



Rencontres scientifiques

08
juillet 2019

Maison de la RATP
Espace du Centenaire
189, rue de Bercy - 75012 Paris

Perturbateurs endocriniens

Recherche et perspectives

CONTRIBUTION À L'ÉVALUATION DE L'EXPOSITION DE L'HOMME AUX SUBSTITUTS ET DÉRIVÉS DU BISPHENOL A ET À LA CARACTÉRISATION DU DANGER ASSOCIÉ

ANR-13-CESA-0012-01
 NEWPLAST



Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA)
 UMR Oniris-INRA 1329, CS 50707, 44307 Nantes Cedex 3, France - www.laberca.org

Dr. Jean-Philippe Antignac

Yoann Deceuninck, Emmanuelle
 Bichon, Ronan Cariou, Bruno Le Bizec



Un projet intégré pour anticiper/alimenter l'évaluation du risque



Acronyme / Acronym		NEWPLAST	
Titre du projet		Contribution à l'évaluation de l'exposition de l'Homme aux substituts et dérivés du Bisphenol A et à la caractérisation du danger associé.	
Proposal title		Contribution to the Human exposure assessment related to substitutes and derivatives of Bisphenol A and to the associated hazard characterisation.	
Axe(s) thématique(s) / theme(s)		☒ 1 - Détection et caractérisation des contaminants en vue de l'identification du caractère toxique ☒ 2 - Contaminants et santé ☐ 3 - Contaminants et écosystèmes ☐ 4 - Usages et comportements ; évaluation des risques ☐ 5 - Modélisations, prédiction	
Type de recherche / Type of research		☒ Recherche Fondamentale / Basic Research ☐ Recherche Industrielle / Industrial Research	
Aide totale demandée / Grant requested	378 551 €	Durée du projet / Projet duration	36 mois / months



JP. Antignac



A. Berrebi



D. Zalko



B. Jegou



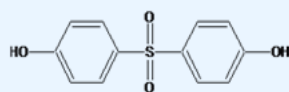
P. Balaguer



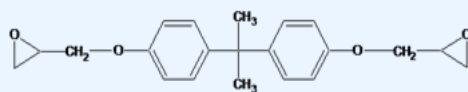
Une couverture étendue en termes de marqueurs d'exposition cibles

Primary targeted substances (BPA's substitutes / derivatives)

(Human exposure, metabolism, hepatotoxicity, reprotoxicity, mode of action, i.e. tasks 1 to 5)



Bisphenol S (BPS)



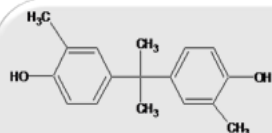
Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE)



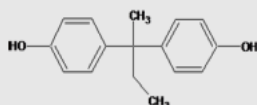
Reconstituted mixture

Secondary targeted substances (BPA's substitutes / analogues)

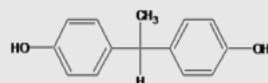
(Human exposure & mode of action, i.e. tasks 1, 2 & 5)



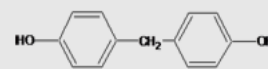
Bisphenol C (BPC)



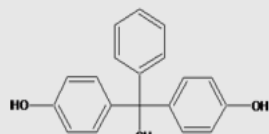
Bisphenol B (BPB)



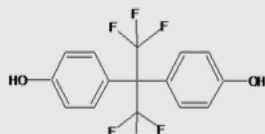
Bisphenol E (BPE)



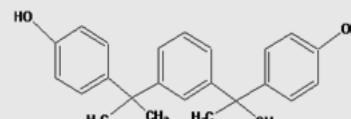
Bisphenol F (BPF)



Bisphenol AP (BPAP)



Bisphenol AF (BPAF)



Bisphenol M (BPM)

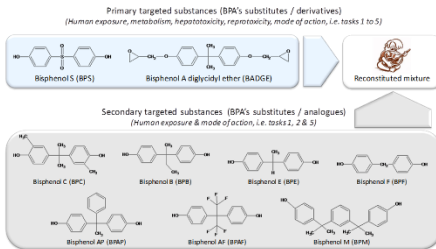
Table 1: Liste des composés de type bisphénols recherchés.

Bisphenol A	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane	BPA
Bisphenol B	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)butane	BPB
Bisphenol AP	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-ethane	BPAP
Bisphenol AF	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane	BPAF
Bisphenol BP	Bis(4-hydroxyphenyl)diphenylmethane	BPBP
Bisphenol C	2,2-Bis(3-methyl-4-hydroxyphenyl)propane	BPC
Bisphenol Cl2	Bis(4-hydroxyphenyl)-2,2-dichloroethylene	BPCl2
Bisphenol E	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)ethane	BPE
Bisphenol PH	5,5'-(1-methylethylidene)-bis[1,1'-(bisphenyl)-2-ol]propane	BPPH
Bisphenol S	Bis(4-hydroxyphenyl)sulphone	BPS
Bisphenol F	Bis(4-hydroxyphenyl)methane	BPF
DHDPE	4,4-Dihydroxyphenyl ether	DHDPE
Bisphenol FL	9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorane	BPFL
Bisphenol Z	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane	BPZ
Biphenyl-4,4'-diol		BP4,4'
Bisphenol M	1,3-Bis(2-(4-hydroxyphenyl)-2-propyl)benzene	BPM
Bisphenol P	1,4-Bis(2-(4-hydroxyphenyl)-2-propyl)benzene	BPP
Bis-2(hydroxyphenyl)methane		BIS2
Bisphenol A diglycidyl ether		BADGE

Trois objectifs complémentaires, à l'échelle *in-vivo*, tissulaire, cellulaire et moléculaire

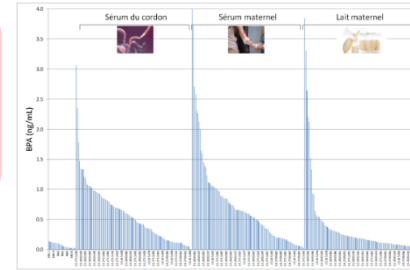


Le BPA et ses substituts



1. Quelle exposition interne et quel transfert materno-fœtal ?

~ 100 couples mères-nouveaux-nés



2. Quel impact toxicologique sur les cibles hépatique et testiculaire ?

Divers modèle cellulaires *in-vitro* et/ou explants *ex-vivo*



3. Quelles interactions avec les différents récepteurs nucléaires ?



Nouvelles données et connaissances relatives à la caractérisation de l'exposition et du danger associés aux bisphénols



Une famille de composé exigeante au plan analytique



Sérum : PE = 1 mL

Ajout ^{13}C -BPA
Ajout ^{13}C -BPS

Hydrolyse enzymatique

Délipidation

Extraction liquide-liquide

Dérivation

Analyse GC-MS/MS

Urine : PE = 5 mL

Ajout ^{13}C -BPA
Ajout ^{13}C -BPS

Hydrolyse enzymatique

Précipitation protéique

SPE MIP

Dérivation

Analyse GC-MS/MS

Lait maternel : PE = 3 mL

Ajout ^{13}C -BPA
Ajout ^{13}C -BPS

Hydrolyse enzymatique

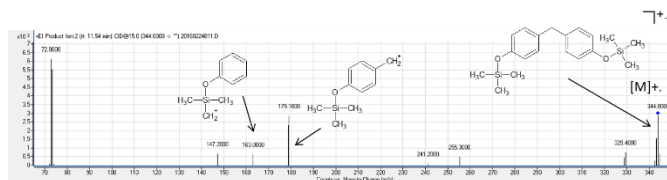
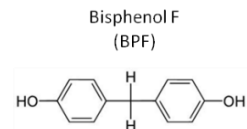
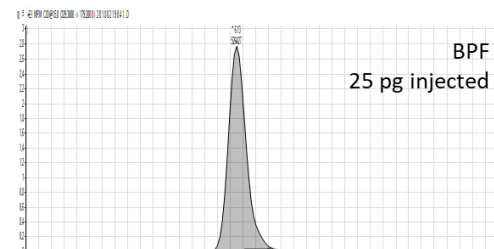
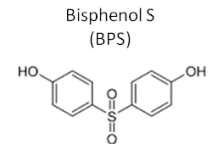
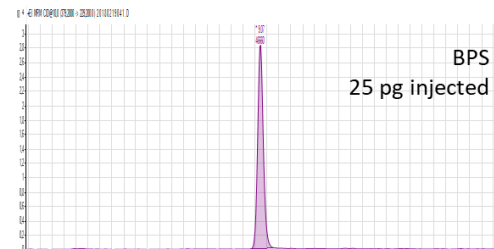
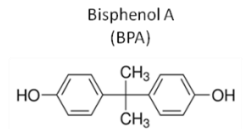
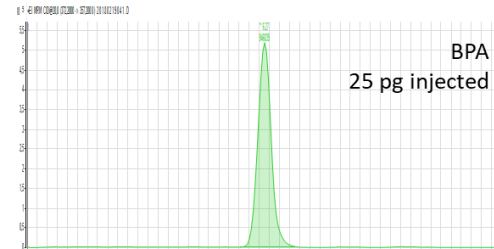
Précipitation protéique

SPE HR-X

SPE MIP

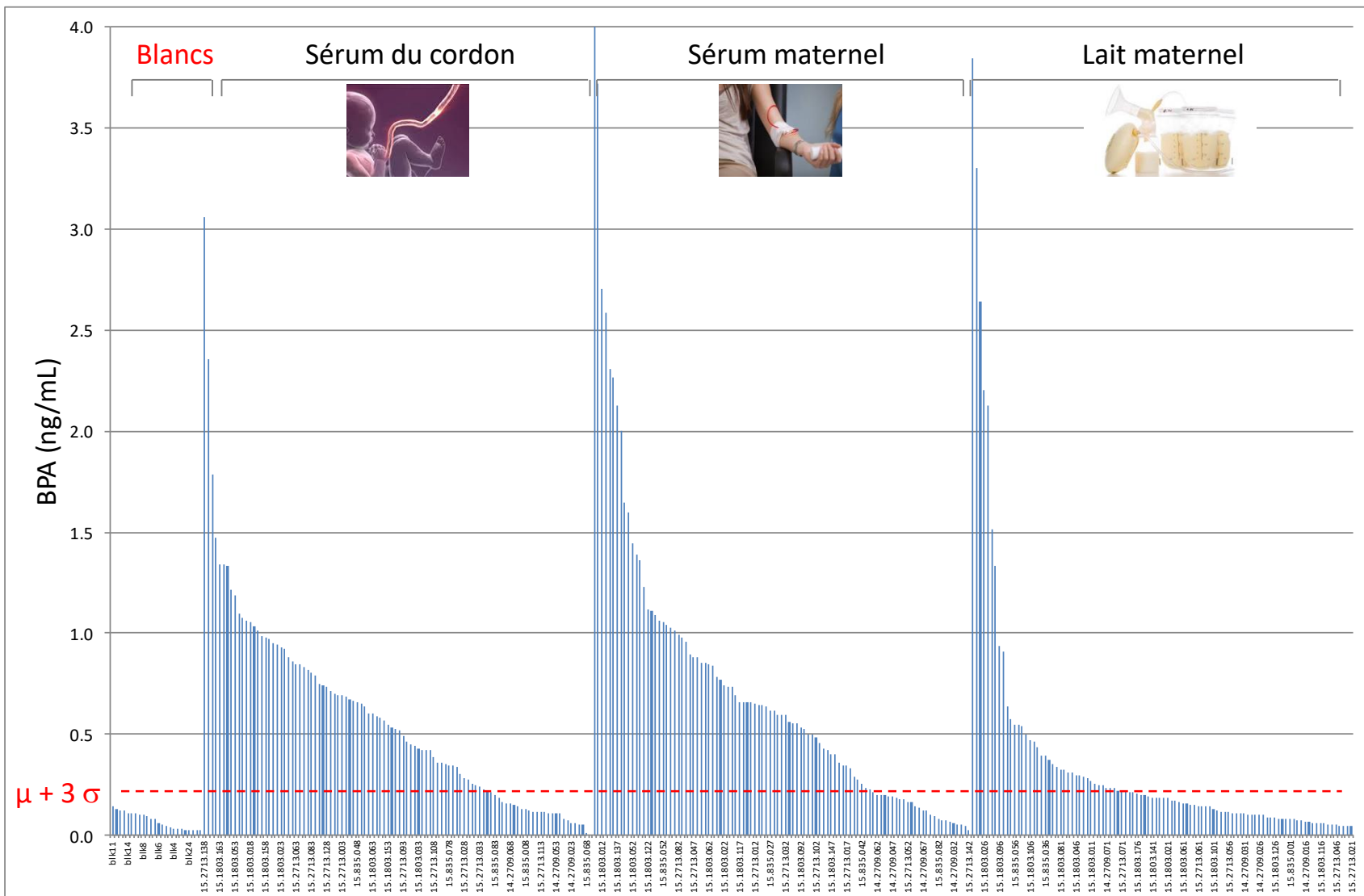
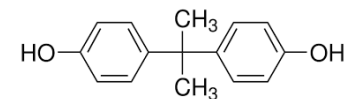
Dérivation

Analyse GC-MS/MS

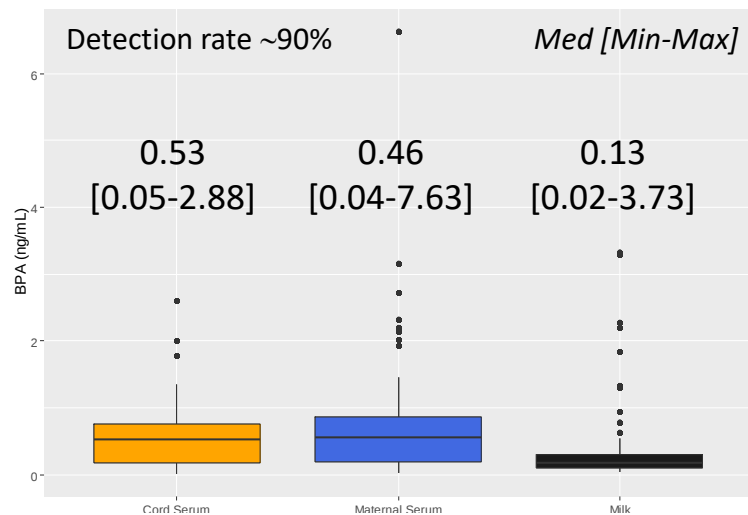
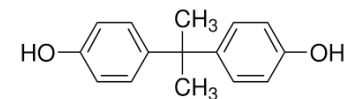


Deceunink et al., Anal. Bioanal. Chem 2015;407:2485-2497.

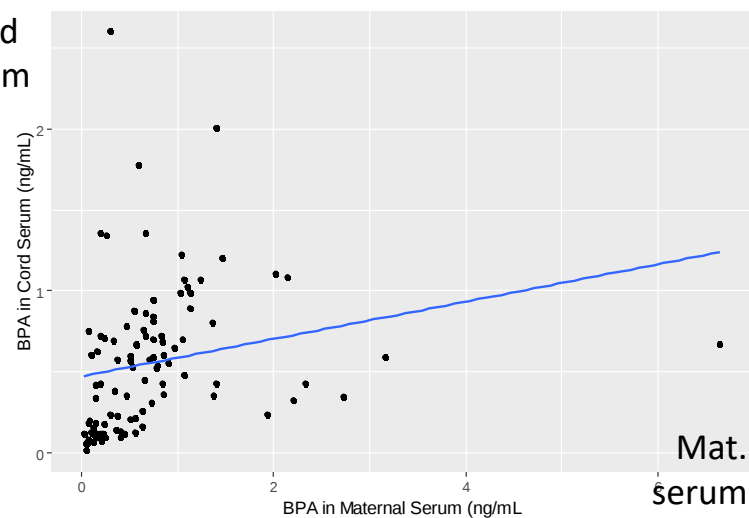
Aperçu global des niveaux de concentration observés en BPA



Aperçu global des niveaux de concentration observés en BPA



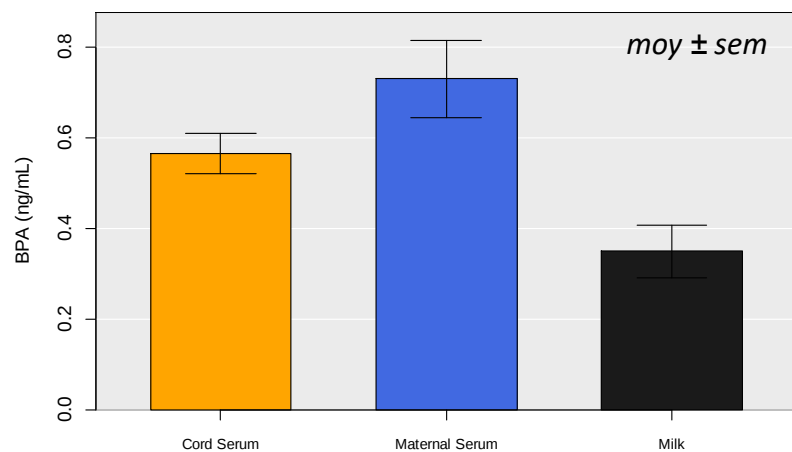
Cord serum



Cord serum

Mat. serum

Milk

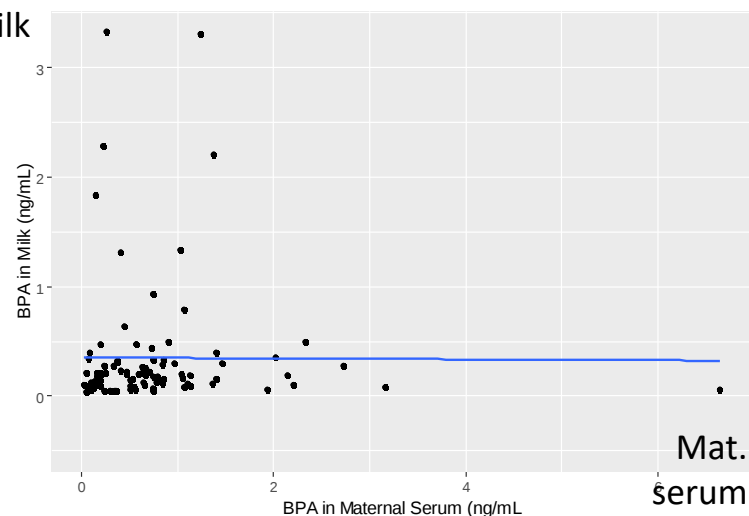


Cord serum

Mat. serum

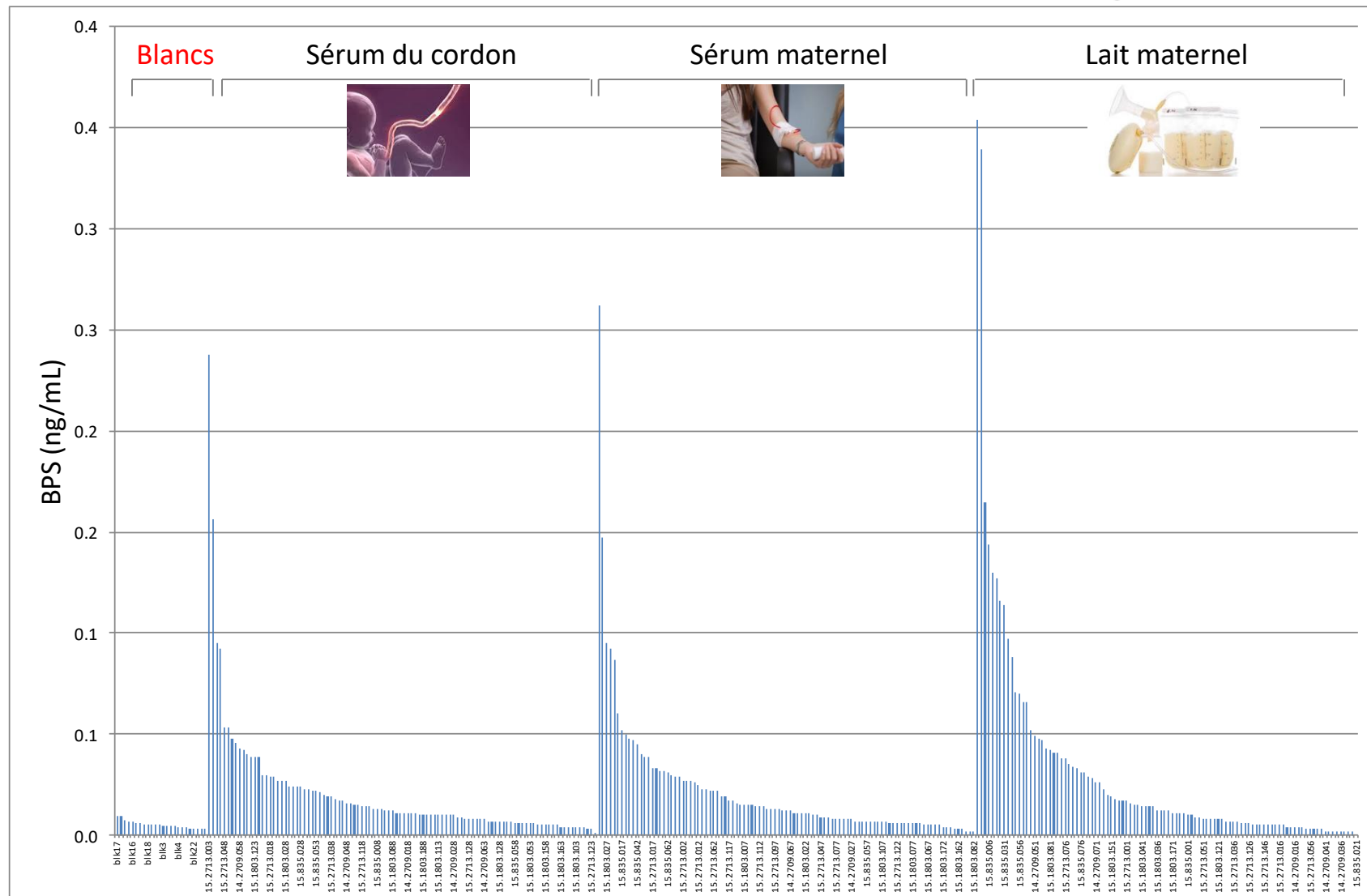
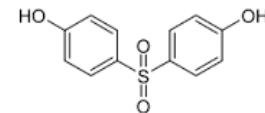
Milk

Milk

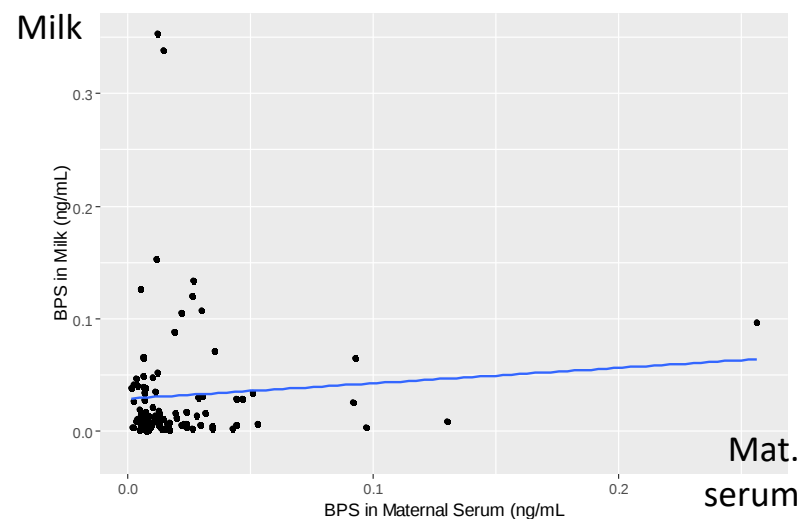
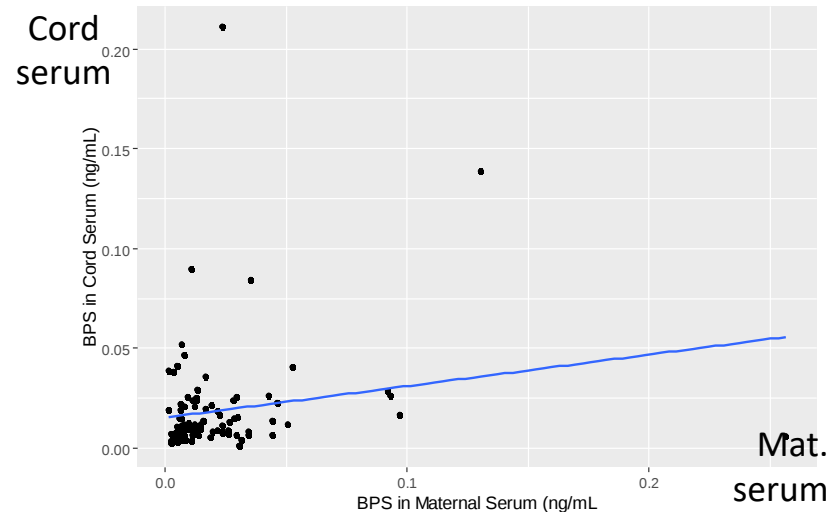
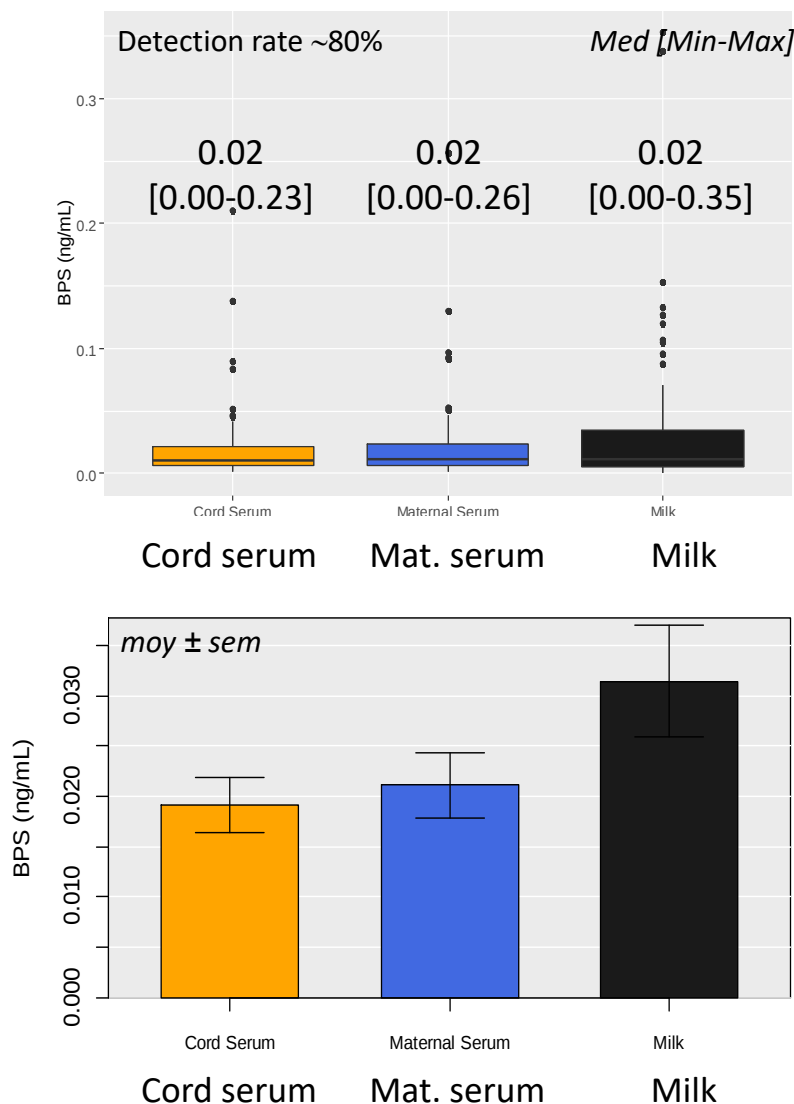
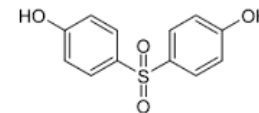


Mat. serum

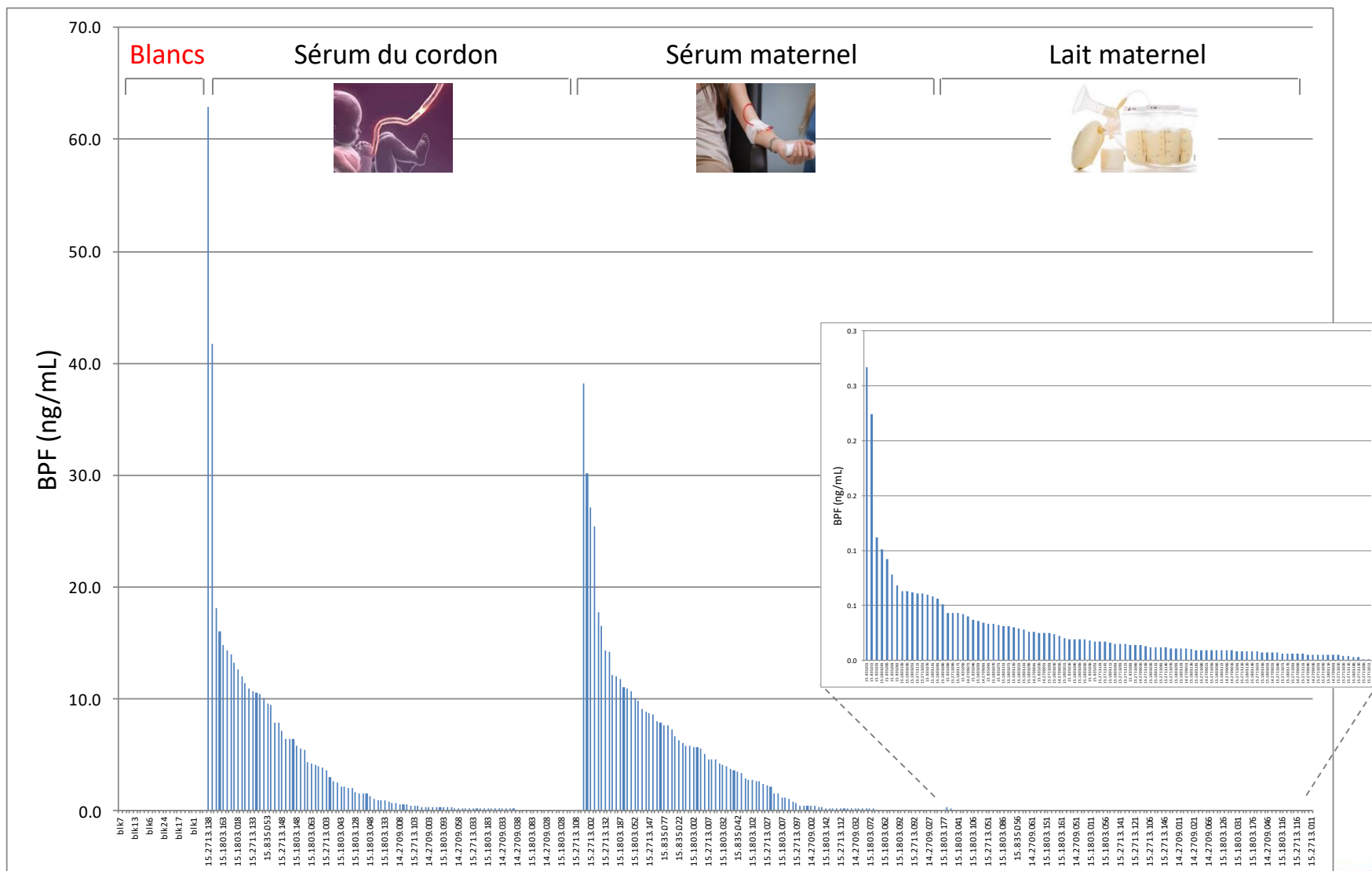
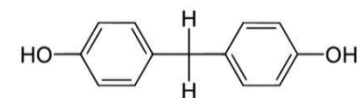
Aperçu global des niveaux de concentration observés en BPS



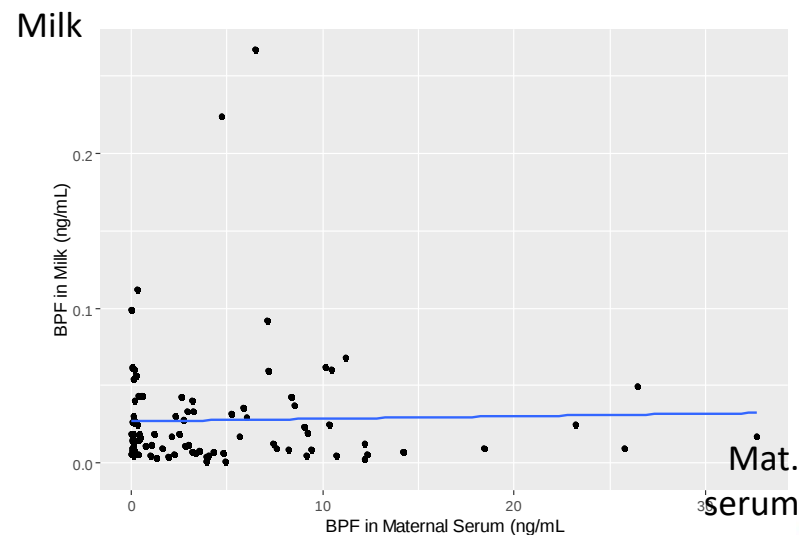
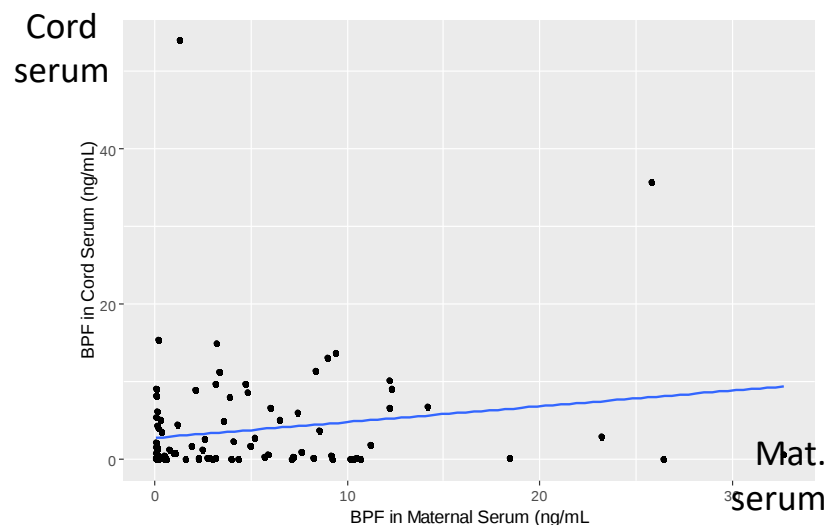
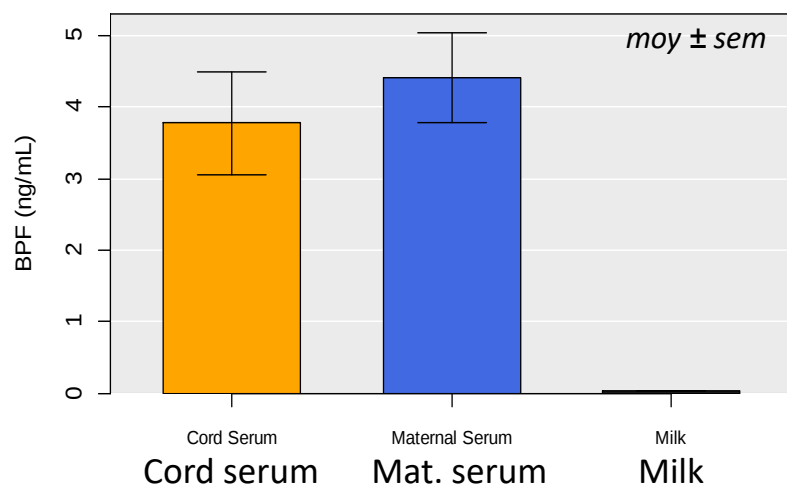
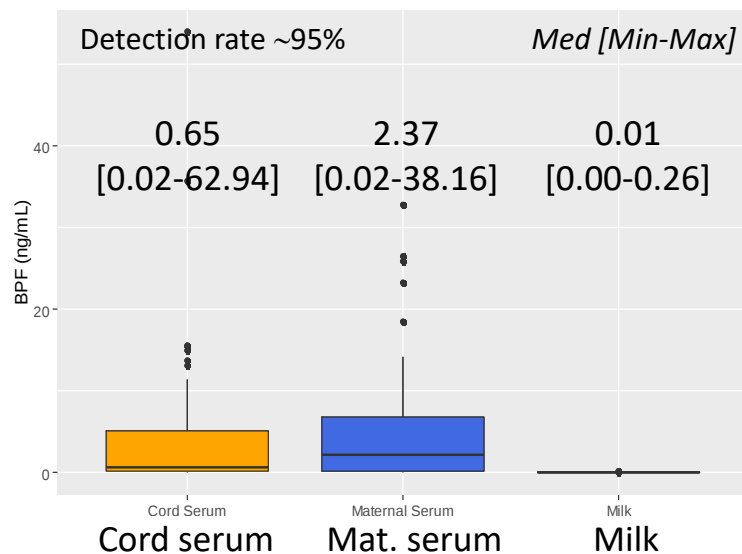
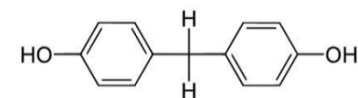
Aperçu global des niveaux de concentration observés en BPS



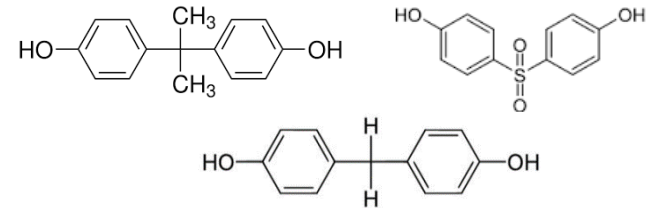
Aperçu global des niveaux de concentration observés en BPF



Aperçu global des niveaux de concentration observés en **BPF**



- Premières données Françaises concernant les niveaux de BPA et substituts dans 3 matrices biologiques
- Niveaux d'exposition observés en BPS < BPA < BPF
- Déterminants des niveaux d'exposition observés restent à caractériser (notamment pour BPF)
- Effet levier du projet au plan national (programme de biosurveillance – cohorte ESTEBAN - SpF) et au plan EU (projet HBM4EU – organisation d'essais interlaboratoires BPA/S/F)



science and policy
for a healthy future

Call: H2020-SC1-2016-RTD
"Human Biomonitoring for EU"
28 countries, >100 partners, 50 M€

De nouvelles données concernant le métabolisme du BPS et du BADGE

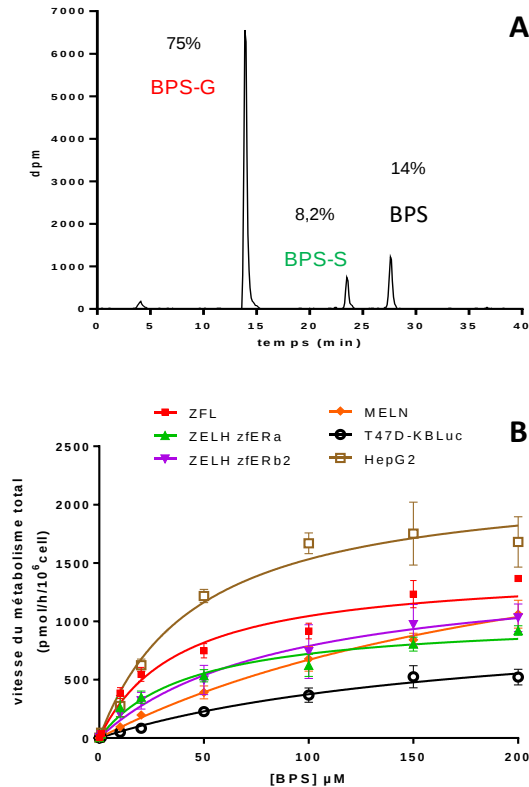


Figure 5 : A) Radio-chromatogramme caractéristique du métabolisme du BPS sur lignées cellulaires humaines (ici : HepaRG, 24h, 150 μM BPS) montrant les deux métabolites majoritaires : le BPS glucuronide (BPS-G) et le BPS sulfate (BPS-S). B) Cinétique de métabolisation (globale : tous métabolites confondus) du BPS sur lignées cellulaires : HepG2, modèle hépatique, est une lignée métaboliquement compétente (Le Fol et al. 2016).

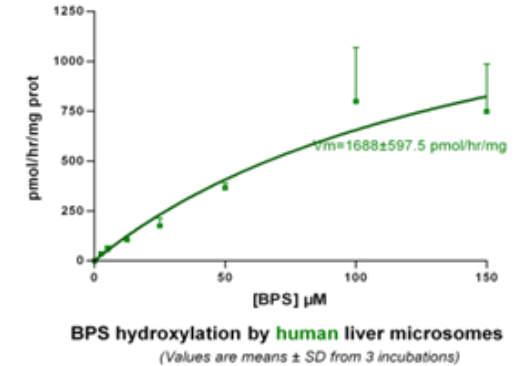
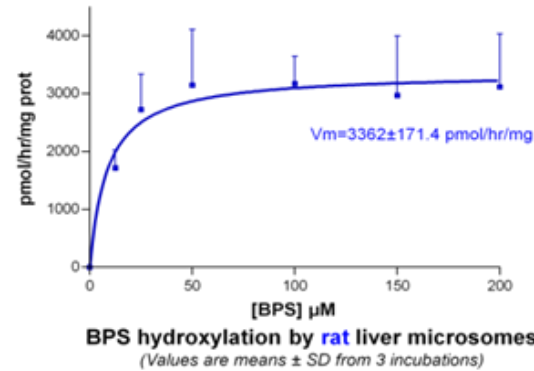


Figure 6. Cinétique de formation du métabolite hydroxylé du BPS en fonction de la concentration de [3H]-BPS incubée avec des fractions microsomales hépatiques de rat (gauche) ou d'homme (centre)

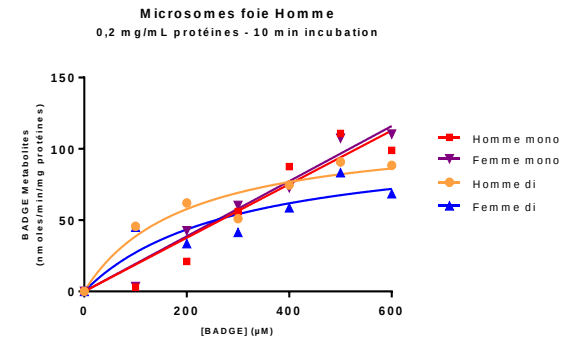
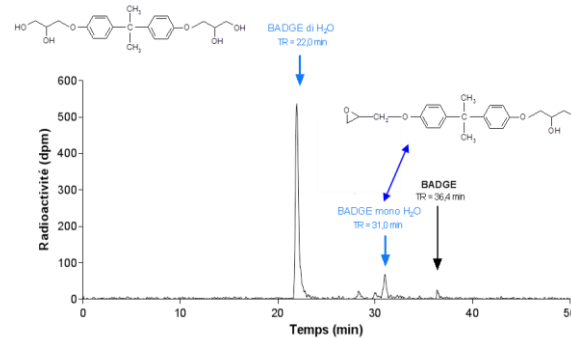


Fig. 7 et 8. A gauche, radio-HPLC d'une incubation de [14C]-BADGE (100 μM , 4h) avec des micro-tranches de foie de rat : formation du BADGE mono-H₂O et du BADGE di-H₂O; A droite, formation de ces métabolites lors d'incubations réalisées avec des fractions microsomales hépatiques humaines.

De nouvelles données concernant l'impact du BPS et du BADGE au niveau du métabolome hépatique et testiculaire

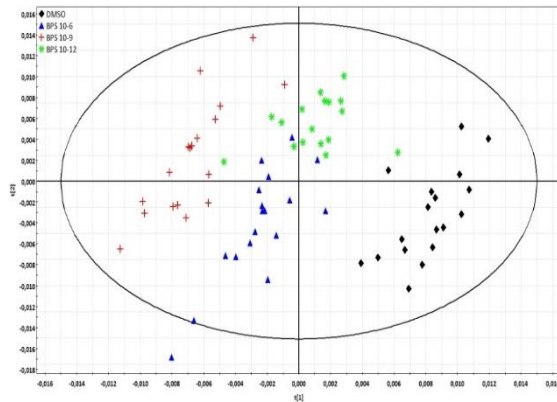


Fig. 10. Analyse discriminante (PLS-DA) après analyse RMN du métabolome de cellules HepG2 exposées 24h à des concentrations de 0 (noir, contrôle), 10-6M (bleu), 10-9M (rouge) ou 10-12M (vert) de bisphénol S. Le modèle est valide et permet de discriminer l'ensemble des concentrations d'exposition des hépatocytes ($R^2 = 57.8\%$ et $Q^2 = 0.454$).

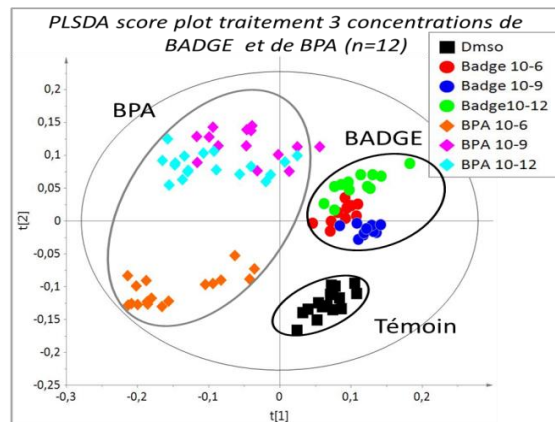
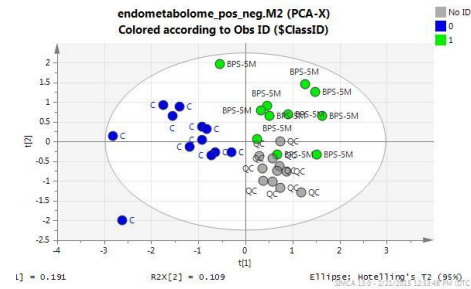
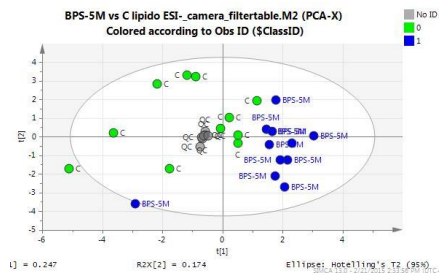


Fig. 11. Analyse discriminante (PLS-DA) après analyse RMN du métabolome de cellules HepG2 exposées 24h à différentes concentrations de bisphénol A (BPA) ou de BADGE. En noir, les contrôles DMSO. Le modèle est robuste et valide ($R^2Y : 50\%$; $Q^2 : 0.40$). Un effet dose est également observé dans le cas du BPA.



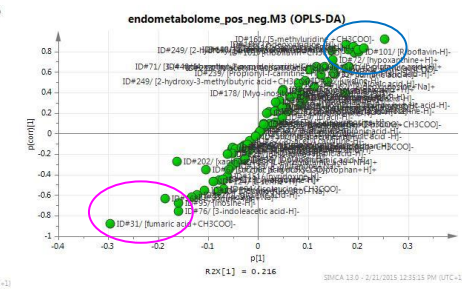
Model combining ESI+ and ESI-

Good discrimination between control and treated samples



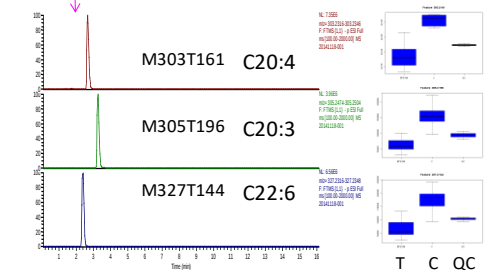
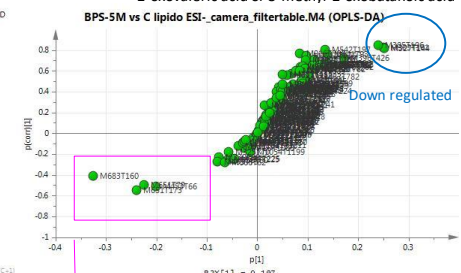
Good discrimination between control and treated samples on the basis of the ESI- profiles, no significant discrimination from the ESI+ profiles

Some fatty acids identified as putative markers



Treated samples – down regulated metabolites:

- O-acetylarnitine ↓
- Propionyl-L-carnitine ↓
- 5-methyluridine ↓
- 4-methyl-2-oxovaleric acid ↓
- Riboflavin ↓
- 2-deoxyuridine ↓
- 2-hydroxy-3-methylbutyric acid ↓
- 2-oxovaleric acid or 3-methyl-2-oxobutanoic acid ↓



CONTRIBUTION À L'ÉVALUATION DE L'EXPOSITION DE L'HOMME AUX SUBSTITUTS ET DÉRIVÉS DU BISPHENOL A ET À LA CARACTÉRISATION DU DANGER ASSOCIÉ

ANR-13-CESA-0012-01
 NEWPLAST



Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA)

USC INRA 1329, Oniris, LUNAM Université

BP 50707, 44307 Nantes Cedex 3, France - www.laberca.org

Dr. Jean-Philippe Antignac

Yoann Deceuninck, Emmanuelle
 Bichon, Ronan Cariou, Bruno Le Bizec

