, 116002. doi:10.1016/j.watres.2020.116002

Wang, W., Abualnaja, K. O., Asimakopoulos, A. G., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., . . . 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. doi:10.1016/j.envint.2015.06.015

Wang, Y., Zhang, W., Li, A., & Song, M. (2021). Tetrachlorobisphenol A induced immunosuppression and uterine injury in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 207, 111527. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111527

Waters, N. J., Jones, R., Williams, G., & Sohal, B. (2008). Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *J Pharm Sci*, 97(10), 4586-4595. doi:10.1002/jps.21317

Wu, Y., Li, Y., Kang, D., Wang, J., Zhang, Y., Du, D., . . . Dong, Q. (2016). Tetrabromobisphenol A and heavy metal exposure via dust ingestion in an e-waste recycling region in Southeast China. *Sci Total Environ*, 541, 356-364. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.038

Yamamoto, T., & Yasuhara, A. (2002). Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere*, 46(8), 1215-1223. doi:10.1016/s0045-6535(01)00198-9

Yamauchi, K., Ishihara, A., Fukazawa, H., & Terao, Y. (2003). Competitive interactions of chlorinated phenol compounds with 3,3',5-triiodothyronine binding to transthyretin: detection of possible thyroid-disrupting chemicals in environmental waste water. *Toxicol Appl Pharmacol*, 187(2), 110-117. doi:10.1016/s0041-008x(02)00045-5

Yang, X., Doerge, D. R., & Fisher, J. W. (2013). Prediction and evaluation of route dependent dosimetry of BPA in rats at different life stages using a physiologically based pharmacokinetic model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 270(1), 45-59. doi:10.1016/j.taap.2013.03.022

Yang, Y., Guan, J., Yin, J., Shao, B., & Li, H. (2014). Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*, 112, 481-486. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.004

Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2005). Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 383(4), 638-644. doi:10.1007/s00216-005-0019-4

Ye, Z., Zetterberg, C., & Gao, H. (2017). Automation of plasma protein binding assay using rapid equilibrium dialysis device and Tecan workstation. *J Pharm Biomed Anal*, 140, 210-214. doi:10.1016/j.jpba.2017.03.019

Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S., & Yuasa, A. (1999). Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*, 340 ( Pt 2), 405-409. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333482>

Yu, Y., Yu, Z., Chen, H., Han, Y., Xiang, M., Chen, X., . . . Wang, Z. (2019). Tetrabromobisphenol A: Disposition, kinetics and toxicity in animals and humans. *Environ Pollut*, 253, 909-917. doi:10.1016/j.envpol.2019.07.067

- Yuan, S. Y., Li, H. T., Huang, H. W., & Chang, B. V. (2010). Biodegradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment and the microbial community changes. *J Environ Sci Health B*, 45(5), 360-365. doi:10.1080/03601231003799820
- Zhang, X., Zhang, Y., Ji, Z., Wang, F., Zhang, L., Song, M., & Li, H. (2020). Oxidative damage mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to tetrachlorobisphenol A. *Environ Toxicol Pharmacol*, 80, 103507. doi:10.1016/j.etap.2020.103507
- Zhao, C., Tang, Z., Chung, A. C. K., Wang, H., & Cai, Z. (2019). Metabolic perturbation, proliferation and reactive oxygen species jointly contribute to cytotoxicity of human breast cancer cell induced by tetrabromo and tetrachloro bisphenol A. *Ecotoxicol Environ Saf*, 170, 495-501. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.12.018
- Zheng, S., Shi, J., Zhang, J., Yang, Y., Hu, J., & Shao, B. (2018). Identification of the disinfection byproducts of bisphenol S and the disrupting effect on peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) induced by chlorination. *Water Res*, 132, 167-176. doi:10.1016/j.watres.2017.12.071
- Zheng, S., Shi, J. C., Hu, J. Y., Hu, W. X., Zhang, J., & Shao, B. (2016). Chlorination of bisphenol F and the estrogenic and peroxisome proliferator-activated receptor gamma effects of its disinfection byproducts. *Water Res*, 107, 1-10. doi:10.1016/j.watres.2016.10.048
- Zhou, Y., Chen, M., Zhao, F., Mu, D., Zhang, Z., & Hu, J. (2015). Ubiquitous occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A and nonylphenol in bleached food contacting papers and their implications for human exposure. *Environ Sci Technol*, 49(12), 7218-7226. doi:10.1021/acs.est.5b00831



## **9 Annexe 2 : Certificat d'éthique animal**

---

**CDEA-F1 DEMANDE D'AUTORISATION D'UTILISER DES ANIMAUX****1. IDENTIFICATION DU PROFESSEUR RESPONSABLE**

NOM : **HADDAD** PRÉNOM : **Sami**  
 DÉPARTEMENT : **SEST** TÉLÉPHONE : **38166**  
 FACULTÉ : **Médecine**  
 ADRESSE : **2375, chemin de la Côte Ste-Catherine, local 4095**  
 FONCTION : **Professeur** COURRIEL : **sami.haddad@umontreal.ca**

**2. IDENTIFICATION DU PROTOCOLE**

TITRE DU PROJET :

**Développement d'un modèle pharmacocinétique à base physiologique pour évaluer l'exposition des femmes enceintes aux dérivés chlorés du bisphénol A (Clx-BPA)**

NOUVELLE DEMANDE  RENOUELEMENT\*, NUMÉRO PRÉCÉDENT :

\* **RENOUELEMENT** : SI VOUS AVEZ ÉLABORÉ UNE (OU PLUSIEURS) PROCÉDURE NORMALISÉE DE FONCTIONNEMENT (PNF), NOUS VOUS PRIONS DE LA RÉVISER POUR LA METTRE À JOUR, PUIS DE NOUS LA TRANSMETTRE, INCLUANT TOUTES LES MODIFICATIONS APPORTÉES MISES EN ÉVIDENCE.

TYPE DE PROTOCOLE : *Expérimental*

PROTOCOLE DE REPRODUCTION : UN FORMULAIRE DISTINCT POUR LE PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DOIT ÊTRE SOUMIS EN MÊME TEMPS AFIN DE JUSTIFIER LA PRODUCTION D'ANIMAUX.

DATE PRÉVUE DU DÉBUT : **Mars 2020**DATE PRÉVUE DE LA FIN : **Avril 2020**

BUT DE L'UTILISATION DES ANIMAUX (BU)\* : BU 1 Études de nature fondamentale CATÉGORIE DE TECHNIQUES INVASIVES\* : B - Peu ou pas d'inconfort ou de stress

\* VOIR ANNEXES I ET II DE CE FORMULAIRE POUR LA DESCRIPTION DES BUTS D'UTILISATION DES ANIMAUX ET DES CATÉGORIES DE TECHNIQUES INVASIVES.

**3. FINANCEMENT**

ORGANISME SUBVENTIONNAIRE	ACCORDÉE	EN ATTENTE*	COMITÉ DE PAIRS EXTERNE À L'UDEM**	
1. ANSES	<input type="checkbox"/> N° COMPTE :	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON
2.	<input type="checkbox"/> N° COMPTE :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON
3.	<input type="checkbox"/> N° COMPTE :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON

\* Si les fonds ne sont pas accordés, mais qu'une évaluation positive a été prodiguée par l'organisme subventionnaire, vous pouvez en informer le CDEA en transmettant une copie de la lettre indiquant la cote d'évaluation. Nous procéderons à une pré-évaluation et, seulement si cela s'avère nécessaire vous devrez suivre la procédure d'évaluation du mérite scientifique, telle que décrite sur le site web du CDEA ([www.cdea.umontreal.ca](http://www.cdea.umontreal.ca)).

\*\* Si l'organisme n'a pas de Comité de pairs qui voit le mérite scientifique du projet, suivre la procédure d'évaluation du mérite scientifique.

ORGANISMES SUBVENTIONNAIRES SUPPLÉMENTAIRES, COCHER ET LES INDIQUER À LA SECTION 6 DE LA PAGE SUIVANTE.

**4. DÉCLARATION DU PROFESSEUR RESPONSABLE**

LES INFORMATIONS FOURNIES DANS CE FORMULAIRE SONT EXACTES ET COMPLÈTES. JE M'ENGAGE À UTILISER LES ANIMAUX CITÉS CI-APRÈS SELON LES POLITIQUES ET LES NORMES DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL ET EN CONFORMITÉ AVEC LES PRINCIPES ET RECOMMANDATIONS DU CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (CCPA) ET CE, APRÈS AUTORISATION PAR LE COMITÉ DE DÉONTOLOGIE DE L'EXPÉRIMENTATION SUR LES ANIMAUX (CDEA). J'AVISERAI LE CDEA AVANT D'APPORTER TOUTE MODIFICATION AU PROTOCOLE IMPLIQUANT LES ANIMAUX.

JE M'ENGAGE À CE QUE TOUTS LES UTILISATEURS D'ANIMAUX PRENNENT CONNAISSANCE DU PROTOCOLE AUTORISÉ PAR LE CDEA AVANT DE DÉBUTER TOUTE MANIPULATION ANIMALE.

**SIGNATURE DU RESPONSABLE :****DATE :**

**ÉQUIVALENCE DE SIGNATURE** : Transmettre directement la demande à partir du courriel institutionnel [@umontreal.ca](mailto:@umontreal.ca) du professeur responsable **OU** Imprimer – signer – scanner et transmettre par courriel cette 1<sup>re</sup> page à [cdea@umontreal.ca](mailto:cdea@umontreal.ca). Ce formulaire complété en format **WORD** doit être transmis par courriel à [cdea@umontreal.ca](mailto:cdea@umontreal.ca).

**5. AUTORISATION DU CDEA (Réservé à l'usage du Comité)****LE CDEA DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL AUTORISE CETTE DEMANDE D'UTILISATION D'ANIMAUX**

CTI : C

BU : 1

ANIMAUX AUTORISÉS : 92 rats



PRÉSIDENT(E) DU CDEA

31 janvier 2020

DATE D'AUTORISATION (VALIDE UN AN)

## **10 Annexe 3 : Certificat d'éthique humaine**

---

RECRUITING

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04788810

## Toxicokinetic Study of Dichlorobisphenol A After an Oral or Dermal Single Dose in Healthy Volunteer. (PRECEPT)

Information provided by Poitiers University Hospital (Responsible Party)

Last Update Posted: 2021-04-05



### The U.S. government does not review or approve the safety and science of all studies listed on this website.

Read our full [disclaimer \(https://beta.clinicaltrials.gov/full-disclaimer\)](https://beta.clinicaltrials.gov/full-disclaimer) for details.

ClinicalTrials.gov is a website and online database of clinical research studies and information about their results. The National Library of Medicine (NLM) maintains the website. **The study sponsor or investigator submits information** about their study to ClinicalTrials.gov and **is responsible for the safety, science, and accuracy** of any study they list.

Before joining a study, talk to your health care professional about possible risks and benefits. To learn more about taking part in studies, read [Learn About Studies \(https://beta.clinicaltrials.gov/about-studies\)](https://beta.clinicaltrials.gov/about-studies).

### Study record dates

These dates track the progress of study record and summary results submissions to ClinicalTrials.gov. Study records and reported results are reviewed by the National Library of Medicine (NLM) to make sure they meet specific quality control standards before being posted on the public website.

### Study Registration Dates

FIRST SUBMITTED	FIRST SUBMITTED THAT MET QC CRITERIA	FIRST POSTED
2021-03-01	2021-03-05	2021-03-09

### Study Record Updates

LAST UPDATE SUBMITTED THAT MET QC CRITERIA	LAST UPDATE POSTED	LAST VERIFIED
2021-03-31	2021-04-05	2021-03

## Study Tab

### Study Overview

#### Brief Summary:

The objective of this study is to determine toxicokinetic parameters of deuterated d12-Cl2BPA after the administration of a single low dose (50 µg/kg) to healthy volunteers via oral or dermal routes.

#### Detailed Description:

Dichlorobisphenol A (Cl2BPA) is formed by the reaction of chlorine with bisphenol A present in water during water disinfection process. As a consequence, Cl2BPA is present in various aqueous media including tap water. Cl2BPA has also been found in human, in blood, urine, breast milk and adipose tissue suggesting chronic exposure to this compound. Cl2BPA is an endocrine disruptor that binds to estrogenic and PPAR-γ receptors. Epidemiological studies have shown that exposure to DCBPA has been related to the occurrence of diabetes, obesity and myocardial infarction.

Currently, no toxicokinetic data are available to estimate the disposition (ADME) of Cl2BPA after oral and dermal exposure in human while these data are needed for proper risk assessment of this compound.

The objective of this study is to determine toxicokinetic parameters of deuterated d12-Cl2BPA after the administration of a single low dose (50 µg/kg) to healthy volunteers via oral or dermal routes.

OFFICIAL TITLE

## Toxicokinetic Study of Dichlorobisphenol A After an Oral or Dermal Single Dose in Healthy Volunteer.

<b>CONDITIONS</b>	<b>STUDY TYPE</b>	<b>ENROLLMENT (ESTIMATED)</b>
Pharmacokinetic Study	Interventional	12
<b>INTERVENTION / TREATMENT</b>	<b>PHASE</b>	<b>OTHER STUDY ID NUMBERS</b>
Other: Administration of d12-CI2BPA	Not Applicable	2020-A02116-33
<b>STUDY START (ACTUAL)</b>	<b>PRIMARY COMPLETION (ESTIMATED)</b>	<b>STUDY COMPLETION (ESTIMATED)</b>
2021-03-01	2022-03	2022-09

Resource links provided by the National Library of Medicine 

[Other U.S. FDA Resources \(https://clinicaltrials.gov/ct2/info/fdalinks\)](https://clinicaltrials.gov/ct2/info/fdalinks)

## Contacts and Locations

This section provides the contact details for those conducting the study, and information on where this study is being conducted.

### STUDY CONTACT

**Name:** Nicolas Venisse, PhD, PharmD  
**Phone Number:** +33549444980  
**Email:** [nicolas.venisse@chu-poitiers.fr](mailto:nicolas.venisse@chu-poitiers.fr)

## France



Poitiers, France

**Recruiting**

CIC Poitiers

Contact: PJ SAULNIER, Pr

## Participation Criteria

Researchers look for people who fit a certain description, called [eligibility criteria](#). Some examples of these criteria are a person's general health condition or prior treatments.

For general information about clinical research, read [Learn About Studies](#) (<https://beta.clinicaltrials.gov/about-studies>).

### Eligibility Criteria

#### AGES ELIGIBLE FOR STUDY

18 Years to 51 Years  
(Adult)

#### ACCEPTS HEALTHY VOLUNTEERS

Yes

#### SEXES ELIGIBLE FOR STUDY

Female

**DESCRIPTION****Inclusion Criteria:**

- Age 18-51 year old
- No current disease
- BMI range: 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>,
- Non smoker
- Normal renal function
- Normal hepatic function
- Normal gastrointestinal function
- Affiliated to national health insurance
- Having signed an informed consent

**Exclusion Criteria:**

- Renal function  $\leq 90$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (CKD-EPI)
- Altered hepatic function ASAT > 50 UI/L and/or ALAT > 50 UI/L,
- Current disease,
- Heavy alcohol consumption
- No treatment susceptible to alter Cl2BPA toxicokinetics (drugs that interact with metabolic enzymes or transporter proteins,, anti-acids, etc)
- Pregnant women, lactating mothers and women of childbearing potential with no reliable medical contraception

## Study Plan

This section provides details of the study plan, including how the study is designed and what the study is measuring.

### How is the study designed?



**DESIGN DETAILS****Primary Purpose:** Basic Science**Allocation:** Randomized**Interventional Model:** Parallel Assignment**Interventional Model Description:** Oral route = 6 volunteers Dermal route = 6 volunteers**Masking:** None (Open Label)**NUMBER OF ARMS**

2

**ARMS AND INTERVENTIONS**

<b>Participant Group/Arm</b>	<b>Intervention/Treatment</b>
Experimental: Oral route Volunteers receiving d12-CI2BPA via oral route	Other: Administration of d12-CI2BPA Administration of d12-CI2BPA
Experimental: Dermal route Volunteers receiving d12-CI2BPA via oral route	Other: Administration of d12-CI2BPA Administration of d12-CI2BPA

## What is the study measuring?

### PRIMARY OUTCOME MEASURES

Outcome Measure	Measure Description	Time Frame
Area under the plasma concentration versus time curve (AUC)	Non-compartmental and compartmental toxicokinetic analysis	Hour 0- Hour 24
Cmax	Non-compartmental and compartmental toxicokinetic analysis	Hour 0- Hour 24
Total clearance	Non-compartmental and compartmental toxicokinetic analysis	Hour 0 - Hour 24
Volume of distribution	Non-compartmental and compartmental toxicokinetic analysis	Hour 0 - Hour 24

### SECONDARY OUTCOME MEASURES

Outcome Measure	Measure Description	Time Frame
Secondary toxicokinetic parameters	half-life	Hour 0 - Hour 24

## Collaborators and Investigators

This is where you will find people and organizations involved with this study.

### SPONSOR

**Poitiers University Hospital**

### COLLABORATORS

No information provided

### INVESTIGATORS

No information provided

## Publications

The person responsible for entering information about the study voluntarily provides these publications. These may be about anything related to the study.

### GENERAL PUBLICATIONS

No publications available

\* Find [Publications about Study Results](#) and related [Pubmed Publications](#) in the "Results" section of the study record.

## More Information

### Terms related to this study

KEYWORDS PROVIDED BY POITIERS  
UNIVERSITY HOSPITAL

Toxicokinetics  
Endocrine Disruptors  
Bisphenol A derivatives

### Drug and device information, study documents, and helpful links

STUDIES A U.S. FDA-REGULATED DRUG  
PRODUCT

No

STUDIES A U.S. FDA-REGULATED DEVICE  
PRODUCT

No

STUDY DOCUMENTS

No study documents available

## 11 Annexe 4 : Autres contributions réalisées durant et en lien avec les études doctorales

### 11.1 Exposés lors de congrès, conférences

1. **Plattard.N.** Présentation orale de mon sujet de thèse. Forum environnement, Université de Montréal, 2019.
2. **Plattard.N.**, Venisse.N, Badirou.K and Haddad.S. Tetrachlorobisphenol A toxicokinetics in Male Sprague-Dawley Rats. 60th Society of Toxicology congress, March 12-26, 2021, online.
3. **Plattard.N.**, Haddad.S, Dupuis.A, Venisse.N. First report on *in vivo* toxicokinetics of dichlorobisphenol A (Cl<sub>2</sub>BPA). 19<sup>th</sup> IATDMCT congress, September 19-22, 2021, Rome, online.

### 11.2 Bourses et distinctions

1. Bourse d'excellence Rosdev, Université de Montréal, 2020.
2. Bourse de mobilité pour cotutelle de thèse du ministère de l'Éducation et de l'Enseignement Supérieur du Québec (MEES), 2020.
3. Bourse de mobilité de la Fondation Poitiers Université, 2020.
4. Bourse de fin d'études doctorales de 4<sup>ème</sup> année, 2021.
5. Prix Jules Brodeur, département de santé environnementale et santé au travail (DSEST), Université de Montréal, 2021.

