

Université de Montréal

**Interactions métaboliques entre le bisphénol A et le
naproxène dans un modèle de foie de rat isolé et perfusé**

Par

Sara Bounakta

**Département de santé environnementale et santé au travail
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Maître
ès sciences (M.Sc.) en Santé environnementale et santé au travail**

Août 2015

© Sara Bounakta, 2015

RÉSUMÉ

L'exposition aux mélanges de contaminants (environnementaux, alimentaires ou thérapeutiques) soulève de nombreuses interrogations et inquiétudes vis-à-vis des probabilités d'interactions toxicocinétiques et toxicodynamiques. Une telle coexposition peut influencer le mode d'action des composants du cocktail et donc de leur toxicité, suite à un accroissement de leurs concentrations internes.

Le bisphénol A (4 dihydroxy-2,2-diphénylpropane) est un contaminant chimique répandu de manière ubiquitaire dans notre environnement, largement utilisé dans la fabrication des plastiques avec l'un des plus grands volumes de production à l'échelle mondiale. Il est un perturbateur endocrinien par excellence de type œstrogène-mimétique. Cette molécule est biotransformée en métabolites non toxiques par un processus de glucuronidation. L'exposition concomitante à plusieurs xénobiotiques peut induire à la baisse le taux de glucuronidation du polluant chimique d'intérêt, entre autres la coexposition avec des médicaments. Puisque la consommation de produits thérapeutiques est un phénomène grandissant dans la population, la possibilité d'une exposition simultanée est d'autant plus grande et forte.

Sachant que l'inhibition métabolique est le mécanisme d'interaction le plus plausible pouvant aboutir à une hausse des niveaux internes ainsi qu'à une modulation de la toxicité prévue, la présente étude visait d'abord à confirmer et caractériser ce type d'interactions métaboliques entre le bisphénol A et le naproxène, qui est un anti-

inflammatoire non stéroïdiennes (AINS), sur l'ensemble d'un organe intact en utilisant le système de foie de rat isolé et perfusé (IPRL). Elle visait ensuite à déterminer la cinétique enzymatique de chacune de ces deux substances, seule puis en mélange binaire. Dans un second temps, nous avons évalué aussi l'influence de la présence d'albumine sur la cinétique métabolique et le comportement de ces deux substances étudiées en suivant le même modèle de perfusion *in vivo* au niveau du foie de rat.

Les constantes métaboliques ont été déterminées par régression non linéaire. Les métabolismes du BPA et du NAP seuls ont montré une cinétique saturable avec une vitesse maximale (V_{max}) de 8.9 nmol/min/ mg prot de foie et une constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat (K_m) de 51.6 μM pour le BPA et de 3 nmol/min/mg prot de foie et 149.2 μM pour le NAP. L'analyse des expositions combinées suggère une inhibition compétitive partielle du métabolisme du BPA par le NAP avec une valeur de K_i estimée à 0.3542 μM .

Les résultats obtenus montrent que l'analyse de risque pour les polluants environnementaux doit donc prendre en considération la consommation des produits pharmaceutiques comme facteur pouvant accroître le niveau interne lors d'une exposition donnée. Ces données *in vivo* sur les interactions métaboliques pourraient être intégrées dans un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) pour prédire les conséquences toxicocinétique (TK) de l'exposition d'un individu à ces mélanges chimiques.

Mots clés : Exposition, naproxène, bisphénol A, mélanges, toxicocinétique, interactions métaboliques, IPRL.

ABSTRACT

Exposure to mixtures of contaminants (environmental, alimentary or therapeutic) poses many questions and concerns about the probability of toxicokinetic and toxicodynamic interactions. Such co-exposure may influence the mode of action of the cocktail of components and therefore their toxicity, as a result of an increase of their internal concentrations.

Bisphenol A (2,2-dihydroxy-4 diphenylpropane) is a ubiquitous chemical contaminant in our environment, widely used in the manufacture of plastics, with one of the largest production volumes globally. It is an endocrine disruptor of oestrogen-mimetic type.

This molecule is metabolized into non-toxic metabolites by glucuronidation process. Several factors including the co-exposure to other xenobiotics may reduce the glucuronidation rate of the chemical pollutant of interest, such as a co-exposure with drugs.

Given that the consumption of therapeutic products is a growing phenomenon in the population, simultaneous exposures of pollutants with medicinal drugs are becoming a concern for health risk assessment.

Knowing that metabolic inhibition is the most plausible mechanism of interaction that could result in an increase of the internal levels and a modulation of the expected toxicity,

the present study aimed at confirming and characterizing this type of metabolic interactions between bisphenol A and naproxen, which is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), on the set of an intact organ using isolated and perfused rat liver system (IPRL). The study also served to determine the enzyme kinetics metabolism of each substance alone and in binary mixture. In a second step, we also evaluated the influence of the presence of albumin on the metabolic kinetics and behavior of the two substances studied using the same *in vivo* perfusion model of rat liver.

Metabolic constants were determined by nonlinear regression. The metabolism of BPA and NAP alone demonstrated saturable kinetics with maximal velocity (V_{max}) and affinity constant (K_m) equal to 8.9 nmol/min/mg prot liver and 51.6 μ M for BPA, and 3 nmol/min/mg prot liver and 149.2 μ M for NAP. The analysis of combined exposures suggests a partial competitive inhibition of BPA metabolism by NAP with a K_i value estimated at 0.3542 μ M.

From these results, it appears that the risk assessment of environmental pollutants must therefore consider the consumption of pharmaceutical products as an important agent that can increase the internal levels for a given exposure. Accordingly, these *in vivo* data on metabolic interactions can be incorporated into a physiologically based pharmacokinetic models (PBPK) to predict the toxicokinetic consequences (TK) of the exposure by an individual to these chemical mixtures.

Keys words: Exposition, naproxen, bisphenol A, mixtures, toxicokinetics, metabolic interactions, IPRL.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	II
Abstract.....	IV
Listes des figures et tableaux	IX
Abréviations.....	XII
Remerciements.....	XIV
Chapitre 1 : Introduction générale	1
1.1. Contexte scientifique du projet	2
1.2. Problématique.....	4
1.3. Bisphénol A (BPA)	6
1.3.1. Propriétés physicochimiques	6
1.3.2. Origine et exposition	8
1.3.2.1. Origine	8
1.3.2.2. Voies d'exposition.....	10
a- Exposition alimentaire	10
b- Exposition par inhalation	11
c- Exposition cutané.....	12
1.3.3. Toxicocinétique	13
1.3.4. Liaison aux protéines plasmatiques.....	16
1.3.5. Toxicité.....	17
1.3.5.1. Effet de reproduction	18
1.3.5.2. Effet sur la fonction métabolique.....	19
1.3.5.3. Effet sur la fonction de la barrière intestinal.....	20
1.3.5.4. Toxicité thyroïdienne	21
1.3.5.5. Effet sur la glande mammaire	21
1.3.5.6. Toxicité cérébral et comportementale.....	22

1.4. Naproxène (NAP)	23
1.4.1. Propriétés physicochimiques	24
1.4.2. Biotransformation et toxicocinétique	25
1.4.3. Effets thérapeutiques	27
1.4.4. Toxicité.....	28
1.5. Considération et mécanismes des interactions métaboliques entre les composants d'un mélange.....	29
1.5.1. Risques liés aux mélanges de substances chimiques.....	29
1.5.2. Consommation de médicaments	31
1.5.3. Intéractions métaboliques	33
1.5.4. Inhibition métabolique.....	34
1.5.4.1. Inhibition réversible.....	35
a-Inhibition compétitive	35
c- Inhibition incompétitive.....	38
d- Inhibition non compétitive.....	40
e- Inhibition mixte.....	41
1.6. Objectifs du projet.....	43
Chapitre 2: Study of bisphenol a and naproxen metabolic interactions in isolated perfused rat liver model	46
2.1 Résumé	48
2.2 Abstract	50
2.3 Introduction	52
2.4 Matériels et méthodes.....	57
2.4.1 Produits chimiques	57
2.4.2 Animaux	57
2.4.3 Technique chirurgicale	58
2.4.4 Système de foie de rat perfusé et isolé (IPRL : isolated perfused rat liver).....	59

2.4.5 Détermination de la clairance hépatique du polluant (bisphénol A) et du médicament (naproxène) en utilisant le modèle IPRL - Préparation des échantillons.	59
2.4.6 Dialyse à l'équilibre et détermination de la fraction libre dans le perfusât (Fup) de NAP et BPA.	61
2.4.7 Analyses HPLC du BPA et du NAP.	62
2.4.8 Analyses des données et statistiques	62
2.4.9 Méthodes de calculs d'extrapolation <i>in vitro in vivo</i> (IVIVE)	63
2.5 Résultats	64
2.6 Discussion	67
2.7 Conclusion.	71
2.8 Remerciements	73
2.9 Déclaration d'intérêt	73
2.10 Références	74
Chapitre 3: Discussion générale.	88
Chapitre 4: Conclusion générale.	96
Bibliographie.	101

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE 1

Figure 1 : Structure chimique du BPA.....	6
Figure 2 : Réaction de glucuronidation (Glucurono-conjugaison) du bisphénol A par l'enzyme de biotransformation UGT (uridine diphosphate glucuronosyl transférase).....	14
Figure 3 : Principales réactions de conjugaison du Bisphénol A. (Sulfatase, UDP-Glucuronosyl-transférase). Les deux principaux métabolites (BPA-Glucuronide), (BPA-Sulfate).....	16
Figure 4 : Structure chimique du naproxène.....	24
Figure 5 : Voie du métabolisme du naproxène.....	28
Figure 6 : L'effet inhibiteur du naproxène sur le processus normal du métabolisme du bisphénol A.....	34
Figure 7 : Le mécanisme réactionnel de l'inhibition compétitive.....	35
Figure 8 : Représentation de l'inhibition compétitive. Le substrat (S) et l'inhibiteur (I) qui sont en compétition pour le même site enzymatique ont des similarités structurales (Casimir B.,2010).....	36
Figure 9 : Le mécanisme réactionnel de l'inhibition compétitive partielle.....	37
Figure 10 : Le mécanisme réactionnel de l'inhibition incompétitive.....	39
Figure 11 : Le mécanisme réactionnel de l'inhibition non-compétitive.....	40

Figure 12. Le mécanisme réactionnel de l'inhibition mixte.....	42
Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du bisphénol A	7

CHAPITRE 2

Figure 1 : Système de perfusion du foie de rat isolé <i>in vivo</i>	84
Figure 2 : Cinétique enzymatique du bisphénol A en absence d'albumine (A) et en présence d'albumine (30 g/L) (B) dans un modèle de foie de rat isolé et perfusé (n=3 foies). La perfusion in situ a été effectuée pendant 2 h à 37 °C. Quatre concentrations du substrat graduellement croissantes (20, 45 , 80 et 180 µM) ont été testées. Quatre mesures par foie ont été utilisées. La barre d'erreur représente l'écart type (SD).....	85
Figure 3 : Cinétique enzymatique du naproxène en absence d'albumine (A) et en présence d'albumine (30 g/L) (B) dans un modèle de foie de rat isolé et perfusé (n=3 foies). La perfusion in situ a été effectuée pendant 2 h à 37 °C. Quatre concentrations du substrat graduellement croissantes (60, 120 , 250 et 750 µM) ont été testées. Quatre mesures par foie ont été utilisées. La barre d'erreur représente l'écart type (SD).....	86
Figure 4 : Graphique de Dixon montrant l'effet du naproxène sur le taux de biotransformation du BPA en absence d'albumine (A) et en présence d'albumine (B). Les symboles  représentent les concentrations du bisphenol A testés dans le modèle IPRL en présence de l'inhibiteur (n=3 foies). La barre d'erreur représente l'écart type (SD).....	87
Tableau 1 : Paramètres d'élimination métaboliques au niveau de l'IPRL.....	77
Tableau 2 : L'ensemble de données de BPA perfusé seul en présence et en absence d'albumine chez le rat, utilisés pour la prédiction de la clairance hépatique (Cl).....	77

Tableau 3 : L'ensemble de données de BPA et du NAP en coexposition binaire chez le rat, utilisés pour la prédiction de la clairance hépatique (Cl).....	78
Tableau 4 : Modèles d'estimation de la Clint in vivo à partir des constantes métaboliques obtenues <i>in vitro</i>	80
Tableau 5 : Comparaison <i>In vitro</i> -IPRL des constantes métaboliques du bisphénol A et du naproxen respectivement en présence et en absence d'albumine dans un modèle de foie de rat isolé perfusé.....	81
Tableau 6 : Constantes métaboliques du bisphénol A dans le cas du mélange binaire (BPA-NAP), en présence et en absence d'albumine.....	81
Tableau 7 : Évaluation comparative de la clairance hépatique prédite versus observée du BPA seul.....	82
Tableau 8 : Évaluation comparative de la clairance hépatique prédite versus observée du BPA en mélange binaire.....	83

ABRÉVIATIONS

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

BPA : Bisphénol A

BPA-G : Bisphénol A-glucuronide

BSA : Albumine de sérum bovin

Cl_{int} : Clairance intrinsèque

COX : Cyclo-oxygénase

CYP : Cytochrome P450

CYP1A2 : Cytochrome P450 1A2

CYP2C9 : Cytochrome P450 2C9

DJA : Dose journalière admissible

DI : Dose interne

E2 : L'œstradiol 2

ESI : Complexe ternaire enzyme-substrat-inhibiteur

FG : Filtration glomérulaire

GI : Gastro-intestinal

IPRL : Système de foie de rat isolé et perfusé

IVIVE : Extrapolation *in vitro-in vivo*

IV : Voie intraveineuse

INSL3 : Protéine Insuline-like 3

K_i : Constante d'inhibition

K_m : Constante d'affinité de Michaelis-Menten

NAP : Naproxène

PBPK : Modèle pharmacocinétique à base physiologique

PC : Polycarbonate

PG : Prostaglandine

PGI2 : Prostacycline

TD : Toxicodynamique

TK : Toxicocinétique

TXA2 : Thromboxane synthase A2

TXB : Thromboxane

UDP : Uridine diphosphate

UDPGA : Acide glucuronique uridine diphosphate

UGT : Uridine diphosphate glucuronosyl-transférase

Vmax : Taux de métabolisme maximum ou vitesse enzymatique maximum

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ces formidables années universitaires.

Je désire d'abord remercier profondément mon professeur Sami Haddad pour avoir été un directeur de recherche attentif et compréhensif, qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de mon projet de recherche. Merci de m'avoir encadré, pour votre soutien, guide et vos conseils scientifiques judicieux, qui m'ont permis de réaliser ce travail dans un esprit d'épanouissement et de convivialités.

C'est un privilège d'avoir un directeur comme vous qui m'as fortement enrichi ma formation, vous serez toujours pour moi un exemple à suivre par votre rigueur scientifique qui n'a d'égale que votre intégrité et vos qualités humaines. Merci cher professeur.

Je remercie aussi le docteur Kannan Krishnan pour son support, serviabilité et son appui scientifique, en plus d'avoir été mon parrain pour ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier Marc Mantha pour sa disponibilité, son aide indispensable lors des manipulations expérimentales au laboratoire et pour ses précieux conseils. Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous.

Mes remerciements s'adressent également aux étudiants, aux professeurs et au personnel administratif du département santé environnementale et santé au travail de l'Université de Montréal. Vous êtes comme une très belle petite famille pour moi, dont je suis fier d'avoir été membre. J'apprécie beaucoup l'ambiance conviviale qui règne dans ce département.

Je tiens également à remercier mes chers colocataires du bureau avec qui j'ai partagé un bureau, une manip, des pauses, des soirées, des rires, des discussions... et une amitié solide, plus particulièrement (Denis, Honesty, Sandra, Rania, Michel, Axelle, Mylène, Igor et Josée). Bonne continuation à tous.

Je ne remercierai jamais assez mes parents, mes sœurs ainsi que toute ma famille pour leur soutien et leur compréhension indéfectible même à travers l'océan, je remercie tous mes proches et amis, qui ont toujours été présents, je vous adore.

Finalement, j'exprime toute ma gratitude à toutes les personnes qui étaient à mes côtés durant cette période. Un grand merci affectueux.

Merci mon beau dieu pour tout... 😊

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU PROJET

La population générale est quotidiennement exposée directement ou indirectement à de nombreuses substances chimiques présentes dans son environnement, se retrouvant surtout dans l'alimentation, l'eau, l'air, le sol et les produits de consommation (thérapeutiques ou autres). Les effets potentiels de l'exposition à des mélanges de ces substances sur l'être humain et leur impact sur l'environnement constituent une préoccupation majeure pour de nombreux pays dans le monde. Cette problématique peut être améliorée par une compréhension de la variation de la dose interne due à l'interaction entre les produits, et le développement de nouvelles méthodologies d'évaluation des risques (Casarett *et al.*, 2007).

Les risques associés à des expositions concomitantes à plusieurs xénobiotiques résident dans le fait qu'une fois dans l'organisme ces substances ont la possibilité d'interagir entre elles et avoir une influence sur leur toxicité. Cette interaction est qualifiée de toxicocinétique (TK) lorsque la présence d'un autre xénobiotique altère l'absorption, la distribution, la biotransformation ou l'excrétion de l'autre (Casarett *et al.*, 1996). En outre, lorsque la présence d'un xénobiotique augmente ou diminue le métabolisme des autres, l'interaction est dite métabolique.

Le bisphénol A (BPA) est un produit chimique largement utilisé avec un éventail d'applications dans une variété d'industries, favorisant ainsi l'exposition de la population générale.

Il a été démontré que le BPA peut causer des perturbations du système endocrinien, et exercer des effets délétères sur la santé des populations dans plusieurs études animales et des lignées cellulaires humaines (N'tumba-Byn T *et al.*,2012). Ce perturbateur endocrinien possède une structure proche de celle des œstrogènes naturels, notamment par la présence des groupements phénol (Vogel, 2009). Cette structure imitant la fonction hormonale pourrait affecter le développement, la reproduction et même induire l'apparition du cancer du sein (Durando *et al.*,2006).

Toutefois, la toxicité de ce composé est limitée par son élimination rapide par glucuronidation, une voie métabolique conduisant à la production d'un métabolite inactif non toxique. La pharmacocinétique du BPA est par ailleurs susceptible d'être modifiée par la coexposition avec d'autres xénobiotiques, incluant la consommation des médicaments. Parmi ces produits thérapeutiques, on compte le naproxène (NAP), un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) dont la voie métabolique principale est la glucuronidation acyle; ce facteur peut diminuer le taux de détoxification du bisphénol A dans l'organisme, par un phénomène d'inhibition métabolique compétitive. Selon l'étude de Verner *et al.* (2010), ce médicament présente le plus fort potentiel d'inhibition et d'interaction métabolique avec le BPA, parmi treize autres médicaments testés.

Dans le présent projet, nous avons tenté de démontrer que la présence et la consommation de médicament peut inhiber significativement la biotransformation du polluant en son métabolite non toxique dans le tissu hépatique. Ceci pourrait contribuer à hausser la toxicité du produit, tout en considérant d'autres facteurs, notamment la liaison aux protéines plasmatiques telles que l'albumine qui pourrait agir sur la concentration en médicament et en polluant libre dans le sang.

Cette recherche vise donc à identifier et caractériser, dans l'organe entier, l'inhibition métabolique du BPA par le NAP via la voie de la glucuronidation, et par conséquent avoir le potentiel de moduler le risque sanitaire lié à l'exposition à ce polluant. Pour atteindre cet objectif, des interactions métaboliques de ces deux produits pris seuls ou en mélange binaire ont été étudiés *in vivo* en utilisant le modèle de foie de rat perfusé isolé, dit système IPRL.

En outre, cette étude visait à produire les paramètres cinétiques nécessaires à la conception des modèles mathématiques PBPK permettant de prédire l'impact des interactions métaboliques au niveau des sites d'action cibles et d'avoir plus d'informations sur le devenir spatio-temporel des xénobiotiques étudiés dans l'organisme (Haddad *et al.*, 2001; Tardif *et al.*, 1997).

1.2. PROBLÉMATIQUE

L'exposition aux mélanges de xénobiotiques est devenue un centre d'intérêt en matière de santé publique et d'environnement. Le problème de la toxicité des mélanges de produits chimiques a été depuis longtemps un grand défi pour les toxicologues et les organismes de réglementation. Des interactions métaboliques peuvent se produire lorsque deux composés sont en coexposition, sous de telles conditions, les contaminants peuvent interagir entre eux et moduler les effets toxicologiques auxquels chacun d'eux est normalement associé. En effet, l'état devient gravement problématique à partir du moment où ces interactions entraînent une élévation des doses internes.

Malgré le fait que les interactions entre polluants et médicaments peu étudiées, ce phénomène reste quand même omniprésent et les chances d'interactions potentielles sont donc plus grandes, puisque les doses de produits thérapeutiques que les gens consomment dans certains cas au quotidien sont élevées en comparaison avec des concentrations de polluants auxquelles ils sont exposés.

Selon le Canadian Institute for Health Information, les dépenses allouées à la consommation de médicaments par la population générale sont en croissance continue (ICIS, 2013). En effet, les produits pharmaceutiques, qui sont biologiquement actifs, peuvent influencer le métabolisme des polluants dans le foie et ainsi affecter la pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique, conséquemment leur toxicité dans le tissu cible.

Bien que les études sur les interactions polluants-médicaments soient quasi inexistantes, des recherches ont déjà démontré que l'acide acétylsalicylique (Aspirin) présente une interaction métabolique avec le benzène (Kowalowka-Zawieja *et al.*, 2003). Il a été démontré que la biotransformation du BPA et du nonylphénol était fortement inhibée (>50%) par le naproxène, l'acide salicylique, la carbamazépine et l'acide méfénamique (Verner *et al.*, 2010). De même, la modulation du métabolisme *in vitro* du trichloréthylène (TCE) et de ses métabolites, trichloroéthanol, trichloroacétate (TCOH, TCA), par une variété de médicaments largement utilisés dans la population dont le naproxène et l'acide salicylique a été prouvée (Cheikh Rouhou *et al.*, 2011).

Ces études portent donc à croire que d'autres interactions peuvent survenir lors d'une exposition simultanée aux médicaments et aux polluants. La présente étude visait à confirmer et à caractériser en conditions *in vivo* l'interaction entre le BPA et le NAP.

1.3. BISPHÉNOL A (BPA)

1.3.1. PROPRIÉTÉS PHYSICOCIMIQUES

Le bisphénol A (BPA), communément connu sous le nom de 4 dihydroxy-2,2-diphénylpropane, est un contaminant réparti de manière ubiquiste dans notre environnement (figure 1). C'est un composé organique aromatique issu de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone; la réaction est catalysée par l'acide chlorhydrique ou par une résine de polystyrène (Flint *et al.*, 2012). Le BPA est utilisé principalement comme monomère dans la polymérisation de deux matières plastiques : le polycarbonate et les résines époxy (Vandenberg *et al.*, 2007 ; Flint *et al.*, 2012).

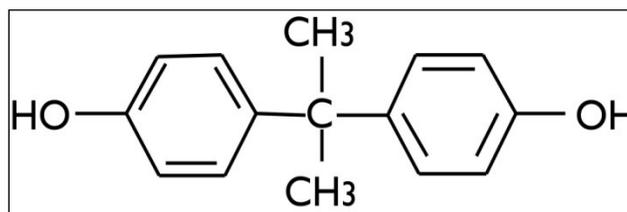


Figure 1. Structure chimique du BPA

Le BPA est un solide blanc de faible émanation phénolique qui a été synthétisé chimiquement sous forme de poudre, écailles ou cristaux. Il est peu à moyennement

soluble dans l'eau, soluble dans l'acide acétique, les solutions aqueuses alcalines et dans quelques solvants (tels que l'éthanol, l'acétone et le méthanol), mais il est insoluble dans le n-heptane ou le dichlorométhane (Rubin, 2011; Hoekstra *et al.*, 2013). Sa structure s'apparente à celle des œstrogènes naturels, notamment par la présence de groupements phénols, ce qui lui confère une activité œstrogénomimétique de par sa capacité à se lier aux récepteurs des œstrogènes (Rubin, 2011).

La molécule en question est chimiquement stable dans les conditions normales et se décompose lentement en phénol et isopropénylphénol à forte température. Le BPA réagit vigoureusement avec les bases fortes ainsi qu'avec les chlorures anhydrides d'acides. La réaction est exothermique, en outre possiblement violente (incendie, explosion, etc.) en coexposition avec des oxydants puissants (Mercea, 2009).

Le BPA a une certaine affinité avec les graisses comme le montre son coefficient de partage octanol : eau ($\log K_{ow}$), qui se situe approximativement entre 3.3 et 3.4, facilitant ainsi son passage à travers les membranes cellulaires (INRS, 2010). Il est important de noter que le BPA est généralement non ionisé à toutes les valeurs de pH, puisqu'il se caractérise par une acidité faible "pKa du BPA ≈ 9.73 " (INRS, 2010). Les propriétés physico-chimiques du bisphénol A sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques du Bisphénol A (INRS, 2010; Saal *et al.*, 2012)

Propriétés chimique	Bisphénol A
Formule chimique brute	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Poids moléculaire (g/mol)	228,3
N°CAS (Chemical Abstract Service)	80-05-7
Point de fusion (°C)	150-157°C
Solubilité dans l'eau (mg/l)	120-300 à 25°C à pH=7
Log K _{ow}	3.32-3.4
Pression de vapeur (Pa)	5,3. 10 ⁻⁶ Pa à 25°C
Densité liquide	1.1 à 1.2
Constante d'ionisation (pKa)	9.73 (9.6-10.2)
Coefficient de partage (sang/plasma)	0.67-1.1

1.3.2. ORIGINE ET EXPOSITION

1.3.2.1. ORIGINE

Le BPA est une substance chimique industrielle largement présente dans notre environnement quotidien. En 2006, sa production à l'échelle planétaire a été estimée à environ 3,8 millions de tonnes par an, utilisées aux deux tiers pour la fabrication du polycarbonate, et pour un tiers pour celle de résines (DHI, 2007).

Le BPA entre dans la fabrication industrielle de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy-phénoliques. Le polycarbonate est un plastique provient de la polymérisation de 50 à 100 monomères de BPA par trans-estérification (Calafat *et al.*, 2005). Le plastique obtenu possède des caractéristiques telles que la biocompatibilité, la facilité de stérilisation, la résistance à la chaleur, la transparence, ce qui explique son

usage à grande échelle. De ce fait, on le retrouve dans le revêtement intérieur de boîtes de conserves, les canettes de boissons et plusieurs emballages alimentaires en plastique, avec la signalisation d'un logo de recyclage entourant le chiffre 3, 7 ou PC "polycarbonate" (Lazear, 1995). De plus, il rentre dans la composition de certains produits électroniques et de l'industrie automobile, des téléphones portables, des lunettes et des lentilles de contact, ainsi que les tickets de caisse à encre thermique ou encore les reçus des distributeurs automatiques de billets, et quelques équipements médicaux (Maia *et al.*, 2009; Nam *et al.*, 2010).

La composition des résines époxy-phénoliques est issue de la condensation d'épichlorhydrine et d'une molécule de bisphénol A qui forment un enchaînement de monomères pour créer du BADGE (BPA diglycidyl éther). Caractérisées par leur stabilité thermique et leur résistance mécanique, elles sont principalement utilisées dans l'industrie automobile, maritime et l'industrie agro-alimentaire, permettant de protéger les aliments et les boissons d'une contamination microbiologique, formant une barrière étanche et jouant ainsi un rôle protecteur vis-à-vis du métal afin d'empêcher la corrosion (Takao *et al.*, 2002). Minoritairement, les résines époxy contenant du BPA sont également utilisées dans des systèmes de stockage et de transport de l'eau "réseau de distribution et réservoir d'eau" (Rudel *et al.*, 2011).

1.3.2.2. VOIES D'EXPOSITION

L'exposition de la population humaine au BPA se fait majoritairement par la voie digestive, soit l'ingestion d'aliments contaminés, et minoritairement par voie respiratoire, soit l'inhalation de poussières, ou par contact cutané avec des matériaux à base de BPA.

Le passage du bisphénol A dans la chaîne alimentaire s'effectue par la libération de monomères suite à une polymérisation incomplète, ou par hydrolyse de la chaîne ester qui lie les monomères de BPA; cet état de libération ou rupture se déroule dans des conditions de pH neutre ou alcalin ou encore au contact de liquides à haute température (Vandenberg *et al.*, 2007).

a- EXPOSITION ALIMENTAIRE

La contamination par le biais de l'alimentation se fait par migration depuis les emballages et récipients vers le contenu en particulier au moment du conditionnement. Aussi le chauffage de ce plastique et ces résines favorise le détachement, la libération et la migration de molécules de bisphénol A, qui peuvent alors se retrouver dans les aliments ou les boissons (Cao *et al.*, 2009).

La synthèse rapportée par Welshons et Nagel (2006), portant sur la contamination des aliments par le BPA, a montré que les niveaux du bisphénol A les plus élevés étaient détectés dans les aliments conditionnés en boîte de conserve métallique. Ainsi, les taux de migration dépendent directement des conditions de stockage et d'utilisation, du temps et de la température de chauffage, de la durée de conservation et du pH des aliments. Il

est aussi indirectement favorisé par des agressions physicochimiques : chaleur, micro-ondes, détergents lave-vaisselle, solutions alcalines (Welshons *et al.*,2006).

b- EXPOSITION PAR INHALATION

Divers enquêtes de recherches ont indiqué qu'il pouvait y avoir un risque d'exposition humaine au BPA par l'inhalation de poussières intérieures ou extérieures du fait de sa large production, utilisation et distribution (Volkel *et al.*, 2008 ; Loganathan et Kannan, 2011). L'usage du bisphénol A dans les processus de fabrications de certains revêtements de sol, certaines peintures, matériel électrique ou électronique conduit à la contamination de l'air ambiant par des particules de BPA et constitue une autre source d'exposition de la population humaine. Plusieurs études rapportent des concentrations moyennes de BPA dans les échantillons de poussières intérieurs ménagères qui varient entre 60 et 843 ng/g; la quantité inhalée reste faible par rapport à la dose journalière admissible (DJA). Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée sur une population d'enfants en bas âge aux États-Unis, qui indique que le BPA contenu dans l'air inhalé ne contribuerait qu'à 1 % de l'exposition totale au BPA (Wilson *et al.*,2007).

c- EXPOSITION CUTANÉ

De récents travaux de recherche ont également mis en évidence une exposition cutanée au BPA mais qui reste faible comme source de contamination (Biedermann *et al.*, 2010 ; Zalko *et al.*, 2011). Cette voie d'exposition pourrait concerner des milieux professionnels, en particulier chez les ouvriers de l'industrie du plastique et aussi chez les caissières. La quantité moyenne du BPA présente dans les billets de caisse est estimée à environ 13.3 g/kg de papier (Liao, Kannan.,2011). Dans le domaine des papeteries, le BPA est utilisé pour produire les papiers d'impression thermique; en réagissant à la température, il libère un colorant (lactone) qui révèle l'encre noire sur les billets de caisse, relevés bancaires etc. L'utilisation répétitive de 10 heures par jour approximativement et la manipulation fréquente de ces billets de caisse causerait une absorption quotidienne de 71 µg du BPA par le seul passage transcutané, ce dernier étant facilité par des mains humides et type de peau grasse. Néanmoins, la possibilité d'une exposition par un transfert percutané ne dépasserait pas les 3 % de la DJA (Biedermann *et al.*, 2010), participant très minoritairement à l'exposition totale au BPA de la population générale (Marquet *et al.*, 2011; Kaddar *et al.*, 2008).

1.3.3. TOXICOCINÉTIQUE

Pour une évaluation du risque toxicologique associé à l'exposition au BPA, il est essentiel de connaître les capacités de biotransformation de ce contaminant par les organismes et les agences de réglementations. Le métabolisme du BPA met en jeu des réactions enzymatiques de conjugaison dites de (phase II) qui consistent à ajouter un groupement généralement hydrosoluble, dont l'acide glucuronique et les sulfates, au composé parent (lipophile). Ces réactions ont principalement lieu dans le foie mais peuvent aussi se produire ailleurs, notamment au niveau intestinal, soit au niveau des entérocytes (Hanioka *et al.*, 2008).

La principale réaction décrite dans la littérature est la glucuronidation qui correspond à la formation d'un composé glucuronoconjugué, le BPA-glucuronide (BPA-G) à partir d'un cofacteur, l'acide uridine diphosphate-glucuronique (UDPGA). Cette réaction est catalysée par l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT) (Volkel W *et al.*, 2002 ; Yokota, Inoue *et al.*, 1999). Les UGTs sont des enzymes présentes majoritairement dans le foie mais qui sont également retrouvées dans de nombreux autres tissus dont l'intestin (Radomska-Pandya *et al.*, 1998). Une variété d'isoenzymes de l'UGT sont impliquées dans la glucuronidation du BPA selon les espèces, comme l'UGT2B1 qui a été identifiée dans le foie, les reins et les testicules chez le rat (Yokota *et al.*, 1999) et son orthologue l'UGT2B7 ou UGT2B15 chez l'homme (Hanioka *et al.*, 2008; Mazur *et al.*, 2010). Ces enzymes de la famille des UGT2B sont aussi impliquées dans la glucuronidation des hormones stéroïdiennes, dont la 17 β -estradiol (E2).

Le métabolite conjugué BPA-G ne possède pas d'activité oestrogénique, car il n'est pas un ligand des récepteurs aux œstrogènes (Matthews *et al.*, 2001). Le métabolisme de biotransformation du BPA en BPA-G (Figure 2) représente donc un mécanisme de détoxification de l'organisme, un moyen de limiter l'exposition interne de la molécule libre et un rôle protecteur de l'organisme contre les perturbations du système endocrinien.

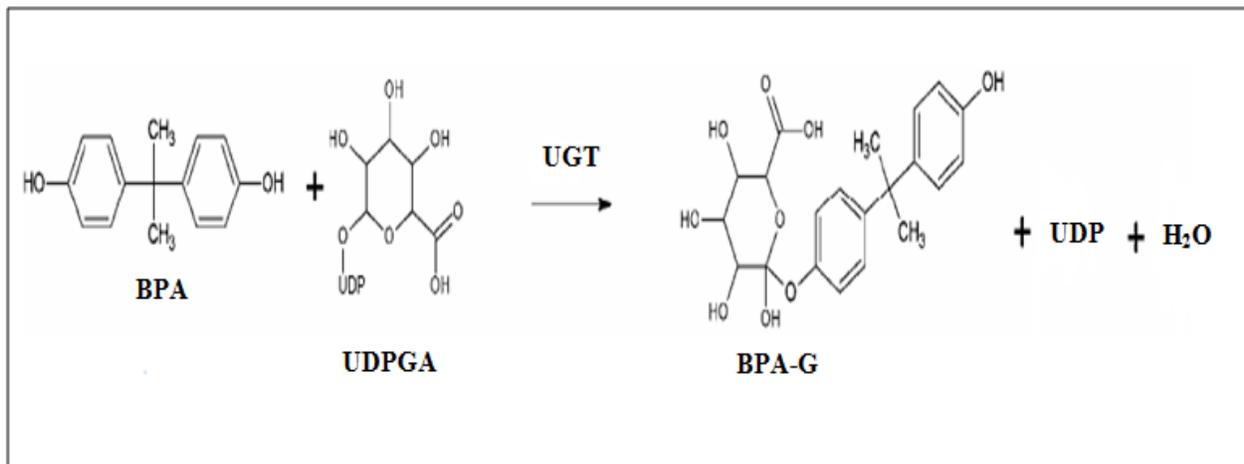


Figure 2. Principales réactions de conjugaison du Bisphénol A. (Sulfatase, UDP- Glucuronosyl-transférase). Les deux principaux métabolites (BPA-Glucuronide), (BPA-Sulfate).
BPA: bisphénol A; **UDPGA:** l'acide uridine diphosphate-glucuronique; **UGT:** Uridine diphosphate Glucuronosyl-Transférase; **BPA-G:** bisphénol A glucuronide; **UDP:** Uridine diphosphate; **H₂O:** eau.

La sulfatation (Figure 3) est une voie secondaire dans le métabolisme du BPA, tant chez les rongeurs que chez l'homme, avec la génération du métabolite BPA-sulfate qui ne possède pas d'activité oestrogénique (Shimizu *et al.*, 2002). Les données *in vitro* de Kurebayashi *et al.* (2010) suggèrent que le BPA-sulfate (BPA-S) représente un métabolite mineur en moyenne de 20 % chez le rat et de 9 % chez l'homme. Une autre étude *in vivo* de l'équipe de recherche de Pottenger *et al.* (2000) a montré que le BPA-S était détecté dans l'urine après l'administration d'une molécule organique radioactif

carbone quatorze ($[^{14}\text{C}]$ -BPA). Ce métabolite sulfaté représentait entre 3 et 7 % de la dose administrée dépendamment de la dose et de la voie d'administration chez le rat (Pottenger *et al.*, 2000). Toutefois, cette voie métabolique reste peu étudiée. En outre, la biotransformation du BPA peut être plus complexe avec la formation de diconjugés méthylés et/ou déshydratés ainsi que des métabolites hydroxylés dont des catéchols (Zalko *et al.*, 2003).

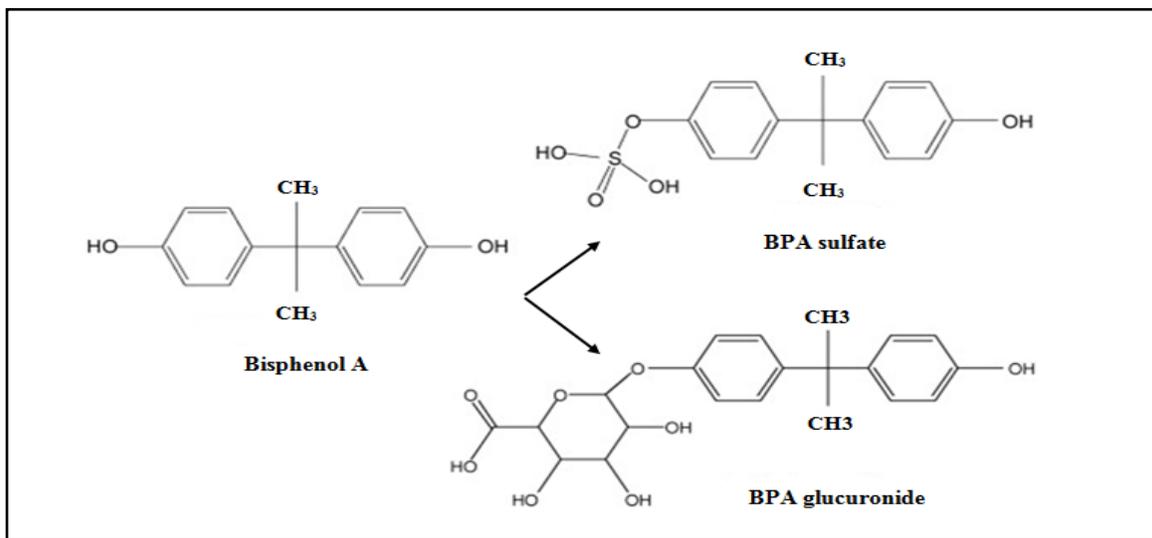


Figure 3. Réaction de glucuronidation (Glucurono-conjugaison) du bisphénol A par l'enzyme de biotransformation UGT (uridine diphosphate glucuronosyl transférase).

L'étude d'Inoue *et al.* (2002) indique que le BPA se caractérise par une métabolisation plus lente chez les rongeurs et plus rapide chez l'humain, avec une demie vie longue moyenne de 39.5 heures lorsqu'il est administré par voie intraveineuse (IV) chez le rat. En revanche, chez l'homme, le temps de demi-vie plasmatique moyen du BPA total est plus petit (environ 4-6 heures). Cette différence peut être expliquée en raison d'absence

du cycle entéro-hépatique chez ce dernier, contribuant ainsi à une excrétion plus rapide (Volkel *et al.*, 2002; Volkel *et al.*, 2005).

Chez l'homme, le BPA est rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal (GI) et conjugué dans le foie en conjugués hydrosolubles qui pourront après être facilement éliminés de l'organisme par voie urinaire ou fécale. Le BPA conjugué est rapidement filtré depuis le sang par les reins (filtration glomérulaire), et excrété dans l'urine sous forme de BPA-G. Par contre, chez le rat, le processus d'élimination est distinct, où une grande partie du BPA conjugué est amené dans la bile et par la suite conduit, excrété par voie fécale (Volkel *et al.*, 2002). Le poids moléculaire seuil pour l'élimination biliaire est de l'ordre 200-300 g/mol chez le rat, alors qu'il est de 500-600 g/mol chez l'homme. Le BPA-G ayant un poids moléculaire de 404g/mol serait principalement éliminé dans les urines chez l'humain, alors qu'il serait éliminé en partie via la bile chez le rat (Clark *et al.*, 1969).

1.3.4. LIAISON AUX PROTÉINES PLASMATIQUES

La majorité des substances (polluants, médicaments, etc.) sont liées à un degré variable aux différentes protéines plasmatiques, principalement l'albumine, l'alpha-1 glycoprotéine acide, les globulines et les lipoprotéines. La protéine porteuse est généralement l'albumine pour les substances acides et neutres, et les autres pour les substances basiques (Csanady *et al.*, 2002).

Le BPA (caractère lipophile) est très fortement lié aux protéines plasmatiques chez les rongeurs et l'homme. La partie liée représente 90 à 95 % et la partie libre, qui est biologiquement active, entre 5 à 10 % du BPA total (Nagel *et al.*, 1997; Teeguarden *et al.*, 2005). Le BPA est lié majoritairement et de façon non spécifique à l'albumine (Csanady *et al.*, 2002).

1.3.5. TOXICITÉ

Le BPA, caractérisé comme un perturbateur endocrinien ayant des propriétés oestrogénomimétiques, est suspecté de causer des effets indésirables sur la santé des humains en raison de ses propriétés néfastes sur la reproduction, le développement et le métabolisme, avérés chez l'animal, suspectés chez l'homme, même à des faibles niveaux d'exposition (Vom Saal *et al.*, 2007). Cette molécule a la capacité d'interférer avec le fonctionnement normal du système hormonal (i.e., le récepteur œstrogénique) et par conséquent d'avoir des impacts délétères sur un large spectre de fonctions de l'organisme ou également sur sa descendance (Kamrin, 2004). Ces effets pourraient être en lien avec des fenêtres d'expositions pendant les phases sensibles du développement de l'individu (phases périnatales) (Kamrin, 2004).

Plusieurs études animales *in vivo* du BPA ont démontré des anomalies et des toxicités à des doses à l'ordre de microgrammes ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ou du nanogrammes (ng/kg), sur la fonction de reproduction provoquant une réponse dans l'expression des gènes en se liant aux récepteurs nucléaires des œstrogènes (Richter *et al.*, 2007). Les effets observés sont la foeto-toxicité, l'altération de la fonction thyroïdienne, l'induction de cancer, une

perturbation du métabolisme des lipides et des sucres, une interaction avec le système immunitaire du tractus digestif et des modifications comportementales (Richter *et al.*, 2007).

1.3.5.1. EFFET DE REPRODUCTION

Diverses études effectuées sur des modèles animaux ont montré qu'une exposition au BPA périnatale induit depuis la naissance et jusqu'à l'âge adulte, des troubles de la fonction de reproduction et des anomalies développementales au niveau des organes génitaux chez la progéniture mâle et/ou femelle (Vandenberg *et al.*, 2007).

Certains auteurs ont rapporté que l'exposition périnatale des souris mères au BPA (0.5 à 10 mg/kg/j s.c.) entraînait, chez la descendance femelle, une puberté précoce, un changement des cycles œstraux, une chute des niveaux plasmatiques de l'hormone gonadotrope lutéinisante (LH), des lésions au niveau de l'utérus et des ovaires et une altération du développement des glandes mammaires (Nikaido *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011; Ayyanan *et al.*, 2011). D'autres auteurs ont aussi montré que l'exposition au BPA (2-20 µg/kg/j p.o.) des mères souris pendant la gestation, mènerait chez la descendance mâle à une augmentation du volume de la prostate, un développement de lésions néoplasiques et un déséquilibre dans l'homéostasie de la testostérone (Timms *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2007). Également, d'autres constatations ont été faites chez ces animaux, soit une diminution de la masse des épидидymes et une baisse de la

production spermatique journalière, influençant par la suite la qualité et la viabilité des spermatozoïdes (Zhang *et al.*, 2012).

1.3.5.2. EFFET SUR LA FONCTION MÉTABOLIQUE

L'action potentielle du bisphénol A sur le poids corporel et le métabolisme énergétique a été observée dans des études réalisées *in vivo* chez des rongeurs. Celles-ci ont permis d'explorer l'impact du BPA sur diverses fonctions vitales et les complications métaboliques associées, dont la mise en place de l'obésité, la différenciation des adipocytes, l'accumulation des lipides, le transport du glucose. Elles ont pu aussi associer l'exposition au BPA avec des changements du contenu des cellules β -pancréatiques en insuline et en sécrétion d'adiponectine et de lectine impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, cruciaux pour le maintien d'un poids corporel adéquat (Vom Saal *et al.*, 2012). Une corrélation a été mise en évidence entre l'exposition périnatale au BPA et la variation du poids corporel à l'âge adulte chez des rongeurs; l'effet obésogène remarqué montre que l'exposition périnatale au BPA (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) augmente la masse corporelle des rats femelles et mâles à l'âge adulte (Rubin *et al.*, 2001). Par ailleurs, une élévation des niveaux plasmatiques de leptine et de cholestérol total a été observé, ce qui peut mener à des perturbations du métabolisme glucidique des lipides et des sucres, contribuant ainsi au développement de l'obésité générale, et présentant un risque de diabète de type 2 insulino-dépendant (Vom Saal *et al.*, 2012).

1.3.5.3. EFFET SUR LA FONCTION DE LA BARRIÈRE INTESTINAL

Une étude réalisée par l'équipe de recherche de Braniste *et al.* (2010) sur des rats révèle que le bisphénol A peut avoir des conséquences sur la fonction intestinale, en utilisant des doses inférieures à celle définie comme dose de référence sans effet nocif observé (NOAEL = 5 mg/kg pc/j). À travers ces recherches, en tenant compte des relations doses-réponses, ils ont pu prouver que le colon des rats montrait une sensibilité vis-à-vis des faibles doses du bisphénol A. Il agit sur l'épithélium intestinal, diminue la perméabilité et l'échange (eau, sels minéraux) nécessaires à l'équilibre. De plus, il affecte la douleur viscérale, la réponse immunitaire à l'inflammation digestive et favorise le développement de maladies inflammatoires, puisque la barrière intestinale est affectée et le système immunitaire est fragilisé suite à une exposition périnatale chez le rat.

Cette même équipe a émis l'hypothèse que l'exposition périnatale au BPA pourrait bloquer le développement des défenses immunitaires intestinales à l'âge adulte, modifiant ainsi leur capacité à reconnaître ultérieurement les substances potentiellement nuisibles pour l'organisme (Braniste *et al.*, 2010).

1.3.5.4. TOXICITÉ THYROÏDIENNE

Une étude sur des cellules humaines *in vitro* a mis en évidence la capacité du bisphénol A à perturber la fonction thyroïdienne à l'intérieur des cellules en déplaçant l'hormone thyroïdienne T3 (triiodothyronine) de son récepteur et en inhibant la transcription des gènes, ce qui montre un effet potentiel du BPA comme antagoniste des hormones thyroïdiennes (Moriyama *et al.*, 2002). Une autre étude française de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, qui s'ajoute sur la liste des enquêtes scientifiques autour des effets nocifs du bisphénol A, a montré que l'exposition du bisphénol A de brebis pendant la grossesse entraînait des perturbations de la fonction thyroïdienne chez celle-ci et également chez leurs rejetons. Ces résultats ont été caractérisés par une diminution du taux plasmatique de la thyroxine (T4, l'hormone thyroïdienne), ce qui peut avoir des conséquences négatives sur la croissance, le développement neuronal et cognitif du rejeton (Viguié *et al.*, 2012).

1.3.5.5. EFFET SUR LA GLANDE MAMMAIRE

Des liens avérés ou suspectés ont été établis entre le BPA et l'apparition de cancer du sein (Lamartiniere *et al.*, 2011). De plus l'exposition au bisphénol A a été associée à une augmentation de l'incidence du cancer mammaire (Jenkins *et al.*, 2009). L'exposition fœtale chez les rats à 2.5, 25, 250 et 1000 µg/kg/j de BPA par voie intraveineuse a

conduit au développement de lésions pré-néoplasiques et néoplasiques dans la glande mammaire et à une augmentation de tumeurs (Murray *et al.*, 2007). D'autres études ont montré l'apparition de cancers mammaires après une exposition au bisphénol A durant la période prénatale chez des rongeurs (Munoz-de-Toro *et al.*, 2005; Durando *et al.*, 2006).

Les effets identifiés portent sur une modification de la structure de la glande mammaire chez les nouveau-nés, un développement plus avancé dès la naissance caractérisé par une accélération de la maturation des glandes mammaires et une densité plus importante du tissu épithélial de celles-ci. Ceci pourrait favoriser un développement tumoral et des lésions précancéreuses et cancéreuses ultérieurement (Macon *et al.*, 2013).

1.3.5.6. TOXICITÉ CÉRÉBRALE ET COMPORTEMENTALE

Les fonctions cérébrales et comportementales sont également perturbées chez les rats et les souris exposés au BPA *in utero*. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une perte du dimorphisme et de caractère sexuel primaire (organes génitaux) ou secondaire (morphologique, physiologique, comportementale, etc.) au niveau des structures cérébrales pour la progéniture exposée à ce contaminant (Cao J *et al.*, 2012). Par ailleurs, de nombreuses publications ont rapporté qu'une exposition des rats au BPA pendant les périodes fœtales et allaitantes à une dose inférieure à la dose journalière tolérable humaine (TDI= 50 µg/kg/j), pourrait induire une toxicité touchant et perturbant le développement, engendrant des modifications structurelles et neurochimiques du cerveau associées à des changements comportementaux (sociaux, sexuels, etc.) comme

l'hyperactivité, des déficits d'apprentissage (test mémoire), comportements cognitifs et anxiolytiques (Kubo *et al.*,2003 ; Panagiotidou *et al.*,2014).

Une exposition à l'âge adulte peut conduire à une altération de la mémoire (reconnaissance d'objets et la mémoire spatial) et du comportement exploratoire (Wang Chong *et al.*,2014). Une déféminisation du comportement social et émotionnel et une altération du comportement maternel sont également observées chez des rongeurs femelles (Gioiosa *et al.*,2007). Dans l'hypothalamus et le cortex préfrontal, le BPA antagonise l'action de l'oestradiol² (E2) sur la formation des synapses (synaptogenèse) (Juraska *et al.*, 2013; Rachel *et al.*, 2015).

1.4. NAPROXÈNE (NAP)

Le NAP fait partie de la classe thérapeutique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). C'est un dérivé de l'acide arylacétique sur lequel on retrouve un groupement d'acide propanoïque (Neal *et al.*,1997). Le nom chimique pour le naproxène est l'acide (+)-6-méthoxy-alpha-méthyle-2-naphtalène acétique, avec un poids moléculaire de 230,26 g/mol et une formule moléculaire brute de C₁₄ H₁₄O₃ (Figure 4) (FDA, 2014). Ce médicament possède des propriétés analgésique, anti-inflammatoire et antipyrétique en diminuant la formation de précurseurs de prostaglandines.

Il est prescrit pour plusieurs traitements afin de soulager une variété de douleurs aiguë et chronique y compris, l'arthrite, l'arthrose, les rhumatismes, les migraines et les maux de tête. Il a également d'autres usages thérapeutiques mineures comme dans le traitement des crampes menstruelles, l'extraction dentaire ou même contre un rhume (Rahme *et al.*, 2009; Todd PA *et al.*, 1990).

1.4.1. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

Sous forme d'une poudre cristalline blanche inodore, il se caractérise par une acidité faible, soluble dans les lipides, pratiquement insoluble dans l'eau à un pH faible et facilement soluble dans l'eau à un pH élevé. Le logarithme du coefficient de partage octanol : eau (Log P) du NAP à pH 7,4 approximativement est de 1,6 à 1,8 avec un point de fusion de 152 à 158 °C (Ferreira *et al.*, 2000; Roskovski, 1971).

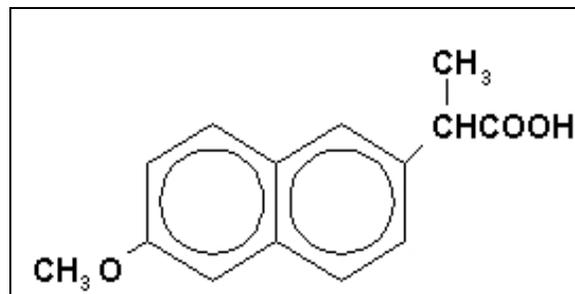


Figure 4. Structure chimique du naproxène

1.4.2. BIOTRANSFORMATION ET TOXICOCINÉTIQUE

Le Naproxène (NAP) est largement métabolisé dans le foie en en 6-O-désméthyle naproxène, biotransformé principalement par les cytochromes CYP1A2 et CYP2C9 (Toothaker *et al.*, 2000). Les deux molécules, NAP et 6-O-désméthyle naproxène (6-DMN), sont métabolisées en glucuronoconjugués par UDP-glucuronosyltransférases (UGT2B7), afin de former respectivement le naproxène acyle glucuronide ou bien le 6-O-désméthyle- naproxène acyle glucuronide (6-DMN-AG) en passant par une réaction intermédiaire qui est la O-désalkylation (phase de déméthylation) (Vree *et al.*, 1993; Konstantianos *et al.*, 1994).

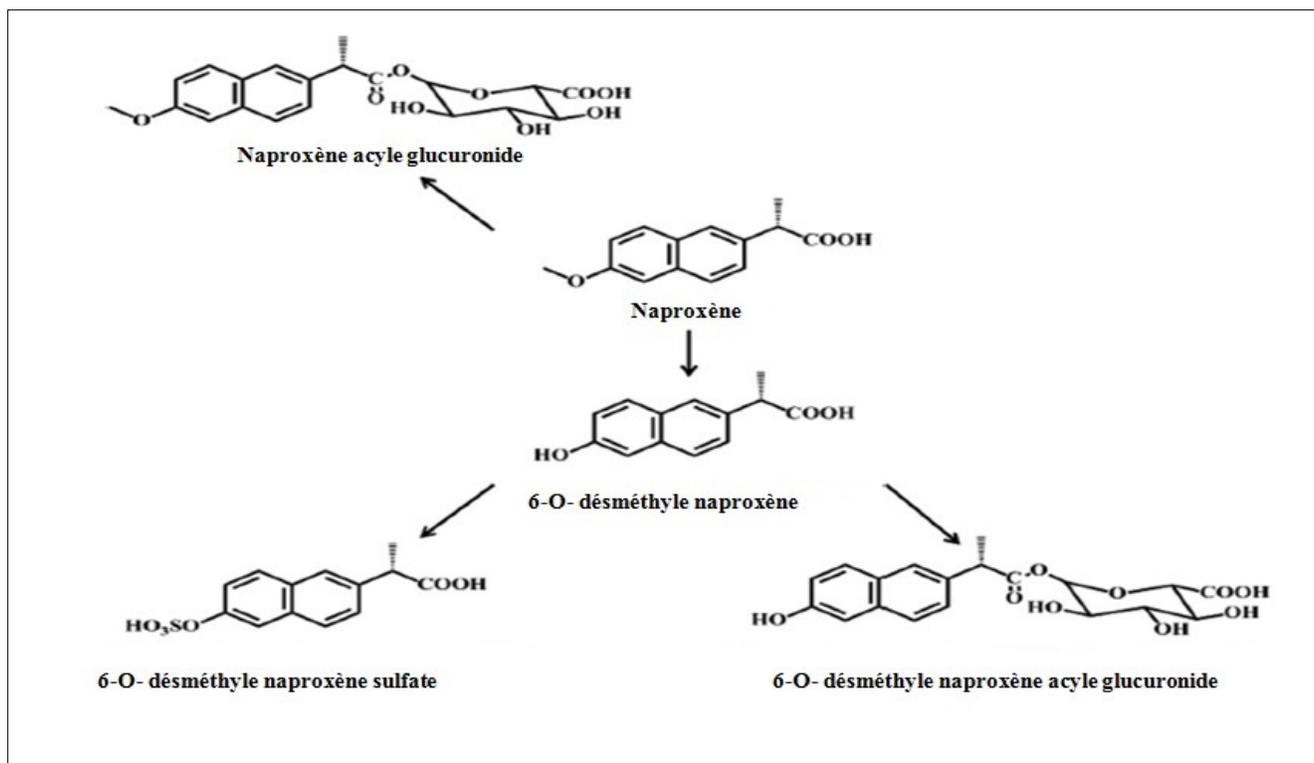


Figure 5. Voie du métabolisme du naproxène

Le NAP est fortement lié aux protéines plasmatiques ($\approx 99\%$), principalement à l'albumine avec un volume de distribution de 0,16 l/kg. Il est rapidement et complètement absorbé par le tractus gastro-intestinal avec une biodisponibilité *in vivo* de 95 % (Moyer, 1986). Les concentrations plasmatiques maximales du médicament sont atteintes dans deux à quatre heures après l'ingestion, avec un état d'équilibre après quatre à cinq doses. Sa demi-vie chez l'homme varie de 12 à 17 h, avec une moyenne de 13 h (Andersen *et al.*, 1992).

Le NAP est principalement éliminé soit sous forme inchangée (10%) ou conjuguée (60%). La presque totalité des 30% restants subit une déméthylation et par la suite excrétée sous forme de 6-DMN ou bien sous forme de 6-DMN AG, ce métabolite est inactif, il a une activité thérapeutique moins de 1% par rapport à la molécule mère (Sidelmann U.G *et al.*, 2001; Runkel R *et al.*,1973).

La clairance du NAP est d'environ 0,13 ml/min/kg. Le NAP et ses métabolites sont excrétés principalement par voie urinaire. La voie d'excrétion est presque exclusivement dans l'urine. Suite à l'administration d'une dose radio-marquée de naproxène environ 95% est récupérée dans les urines et 3% ou moins dans les fèces (Runkel *et al.*,1973). À des doses thérapeutiques, aucun des métabolites du NAP n'était actif (Vree *et al.*,1993; Kuramoto *et al.*,1973).

1.4.3. EFFETS THERAPEUTIQUES

Le NAP est un médicament qui possède un ensemble d'activité anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) avec des propriétés analgésiques et antipyrétiques qui soulage la douleur, diminue l'enflure et la fièvre. Le mécanisme d'action de l'anion NAP, comme celui d'autres AINS, n'est pas entièrement connu, mais peut être associé à l'inhibition de la prostaglandine-synthase (PGS).

Le naproxène exerce son effet au site de la douleur, en interrompant la production des prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TXB), des substances qui causent de l'inflammation, la douleur et de la fièvre (Capone *et al.*,2004).

Le NAP inhibe à la fois la formation de la thromboxane synthase A2 (TXA2), dépendante de la cyclo-oxygénase 1 (COX-1), ce qui réduit l'agrégation des plaquettes et la synthèse du prostacycline (PGI2) dépendante de la de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), qui est un médiateur important de vasodilatateurs (Martal *et al.*,2005). Le NAP est donc considéré comme un inhibiteur double non sélectif du cyclo-oxygénase iso-enzyme 1 et 2 (COX-1/COX-2) (Brogden *et al.*, 1979; Martal *et al.*, 2005). La plupart des inhibitions causées par les AINS, y compris le NAP, sont réversibles. Les AINS sont des inhibiteurs compétitifs de la COX, et puisque l'inhibition est réversible, leur durée d'action est dépend principalement de leur clairance rénale ou hépatique.

1.4.4. TOXICITÉ

L'irritation gastro-intestinale et la néphropathie sont les effets pathologiques les plus importants décrits par des études de toxicité préclinique (^{Pr}Naprosyn®, 2013).

L'apparition des lésions gastro-intestinales, suite à l'administration de NAP, a été mise en évidence au cours d'essais toxicologiques chez plusieurs espèces animales (rats, souris, cobayes, singes etc.). Certains effets ont été observés allant de l'hyperémie, l'inflammation de la muqueuse gastro-intestinale à la péritonite. Une tolérance a été remarqué après la prise d'une dose orale équivalente à 30 mg/kg pc/jour chez des rats pendant 90 jours; néanmoins la même dose s'est avérée ulcérogène lorsqu'elle a été administrée durant presque 6 mois (^{Pr}Naprosyn®, 2013).

Une néphropathie a été remarquée à cet effet chez les rats, les souris et les lapins à des doses élevées de NAP; des changements pathologiques ont été produits dans le cortex et les papilles rénaux. Chez les souris ayant reçu du NAP par voie orale à une dose de 120 mg/kg pc/jour pendant 6 mois, une faible incidence de sclérose corticale et de nécrose de l'extrémité papillaire des reins a été notée. L'administration répétée de fortes doses de NAP à des souris serait liée à une exacerbation d'une néphropathie spontanée (Wax *et al.*, 1975; Diane *et al.*, 1980).

À propos de la reproduction, dans des études portant sur les périodes périnatale et post-natale chez le rat, des doses orales de NAP allant jusqu'à 20 mg/kg/jour durant la dernière

partie de la gestation jusqu'au sevrage, n'ont produit aucun effet nocif sur la viabilité des petits, l'indice de lactation, la proportion des sexes ou les gains pondéraux de la progéniture. Toutefois, une légère augmentation de la durée de gestation a été observée aux doses de 10 et 20 mg/kg/j après 21 jours de la grossesse (Csapo AI *et al.*,1973).

1.5. CONSIDÉRATION ET MÉCANISMES DES INTERACTIONS METABOLIQUES ENTRE LES COMPOSANTS D'UN MÉLANGE

1.5.1. RISQUES LIÉS AUX MÉLANGES DE SUBSTANCES CHIMIQUES

L'homme est constamment exposé à une multitude de xénobiotiques présentes dans son environnement. Au cours de ses activités quotidiennes, la contamination peut provenir de l'ingestion d'eau ou d'aliments, de l'absorption ou la consommation de médicaments, de l'inhalation d'air ou par contact cutané avec divers agents chimiques (Casarett *et al.*, 1996).

Vis-à-vis les probabilités d'interactions métaboliques et des modifications de la toxicocinétique des composantes de mélanges, de nombreuses interrogations et inquiétudes sont soulevées sur les possibilités que la toxicité prédite soit sous-estimée. Les notions d'additivité ou d'interactions métaboliques doivent être prises en considération dans l'application des valeurs limites. L'exposition simultanée à deux ou plusieurs substances peut créer des impacts sur des organes cibles communs, influencer le mode d'action des constituants du mélange, et conduire à un accroissement de leurs concentrations internes et donc de leur toxicité (Krishnan et Brodeur, 1991). La

combinaison d'une variété de substances chimiques cause souvent des réponses toxicologiques imprévues et différentes par rapport à des réponses induites par des substances exposées individuellement (Yang, 1994).

Ces interactions toxicologiques étant des effets différents de la somme des effets prévus par les constituants peuvent être de type antagonisme, synergique ou potentialisation, donc ce concept dépend essentiellement de la nature des interactions, des mécanismes d'action de chaque constituante du mélange, de leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leurs caractéristiques toxicocinétiques (y compris les voies métaboliques) et toxicodynamiques (Beck *et al.*, 1994). Ces facteurs nous guideront vers une bonne compréhension et interprétation de ces interactions afin de prédire les effets toxiques d'un mélange.

Les approches d'analyse du risque sont bien développées pour les substances prises toutes seules. Par contre, l'évaluation et la gestion globale du risque applicables aux mélanges sont en cours de développement. Une fois développées, elles faciliteront la prise de décision vis à vis des mesures de protection de la santé et le bien-être de la population (IGHRC., 2009).

1.5.2. CONSOMMATION DE MÉDICAMENTS

La consommation des produits thérapeutiques est un phénomène grandissant au sein de la population canadienne avec différentes classes d'âge. Selon la base de données sur les dépenses nationales de santé de l'Institut Canadien d'Information sur la Santé en 2013 (ICIS., 2013), la prise de médicaments constitue 16,3% des frais en santé au Canada, soit un montant de 34,5 millions de dollars, une hausse de dépenses à l'achat de produits pharmaceutiques remarquables par rapport à l'année 1975, où elles n'ont atteint seulement que 8 %. Cette situation favorise la possibilité d'une exposition concomitante à des médicaments et à des polluants environnementaux, qui est d'autant plus forte qu'elle suscite l'intérêt des experts en matière de santé publique.

La coexposition à certains produits chimiques du mélange peut causer des interactions toxicocinétiques ou pharmacocinétiques, entraînant, par exemple, un changement du taux de métabolisme, de toxicité et des effets sur les organes cibles communs, modifiant ainsi les concentrations sanguines et tissulaires. Récemment une étude a démontré que certains médicaments peuvent interagir au niveau métabolique avec le bisphénol A (BPA), un polluant environnemental connu comme étant un perturbateur endocrinien (Verner *et al.* 2010). Parmi eux, on note le naproxène (NAP) appartenant à la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiennes (AINS) dont la consommation est courante. Ces deux substances empruntent la même voie métabolique et sont principalement éliminées par voie de conjugaison à l'acide glucuronique (AG).

La présence simultanée du médicament peut altérer l'activité enzymatique des uridine diphosphate glucuronosyltransférase (UGT), la production ou le transport du cofacteur acide glucuronique uridine diphosphate (UDPGA). Sachant que ces deux composants (BPA et NAP) en combinaison pourraient avoir une compétition pour accéder au site actif de la même enzyme responsable du métabolisme (l'isoforme UGT2B1) (Figure 6). En effet, cette coexposition réduirait le taux de métabolisme du polluant, inhiberait sa détoxification et augmenterait donc le risque toxicologique (Verner *et al.*, 2010). Cette interaction métabolique résulte de la compétition pour la liaison au niveau des sites catalytiques de l'enzyme métabolisant, de sorte que chaque constituant du mélange (BPA-NAP) peut inhiber le métabolisme de l'autre et induire une élévation des doses internes (DI).

Pour cette raison, la conception et le recours à des modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK) constituent de nos jours des outils efficaces et adaptés pour estimer les conséquences toxicocinétiques (TK) de l'exposition à certains mélanges de contaminants environnementaux.

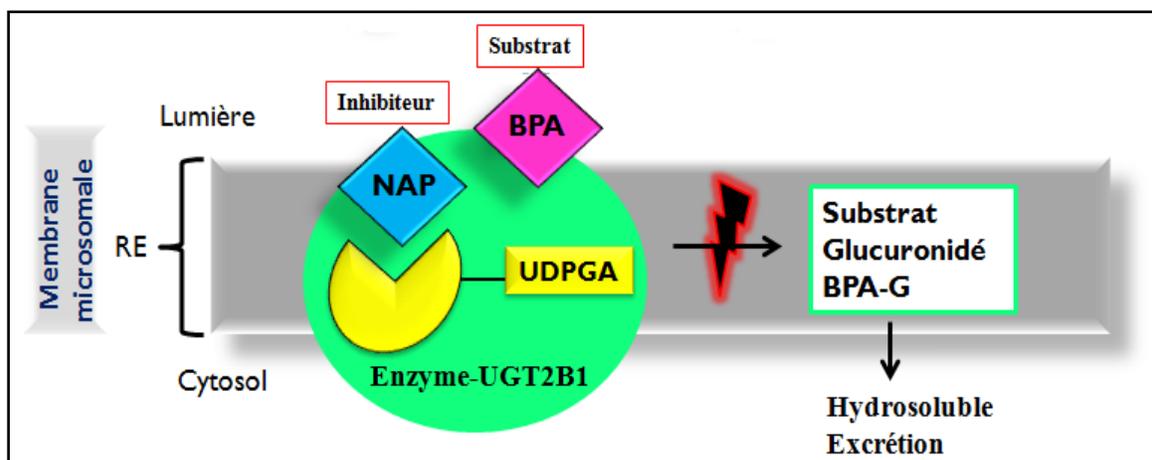


Figure 6 . Effet inhibiteur du naproxène sur le processus normal du métabolisme du bisphénol A

1.5.3. INTÉRACTIONS MÉTABOLIQUES

Le terme métabolisme est souvent employé de façon interchangeable avec celui de biotransformation. Dans cette phase de la toxicocinétique, les composés liposolubles sont transformés en des substances hydrosolubles, plus facilement excrétées dans les urines, grâce à un ensemble d'enzymes clés dans l'organisme.

L'exposition simultanée à des substances, métabolisées par la même voie enzymatique fait en sorte que chacune inhibera la biotransformation de l'autre. L'interaction métabolique apparaît lorsque l'addition d'une nouvelle substance induit une modification de la clairance métabolique prévue des autres constituants du mélange (Krishnan et Brodeur., 1991). C'est le cas du NAP et le BPA qui empruntent les mêmes voies enzymatiques de biotransformation, (Verner *et al.*, 2010).

L'interaction métabolique est un facteur pouvant changer le profil toxicocinétique des composants du mélange, menant ainsi à une modification du risque de toxicité. Une telle interaction peut causer une modulation des paramètres de surveillance biologique de l'exposition.

Parmi les conséquences problématiques provoquées par ce genre de situation d'interaction métabolique, on note l'élévation des doses internes pouvant mener à des dommages dans les organes cibles de l'organisme. Afin de prévoir/prédire ce genre de

scénarios, les modèles PBPK sont souvent utilisés comme des outils en évaluation du risque. Il serait donc important de les développer pour mieux estimer la cinétique des constituants de mélanges pouvant interagir entre eux.

1.5.4. INHIBITION MÉTABOLIQUE

L'inhibition métabolique ou enzymatique est un mode de régulation souvent présent lors de coexpositions, où on observe une diminution du taux d'activité des enzymes en présence simultanée d'un substrat inhibiteur. L'inhibition peut-être réversible ou irréversible selon la nature et le degré d'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme (Marangoni, 2003).

L'étude des effets inhibiteurs nous permet de mieux comprendre le mécanisme catalytique d'une réaction enzymatique donnée, connaître la spécificité d'une enzyme, marquer et identifier les groupes actifs du site catalytique et déterminer les caractéristiques physicochimiques ainsi la nature des substances mises en jeu (Bisswanger, 2002).

1.5.4.1. INHIBITION RÉVERSIBLE

a-INHIBITION COMPÉTITIVE

L'inhibition compétitive est un mécanisme impliquant la liaison réversible de l'inhibiteur (I) sur le site catalytique de l'enzyme (E); cette action va pouvoir empêcher la liaison du substrat (S) à l'enzyme, et la formation du complexe (ESI) (Figure 8). La constante de dissociation (k) est définie selon plusieurs paramètres y compris la concentration de l'enzyme libre, de l'inhibiteur et du complexe (EI) formé (Marangoni, 2003).

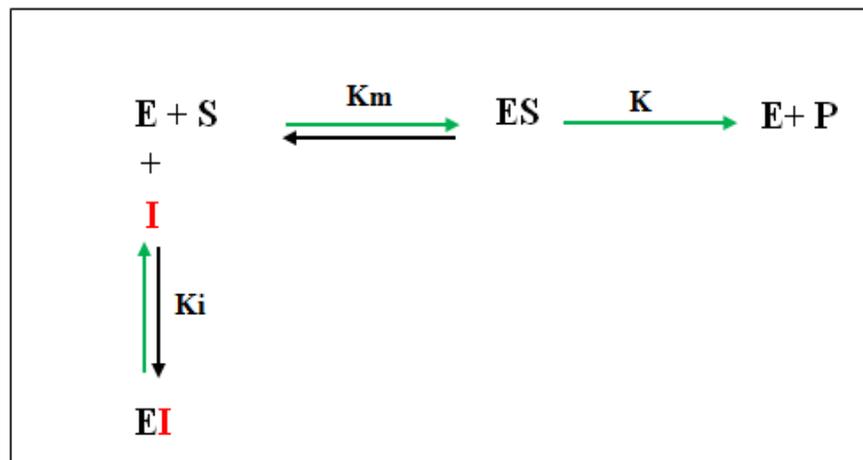


Figure 7. Le mécanisme réactionnel de l'inhibition compétitive

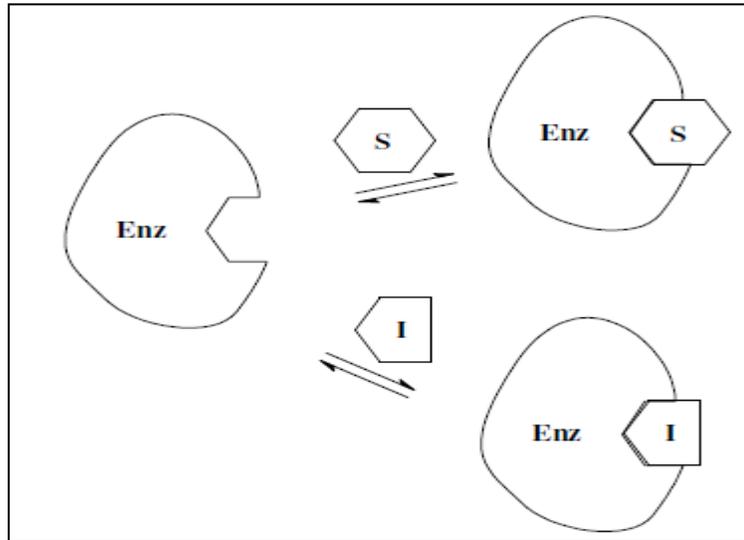


Figure 8. Représentation de l'inhibition compétitive. Le substrat (S) et l'inhibiteur (I) qui sont en compétition pour le même site enzymatique ont des similarités structuruelles (Casimir B.,2010).

L'équation générale de la vitesse de réaction (v) d'une substance étant inhibée compétitivement est défini comme suit :

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad [\text{eq. 1}]$$

Où la constante d'affinité de Michaelis-Menten (Km) est modulée par la concentration de l'inhibiteur [I] et son affinité pour l'enzyme (Ki). La vitesse maximale enzymatique (Vmax) ne change pas, mais la constante Michaelis-Menten apparente sera augmentée.

b-INHIBITION COMPÉTITIVE PARTIELLE

L'enzyme a la capacité de fixer le substrat et l'inhibiteur; c'est ce qu'on appelle la fixation non exclusive. Si le complexe inhibiteur-substrat-enzyme (ESI) formé reste encore actif, l'inhibition est dite partielle. Par contre, l'inhibition sera totale si le complexe devient complètement inactif. L'inhibition compétitive partielle est une forme d'inhibition réversible dans laquelle le complexe ESI peut encore générer des produits, même à des concentrations de saturation, quoiqu'à un rythme plus lent par rapport au système sans inhibiteur. Dans ce cas ci, l'inhibiteur antagonise la liaison du substrat sans affecter la constante de vitesse de formation de produit (Purich, 2010).

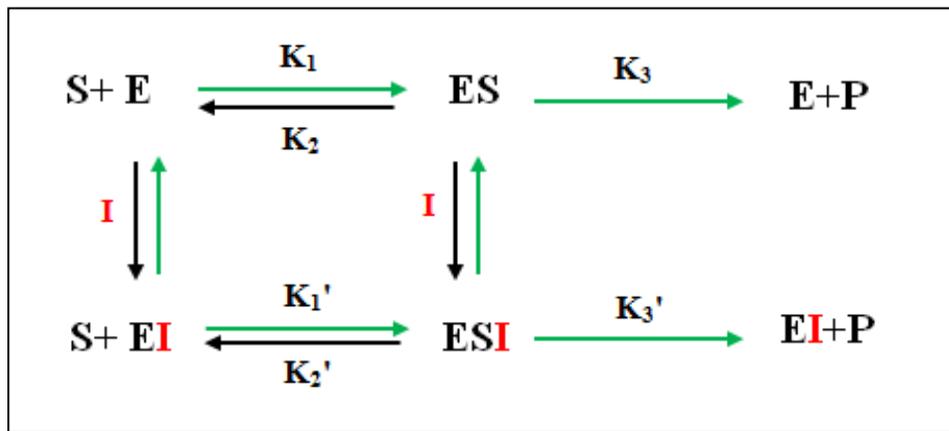


Figure 9. Le mécanisme réactionnel de l'inhibition compétitive partielle.

L'équation générale de la vitesse est définie comme suit :

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{1 + (K_m / [S]) * \left(\frac{1 + [I]}{K_i} \right) + [S]} \quad [\text{eq. 2}]$$

Où α représente le degré d'inhibition.

c- INHIBITION INCOMPÉTITIVE

Ce type d'inhibition est occasionné lorsqu'une substance bloque le complexe enzyme-substrat (ES). Quand ES se forme en premier lieu, l'inhibiteur (I) se fixe par la suite à celui-ci pour donner un complexe ESI non productif. Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur ne peut pas se fixer sur l'enzyme libre, le site de fixation de I étant induit par celle du S (Voet *et al.*, 1990).

Au moment où le substrat se fixe sur l'enzyme, un changement de conformation de l'enzyme se déclenche révélant ainsi un nouveau site de liaison pour l'inhibiteur. Ce dernier affecte le rôle catalytique de l'enzyme sans toutefois nuire à la liaison au substrat. Généralement, l'inhibiteur cause une déformation structurelle du site actif, ce qui diminue l'activité de l'enzyme (Marangoni *et al.*, 2003).

d- INHIBITION NON COMPÉTITIVE

Lors d'une inhibition non-compétitive, l'inhibiteur peut se fixer à l'enzyme libre E et au complexe ES; de même le substrat se lie à l'enzyme libre E et au complexe EI. Les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont différents et la fixation se fait d'une manière séquentielle, donc l'inhibiteur n'a aucun effet sur la fixation du substrat. Les inhibiteurs non compétitifs n'ont pas d'homologie structurale avec les substrats; ainsi ils ne modifient pas la façon dont se fixe le substrat mais ils empêchent les adaptations conformationnelles du site actif qui devraient avoir lieu pour qu'il y ait catalyse. Le complexe ESI produit est inactif et inopérant (Marangoni *et al.*, 2003).

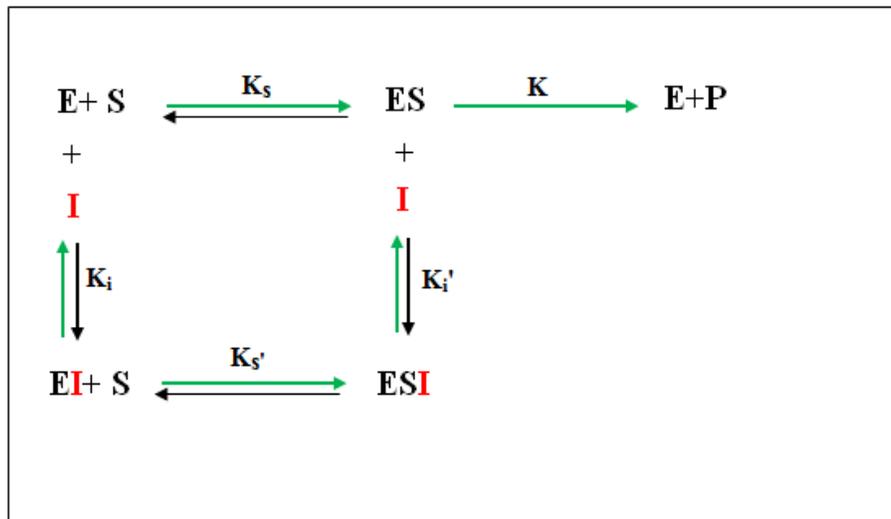


Figure 11. Le mécanisme réactionnel de l'inhibition non-compétitive.

L'équation générale de la vitesse est décrite comme suit :

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad [\text{eq. 4}]$$

Dans ce cas, la vitesse maximale enzymatique (V_{max}) de la réaction diminue car la concentration du complexe enzyme-substrat (ES) baisse. Par contre, l'affinité de l'enzyme (K_m) pour le substrat n'est pas influencée car le (S) peut se lier aussi bien sur l'enzyme libre que sur le complexe enzyme-inhibiteur (EI) (Marangoni *et al.*, 2003).

e- INHIBITION MIXTE

Dans ce type d'inhibition réversible, l'inhibiteur peut interagir à la fois avec l'enzyme libre (E) ou bien avec le complexe "enzyme-substrat" à un site autre que le site actif et avec des pourcentages d'affinités différents (Marangoni *et al.*, 2003).

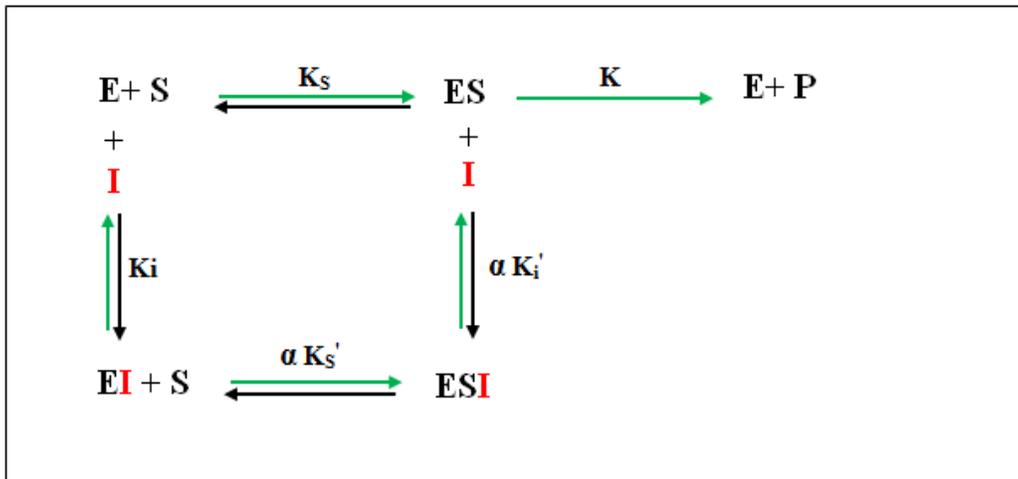


Figure 12. Le mécanisme réactionnel de l'inhibition mixte.

L'équation générale de la vitesse est décrite comme suit :

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{S * \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_m * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad [\text{eq. 5}]$$

1.6. OBJECTIFS DU PROJET

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU MÉMOIRE

L'objectif général du projet est de caractériser les interactions métaboliques entre le polluant environnemental BAP et le NAP dans un système de foie de rat isolé et perfusé *in situ* (IPRL), un modèle se rapprochant de la situation *in vivo*. Il s'agit par la suite de voir si l'addition de protéines plasmatiques (c.-à-d., albumine) module et influence la clairance métabolique hépatique du polluant et du médicament perfusés individuellement ou en co-exposition.

L'hypothèse initiale est que la coexposition à ce mélange binaire (BPA+NAP) au niveau de l'IPRL déclenche une interaction métabolique qui pourrait perturber le processus normal du métabolisme des substrats dans notre organe cible perfusé qui est le foie de rat. Une réduction de la biotransformation, augmentation des doses internes et une modification de la toxicité du polluant pourraient survenir suite à ce genre de mélange simultané de xénobiotiques choisis.

Les objectifs spécifiques de cette étude sont donc de :

(i) Déterminer la clairance métabolique et la cinétique enzymatique hépatique de chacune de ces substances seules (V_{max} et K_m) ou en mélange binaire (K_i) en fonction de temps dans l'organe entier en présence et en absence de l'albumine; (ii) caractériser l'impact de l'ajout de l'albumine sur la cinétique enzymatique et la clairance métabolique du BPA et NAP dans le foie de rat isolé et perfusé; (iii) identifier la nature d'inhibition enzymatique causée par la coexposition; (iv) comparer les paramètres métaboliques de

l'IPRL avec les valeurs obtenues en condition *in vitro*. Ceci sera fait en utilisant diverses approches d'extrapolation de *in vitro* à *in vivo* (IVIVE) pour prédire la clairance métabolique hépatique du bisphénol A et celle du naproxène, permettant ainsi une évaluation quantitative de leur pouvoir prédictifs..

CHAPITRE 2: Study of Bisphenol A and Naproxen metabolic interactions in isolated perfused rat liver model

Study of Bisphenol A and Naproxen metabolic interactions in isolated perfused rat liver model

Sara Bounakta, Marc Mantha, Sami Haddad*.

Department of Environmental Health and Occupational Health, ÉSPUM, Faculty of Medicine, University of Montreal, C.P. 6128 Succ. Downtown, Montreal, Qc. H3C 3J7, Canada.

* To whom correspondence should be addressed:

Sami Haddad

Department of Environmental and Occupational Health,

University of Montreal,

C.P. 6128 Succ. Downtown,

Montreal, (Qc.), Canada, H3C 3J7

Phone: (+001) 514-343-6111 ext.38166

Fax: (514) 343-2200

2.1 RÉSUMÉ

Le naproxène (NAP), un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien, peut inhiber de manière compétitive chez le rat et aussi au niveau des microsomes hépatiques humain la glucuronidation du bisphénol A (BPA) qui est un perturbateur endocrinien omniprésent dans notre environnement. Il pourrait en résulter une augmentation des niveaux internes du BPA lors d'une consommation chronique du NAP.

Cette étude visait à caractériser ce type d'interaction métabolique sur l'ensemble d'un organe intact qui conservait l'architecture lobulaire en utilisant le système de foie du rat isolé perfusé (IPRL), et à déterminer la cinétique enzymatique du métabolisme de chacune des substances seules ou en mélange binaire en présence et en absence d'albumine. Nous avons par ailleurs mis en évidence l'influence de la liaison aux protéines plasmatiques sur le comportement et le profil cinétique des constituants du cocktail, en utilisant le même modèle des foies perfusés exposés aux mêmes doses. Les données de clairance mesurées ont servi à comparer le pouvoir prédictif des méthodes d'extrapolation *in vitro-in vivo* (IVIVE) dans les conditions testées.

Des foies de rat ont été canulés et perfusés avec le tampon physiologique Krebs-Henseleit contenant du BPA seul, NAP seul ou en combinaison à des concentrations différentes. Les taux d'élimination du BPA et du NAP ont été calculés à partir des mesures de leurs concentrations dans le perfusât à l'entrée et à la sortie de l'organe. Les constantes métaboliques ont été déterminées par régression non linéaire. Les métabolismes du BPA et du NAP seuls ont démontré une cinétique saturable avec un V_{max} et K_m de 530 nmol/min/g de foie et 51.6 μM pour le BPA, ainsi que 178.5 nmol/min/g de foie et 149.2 μM pour le NAP. L'analyse des expositions combinées suggère une inhibition compétitive partielle du BPA par le NAP avec une valeur de K_i estimée à 0.3542 μM .

Par ailleurs, le taux de disparition a été précisé pour ces deux composés en présence d'albumine (30g/l). La présence d'albumine induit clairement une diminution de la clairance et l'extraction hépatique du bisphénol A ($V_{max} = 1,3$ nmol/min/ mg prot de foie, $K_m = 3,6$ μM) et du naproxène. ($V_{max} = 2$ nmol/min/ mg prot de foie, $K_m = 197,9$ μM). Les algorithmes permettent d'appuyer l'hypothèse que la forte liaison aux protéines

plasmatiques perturbe et diminue la biotransformation du polluant et du médicament perfusés individuellement ou en coexposition. Parmi, les méthodes prédictives IVIVE testées, celle de Poulin et al. permettait la meilleure prédiction en présence ou absence d'albumine. Ces données *in vivo* sur les interactions métaboliques pourront être intégrées dans un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) pour prédire la dose interne résultant d'une exposition à ces mélanges chimiques.

Mots clés : Bisphenol A, Naproxène, perfusion, inhibition, interaction métabolique, co-exposition, biotransformation, IPRL.

2.2 ABSTRACT

Naproxen (NAP), an anti-inflammatory nonsteroidal drug, has been shown to competitively inhibit the glucuronidation of bisphenol A (BPA) in rat and human liver microsomal. Chronic consumption of NAP could result in increased internal levels of BPA, which is a ubiquitous endocrine disruptor in our environment.

This study aimed to determine if this interaction could be reproduced in the whole organ using the isolated perfused rat liver system (IPRL), and characterize the enzyme kinetics of each substance alone or in binary mixtures, in the presence and absence of albumin, highlighting the influence of the plasma protein binding (i.e. albumin) on the behavior and the kinetic profile of cocktail constituents.

Rat livers were cannulated and perfused with physiological buffer containing only BPA, NAP or a combination of both xenobiotics. The BPA and NAP elimination rates were calculated from measurements of their concentrations in the perfusate at the inlet and the outlet of the organ. The metabolic constants were determined by nonlinear regression. The measured clearance data is served to compare the predictive power of extrapolation methods *in vitro-in vivo* (IVIVE) under the conditions tested.

The metabolism of BPA and NAP alone showed a saturable kinetics with V_{max} and K_m equivalent to 530 nmol/min/g liver and 51.6 μM for the BPA and 178.5 nmol/min/g liver and 149.2 μM for NAP. Analysis of combined exposures suggests a partial competitive inhibition of BPA by the NAP with a K_i estimated 0.3542 μM . The presence of albumin induces a decrease in clearance and hepatic extraction of bisphenol A ($V_{max} = 1.3$ nmol/min/mg prot liver, $K_m = 3.6$ μM) and naproxen. ($V_{max} = 2$ nmol/min/mg prot liver, $K_m = 197.9$ μM). The algorithms allow to support the hypothesis that the high plasma protein binding disrupts and reduces the metabolism the pollutant and the drug perfused individually or in co-exposure. Among the predictive methods IVIVE tested, the method by Poulin et al. gave the best predictions in the presence or absence of albumin.

These in vivo data on metabolic interactions can be incorporated in physiologically based pharmacokinetic models (PBPK) to predict the internal dose resulting from exposure to chemical mixtures.

Keywords: Bisphenol A, Naproxen, perfusion, inhibition, metabolic interaction, co-exposure, biotransformation, IPRL.

2.3 INTRODUCTION

Le bisphénol A (BPA) (2,2-bis (4-hydroxy-phényle) propane), produit chimique synthétique, est un contaminant répandu de manière ubiquitaire dans notre environnement, avec l'un des plus grands volumes de production dans le monde (supérieure à 3,8 millions de tonnes annuellement). Le BPA est utilisé comme monomère dans la fabrication de matières plastiques de polycarbonate, des résines époxy, des matériaux composites et des papiers thermiques et, par conséquent, a des applications importantes dans une variété d'industries (alimentaire, dentisterie, plasturgie, équipement électroniques) (Le *et al.*, 2008; Hoekstra et Simoneau, 2013).

L'exposition de la population humaine au BPA a lieu majoritairement par l'ingestion d'aliments. L'exposition se fait aussi par inhalation de poussières ou par contact cutané avec des matériaux contenant du BPA mais ces contributions à son exposition totale seraient mineures. La migration du BPA par le biais du réseau alimentaire se fait soit par la libération de monomères causée par une polymérisation incomplète, ou par une hydrolyse de la chaîne ester qui enchaîne les monomères de BPA dans des conditions de pH neutre ou alcalin ou au contact de liquides à température intense (Kang *et al.*, 2006 ; Brede *et al.*, 2003).

Le BPA est un perturbateur endocrinien bien connu au sein des organismes de protection de la santé et du bien-être. Il a démontré une activité oestrogénique ayant des effets

néfastes sur le système reproducteur (Kim *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Il a été démontré que le BPA peut provoquer des effets indésirables chez les animaux de laboratoire exposés à des doses plus faibles que la prise de la dose tolérable recommandée (TDI 50 µg/kg/j) (Vom Saal et Hughes. 2005). D'ailleurs, il a été prouvé *in vitro* qu'il pourrait favoriser la formation de cancer du sein (Hoyer, 2001; Stéphane, 2013) et avoir des impact sur d'autres récepteurs non-oestrogéniques pouvant mener à des effets hépatotoxiques, immunotoxiques, mutagènes et cancérigènes (Jaromir Michalowicz *et al.*, 2014).

La toxicité du BPA est limitée par son élimination rapide par glucuronidation, une voie métabolique conduisant à la production d'un métabolite inactif non toxique. Les données *in vitro* montrent que le substrat est largement métabolisé dans le foie de rat par des microsomes hépatiques et aussi dans les tissus de l'intestin, majoritairement par la voie de la glucuronidation. Cette réaction est considérée comme un mécanisme de détoxification puisque le BPA glucurono-conjugué a une très faible activité œstrogénique (Snyder R.W. *et al.*, 2000) et une capacité réduite de liaison au récepteur oestrogénique (Matthews *et al.*, 2001). La conjugaison du BPA à l'acide glucuronique uridine diphosphate (UDPGA) est catalysée par l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase 2B1 (UGT2B1) chez le rat (Yokota *et al.*, 1999) et UGT2B15 et/ou UGT2B7 (orthologue de UGT2B1) chez l'homme (Hanioka *et al.*, 2008). Des études *in vivo* supplémentaires en utilisant les hépatocytes ou le foie du rat perfusé isolé (IRPL) confirment la formation d'un composé β -glucuronconjugué (BPA-G), ce qui limite grandement la biodisponibilité systémique du produit mère, en plus d'être par la suite excrété principalement dans la bile (Pottenger *et al.*, 2000; Upmeier *et al.*, 2000).

La coexposition aux médicaments est un facteur susceptible de réduire le taux d'élimination de ce polluant. Étant donné que la consommation de produits thérapeutiques est un phénomène grandissant dans la population, la possibilité d'une exposition simultanée est d'autant plus forte. Par exemple, de nombreux médicaments, tels que le naproxène (NAP), sont connus pour être glucuronidés par le UGT2B1 (Toothaker *et al.*, 2000) chez le rat ou UGT2B7 chez l'humain (Kiang *et al.*, 2005) et sont donc des inhibiteurs compétitifs potentiels de cette réaction de conjugaison.

Le NAP est un produit thérapeutique à usage répandu et fait partie des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Il se caractérise par des propriétés antalgiques et antipyrétiques. Ce médicament a présenté des interactions métaboliques avec certains contaminants chimiques dont le trichloréthylène, n-nonylphénol et le bisphénol A dans des études *in vitro* utilisant des microsomes hépatiques (Cheikh. Rouhou *et al.*, 2012 ; Verner *et al.*, 2010). L'étude menée par Verner et al. (2010) a montré que la biotransformation du BPA par le processus de glucuronidation était inhibée à plus de 50% de façon concurrentielle par la présence simultanée du médicament (i.e., NAP). Ce scénario d'inhibition a été déclenché puisque les deux composants du mélange testés empruntent la même voie enzymatique pour leur biotransformation et élimination, métabolisés par le même isoforme de l'UGT2B1 et cofacteur UDPGA. C'est ainsi que la liaison de l'inhibiteur (NAP) a changé le processus normal de la biotransformation du substrat (BPA), produisant à cet effet un risque d'interaction métabolique et une réduction du taux de métabolisme du polluant. L'activité inhibitrice a été traduite par un croisement de l'exposition interne conduisant à une augmentation du risque

toxicologique. La caractérisation métabolique observée lors de cette étude a été réalisée à l'aide de microsomes hépatiques de rats.

Ces études *in vitro* suggèrent que des expositions concomitantes aux médicaments comme le NAP et au BPA pourraient affecter l'extraction hépatique quasi-complète du bisphénol A et ainsi changer la toxicité des composants du mélange et augmenter la dose interne tissulaire du polluant. Or, ceci nécessite une confirmation dans un organe entier.

Une méthode permettant d'étudier la clairance dans un organe entier est le foie de rat perfusé et isolé (IPRL). L'IPRL est une technique largement employé pour les études des fonctions hépatiques (De Bandt JP *et al.*, 1995), Il permet d'isoler l'organe et de maîtriser complètement les facteurs susceptibles d'agir sur le métabolisme hépatique en faisant abstraction de la contribution des autres organes viscéraux contrairement au système *in vitro*. Par ailleurs, il conserve l'architecture du foie et surtout respecte la coopération entre les différentes populations cellulaires hépatiques. Ceci permet ainsi à obtenir une description plus réaliste, plus physiologique et plus exacte des évènements biologiques se produisant dans l'organe intact.

Afin de mieux comprendre le phénomène d'interaction entre le BPA et le naproxène et pour approfondir nos connaissances pour une bonne analyse de risque aux expositions mixtes, la présente étude visait à i) confirmer les interactions entre le polluant environnemental, BPA, et le médicament, NAP, dans le système IPRL, ii) caractériser dans l'organe entier la clairance métabolique et la cinétique enzymatique hépatique de

chacune de ces substances seules ou en mélange binaire, iii) caractériser l'impact de l'ajout de l'albumine sur la cinétique enzymatique du BPA et NAP et de leur interaction dans le foie de rat isolé et perfusé, et iv) comparer ces valeurs avec les valeurs obtenues en condition *in vitro* (Verner *et al.*, 2010).

2.4 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.4.1 Produits chimiques

Le BPA (pureté >99%), le NAP (pureté $\geq 98\%$) et le bis (4-hydroxyphenyl) méthane (pureté + 98 % ; standard interne) ont été achetés chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'isoflurane, USP (pureté 99%) utilisé pour l'anesthésie des rats a été fourni par Abbott Animal Health "Laboratories" (North Chicago, USA). Le charbon actif Omnicon (f/air) a été délivré par Veterinary Product (Bickford INC, NY, USA). L'héparine sodium, l'acétonitrile et l'acide acétique glacial (HPLC-grade) ont été obtenus chez Fisher-scientific (St. Louis, MO, USA). L'albumine de sérum bovin (BSA) (Frac V, pureté 98%) a été achetée chez Bioshop (Burlington, Ontario, Canada).

2.4.2 Animaux

Des rats Sprague-Dawley mâles (250-300g) ont été achetés chez Charles River laboratories (St-Constant, Québec, Canada), avec la permission du comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA-DV) de l'Université de Montréal. Une période d'acclimatation de 72 h minimum a été respectée pour les rats avant le déroulement des expériences chirurgicales. Ainsi, les rats ont été entretenus avec soins durant leur hébergement à la division d'animalerie (DV), conformément aux lignes directrices du conseil canadien de protection des animaux (CCPA), en contrôlant la température de la pièce (à 20°C), l'humidité relative (45%), l'éclairage (cycle jour-nuit; 12h de lumière, 12h d'obscurité), avec une nourriture et de l'eau *ad libitum* (certifiés et

stérilisés). Les animaux ont été traités en accord avec les lignes directrices dictées par le comité déontologique institutionnel.

2.4.3 Technique chirurgicale

Sur une table chauffante réglée à 37°C, les rats (n=3) ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane (3%). L'effet sédatif survient après 40 secondes et le gaz anesthésiant qui s'échappe par exhalation est piégé par le charbon actif. Brièvement, après l'anesthésie de l'animal, l'abdomen est ouvert, le foie, la veine porte (VP), la veine cave supérieure thoracique (SVC), et la veine cave inférieure abdominale (IVC) sont exposés. La veine porte (l'entrée) et la veine cave inférieure (la sortie) sont ensuite canulées avec des cathéters 18 et 14 GA, respectivement. Immédiatement après la canulation, le diaphragme est perforé et coupé et la SVC était immédiatement localisée et ligaturée avec un fil de suture 3/0. Le foie n'était pas excisé; toutes les expériences ont été réalisées *in situ*. Le rat meurt rapidement par exsanguination. Les cathéters sont rincés avec de l'héparine sodium avant la canulation des veines empêchant ainsi la coagulation sanguine et la formation de caillots (Bessems *et al.*, 2006; Ferrigno *et al.*, 2013).

2.4.4 Système de foie de rat perfusé et isolé (IPRL : isolated perfused rat liver)

Les perfusions de foie sont effectuées à l'aide du système de perfusion d'organe HSE Uniper UP-100, type 834 (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, Germany) (Figure 1). À l'aide d'une pompe péristaltique, le foie est perfusé à débit constant de 20 ml/min avec une solution physiologique de Krebs-Heinselet à pH 7,4 (Krebs et Heinseleit. 1932) maintenue à 37°C par un thermocirculateur et saturée de carbogène (95% O₂, 5% CO₂). La solution contenait soit du bisphénol A, du naproxène, ou un mélange des deux. Avant l'exposition aux xénobiotiques, le système est mis en équilibre avec le tampon Krebs seule en perfusant pendant 30 min. Le perfusât entre par la canule de la veine porte et la collecte des échantillons se fait à la sortie par la canule de la veine cave inférieure. Un réservoir d'air ainsi qu'un piège à bulles sont placés sur le circuit pour réduire la pulsation (action d'amortissement) provoquée par la pompe péristaltique et empêcher les bulles d'air engendrées par l'oxygénation de rentrer dans le foie.

2.4.5 Détermination de la clairance hépatique du polluant (bisphénol A) et du médicament (naproxène) en utilisant le modèle IPRL - Préparation des échantillons.

Afin d'évaluer la clairance hépatique du BPA et du NAP, et pour déterminer les paramètres métaboliques du polluant et du médicament (V_{max} , K_m , et K_i), nous avons effectué des perfusions à diverses concentrations de substances, en présence et en absence d'albumine, pour caractériser l'impact de la liaison des protéines plasmatiques sur le taux de métabolisme dans l'IPRL.

Trois séries de perfusions ont été effectuées (n=3 rats). La première consistait à perfuser le foie en cinq phases. La première consistait en une phase d'équilibre avec un tampon physiologique de Krebs-Heinselet durant 30 min. Les quatre phases subséquentes avaient une durée totale de 2 h où le foie a été perfusé à 4 différentes concentrations de xénobiotique grandissantes graduellement. Les concentrations de la série d'exposition au BPA seul étaient 15, 45, 80 et 180 μM ; celles au NAP seul étaient de 60, 120, 250 et 750 μM . Les concentrations utilisées durant les combinaisons BPA-NAP étaient de 15 ou 20 μM pour le BPA, et 60, 120, 250, ou 750 μM pour le NAP. À la fin de la perfusion, le poids du foie perfusé a été mesuré.

Dans des vials, des échantillons de 300 μl de perfusât ont été récoltés : dans le réservoir à la 5^{ème} min après le changement de concentration, et à la sortie de la veine cave inférieure à 10, 15, 20 et 25 min. À ces échantillons, 700 μl d'acétonitrile contenant le standard interne (4-hydroxyphenyl méthane) ont été ajoutés. Les aliquots (1000 μl) ont été centrifugés pendant 2 min à 9000 g (Eppendorf Minispin Ultracentrifuges, On. Canada). Le surnageant a été prélevé pour l'analyse. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'au moment d'analyse par la chromatographie en phase liquide à haute performance-détecteur de fluorescence (HPLC-FD).

2.4.6 Dialyse à l'équilibre et détermination de la fraction libre (F_{up}) de NAP et BPA

La fraction libre du BPA ou du NAP dans le perfusât (F_{up}) en présence des protéines plasmatiques (i.e. albumine), a été mesurée expérimentalement en utilisant la procédure de Rapid Equilibrium Dialysis (RED). Les cartouches ont été placés dans des puits au niveau de la plaque téflon de base. Chaque pair de cartouches RED est séparé en deux compartiments par une membrane semi-perméable, avec un seuil de coupure de poids moléculaire (MWCO) d'environ 8 kDa. Dans l'un compartiment est déposé l'échantillon de perfusât (chambre rouge), et dans l'autre y est introduit le tampon physiologique (chambre blanche). La plaque de base, les cartouches, ainsi que tous les accessoires de RED, ont été obtenus à partir de Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA.

Les compartiments rouges des cartouches ont été remplis par un volume de 500 µl à des concentrations prédéfinies de BPA et NAP, mis individuellement ou en mélange binaire en présence de l'albumine. Cependant, dans le compartiment blanc de la cartouche, 750 µl de tampon physiologique Krebs-Henseleit ont été ajoutés. Par la suite, la plaque téflon de base a été placée dans un agitateur orbital de FisherBrand (150 RPM) et incubée à 37°C pendant 6 heures. Après le passage du temps d'incubation afin d'atteindre l'équilibre entre les deux chambres, les échantillons ont été collectés à partir des deux compartiments et analysés par HPLC couplé à un détecteur de fluorescence (FLD). La

courbe standard de BPA et de NAP a été utilisée pour quantifier les concentrations totaux (Ct) trouvées dans la chambre de perfusât et les concentrations libres (Cu) identifiées et mesurées dans la chambre de tampon, et ce pour les deux composés d'intérêt. Enfin, l'analyse des concentrations Ct et Cu a permis de calculer la fraction libre (Fup) en divisant Cu/Ct.

2.4.7 Analyses HPLC du BPA et du NAP

Les échantillons ont été analysés en les injectant dans un système HPLC Agilent technologies série 1100 couplé à un détecteur de fluorescence (FLD, G1321A). En bref, les échantillons ont été élués par une solution de phase mobile acétonitrile/H₂O/acide acétique (70:30:0,1 v/v/v) à un débit constant de 1 ml/min, et en utilisant une colonne chromatographique Supelcosil™ (LC18) (25 cm × 4.6 mm, 5 μM). La température de la colonne était fixée à 20°C. Les longueurs d'onde pour la fluorescence étaient de 227 nm (excitation) et 313 nm (émission). Les temps de rétention pour bisphénol A, naproxène et bis (4-hydroxyphenyl) méthane étaient de 3.45, 3.72 et 3.17 min, respectivement.

2.4.8 Analyses des données et statistiques

Pour quantifier le processus d'élimination et bien décrire les phénomènes se déroulant lors de la perfusion de foie de rat isolé *in vivo*, les concentrations à l'entrée (C_A) ont été définies comme étant celles qui ont été prélevées dans le réservoir et celles à la sortie (C_B) de l'organe comme étant celle prélevées à la veine cave inférieure. La différence

entre C_a et C_b représente ainsi la capacité globale d'épuration du foie en fonction du temps. Ainsi, les paramètres suivants ont été calculés : le coefficient d'extraction (E), la clairance (Cl), la clairance intrinsèque (Cl_{int}) et le taux de métabolisme (V_0) (Tableau 1).

Les constantes cinétiques enzymatiques (K_m , V_{max} et K_i) des constituants du mélange en présence ou en absence d'albumine ont été estimées par des régressions non linéaires sous forme des représentations graphiques de Michaelis-Menten et Dixon, en utilisant le logiciel d'analyse (Sigma-plot) version 13 module d'analyse en cinétique enzymatique (Systat software, Inc., San Jose, CA, USA).

2.4.9 Méthodes de calculs d'extrapolation *in vitro in vivo* (IVIVE)

La méthode IVIVE utilisée lors de cette étude consiste en l'utilisation d'algorithmes mathématiques, pour obtenir de bonnes estimations de clairances hépatiques du BPA seul et en mélange. (Voir équations décrites en bas, Tableau 4) publiés par; Poulin *et al.*, 2012, Rowland *et al.*, 2011, Obach, 1999 et Wilkinson, 1987. Afin de calculer la clairance métabolique hépatique du bisphénol A, les mesures de F_{up} ont été utilisées (voir plus haut) et la fraction libre dans le foie (F_u liver) ainsi que la fraction libre d'incubation ont été déterminés (F_u inc). Ces valeurs ont été intégrées soigneusement dans des équations de prédiction. De plus, d'autres paramètres dont la P_{ma} (coefficient de partage milieu : phase aqueuse), P_{nla} (coefficient de partage lipide neutre : phase aqueuse) et F_{nlm} (fraction volumique d'équivalent de lipides neutres dans le milieu d'incubation) ont été

pris en considération dans ces calculs; les équations développées sont indiqués dans le Tableau 3.

Les estimations de la clairance (CL) ont été calculées comme suit :

$$CL = \frac{Q \times RBP \times Clint}{Q \times RBP + Clint} \quad \text{Eq. 1}$$

Où : **Q** représente le débit de la perfusion de foie; **Clint** représente la clairance intrinsèque; **RBP** représente le ratio de concentration entre sang et le perfusât. La Clint est estimé en utilisant les équations présentées dans le Tableau 4.

2.5 RESULTATS

Cinétique enzymatique des substances seules

Une analyse par régression non linéaire a été effectuée pour le métabolisme du BPA et le NAP au niveau du modèle du foie de rat isolé et perfusé en présence et en absence des protéines plasmatiques. Les Figures 2 et 3 rapportent ces résultats de perfusions du BPA et du médicament testés séparément sous forme d'une courbe de Michaelis Menten où le foie a été perfusé à différentes concentrations graduellement croissantes pendant deux heures de temps. Avec les vitesses du métabolisme obtenues en fonctions des concentrations du perfusât, les Vmax et les Km pour chacun des deux composés ont été calculés (Tableau 5). Sans albumine, le BPA était rapidement biotransformé avec une

$V_{max} = 9 \text{ nmol/min/mg}$ et un $K_m = 51,6 \text{ }\mu\text{M}$, alors que le naproxène démontrait une biotransformation beaucoup plus faible avec une $V_{max} = 3 \text{ nmol/min/mg}$ et un $K_m = 149,2 \text{ }\mu\text{M}$ (Figure 2A et 3A).

Un autre facteur déterminant a été introduit dans les conditions de perfusions, soit l'addition de l'albumine, une protéine plasmatique ayant une forte liaison avec le bisphénol A ou le naproxène. Les Figures 2B et 3B représentent l'impact de la forte liaison de l'albumine sur la cinétique enzymatique, la clairance hépatique et le profil global des graphes de Michaelis Menten du taux de métabolisme en fonction de la concentration en substrat.

Cinétique enzymatique des substances en mélange binaire

La Figure 4 rapporte les courbes de Dixon en absence et en présence d'albumine respectivement ($1/\text{vitesse}$ de biotransformation en fonction de la concentration de l'inhibiteur) des interactions métaboliques du naproxène sur la biotransformation et l'élimination du bisphénol A obtenues lors des perfusions de foies de rat isolés. Les résultats des expositions en mélanges binaires ont montré que le médicament interfère avec le métabolisme du BPA par une inhibition compétitive partielle, avec un K_i de $0,3542 \text{ }\mu\text{M}$. L'ensemble des constantes métaboliques estimées pour le BPA sont présentées dans le Tableau 6.

Extrapolation *in vitro-in vivo* de la clairance hépatique, profils pour les composés seuls

L'ensemble de données des paramètres métaboliques (Tableau 2 et 3), traités par des équations mathématiques proposées (Tableau 4), a montré une estimation satisfaisante de la clairance hépatique par rapport à celle observée à partir du système de foie de rat isolé et perfusé *in vivo* (Tableau 7). Les résultats de CL prédits par toutes les méthodes sont comparables avec les valeurs de la CL prédites dans les conditions où il n'y avait pas d'albumine dans le perfusât. Par contre, on observe que la justesse de prédiction de la CL par les équations 2 et 5 diminue avec l'addition de l'albumine dans le milieu, et plus particulièrement au niveau des équations 3 et 4. L'équation 5 est celles qui donne de meilleures prédictions, sauf pour la concentration la plus forte de BPA (180 μM), où la clairance se rapproche plus des résultats des équations 3 et 4.

Extrapolation *in vitro-in vivo* des interactions métaboliques

Dans l'ensemble des résultats pour les mélanges binaires (Tableau 8), le profil des clairances hépatiques du bisphénol A était bien prédit en utilisant les méthodes de calcul IVIVE de Poulin *et al.* (2012) dans les expériences sans l'albumine. En revanche, après l'addition des protéines plasmatiques (BSA), l'estimation de la clairance métabolique du substrat (BPA) était moins précise aux fortes concentrations de l'inhibiteur (250 et 750 μM) pour l'équation 2 et 5, tandis que les deux équations 3 et 4 ont bien prédits la clairance hépatique par comparaison à la clairance observée en IPRL.

2.6 DISCUSSION

Les interactions métaboliques peuvent survenir lors d'une exposition simultanée à un mélange de xénobiotiques, ce qui cause souvent des altérations dans le profil cinétique de chaque substance mise en jeu et aussi des variations de la dose interne due à l'interaction entre les produits. Or, il est courant que des interactions soient mises en évidence par des tests *in vitro*, mais est-ce que ces informations recueillies se reflètent *in vivo* ? Et les valeurs de constantes métaboliques mesurées *in vitro* peuvent-elles nous informer quantitativement sur l'impact de la coexposition *in vivo* ? Afin de bien comprendre les particularités de cette situation assez fréquente, nous avons réalisé dans la présente étude des modèles de foies de rat isolés et perfusés *in vivo* afin d'évaluer et caractériser l'impact de la coexposition au naproxène sur la clairance du bisphénol A, qui a précédemment fait le sujet d'une étude *in vitro* (Verner *et al.*,2010), en présence et en absence de protéines plasmatiques (l'albumine). Dans la présente étude, nous avons démontré la présence d'interactions entre ces deux xénobiotiques dans l'organe intact perfusé et caractérisé celles-ci en présence et absence d'albumine. Finalement, nous avons comparé des estimations de 4 algorithmes pour prédire la clairance hépatique du BPA (seul et en mélange).

Les résultats obtenus sur la cinétique enzymatique du métabolisme du BPA seul et en absence d'albumine démontrent que le bisphénol A est rapidement éliminé par une V_{max}

= 9 nmol/min/mg de protéines de foie ainsi avec une grande affinité envers l'enzyme métabolisant dont le $K_m = 51,6 \mu\text{M}$, tandis que le naproxène est moins rapidement biotransformé par comparaison au bisphénol A, avec une $V_{\text{max}} = 3 \text{ nmol/ min/mg}$ de protéines de foie et un $K_m = 149.2 \mu\text{M}$. En faisant une comparaison direct des V_{max} et K_m du BPA mesurée *in vitro* (i.e., $V_{\text{max}} = 23.4 \text{ nmol/min/mg}$ et $K_m = 114.4 \mu\text{M}$), on s'aperçoit que les valeurs en V_{max} et K_m *in vitro* de BPA sont très comparables aux valeurs de cette étude en IPRL (Tableau 5).

Les données expérimentales de clairances intrinsèques et de vitesses maximales enzymatiques obtenues en IPRL démontrent une activité d'inhibition compétitive du médicament sur le taux de biotransformation du polluant, quand ces deux substances se trouvent en concomitance au niveau du foie. À l'aide d'une série d'expériences d'IPRL, des profils de cinétiques enzymatiques ont été construits pour les deux xénobiotiques en mélange pour pouvoir dériver les paramètres métaboliques (V_{max} , K_m , Cl_{int} et K_i) dans l'organe entier. Les analyses par régression non-linéaires des effets inhibiteurs du naproxène sur l'activité métabolique (représentée par des courbes de Dixon à la Figure 4) indiquent la présence d'une inhibition compétitive partielle avec la valeur estimée de $K_i = 0,3542 \mu\text{M}$ et un $\alpha = 2049,7$. Ceci diffère légèrement des observations *in vitro* qui indiquaient plutôt une interaction purement compétitive. Une explication plausible pour cette différence pourrait être la présence d'autres voies métaboliques (e.g. oxydation par les cytochromes P450) qui n'auraient pas été sollicitées durant les incubations microsomes et l'utilisation d'UDPGA comme cofacteur.

Dans une seconde perspective de recherche, on avait rajouté un autre facteur qui était l'albumine de sérum bovin (BSA) pour identifier l'effet de la forte liaison aux protéines plasmatiques des substrats sur leur processus de clairance hépatique. Les résultats cinétiques obtenus nous indiquent que la forte liaison à l'albumine diminue la biotransformation du bisphénol A et du naproxène perfusé individuellement, une baisse par un facteur de 7 pour la vitesse enzymatique du BPA et d'un facteur de 1.5 pour celle du NAP (Tableau 5). Selon la même tendance, l'ajout du BSA en mélange a mené à une baisse, de la constante d'inhibition (K_i) d'un facteur de 1.25, et du degré d'inhibition alpha (α) par un facteur de 6 (Tableau 6). Ceci était prévisible puisqu'on s'attend à ce qu'une forte liaison aux sites spécifiques de l'albumine entraîne une chute des concentrations libres des substrats qui doivent se rendre au niveau de l'enzyme. Ceci aurait comme conséquence, comme nous l'observons ici, une baisse des valeurs des paramètres métaboliques V_{max} et K_i .

L'évaluation comparative de la clairance hépatique pour le BPA se trouvant seul ou en mélange (Tableau 7 et 8) démontre la nécessité de tenir compte de la liaison à l'albumine et de la liaison non-spécifique dans le milieu d'interaction. En absence d'albumine, tous les algorithmes ont bien performé dans la prédiction de la clairance hépatique. Ceci était prévisible car elle ne diffère que par la considération de la liaison aux macromolécules. Or, en présence d'albumine, il est clair que d'utiliser simplement F_{up} pour prédire la fraction de substrat disponible à l'enzyme n'est pas suffisant puisque les équations 2 à 4

ne permettent pas une prédiction adéquate comparativement à l'équation 5 dont la marge d'erreur était la plus près de 1. Il est difficile d'expliquer la surestimation observée à la plus haute concentration de BPA seule. Il y a deux possibilités : 1) la description provenant de la caractérisation *in vitro* est inadéquate à cette haute concentration; 2) un processus d'interaction entre le complexe albumine-substrat et les hépatocytes serait non-linéaire et donc jusqu'à maintenant pas considéré dans les algorithmes utilisés. Cet effet est moins évident dans exposition mixte.

Par la présente étude, nous avons réussi à confirmer la présence des interactions métaboliques entre le bisphénol A et le naproxène dans le système IPRL, en se basant sur les paramètres métaboliques. Ainsi, la clairance et la cinétique enzymatiques sont trouvées et identifiées pour chacune de ces substances prises seules ou en mélange binaire, en prenant en considération l'effet de l'albumine comme facteur déterminant. Également grâce aux données expérimentaux de clairances intrinsèques obtenues par l'IPRL, nous avons pu valider les différentes équations algorithmiques pour l'estimation de la clairance hépatique à partir de valeurs obtenues en condition *in vitro* (Verner *et al.*, 2010) et celles observés en IPRL et ceci en condition d'exposition mixte et à différentes concentrations (condition saturante et non-saturantes).

Selon ces résultats, nous supposons que la présence d'albumine peut engendrer des interactions entre le BPA et NAP au niveau des sites de liaison. Un phénomène de saturation de ces sites pourrait aussi être présent surtout lorsque la concentration de

l'inhibiteur (NAP) est élevée. Ainsi, une variation des concentrations libres de BPA est remarquée dans nos expériences. Cette variation est due probablement à la présence compétitive du NAP soit au niveau de BSA, soit au niveau de l'enzyme. Deux types d'interactions seront donc à envisager : au niveau de l'enzyme et au niveau des sites de liaison ou d'affinité aux protéines plasmatiques. Ces interactions affectent le niveau des concentrations libres du BPA supposément disponibles pour la biotransformation et l'élimination. Désormais, les interactions au niveau des sites de liaison devraient aussi être prises en considération dans des études futures.

2.7 CONCLUSION

Au terme de ce projet, nous avons réussi à confirmer, dans un organe entier, les interactions métaboliques entre l'anti-inflammatoire NAP et le polluant BPA auxquels la population est quotidiennement exposée et qu'il y a des quelques différences entre cette interaction et celle précédemment observée en condition *in vitro* (i.e., inhibition compétitive partielle vs inhibition purement compétitive). La présence d'albumine a aussi un effet sur la cinétique enzymatique des substrats, et l'algorithme de Poulin *et al.* (2012) permet la meilleure estimation de la clairance *in vivo* des substances seules et en mélange à basses concentrations. Des interactions possibles entre le NAP et le BPA au niveau du site de liaison à l'albumine peuvent être une des causes principales derrière la variabilité des concentrations libres du BPA qui doivent se rendre aux hépatocytes. Enfin, ces équations pourraient être adaptées pour mieux évaluer non seulement les

interactions métaboliques mais aussi les interactions au niveau des protéines plasmatiques pour ces deux substances chimiques.

2.8 REMERCIEMENTS

Ce travail a été supporté par une subvention à la découverte obtenu par le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), et l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) pour le professeur Sami Haddad du département santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal, Canada. Nous sommes très reconnaissants pour le soutien.

2.9 DÉCLARATION D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent qu'il n'y a pas de conflits d'intérêts.

2.10 RÉFÉRENCES

Bessem M, Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG, Ploeg RJ. 2006. The isolated perfused rat liver : Standardization of a time-honoured. Model Laboratory Animals 40 : 236–246.

Bowalgaha Kushari, David J Elliot, Peter I Mackenzie, Kathleen M knights, Stellan Swedmark, John O Mines. 2005. S-Naproxen and desmethylnaproxen glucuronidation by human liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransférases (UGT) : role of UGT2B7 in the elimination of naproxen. Br J Clin Pharmacol 60 (4) : 423-433.

Brede C, Fjeldal P, Skjevrak I, and Herikstad H.2003. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. Food Addit Contam 20 (7): 684-9.

Cheikh Rouhou M, Rheault I, Haddad S. 2013. Modulation of trichloroethylene *in vitro* metabolism by different drugs in rats. Toxicology *in vitro* 27 : 34–43.

Chen MY, Ike M, and Fujita M. 2002. Acute toxicity, mutagenicity and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. Environ Toxicol 17: 80–86.

Ferrigno Andrea, Plinio Richelmi, Mariapia Vairetti.2013.Troubleshooting and improving the mouse and rat isolated perfused liver preparation. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 67 : 107-114.

Hoekstra E, Simoneau C. 2013. Release of bisphenol A from polycarbonate. A review. Critic. Rev. Food Sci. Nutr 53 : 386–402.

Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. 2008. Human UDP glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. Chemosphere 74(1) :33–6.

Hoyer PB.2001. Reproductive toxicology: current and future directions. Biochem Pharmacol 62: 1557–1564.

Jaromir Michalowicz.2014. Bisphenol A-Sources, toxicity and biotransformation. Environmental toxicology and pharmacology (37) : 738-758.

Kang, J.H, Y. Katayama, and F. Kondo. (2006). Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals. Toxicology 217(2-3): 81-90.

- Kiang TK, Ensom MH, Chang TK.2005. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug–drug interactions. *Pharmacol Ther* 106(1): 97–132.
- Kim HS, Han SY, Yoo SD, Lee BM, and Park K. 2001. Potential estrogenic effects of bisphenol-A estimated by *in vitro* and *in vivo* combination assays. *J Toxicol Sci* 26:111–118.
- Kowalowka Zawieja J, Zielinska Psuja B, Plewka A.2003. Metabolic interactions between acetylsalicylic acid and benzene, *Toxicology* 188: 161-170.
- Krebs H, Henseleit K.1932. Untersuchungen über die harnstoffbildung im tierkörper. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*210: 33–66.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L and Feldman D.1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279– 2286.
- Le HH, Carlson EM, Chua JP, and Belcher SM. 2008. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.* 176: 149–156.
- Matthews JB, Twomey K, and Zacharewski TR.2001. *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14 : 149–157.
- Obach RS. 1999. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 27: 1350-1359.
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagan SZ, and Waechter JM Jr.2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 54:3–18.
- Poulin P, Kenny JR, ECA Hop, Haddad S. 2012. *in vitro-in vivo* extrapolation of clearance : Modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing methods. *J Pharm Sci* 101:838-851.
- Rowland M, Poulin P, Ring B, Chien JY, Jones HM, Jones RDO, Yates JWT, Ku MS, Gibson CR, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Bjornsson T, Lavé T. 2011. PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics. 3 . Comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci* 100: 4090-4110.

Stéphane Foucart.2013. Bisphénol A reduces testosterone in the human fetus. Journal-Le Monde: 8.

Toothaker RD, *et al.* 2000. Biopharm Drug Dispos 21(6):229-33.

Upmeier A, Degen GH, Diel P, Michna H, and Bolt HM.2000. Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i. v. and oral administration. Arch Toxicol 74:431–436.

Verner M.-A, Magher T, Haddad S. 2010. High concentrations of commonly used drugs can inhibit the *in vitro* glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol in rats. Xenobiotica, 1–10.

Vom Saal FS, and Hughes C. 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. Environ. Health Perspect 113: 926–933

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 UDPglucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. Biochem J 340(Pt 2):405–9.

2.11 Tableaux et Figures

Tableau 1. Paramètres d'élimination métaboliques au niveau de l'IPRL.

Paramètres	Équations
Cl	¹ $Cl = Q \times E$
E	² $E = \frac{(C_A - C_B)}{C_A}$
Cl _{int}	³ $Cl_{int} = \frac{(Q \times E)}{1 - E}$
V _o	⁴ $V_o = Cl_{int} \times C_A$

¹ eq : Cl est la clairance (ml/min), Q le débit sanguin (ml/min) et E le coefficient d'extraction.

² eq : C_A est la concentration du substrat à l'entrée de l'organe du foie perfusé (µM).

C_B est la concentration du substrat à la sortie de l'organe du foie perfusé (µM).

³ eq : Cl_{int} est la clairance intrinsèque ou métabolique propre à l'organe du foie perfusé (ml/min).

⁴ eq : V_o est le taux de métabolisme ou la vitesse de biotransformation (nmol/min/g foie).

Tableau 2. L'ensemble de données de BPA perfusé seul en présence et en absence d'albumine chez le rat, utilisés pour la prédiction de la clairance hépatique (Cl).

[BPA] total (µM)	Fu inc**	Fup**	Fu liver**	Protéine de liaison
15	0,8139	1	1	sans Alb
45	0,8139	1	1	sans Alb
80	0,8139	1	1	sans Alb
180	0,8139	1	1	sans Alb
15	0,8139	0,0450	0,291	avec Alb
45	0,8139	0,0450	0,291	avec Alb
80	0,8139	0,0365	0,248	avec Alb
180	0,8139	0,0365	0,248	avec Alb

Tableau 3. L'ensemble de données de BPA et du NAP en coexposition binaire chez le rat, utilisés pour la prédiction de la clairance hépatique (Cl).

[BPA] total (μM)	Fu inc**	Fup**	Fu liver**	[NAP] total (μM)	Fu inc	Fup	Fu liver	Protéine de liaison
15	0,8139	1	1	60	0,995	1	1	sans Alb
15	0,8139	1	1	120	0,995	1	1	sans Alb
15	0,8139	1	1	250	0,995	1	1	sans Alb
15	0,8139	1	1	750	0,995	1	1	sans Alb
15	0,8139	0,0365	0,248	60	0,995	0,12	0,543	avec Alb
15	0,8139	0,0365	0,248	120	0,995	0,12	0,543	avec Alb
15	0,8139	0,0365	0,248	250	0,995	0,12	0,543	avec Alb
15	0,8139	0,0365	0,248	750	0,995	0,12	0,543	avec Alb
20	0,8139	1	1	60	0,995	1	1	sans Alb
20	0,8139	1	1	120	0,995	1	1	sans Alb
20	0,8139	1	1	250	0,995	1	1	sans Alb
20	0,8139	1	1	750	0,995	1	1	sans Alb
20	0,8139	0,0365	0,248	60	0,995	0,12	0,543	avec Alb
20	0,8139	0,0365	0,248	120	0,995	0,12	0,543	avec Alb
20	0,8139	0,0365	0,248	250	0,995	0,12	0,543	avec Alb
20	0,8139	0,0365	0,248	750	0,995	0,12	0,543	avec Alb

** **Pma** (= 1,229) : Milieu phase aqueuse PC; **Fwm** (= 1) : volume fractionnel de l'équivalent en eau dans un milieu d'incubation; **Pnla** (= 1905,46) : lipide neutre de la phase aqueuse PC pour le milieu d'incubation; **Fnlm** (= 0,00012) : le volume fractionnel de l'équivalent en lipide neutre dans un milieu d'incubation; **Im** (= 0) : terme d'ionisation pour le milieu d'incubation; **RBP** (= 1) : ratio concentration sang-plasma; **PLR** : rapport de concentration de l'albumine du plasma au foie entier (PLR = 1 sans ALB; PLR= 8,7 avec ALB) ; **Fu inc** : fraction libre d'incubation dans le foie; **Fup** : fraction libre dans le perfusât, mesuré et calculé expérimentalement en utilisant la procédure du dialyse à l'équilibre de RED (rapid equilibrium dialysis) Device inserts; **Fu liver** : fraction libre dans le foie; **débit** : Q= 20 ml/min; **Cp** ' concentration des protéines microsomales' = 0,25 mg/ml (Verner. M *et al.*,2010); **Facteur d'échelle** ' quantité des protéines microsomales dans le foie' = 60 mg/g liver (Poulin.P *et al.*,2010).

** **Pma** = $F_{wm} + [(P_{nla} \cdot F_{nlm}) / (1 + I_m)]$

** **Pnla** = $10^{(\log P_{ow25^\circ C} + 0.009/^\circ C \times \Delta^\circ C)}$

** **Fnlm** = $4,8e^{-4} \times C_p$

** **Fu inc** = $1/P_{ma}$

** **Fu liver** = $[(PLR \times F_{up}) / ((1 + (PLR - 1) \times F_{up}))]$

** **Fup** = (concentration total du substrat / concentration libre du substrat), où % Libre = concentration dans la chambre tampon/ concentration dans la chambre de perfusât) x 100 et % de liaison = 100% - % libre.

Tableau 4. Modèles d'estimation de la Cl int in vivo à partir des constantes métaboliques obtenues in vitro.

Équation	Présomption	Formule*	Référence
2	Aucune considération de liaison	$Cl_{int} = \frac{V_{max}}{(K_m \times \alpha) + C_{tot}} \times SF \times LW$	Wilkinson (1987)
3	Liaisons plasmatiques considérées	$Cl_{int} = \frac{V_{max} \times F_{up}}{(K_m \times \alpha) + (C_{tot} \times F_{up})} \times SF \times LW$	Rowland <i>et al.</i> , (2011)
4	Liaisons plasmatiques et dans le milieu d'incubation considérées	$Cl_{int} = \frac{V_{max} \times F_{up}}{(K_m \times \alpha \times F_{u\ inc}) + (C_{tot} \times F_{up})} \times SF \times LW$	Obach (1999)
5	Liaisons tissulaires et dans le milieu d'incubation considérées	$Cl_{int} = \frac{V_{max} \times F_{u\ liver}}{(K_m \times \alpha \times F_{u\ inc}) + (C_{tot} \times F_{u\ liver})} \times SF \times LW$	Poulin <i>et al.</i> (2012)

* **Où**, **V_{max}** représente la vitesse enzymatique maximale; **K_m** représente la constante d'affinité de Michaelis-Menten [**i**], concentration d'inhibiteur; **K_i** représente la constante d'inhibition, **C_{tot}** représente la concentration total du substrat dans le perfusât; **F_{up}** représente la fraction libre dans le perfusât; **F_{u inc}** représente la fraction libre d'incubation; **F_{u liver}** représente la fraction libre dans le foie; **LW** représente : poids du foie; **Scaling factor (SF)** représente la quantité des protéines microsomales dans le foie (mg/g liver) ; **α** représente la constante d'ajustement pour inhibition compétitive ($\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$).

Tableau 5. Comparaison *in vitro*-IPRL des constantes métaboliques du bisphénol A et du naproxène respectivement en présence et en absence d'albumine dans un modèle de foie de rat isolé perfusé.

Condition	Bisphénol A		Naproxène	
	Vmax (nmol/min/mg prot)	Km (μ M)	Vmax (nmol/min/mg prot)	Km (μ M)
Sans albumine	8,9	51,6	3	149,2
Avec albumine	1,3	3,6	2	197,9
<i>In vitro</i> *	23,4	114,4	N.D.	N.D.

* Verner *et al.*,2010.

N.D : information non disponible.

Tableau 6. Constantes métaboliques du bisphénol A dans le cas du mélange binaire (BPA-NAP), en présence et en absence d'albumine

Condition	Constantes métaboliques			
	Vmax (nmol/min/mg prot)	Km (μ M)	Ki (μ M)	α
Sans albumine	3,71	44,6	0,35	2049,7
Avec albumine	2,85	78,7	0,28	322,6

Tableau 7. Évaluation comparative de la clairance hépatique prédite versus observée du BPA seul.

		Clairance hépatique (ml/min)				
		Observée	Prédite*			
[BPA] total (μ M)	Protéine	IPRL	Eq 2	Eq 3	Eq 4	Eq 5
15	sans Alb	13,93	15,85 (1,1)	15,85 (1.1)	16,34 (1.2)	16,34 (1.2)
45	sans Alb	14,28	14,50 (1,0)	14,50 (1.0)	14,91 (1.0)	14,91 (1.0)
80	sans Alb	12,62	13,19 (1,0)	13,19 (1.0)	13,52 (1.1)	13,52 (1.1)
180	sans Alb	10,45	10,47 (1,0)	10,47 (1.0)	10,68 (1.0)	10,68 (1.0)
15	avec Alb	12,4	15,34 (1.2)	3,18 (3.9)	3,76 (3.3)	11,58 (1.3)
45	avec Alb	8,11	13,88 (1.7)	3,11 (2.6)	3,66 (2.2)	10,73 (1.3)
80	avec Alb	6,23	12,50 (2.0)	2,53 (2.5)	3,02 (2.1)	9,36 (1.5)
180	avec Alb	2,86	9,73 (3.4)	2,36 (1.2)	2,83 (1.0)	7,71 (2.7)

* marge d'erreur entre parenthèses

Tableau 8. Évaluation comparative de la clairance hépatique prédite versus observée du BPA en mélange binaire.

[BPA] total (μM)	[NAP] total (μM)	Protéine	Clairance hépatique (ml/min)				
			Observée	Prédite*			
			IPRL	Eq 2	Eq 3	Eq 4	Eq 5
15	60	sans Alb	17,079	14,87 (1.15)	14,87 (1.15)	15,45 (1.11)	15,45(1.11)
15	120	sans Alb	14,889	14,67 (1.01)	14,67 (1.01)	15,28 (1.03)	15,28 (1.03)
15	250	sans Alb	12,22	14,27 (1.17)	14,27 (1.17)	14,92 (1.22)	14,92 (1.22)
15	750	sans Alb	10,12	12,89 (1.27)	12,89 (1.27)	13,68 (1.35)	13,68 (1.35)
15	60	avec Alb	8,02	15,00 (1.87)	2,42 (3.31)	2,89 (2.78)	10,34 (1.29)
15	120	avec Alb	6,95	14,8 (2.13)	2,29 (3.03)	2,73 (2.55)	10,05 (1.45)
15	250	avec Alb	5,88	14,4 (2.45)	2,04 (2.88)	2,45 (2.40)	9,46 (1.61)
15	750	avec Alb	3,18	13,05 (4.10)	1,45 (2.19)	1,76 (1.81)	7,73 (2.43)
20	60	sans Alb	17,08	14,73 (1.16)	14,73 (1.16)	15,28 (1.12)	15,28 (1.12)
20	120	sans Alb	14,89	14,55 (1.02)	14,55 (1.02)	15,12 (1.02)	15,12 (1.02)
20	250	sans Alb	12,22	14,16 (1.16)	14,16 (1.16)	14,78 (1.21)	14,78 (1.21)
20	750	sans Alb	10,13	12,85 (1.27)	12,85 (1.27)	13,60 (1.34)	13,6 (1.34)
20	60	avec Alb	8,03	14,6 (1.82)	2,34 (3.43)	2,79 (2.88)	10,06 (1.25)
20	120	avec Alb	6,95	14,41 (2.07)	2,21 (3.14)	2,64 (2.63)	9,77 (1.41)
20	250	avec Alb	5,89	14,02 (2.38)	1,98 (2.97)	2,37 (2.49)	9,19 (1.56)
20	750	avec Alb	3,81	12,69(3.33)	1,41 (2.70)	1,70 (2.24)	7,5 (1.97)

* marge d'erreur entre parenthèses

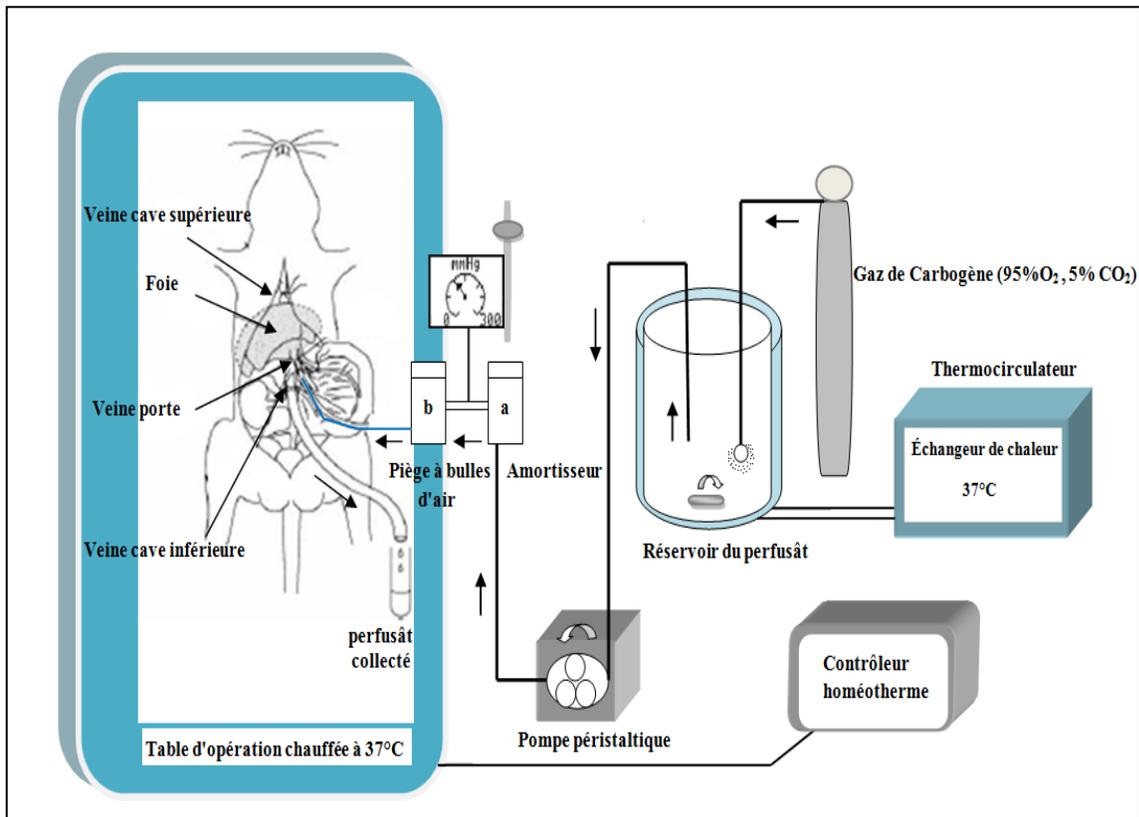


Figure 1. Système de perfusion du foie de rat isolé *in vivo*. L'appareil de perfusion est constitué de: **a.** un contrôleur homéotherme pour la table d'opération, **b.** une table d'opération chauffée à 37°C, **c.** une pompe péristaltique réglé à une débit constant de 20 ml/min, **d.** un réservoir à double paroi contenant le perfusât qui est aérée par du carbogène (95% O₂, 5% CO₂) et thermostatée à 37°C, **e.** un thermocirculateur qui pompe l'eau dans le circuit de thermorégulation, **f.** un windkessel, qui réduit la pulsation provoquée par la pompe et agit comme piège à bulles d'air, **g.** un manomètre réglable indiquant la pression de perfusion maintenu à 8 et 10 mm Hg (Gores *et al.* 1986), **h.** un échangeur de chaleur et piège à bulles d'air qui réchauffe le liquide de perfusion, compense la perte de la température, et amortit la pulsation. Ce dernier est raccordé à la canule de cathéter 18 GA et la perfuse le foie par la veine porte.

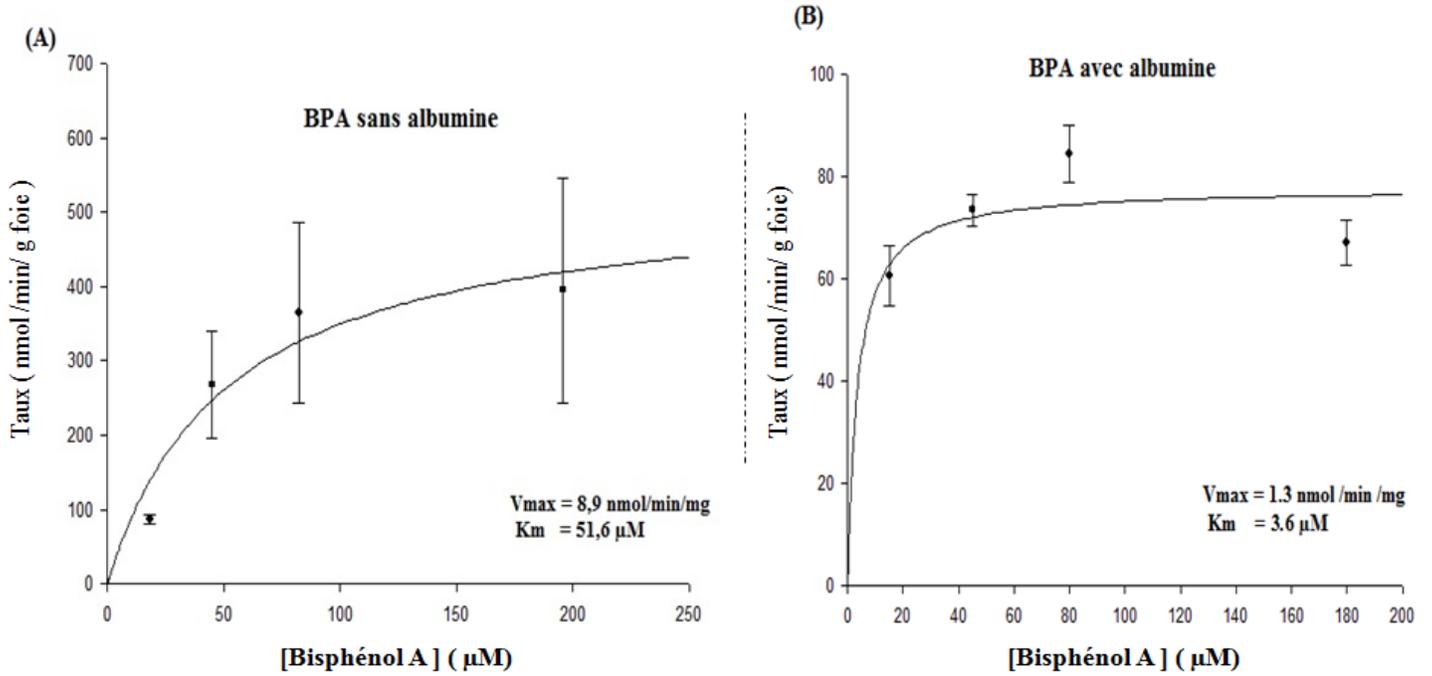


Figure 2. Cinétique enzymatique du bisphénol A en absence d'albumine **(A)** et en présence d'albumine (30 g/L) **(B)** dans un modèle de foie de rat isolé et perfusé (n=3 foies). La perfusion in situ a été effectuée pendant 2 h à 37 °C. Quatre concentrations du substrat graduellement croissantes (20, 45, 80 et 180 μM) ont été testées. Quatre mesures par foie ont été utilisées. La barre d'erreur représente l'écart type (SD).

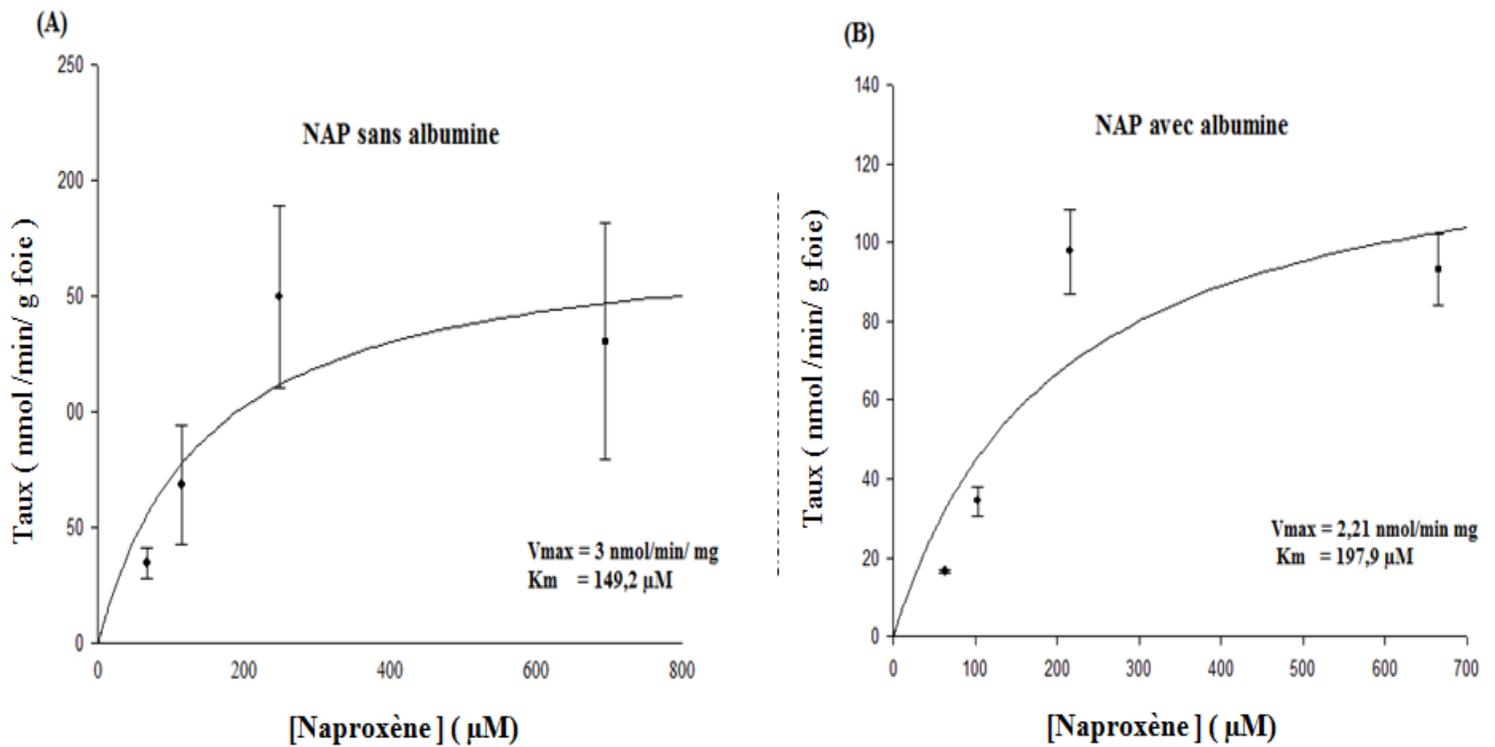


Figure 3. Cinétique enzymatique du naproxène en absence d'albumine (A) et en présence d'albumine (30 g/L) (B) dans un modèle de foie de rat isolé et perfusé (n=3 foies). La perfusion in situ a été effectuée pendant 2 h à 37 °C. Quatre concentrations du substrat graduellement croissantes (60, 120, 250 et 750 μM) ont été testées. Quatre mesures par foie ont été utilisées. La barre d'erreur représente l'écart type (SD).

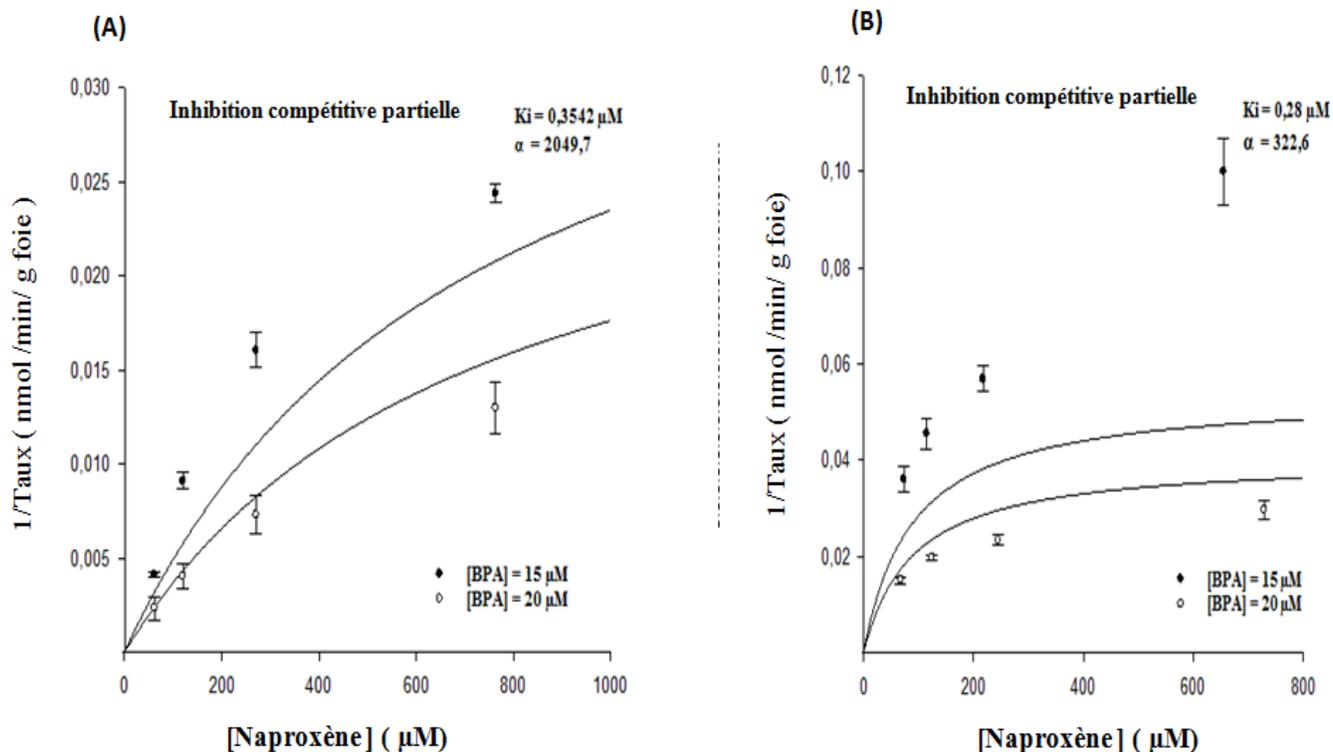


Figure 4. Graphique de Dixon montrant l'effet du naproxène sur le taux de biotransformation du BPA en absence d'albumine **(A)** et en présence d'albumine **(B)**. Les symboles \blacksquare représentent les concentrations du bisphénol A testés dans le modèle IPRL en présence de l'inhibiteur (n=3 fois). La barre d'erreur représente l'écart type (SD).

CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE

La population générale, adulte comme enfant, est exposée à des mélanges de contaminants présents dans son environnement. Certaines substances peuvent agir sur d'autres, de façon à augmenter leur toxicité surtout lors d'une exposition à une multitude de composés simultanément. L'analyse de risque toxicologique des mélanges complexes doit donc tenir compte des probabilités d'interactions métaboliques potentielles possibles entre les composants d'intérêts. Afin de prévenir les effets sur les organes cibles des polluants et des médicaments en mélange, il est indispensable de bien connaître et décrire les interactions métaboliques existantes entre les constituants du cocktail. La présente étude avait pour objectifs de caractériser les interactions métaboliques entre le polluant environnementale connu, le bisphénol A (BPA) et le naproxène (NAP), de décrire l'impact de la consommation du médicament sur le métabolisme et le comportement du polluant, tout en déterminant la cinétique enzymatique de chacune de ces substances seules ou en mélange (K_m , V_{max} , K_i) en présence et en absence d'albumine, et de déterminer l'adéquation entre les observations *in vitro* et celles dans le foie entier perfusé *in situ*.

Pour tracer le profil toxicocinétique du BPA et du NAP seul ou en mélange, une série de tests de perfusions de foie de rat *in vivo* a été réalisée en vue de déterminer les vitesses initiales du métabolisme et de la capacité globale du foie à éliminer ces deux xénobiotiques en fonction du temps ce qui signifie la clairance métabolique.

En ce qui concerne la biotransformation du bisphénol A, plusieurs perfusions en série ont été menées pour investiguer son taux de métabolisme dans un modèle de foie de rat isolé et perfusé. Une analyse et le traitement des données obtenues ont été réalisés grâce au logiciel Sigma plot (version 13, module d'analyse en cinétique enzymatique), qui nous a permis d'obtenir une régression non linéaire sous forme de graphe de Michaelis Menten, après une perfusion du foie à différentes concentrations croissantes (20, 45, 80 et 180 μM) pendant deux heures. La cinétique enzymatique du métabolisme du polluant nous a montré que le bisphénol A est rapidement éliminée avec une $V_{\text{max}} = 9 \text{ nmol/min/mg}$ de protéines de foie, ainsi qu'une grande affinité envers l'enzyme métabolisant dont le $K_{\text{m}} = 51,6 \mu\text{M}$.

De la même façon, le taux du métabolisme du médicament testé (NAP) a été décrit sous forme d'une cinétique enzymatique et une régression non linéaire de Michaelis Menten suite à une perfusion du foie à différentes concentrations croissantes (60, 120, 250 et 750 μM) en fonction du temps. Le NAP est donc moins rapidement biotransformé par rapport au bisphénol A, avec une $V_{\text{max}} = 3 \text{ nmol/min/mg}$ de protéines de foie, et une constante d'affinité avec l'enzyme responsable de l'ordre $K_{\text{m}} = 149,2 \mu\text{M}$.

Les études rapportées par la littérature dévoilent que le BPA et le NAP empruntent la même voie enzymatique pour leur métabolisation et l'élimination, catalysés par le même isoforme, l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase 2B1 (UGT2B1), chez le rat (Yokota *et al.*, 1999; Toothaker *et al.*, 2000) ou UGT2B7 chez l'homme (Hanioka *et al.*, 2008; Kiang *et al.*, 2005), et conjugué par le même cofacteur, l'acide glucuronique uridine diphosphate (UDPGA).

Le fait que les deux substances chimiques (bisphénol A et naproxène) sont des substrats pour le même site catalytique de l'enzyme de biotransformation, l'isoforme UGT2B1, l'exposition concomitante des deux risquent certes de mener à une inhibition enzymatique au niveau du foie. De plus, la réduction de la glucoroconjugaison du polluant entraîne l'accroissement de son exposition interne du produit mère et pourrait augmenter une production des métabolites par d'autres voies métaboliques mineures. Cela augmenterait le risque toxicologique prévu en lien avec le polluant.

L'étude des mélanges binaires, lors de ce projet de recherche, a confirmé que le taux de biotransformation du bisphénol A peut être influencé par la présence simultanée du médicament (NAP). Ce dernier a été constaté comme étant un inhibiteur compétitif. Dans ce cas de coexposition en mélange binaire, les résultats de nos analyses des données expérimentales ont été représentés par des graphiques de Dixon. La courbe de régression non linéaire a montré une interférence métabolique du NAP sur la clairance hépatique du bisphénol A par une inhibition compétitive partielle avec une constante d'inhibition de $K_i = 0.3542 \mu\text{M}$. Cette interférence a causé une réduction du taux de métabolisme du bisphénol A en présence concomitante d'inhibiteur pendant la perfusion du foie de rat isolé et perfusé (IPRL).

Nos résultats *in vivo* convergent vers ceux obtenus par Verner *et al.* (2010) au niveau des microsomes hépatiques du rat, dans le sens que le NAP interfère considérablement avec la biotransformation du bisphénol A par une inhibition métabolique. Toutefois, le type

d'inhibition, les valeurs de K_i ou le degré d'inhibition entre les deux études *in vitro-in vivo* ne concordent pas, puisque l'interaction métabolique est décrite comme partiellement compétitive à partir du système d'organe entier et complètement compétitive à partir des essais microsomaux. Les différences observées entre les deux approches métaboliques pourraient être dues à plusieurs causes, notamment l'hétérogénéité des enzymes et la multitude des voies métaboliques qui ne seraient pas prises en considération dans les essais des microsomes, de même que les conditions d'exposition et la procédure analytique du foie qui étaient différentes entre les deux études.

Dans un second temps, nous avons ajouté l'albumine sérique bovine (fraction V, Sigma) à 3%, dissous dans le perfusât (tampon physiologique de Krebs-Heinselet), pour identifier l'impact de la liaison aux protéines plasmatiques sur le processus d'élimination des substrats perfusés, en plus de faire une comparaison entre les deux profils cinétiques du bisphénol A et naproxène seul ou en mélange, avec ou sans albumine. La même approche méthodologique a été respectée (souche, genre d'animale choisie, paramètres du modèle de perfusion (IPRL) et concentrations ainsi les volumes expérimentales de la perfusion).

Le contaminant environnementale BPA se lie fortement aux protéines plasmatiques, majoritairement à l'albumine (fraction liée de 95%), mais également à la SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) (Csanady G.A. *et al.*, 2002; Dechaud H *et al.*, 1999). De plus le NAP a une fraction liée à l'albumine de 97%. Habituellement, les AINS sont très fortement fixés aux protéines plasmatiques (Verbeeck *et al.*, 1983).

La liaison à des protéines plasmatiques, telles que l'albumine peut influencer la concentration en médicaments et en polluants libres dans le foie du rat isolé et perfusé, sachant que seule la fraction libre (non liée) est disponible pour la diffusion dans l'organe cible, et par conséquent pour le métabolisme hépatique. Les résultats obtenus après l'ajout de l'albumine durant les perfusions des foies, indiquent que la clairance métabolique et l'extraction hépatique du bisphénol A ainsi que celle du naproxène ont diminué par rapport aux expositions sans albumine. L'analyse des données expérimentales de clairances intrinsèques obtenues par l'IPRL nous a permis de tracer des courbes de régressions non linéaires sous forme de Michaelis Menten et de Dixon pour le cas d'exposition seul et en mélange. De la même manière, les paramètres d'élimination métaboliques ont été identifiés ($V_{max} = 1,3 \text{ nmol/min/ mg protéines de foie}$, $K_m = 3,6 \text{ } \mu\text{M}$) pour le bisphénol A, ($V_{max} = 2 \text{ nmol/min/ mg protéines de foie}$, $K_m = 197,9 \text{ } \mu\text{M}$) pour le naproxène.

L'analyse des expositions combinées en présence de l'albumine suggère fortement que le mécanisme du métabolisme du BPA est inhibé de façon partiellement compétitive en présence du médicament NAP avec une valeur K_i estimée à $0,28 \text{ } \mu\text{M}$ et α à 322,6.

Les résultats obtenues permettent d'appuyer l'hypothèse que la forte liaison à l'albumine diminue la biotransformation ou la métabolisation du bisphénol A et du naproxène seul ou en mélange en diminuant la fraction disponible des substrats. Il est aussi possible que la présence du médicament (NAP) interagisse avec la liaison du bisphénol A sur

l'albumine et par conséquent induit à une augmentation de la fraction libre et conséquemment à un impact sur la clairance.

Par le recours à l'extrapolation IVIVE avec des algorithmes déjà publiés (Poulin *et al.*, 2012, Rowland *et al.*, 2011, Obach, 1999 et Wilkinson, 1987) et des données *in vitro* des constantes métaboliques et d'interactions (Verner *et al.*, 2010), nous avons réalisé une évaluation comparative et quantitative des algorithmes pour déterminer lequel est le plus prédictif de la clairance métabolique hépatique du BPA en présence ou en absence d'albumine.

La meilleure méthode de prédiction IVIVE testée lors de cette étude est celle publiée par Poulin *et al.* (2012). Avec cette approche et comme toutes les autres d'ailleurs, nous avons obtenu des bonnes estimations de clairances hépatiques quand aucune albumine a été ajouté au perfusât. Par contre, lors de l'addition des protéines plasmatiques (BSA), le degré d'estimation de la clairance hépatique du substrat (BPA) par l'algorithme de Poulin *et al.*, (2012) était nettement supérieure aux 3 autres. C'est seulement dans la condition d'exposition seule au BPA, à la plus haute concentration (180 μ M), que cette méthode a généré de moins bonnes prédictions. Une explication plausible serait que le métabolisme du BPA peut être différent aux fortes doses et aux faibles doses (Krishnan *et al.*, 2002).

En somme, ce projet ouvre plusieurs portes pour des études futures avec d'autres polluants environnementales et médicaments et sera d'une grande utilité pour la prédiction des interactions métaboliques, grâce à l'expérience que nous avons menée qui

était encourageante et satisfaisante. Par la suite, il serait de plus intéressant d'incorporer ce modèle de clairance et d'interaction dans des modèles de PBPK qui permettraient de mieux prédire la pharmac/toxicocinétiques de constituants de mélanges, en prenant en considération plusieurs variables qui peuvent moduler, altérer le métabolisme dans l'organisme. Les résultats de cette étude nous amène donc à conclure que le risque associé à l'exposition en mélange peut être différent de celui observé lorsqu'un polluant est considéré seul.

CHAPITRE 4: CONCLUSION GÉNÉRALE

Au terme de ce projet, nous avons pu mettre en évidence les interactions métaboliques de mélanges de bisphénol A (BPA), un polluant environnemental ubiquiste, et de naproxène (NAP), un médicament largement utilisé comme un anti-inflammatoire non stéroïdien dans la population générale. De plus, il a été démontré que le NAP a le potentiel d'inhiber la biotransformation du bisphénol A, ce phénomène va affecter la cascade et le déroulement normal des évènements biologiques (détoxification, comportement, dose interne et toxicité prévue, ect.). Il est donc primordial d'inclure la consommation médicamenteuse en tant qu'un facteur pouvant influencer le métabolisme lorsqu'on effectue une analyse du risque liée à l'exposition simultanée à des polluants environnementaux tels que le BPA. En outre, il serait très important d'investiguer et de poursuivre les études dans le sens d'identification et de caractérisation des interférences métaboliques avec d'autres médicaments et polluants afin d'adapter les limites d'exposition à la réalité de la consommation répandue de produits pharmaceutiques, ainsi que pour la mise à jour et la correction des paramètres de surveillance biologique dans le cas d'une exposition à une substance unique.

Dans le cadre de ce projet, nous avons également mesuré les paramètres métaboliques des deux substances d'intérêt (K_m et V_{max}) ainsi que leurs constantes d'inhibition (K_i) en présence et en absence des protéines plasmatiques (albumine). La compréhension de ce

genre d'interactions entre ces xénobiotiques permettrait d'améliorer la prédiction des conséquences toxiques d'une substance, le développement de nouvelles approches pour la surveillance de l'exposition et un positionnement plus éclairé. Par conséquent, l'évaluation des risques associés à l'exposition aux mélanges de produits chimiques par voies multiples peut être améliorée par une compréhension de la variation de la dose interne due à l'interaction métabolique entre les produits à l'aide des modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK) qui sont des bons outils de référence pour prédire l'ampleur de ces variations suivant différents scénarios d'exposition.

BIBLIOGRAPHIE

Andersen JV, Hansen SH. 1992. Simultaneous quantitative determination of naproxen, its metabolite 6-O-desmethylnaproxen and their five conjugates in plasma and urine samples by high-performance liquid chromatography on dynamically modified silica. *J. Chromatogr*; 577 (2), 325–333.

Ayyanan A, Laribi O. 2011. Perinatal exposure to bisphenol a increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Mol Endocrinol* 25(11): 1915-23.

Barnes KK, Kolpin DW. 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--I groundwater. *Sci Total Environ* 402(2-3): 192-200.

Basheer C, Lee HK, Tan KS. 2004. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Mar Pollut Bull* 48(11-12): 1161-1167.

Beck BD, Rudel R, Calabrese EJ. 1994. « Use of toxicology in the regulatory process ». In *Principles and Methods of Toxicology*, 3^e édition. (A.W. Hayes, ed.), Raven Press, New York, p.19-58.

Becker K, Goen T. 2009. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 212(6): 685-92.

Belfroid A, van Velzen M, van der Horst B, Vethaak D. 2002. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* ;49(1):97-103.

Biedermann S, Tschudin P. 2010. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 398(1): 571-6.

Bisswanger Hans. 2002. *Enzyme Kinetics. Principles and Methods.*

Bois F, Jamei M, Clewell HJ. 2010. PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals. *Toxicology* 278:256–267.

Bono-Blay F, Guart A. 2012. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. *Environ Sci Pollut Res Int*.

Bouvier d'Yvoire M, Prieto P, Blaauboer BJ, Bois F, Boobis A, Brochot C, Coecke S, Freidig A. 2007. Physiologically-based kinetic modelling (PBK modelling): meeting the 3Rs agenda - The report and recommendations of ECVAM Workshop 63a, *Alternatives to Laboratory Animals*, 35: 661-671.

Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, Martin PG, Theodorou V, Fioramonti J, Houdeau E. 2010. Impact of oral Bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *PNAS* .107(1):448-53.

Brogden RN, Heel RC, Speight TM et Avery GS. 1979. Naproxen up to date: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy and use in rheumatic diseases and pain states. *Drugs* 1979;18:241-77.

Burridge E. 2003. Bisphenol A: product profile. *Eur Chem News*. 17: p.14-20.

Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*; 113:391-395.

Cao J, Mickens JA. 2012. Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology* 33(1): 23-36.

Cao X, Corriveau J, Popovic S. 2009. Levels of bisphenol A incanned soft drink products in canadian markets. *J. Agric. FoodChem*. 57, 1307–1311.

Capone ML, Tacconelli S, Sciulli MG. 2004. Clinical pharmacology of platelet, monocyte, and vascular cyclooxygenase inhibition by naproxen and low-dose aspirin in healthy subjects. *Circulation*,109,pp.1468-1471.

Casarett LJ, Klaassen CD, Arndur MO et Doull, J. 1996. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. (McGraw-Hill Health Professions Division). 5th, New York ; Montreal.

Casimir Blonski. 2010. *Enzymologie-inhibition enzymatique*. Groupe de chimie bioorganique et bioinorganique. Paris : Institut de chimie moléculaire et des matériaux d'Orsay-Lab Ex Lermite.

Cho CY, Shin BS, Jung JH, Kim DH, Lee KC, Han SY. 2002. Pharmacokinetic scaling of bisphenol A by species-invariant time methods. *Xenobiotica* ; 32: 925-934.

Clark AG, Hirom P, Millburn RL, Smith and Williams RT. 1969. Reabsorption from the biliary system as a factor influencing the biliary excretion of organic anions. *Biochem j.* 115(5): p.62P.

Couse JF, Yates MM, Walker VR, and Korach KS. 2003. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol*, 17(6): p.1039-53.

Csanady GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, and Filser JG. 2002. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol*, 76(5-6): p.299-305.

Csapo AI, Csapo EF, Fay E, Henzel MR, and Salau G. 1973. The Delay of spontaneous labor by naproxen in the rat model Prostaglandins 3, 827-837.

Dechaud H, Ravard C, Claustrat F and Pugeat M. 1999. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids*. 64(5): p.328-34.

DHI Water & Environnement (DHI).2007. Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. DHI, No. ENV.D.4/ETU/2005/0028r (DHI,Horsholm).

Diane Feldman, Joseph Lee. 1980. Naprosyn (Naproxen). Monograph and Clinical Practice Handbook. Medical Department, Syntex Laboratories, Inc. California 94304.

Dixon M and Webb EC. 1980. *Enzymes*. New York: Academic Press.

Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Munoz de Tro MM. 2006. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 10. 1289/ehp.

FDA. January 2014. Naprosyn (Naproxen)[®] [Online]. US : US Food and Drug Administration. Available : [http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drug s/ArthritisAdvisoryCommittee/UCM383181](http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drug%20s/ArthritisAdvisoryCommittee/UCM383181). [Accessed 15 mars 2014].

Ferreira DC, Sousa Lobo JM, Helena M. 2000. Effect of Hydroxypropyl Methylcellulose and Hydrogenated Castor Oil on Naproxen Release From Sustained-Release Tablets. 2(2) article 6, AAPS Pharmascitech.

Flint S, Markle T, Thomson S, Wallace E. 2012. Bisphenol A exposure effects and policy; a wildlife perspective. *J. Environ. Manag.* 104, 19–34.

Frederick S. vom Saal, Susan C. Nagel, Benjamin L. Coe, Brittany M. Angle, Julia A. Taylor. 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Environnement, Epigenetics and Reproduction*. Volume 354, Issues 1-2, 6, Pages 74-84.

Gioiosa L, Fissore E, Ghiradelli G, Parmigiani S, Palanza P. 2007. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm. Behav.* 52, pp.307-316.

Habert R, N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L. 2013. Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. *PLoS ONE* 7(12) : e51579. doi: 10.1371/journal.pone.0051579.

Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. 2008. Human UDP glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 74(1) :33–6.

Ho SM, Tang WY. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 66(11): 5624-32.

Hoekstra E, Simoneau C. 2013. Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.* 53,386–402.

ICIS. 2013. Institut canadien d'information sur la santé. Tendances des dépenses nationales de santé, 1975 à 2013 — rapport annuel du registre canadien des dépenses et main d'oeuvre de la santé. Ottawa, ON: ICIS;2013.

IGHRC. 2009. Chemical Mixtures: A framework for assessing risk to human health (CR14). The Interdepartmental Group on Health Risks from Chemicals. Institute of Environment and Health, Cranfield University, UK.

Inoue H, Yuki G, Yokota H, and Kato S. 2003. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos*, 31 (1) : p. 140-4.

Inoue K, Wada M, Higuchi T, Oshio S, Umeda T, Yoshimura Y. 2002. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 773(2): p.97-102.

INRS. 2010. Fiche Toxicologique : Bisphenol A.

Jenkins S, Raghuraman N, Eltoum I, Carpenter M, Russo J, Lamartiniere CA. 2009. Oral exposure to bisphenol A increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Environ Health Perspect.* 117 (6):910-915.

Juraska JM, Sisk CL, DonCarlos LL. 2013. Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: hormonal influences and developmental mechanisms. *Horm. Behav.*, 64 (2), pp. 203–210.

Kaddar N, Harthe C, Dechaud H, Mappus E, and Pugeat M. 2008. Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A*, 71(8): p.471-3.

Kamrin F. 2004. Bisphenol A: a scientific evaluation: what is the toxicity of BPA? *MedGenMed* 6, 7–17.

Kang JH, Kondo F, Katayama Y. 2006. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* ;226(2-3):79-89.

Klaassen CD and Eaton DL. 1991. Principles of toxicology; in Amdur, M.O., Doull, J., and Klaassen, C.D. (eds.), *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*: Pergamon Press, New York, pp. 12–49.

Konstantianos DG, Ioannou PC, Stratikos E. 1994. Simultaneous determination of naproxen and its desmethyl metabolite in human serum by second-derivative synchronous fluorescence spectrometry. *Anal. Chim*, 290 (1–2), 34–39.

Kortenkamp A. 2007. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1:98-105.

Krishnan K et Brodeur J. 1991. Toxicological consequences of combined exposure to environmental pollutants. *Archives of complex environmental studies*.3 (3): 1-106.

Krishnan K, Haddad S, Beliveau M et Tardif R. 2002. Physiological modeling and extrapolation of pharmacokinetic interactions from binary to more complex chemical mixtures. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 6: 989-994.

Kubo KO, Arai M, Omura R, Watanabe R, Ogata. 2003. Effets de faibles doses de bisphénol A sur la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement chez les rats-*Neurosci. Res.*, 45, pp. 345-356.

Kuramoto M, Ishimura M, Miura K. 1978. Studies on the fate of naproxen II. Metabolic fate in various animals and man. *Chem Pharm Bull*;26:3312-21.

Kurebayashi H, Okudaira K, Ohno Y. 2010. Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol*; 198: 210-215.

Lamartiniere CA, Jenkins S, Betancourt AM, Wang J, Russo J. 2011. Exposure to the endocrine disruptor bisphenol A alters susceptibility for mammary cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 5(2):45-52.

Lazear S. 1995. Polycarbonate: high-performance resin. *Adv Materials Processes*, 147: p.43-45.

Loganathan SN and Kannan K 2011. Occurrence of bisphenol a in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol*,61(1): p.68-73.

Loos R, Locoro G. 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res* 44(14): 4115-26.

Liao C and Kannan K. 2011. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 45(21): 9372-9.

Macon MA and Fenton SE. 2013. Endocrine disruptors and the breast : early life effects and later life disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*;18: 43-61.

Maia J, Cruz J, Sendón R, Bustos J, Sanchez J, Paseiro P. 2009. Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Res. Int.* 42, 1410–1414.

Marangoni, Alejandro G. 2003. *Enzyme Kinetics. A Modern Approach.*

Marquet F, Payan JP, Beydon D, Wathier L, Grandclaude MC, and Ferrari E. 2011. *In vivo* and *ex vivo* percutaneous absorption of [(14)C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol*, 85(9): p.1035-43.

Martal LC, Maria GS, Stefania T, Marilena G, Emanuela R, Giulia R, Patrizia Di Gregorio, Gabriele M, Paola P. 2005. Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. *Vol 45, Issue 8* : 1295-1301.

Matthews JB, Twomey K, and Zacharewski TR. 2001. *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*,14(2): p.149-57.

Mazur CS, Kenneke JF, Hess-Wilson JK, and Lipscomb JC. 2010. Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on *in vitro* kinetic measurements. *Drug Metab Dispos*,38(12): p.2232-8.

Mercea P. 2009. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *J. Appl. Polym.Sci.* 112, 579–593.

- Micallef S, Brochot C, Bois F. 2005. L'analyse statistique bayésienne de données toxicocinétiques, *Environnement, Risque et Santé*, 4:21-34.
- Milligan SR, Khan O, and Nash M. 1998. Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen Comp Endocrinol*, 112(1): p.89-95.
- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N. 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab*; 87(11).
- Moyer S.1986. Pharmacokinetics of naproxen sodium. *Cephalalgia* 6 (Suppl.4): 77-80,1986.
- Murray TJ, Maffini MV, Sonnenschein C, Soto AM. 2007. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphénol a exposure. *Reprod. Toxicol*; 23(3):383-390.
- Munoz-de-Toro M, Markey C, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C. 2005. Perinatal exposure to bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*; 146:4138-4147.
- N'tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud'homme S, Pozzi-Gaudin S, Frydman R, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V. 2012. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal Leydig cell function. *PLoS One*, 7:e51579.
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, and Welshons WV. 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): p.70-6.
- Nam S, Seo Y, Kim M. 2010. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*79, 949–952.
- Neal M. Davies and Keith E. Anderson. 1997. Clinical Pharmacokinetics of Naproxen. *Clin. Pharmacokinet*; 32 (4): 268-293.
- Niwa T, Fujimoto M. 2001. Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biol Pharm Bull* 24 (9): 1064-7.
- Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. .2004. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol*;18(6):803-811.

Obach RS. 1999. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 27: 1350-1359.

Panagiotidou E, Zerva S, Mitsiou DJ, Alexis MN, Kittraki E. 2014. Perinatal exposure to low dose bisphenol A affects the neuroendocrine stress response in rats. *J. Endocrinol.*, 220 (3), pp. 207–218.

Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM, Jr. 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci*;54(1):3-18.

Poulin P, Kenny JR, ECA Hop, Haddad S. 2012. *in vitro-in vivo* extrapolation of clearance : Modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing methods. *J Pharm Sci* 101:838-851.

Prins GS, Birch L. 2007. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol* 23(3): 374-82.

Purich Daniel L. 2010. *Enzyme Kinetics : Catalysis and control " A reference of theory and best-practice methods"*.

Rachel E, Bowman, Victoria Luine, Samantha Diaz Weinstein, Hamed Khandaker, Sarah DeWolf, Maya Francfort. March 2015. Bisphenol A exposure during adolescence leads to enduring alterations in cognition and dendritic spine density in adult male and female rats. *Hormones et comportment*, Volume 69, pages 89-97.

Radomska-Pandya A, Little JM, Pandya JT, Tephly TR, King CD, Barone GW. 1998. UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*,1394(2-3): p.199-208.

Rahme E, Lafrance JP, Nedjar H, Rahme G, Morin S. 2009. Discrepancy among observational studies: example of naproxen-associated adverse events. *Open Rheumatol J*3:1-8.

Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS. 2007. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*;24(2):199-224.

Rolland M. 2012. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1990 and 2010 in France. *Hum. Reprod*; 28: 462470.

Roskovski AP, Rooks WH, Tomolonis AJ et Miller LM. 1971. Anti-inflammatory analgesic properties of d-2-(6-methoxy-2-naphthyl) propionic acid (naproxen). *J Pharmac Exp Ther*;179(1):114-24.

Rowland M, Poulin P, Ring B, Chien JY, Jones HM, Jones RDO, Yates JWT, Ku MS, Gibson CR, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Bjomsson T, Lavé T. 2011. PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics. 3 . Comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci* 100: 4090-4110.

Rubin BS. 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem.Mol. Biol.* 127, 27–34.

Rudel RA, Gray JM, Engel CL, Rawsthorne TW, Dodson RE, Ackerman JM. 2011. Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention. *Environ Health Perspect.*

Runkel R, Forchielli E, Boost G, Chaplin M, Hill R, Sevelius H, Thompson G, and Segre E. 1973. Naproxen metabolism, excretion and comparative pharmacokinetics. *Scand J Rheum (Suppl 2) : 29-36.*

Rowland M, Poulin P, Ring B, Chien JY, Jones HM, Jones RDO, Yates JWT, Ku MS, Gibson CR, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Bjomsson T, Lavé T. 2011. PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics. 3 . Comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci* 100: 4090-4110.

Saal F, Nagel S, Coe B, Angle B, Taylor J. 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 74–84.

Shimizu M, Ohta K. 2002. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicol In Vitro* 16(5): 549-56.

Shin BS, Kim CH, Jun YS, Kim DH, Lee BM, Yoon CH. 2004. Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *J Toxicol Environ Health A; 67: 1971-1985.*

Sidelmann UG, Bjørnsdottir I, Shockcor JP, Hansen SH, Lindon JC, Nicholson JK. 2001. Directly coupled HPLC-NMR and HPLC-MS approaches for the rapid characterisation of drug metabolites in urine: application to the human metabolism of naproxen. *J. Pharm. Bioned. Anal,* 24 (4), 569–579.

Silins I, Hogberg J. 2011. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8: 629-647.

Takao Y, Lee HC, Kohra S, Arizono K. 2002. Release of bisphenol A from food can lining upon heating. *J. Health Sci.* 48, 331–334.

- Teeguarden JG, Waechter JM, Clewell HJ, Covington TR, and Barton HA. 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): p.823-38.
- Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS.2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA*;102(19):7014-7019.
- Todd PA, Clissold SP. 1990. Naproxen. A reappraisal of its pharmacology, and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states. *Drugs*;40:91-137.
- Toothaker RD, Barker SH, Gillen MV. 2000. Absence of pharmacokinetic interaction between orally co-administered naproxen sodium and diphenhydramine hydrochloride. *Biopharm Drug Dispos*; 21(6) :229-33.
- Vandenberg L, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons W. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.*24, 139–177.
- Verbeeck RK, Blackburn JL & Loewen GR. 1983. Clinical pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Pharmacokinet* 8:297-331.
- Verner M, Magher T , Haddad S. 2010. High concentrations of commonly used drugs can inhibit the *in vitro* glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol in rats. *Xenobiotica*; 40 (2) : 83-92.
- Viguié C, Collet SH, Gayrard V, Picard-Hagen N, Puel S, Roques BB, Toutain PL, Lacroix MZ. 2012. Maternal and Fetal Exposure to Bisphenol A Is Associated with Alterations of Thyroid Function in Pregnant Ewes and Their Newborn Lambs, *Endocrinology*; 154 (1):521-8.
- Voet D and Voe JG. 1990. *Biochemistry*, John Wiley and Sons, New York, 335-344.
- Vogel SA. 2009. " The politics of plastics : the making and unmaking of bisphenol a "safety" *Am J Public Health* 99 Suppl 3 : S559-66.
- Volkel W, Kiranoglu M, and 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): p.155-62.
- Volkel W, Bittner N. 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.
- Volkel W, Colnot T. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15(10): 1281-7.

- Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M. 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol.* 24 (2): p.131-8.
- Vree TB, Van Den Biggelaar-Martea M, Corrien PW. 1993. Pharmacokinetics of naproxen, its metabolite O-desmethylnaproxen, and their acyl glucuronides in humans. *Biopharm Drug Dispos*; 14: 491-502.
- Wang Chong, Niu Ruiyan, Zhu Yuchen, Han Haijun, Luo Guangying, Zhou Bingrui, Wang Jundong. 2014. Changes in memory and synaptic plasticity induced in male rats after maternal exposure to bisphenol A. *Toxicology*, Vol 322; pp 51-60.
- Wax J, Winder CV, Tessman DK and Stephens MD. 1975. Comparative activities, tolerance and safety of nonsteroidal anti-inflammatory agents in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 192 :172-178.
- Welshons WV, Nagel SC. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147(6 Suppl): S56-69.
- Wilkinson GR. 1987. Clearance approaches in *Pharmacology*, vol.39,N(1).
- Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK, Lordo RA, and Sheldon LS. 2007. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res*,103(1) : p.9-20.
- Yang R. 1994. Introduction to the Toxicology of Chemical Mixtures. In *Toxicology of Chemical Mixtures*. Yang (ed.). Academic Press, San Diego, Inc. 1-10 pp.
- Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S. 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDPglucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*,340 (Pt 2): p.405-9.
- Yoshihara S, Mizutare T. 2004. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci* 78 (1): 50-9.
- Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. 2010. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*.
- Zalko D, Jacques C. 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82(3): 424-30.

Zhang GL, Zhang XF. 2012. Exposure to bisphenol A results in a decline in mouse spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev*.

Zhang HQ, Zhang XF. 2011. Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep* 39(5): 5651-7.